

猫爪草中的脂肪酸类化合物

熊英, 茆美燕, 章常华, 罗永明, 邓可众*

(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 为了解小毛茛(*Ranunculus ternatus* Thunb.)的化学成分, 采用色谱技术从其干燥块根猫爪草中分离纯化得到 5 个脂肪酸类化合物, 经波谱分析, 他们的结构分别鉴定为(*R*)-3-hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid (**1**)、十六烷酸 (**2**)、棕榈酸乙酯 (**3**)、己二酸 (**4**)和硬脂酸 (**5**)。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 这些成分对耐药结核分枝杆菌(耐 INH+RFP)有一定的体外抑制活性。

关键词: 猫爪草; 脂肪酸; 耐多药结核

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.014

Fatty Acids from *Ranunculus ternatus*

XIONG Ying, CHANG Mei-yan, ZHANG Chang-hua, LUO Yong-ming, DENG Ke-zhong*

(College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: The aim is to investigate the chemical constituents of *Ranunculus ternatus* Thunb. Five fatty acids are isolated from tubers of *R. ternatus*. On the basis of spectral data, they are identified as (*R*)-3-hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid (**1**), palmitic acid (**2**), ethyl palmitate (**3**), adipic acid (**4**) and stearic acid (**5**). Compound **1** is a new compound. All compounds have a certain inhibitory activities *in vitro* against multidrug-resistant strain.

Key words: *Ranunculus ternatus*; Fatty acid; Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

猫爪草为毛茛属植物小毛茛(*Ranunculus ternatus* Thunb.)的干燥块根^[1], 是 20 世纪 50 年代河南省信阳地区新发现的一种草药, 具散结、消肿之效, 临床上用于治疗颈淋巴结结核、肺结核、腮腺炎, 疗效确切^[2-3]。目前该药材在河南信阳及安徽天长地区已大量栽培种植, 此外, 浙江、江苏、江西、广西、湖北、湖南等地亦有野生分布。本课题组前期研究报道了猫爪草中含有内酯、黄酮、二苯甲酮等多种类型的化学成分^[4-6], 本文报道猫爪草中 5 个脂肪酸类成分的提取分离、结构鉴定及其体外抗耐药结核分枝杆菌的活性, 为猫爪草的资源利用和开发提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小毛茛(*Ranunculus ternatus* Thunb.)干燥块根猫爪草于 2011 年 6 月购自江西樟树药材市场, 由江西中医药大学邓可众副教授鉴定。ODS-A 色谱柱 (250 mm×20 mm, 5 μm, 日本 YMC 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 100~200 目、200~300 目均为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham 公司), XAD-16 大孔吸附树脂(美国罗门哈斯公司), 制备 HPLC 用甲醇为色谱纯, 其余所用试剂均为分析纯。临床分离耐药结核分枝杆菌(耐

收稿日期: 2015-08-28 接受日期: 2015-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060334)资助

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (Grant No. 81060334).

作者简介: 熊英, 女, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: jzxiongying@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dengkezhong@126.com

INH+RFP)由南昌市第三人民医院提供。

1.2 仪器

Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); Bio-Rad FTS 6000 傅里叶红外光谱仪(美国伯乐公司); LTQ Orbitrap Discovery 质谱仪(美国 Thermo 公司); WZZ-1 自动旋光仪(上海精科); LC3000 制备高效液相色谱仪(北京创新通恒公司)。

1.3 提取和分离

猫爪草 50 kg, 粉碎, 以 95%乙醇和 65%乙醇各回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液减压浓缩得浸膏约 8 kg。将浸膏加适量水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取 3~4 次, 回收溶剂分别得到石油醚萃取物 300 g, 乙酸乙酯萃取物 400 g, 正丁醇萃取物 1 kg。正丁醇萃取物用水溶解后经 XAD 16 大孔吸附树脂柱吸附, 依次用 30%、70%、95%乙醇洗脱, 其中 70%乙醇洗脱部分再经硅胶柱层析梯度洗脱(二氯甲烷-甲醇 10:1→0:1, V/V)和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(二氯甲烷-甲醇 1:1, V/V)分离, 再经制备液相色谱(甲醇-水 6:4, V/V)纯化得到化合物 **1** (98 mg)和 **4** (78 mg); 石油醚萃取部分经反复硅胶柱梯度洗脱(石油醚-乙酸乙酯 1:0→0:1)和 Sephadex LH-20 凝胶柱(二氯甲烷-甲醇 1:1)分离及制备薄层色谱纯化得到化合物 **2** (83 mg)、**3** (125 mg)和 **5** (103 mg)。

1.4 结构鉴定

(R)-3-Hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid (1) 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 247.1538 (计算值 247.1540, $[M + H]^+$), 分子式为 $C_{12}H_{22}O_5$; IR 光谱 3542, 3455, 2924, 2853, 1736, 1685, 1469, 1437, 1220, 869, 545 cm^{-1} 显示分子中具有羟基(3542, 3455 cm^{-1})、酯羰基(1736 cm^{-1})和羧基

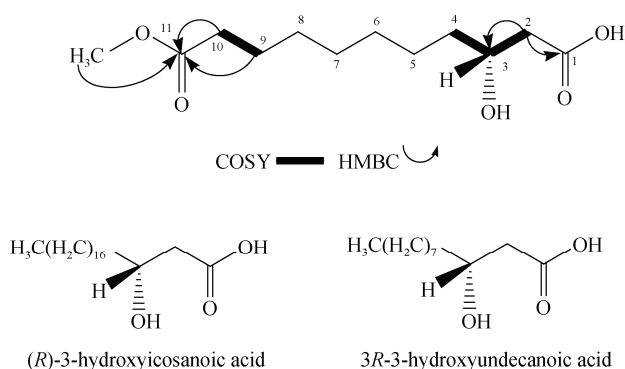


图1 化合物 **1** 的结构及主要 COSY 和 HMBC (H→C) 相关

Fig. 1 Structure and key COSY and HMBC correlations of compound **1**

(1685 cm^{-1})。

1H NMR (400 MHz, CD_3OD)谱中, δ_H 1.35~2.46 处有多个饱和质子信号, 此外, 还有 1 个次甲基质子 δ_H 3.99 (1H, m)和 1 个甲氧基信号 δ_H 3.67 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR 结合 DEPT 及 HSQC 显示化合物共有 12 个碳原子, 2 个羰基(δ_C 174.5, 174.8), 1 个 CH (δ_C 68.0), 1 个 OCH_3 (δ_C 50.7), 8 个 CH_2 (δ_C 42.0, 36.7, 25.2, 29.1, 28.9, 28.8, 24.7, 33.5); 在 HMBC 谱中, δ_C 174.8 (C-11)与 δ_H 2.34 (H-10)、 δ_H 1.62 (H-9) 以及 δ_H 3.67 (OCH_3)相关, 表明该化合物为脂肪酸甲酯类成分, δ_H 2.43 (H-2)与 δ_C 174.5 (C-1)和 δ_C 68.0 (C-3)相关, 确定羟基连在 3 位, 且比旋光度为 $[\alpha]_D^{25} -9.2^\circ$ (c 0.23, $CHCl_3$)与 *(R)*-3-hydroxyicosanoic acid^[7] 和 *3R*-3-hydroxyundecanoic acid^[8] 在相同溶剂、相似温度下比旋光方向均为左旋, 推测 3 位手性碳原子为 *R* 构型, 根据螺旋理论^[9]及 Brewster 模型^[10], 由测得的左旋方向同样推测手性碳构型为 *R*。因此, 鉴定化合物 **1** 为 *(R)*-3-hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid。结合 1H - 1H COSY 归属, 其波谱数据见表 1。

十六烷酸 (2) 白色颗粒状固体; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2),

表1 化合物 **1** 的核磁数据(CD_3OD , 400 MHz)

Table 1 NMR data of compound **1** (CD_3OD , 100 MHz)

位置 Position	δ_H	δ_C (DEPT)	位置 Position	δ_H	δ_C (DEPT)
1		174.5 (C)	7	1.35 (2H, br.s)	28.9 (CH_2)
2	2.46 (1H, dd, 15.2, 4.8)	42.0 (CH_2)	8	1.35 (2H, br.s)	28.8 (CH_2)
	2.38 (1H, dd, 15.2, 8.0)		9	1.62 (2H, m, H-9)	24.7 (CH_2)
3	3.99 (1H, m)	68.0 (CH)	10	2.34(2H, t, 7.6)	33.5 (CH_2)
4	1.49 (2H, m)	36.7 (CH_2)	11		174.8 (C)
5	1.35 (2H, br.s)	25.2 (CH_2)	OCH_3	3.67 (3H, s)	50.7(CH_3)
6	1.35 (2H, br.s.)	29.1 (CH_2)			

1.63 (2H, m, H-3), 1.23~1.29 (24H, m, H-4~15), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 178.9 (C-1), 33.9 (C-2), 31.9 (C-14), 29.7~29.1 (C-4~13), 24.7 (C-3), 22.7 (C-15), 14.6 (C-16)。光谱数据与文献[11]报道基本一致。

棕榈酸乙酯 (3) 白色颗粒状固体; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.10 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-17), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 1.59 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-3), 1.23 (27H, m, H-4~15, H-18), 0.85 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 173.7 (C-1), 60.1 (C-17), 34.4 (C-2), 31.9 (C-14), 29.7~29.1 (C-4~13), 25.0 (C-3), 22.7 (C-15), 14.2 (CH_3), 14.1 (CH_3)。光谱数据与文献[12]报道基本一致。

己二酸 (4) 白色固体; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.36 (4H, m, H-2,5), 1.65 (4H, m, H-3, 4)。上述波谱数据与文献[11]报道一致。

硬脂酸 (5) 白色粉末; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.35 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 1.63 (2H, m, H-3), 1.26 (28H, m, H-4~17), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 179.0 (C-1), 34.0 (C-2), 31.9 (C-16), 29.3 (C-4~15), 22.5 (C-3), 22.7 (C-17), 14.4 (C-18)。光谱波谱数据与文献[13]报道基本一致。

1.5 抗耐药结核分枝杆菌活性

采用绝对浓度法^[14]测定化合物对耐药菌株(耐异烟肼和利福平, INH+RFP)的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC), 同时制备不含任何药物的培养基(空白对照)和单含异烟肼 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 及单含利福平 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 培养基进行对照, 以链霉素(SM)和乙胺丁醇(EMB)为阳性对照, 浓度分别为 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 结果表明, 化合物 **1**、**3** 的 MIC 为 1 mg mL^{-1} , 化合物 **2**、**4**、**5** 的 MIC 为 2 mg mL^{-1} , 均具有一定抗耐药结核分枝杆菌的活性。

2 结果和讨论

采用硅胶、Sephadex LH-20 以及制备 HPLC、TLC 等多种色谱技术从猫爪草中分离纯化得到 5 个脂肪酸类成分, 根据波谱特征鉴定结构分别为 3-hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid (**1**)、十六烷酸 (**2**)、棕榈酸乙酯 (**3**)、己二酸 (**4**) 和硬脂酸

(**5**), 其中, 化合物 **1** 为新化合物; 体外药敏试验表明, 5 个脂肪酸类化合物与阳性对照相比, 对耐多药结核分枝杆菌(耐 INH+RFP)具有一定的抑制作用, 但抑菌浓度较高, 脂肪酸及其衍生物是天然、高效食品抑菌剂的重要来源如蔗糖脂肪酸酯^[15], 目前, 除小毛茛内酯^[16]外, 亦有报道有机酸类为猫爪草的抗结核活性成分^[17], 中药中常多种类型成分共同发挥临床疗效, 猫爪草中各类活性成分的相互作用还有待后续研究进行深入探讨。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 319-320.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 319-320.
- [2] BAI D. Clinical effects of Maozhaccao capsule as adjunctive therapy for cavitary pulmonary tuberculosis [J]. China Prac Med, 2015, 10(32): 171-172.
白迪. 猫爪草胶囊辅助治疗空洞型肺结核患者临床效果分析 [J]. 中国实用医药, 2015, 10(32): 171-172. doi: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2015.32.124.
- [3] WANG L, WANG K J, LI S J, et al. Clinical study on Maozhaccao capsules in treatment of tuberculosis [J]. Modern J Integr Trad Chin West Med, 2015, 24(18): 1948-1950. doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2015.18.004.
王玲, 王开金, 李升锦, 等. 猫爪草胶囊治疗肺结核的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(18): 1948-1950. doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2015.18.004.
- [4] XIONG Y, DENG K Z, GUO Y Q, et al. Studies on chemical constituents of flavonoids and glycosides in *Ranunculus ternatus* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2008, 39(10): 1449-1452. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2008.10.003.
熊英, 邓可众, 郭远强, 等. 猫爪草中黄酮类与苷类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1449-1452. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2008.10.003.
- [5] XIONG Y, DENG K Z, GAO W Y, et al. A novel alkenoic acid ester and a new benzophenone from *Ranunculus ternatus* [J]. Chin Chem Lett, 2007, 18(11): 1364-1366. doi: 10.1016/j.ccllet.2007.09.017.
- [6] XIONG Y, DENG K Z, GAO W Y, et al. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus* [J]. Chin J Chin Mat Med, 2008, 33(8): 909-911. doi: 10.3321/j.issn:1001-5302.2008.08.011.
熊英, 邓可众, 高文远, 等. 中药猫爪草化学成分的研究 [J]. 中国

- 中药杂志, 2008, 33(8): 909-911. doi:10.3321/j.issn:1001-5302.2008.08.011.
- [7] MATSUO Y, ISHIDA R, MATSUMOTO T, et al. Yendolipin, a novel lipobetaine with an inhibitory activity toward morphogenesis in a foliaceous green alga *Monostroma oxyspermum* [J]. Tetrahedron, 1997, 53(3): 869-876. doi: 10.1016/S0040-4020(96)01007-1.
- [8] ELLIOTT J D, STEELE J, JOHNSON W S. Asymmetric synthesis via acetal templates: 12. Highly diastereoselective coupling reactions with a ketene acetal, an efficient, asymmetric synthesis of *R*-(+)- α -lipoic acid [J]. Tetrah Lett, 1985, 26(21): 2535-2538. doi: 10.1016/S0040-4039(00)98830-0.
- [9] YIN Y Y, LIU C Y. The predictoin of the absolute configuration of aliphatic compound [J]. J Grad School Chin Acad Sci, 2001, 18(2): 160-166. doi: 10.3969/j.issn.1002-1175.2001.02.013.
- 尹玉英, 刘春蕴. 根据螺旋理论推断脂肪族化合物的绝对构型 [J]. 中国科学院研究生院学报, 2001, 18(2): 160-166. doi: 10.3969/j.issn.1002-1175.2001.02.013.
- [10] SU G F, JIANG X M. Opticities of some organic compounds and their group's polarizabilities [J]. J Guangxi Norm Univ (Nat Sci), 1996, 14(4): 54-60.
- 苏桂发, 蒋先明. 含一、二个手性中心的有机物的旋光性与基团的极化度 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1996, 14(4): 54-60.
- [11] JI C, ZHANG M W, ZHANG S J, et al. Chemical constituents of *Athyrium multidentatum* [J]. J Qiqihar Univ, 2013, 29(1): 76-78.
- 冀承, 张美薇, 张树军, 等. 猴腿蹄盖蕨化学成分研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报, 2013, 29(1): 76-78.
- [12] TIAN J K, WU L M, WANG A W, et al. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus* [J]. Chin Pharm J, 2004, 40(9): 661-662.
- 田景奎, 吴丽敏, 王爱武, 等. 猫爪草化学成分的研究 I [J]. 中国药学杂志, 2004, 40(9): 661-662. doi: 10.3321/j.issn:1001-2494.2004.09.008.
- [13] CAI L N, WANG H S, CAO H X, et al. The constituents from the rhizoma of *Alisma orientalis* (Sam) Juzep [J]. Nat Prod Res Dev, 1996, 8(1): 5-9.
- 蔡立宁, 王红姝, 曹红兴, 等. 泽泻化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(1): 5-9.
- [14] XU S Y. Pharmacology Experiment Methodology [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 171-172.
- 许叔云. 药理实验方法学 [M]. 第3版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 171-172.
- [15] ZHANG X, YANG M, SONG F, et al. Antimicrobial activity of selected fatty acids and their derivatives [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci), 2013, 39(2): 155-160. doi:10.3785/j.issn.1008-9209.2012.11.066.
- 张希, 杨明, 宋飞, 等. 脂肪酸及其衍生物的抑菌活性 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(2): 155-160. doi: 10.3785/j.issn.1008-9209.2012.11.066.
- [16] JI X Y, LI S Y, MENG S. Synthesis and antimycobacterial activity of ternatolide [J]. J Chin Pharm Sci, 2012, 21(3): 265-268.
- [17] CHI Y M, YANG Y Q, YU S. Effect and composition of organic acid of radix *Ranunculus ternate* [J]. J Nanjing Trad Chin Mat Univ, 2007, 23(6): 365-367. doi: 10.3969/j.issn.1000-5005.2007.06.009.
- 池玉梅, 杨毅琴, 于生. 中药材猫爪草有机酸部位药效及组成的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(6): 365-367. doi: 10.3969/j.issn.1000-5005.2007.06.009.