

## 流苏子根中化学成分分离鉴定和抗菌活性研究

白路遥<sup>1</sup>, 杨雪飞<sup>2</sup>, 鲁春华<sup>1\*</sup>, 沈月毛<sup>1</sup>

(1. 山东大学药学院天然产物生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012;

2. 中国科学院昆明植物研究所植物资源与生物技术研究室, 云南 昆明 650201)

**摘要:** **目的** 系统开展流苏子 [*Coptosapelta diffusa* (Champ. ex Benth.) Steenis] 根中化学成分的分离、鉴定和抗菌活性测试。**方法** 利用硅胶、Sephadex LH-20 等柱色谱方法进行分离、纯化, 根据波谱数据鉴定化合物的结构, 通过纸片扩散法进行抗菌活性测试。**结果** 从流苏子根中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为拉帕醇(lapachol, **1**)、hydroxyhydrolapachol (**2**)、dehydro- $\alpha$ -lapachone (**3**)、 $\alpha$ -lapachone (**4**)、rhinacantin A (**5**)、 $\beta$ -lapachone(**6**)、2-carbomethoxyanthraquinone (**7**)、7-hydroxy-2-methylanthraquinone (**8**)、isoscopoletin (**9**)、alixialactone (**10**)、(3S)-3-(hydroxymethyl)-3H-isobenzofuran-1-one (**11**) 和 (7'S, 8S, 8'R)-4, 4'-dihydroxy-3, 3', 5, 5'-tetramethoxy-7, 9-epoxylignan-9'-ol-7-one (**12**)。化合物 **1~4** 和 **6** 对测试病原菌株表现出较好的抗菌作用。**结论** 化合物 **1~6** 和 **10~12** 均为首次从该种植物中分离得到; 流苏子根中拉帕醇的含量为 3.56 g/kg(干重), 可作为拉帕醇的原料来源; 该研究为流苏子根抗菌消炎的民间药用价值提供了科学依据。

**关键词:** 流苏子根; 化学成分; 拉帕醇; 抗菌活性; 纸片扩散法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2023)05-0059-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.05.012

### Studies on the Isolation and Identification of Chemical Components from *Coptosapelta diffusa* Roots and Their Antimicrobial Activities

BAI Luyao<sup>1</sup>, YANG Xuefei<sup>2</sup>, LU Chunhua<sup>1</sup>, SHEN Yuemao<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), Shandong University,

Jinan 250012, China; 2. Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the chemical constituents of *Coptosapelta diffusa* roots and measure their antimicrobial activities. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified using silica gel, Sephadex LH-20 column chromatographies. Their structures were identified based on spectral analysis, and the antimicrobial activity was carried out by the paper diffusion method. **Results** 12 compounds were identified as lapachol (**1**), hydroxyhydrolapachol (**2**), dehydro- $\alpha$ -lapachone (**3**),  $\alpha$ -lapachone (**4**), rhinacantin A (**5**),  $\beta$ -lapachone (**6**), 2-carbomethoxyanthraquinone (**7**), 7-hydroxy-2-methylanthraquinone (**8**), isoscopoletin (**9**), alixialactone (**10**), (3S)-3-(hydroxymethyl)-3H-isobenzofuran-1-one (**11**), and (7'S, 8S, 8'R)-4, 4'-dihydroxy-3, 3', 5, 5'-tetramethoxy-7', 9-epoxylignan-9'-ol-7-one (**12**). Compounds **1-4** and **6** showed good antimicrobial activity against the tested strains. **Conclusion** Compounds **4-6** and **10-12** were isolated from this plant for the first time. Lapachol was identified as the main constituent of *C. diffusa* roots with the content of 3.56 g/kg (dry weight), indicating that *C. diffusa* roots could serve as a source of lapachol. This study provided a scientific basis for the folk antimicrobial and anti-inflammatory medicinal function of *C. diffusa* roots.

**KEY WORDS:** *Coptosapelta diffusa* (Champ. ex Benth.) Steenis; chemical constituents; lapachol; antimicrobial activity; paper diffusion method

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(22377067, 22177062); 教育部创新滚动支持项目(IRT\_17R68); 山东大学微生物技术国家重点实验室创新研究群体基金(WZCX2021-03)

**作者简介:** 白路遥(1997-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: 202136810@mail.sdu.edu.cn

\* **通信作者:** 鲁春华(1975-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: ahua0966@sdu.edu.cn

流苏子 [*Coptosapelta diffusa* (Champ.ex Benth.) Steenis] 是茜草科流苏子属植物, 主要分布于中国长江流域及其以南各地和日本的温带地区<sup>[1]</sup>。《中华本草》记载其根为药用部位。将其根部加水煮沸后清洗, 或直接将根研末调涂患处可治疗皮炎、湿疹瘙痒、荨麻疹、风湿痹痛、疮疥等皮肤病。作为一种传统中草药, 其化学成分和药理活性研究较少。目前, 从该植物中已报道的化学成分共约 50 个<sup>[2-4]</sup>, 包括蒽醌、萘醌、香豆素和萜类等。本课题组前期已从其地上部分分离得到结构新颖的环烯醚萜苷和愈创木烯型倍半萜等化合物<sup>[3]</sup>。

为进一步挖掘流苏子中的化学成分, 本实验对其根部的化学成分进行系统分离, 共鉴定了 12 个化合物(图 1), 包括 6 个萘醌 lapachol (**1**)、hydroxyhydro-lapachol (**2**)、dehydro- $\alpha$ -lapachone (**3**)、 $\alpha$ -lapachone (**4**)、rhinacantins A (**5**) 和  $\beta$ -lapachone (**6**), 2 个蒽醌 2-carbomethoxyanthraquinone (**7**) 和 7-hydroxy-2-methylanthraquinone (**8**), 1 个香豆素 isoscopoletin (**9**), 1 个环烯醚萜 alyxialactone (**10**), 1 个芳香化合物 (3S)-3-(hydroxymethyl)-3H-isobenzofuran-1-one (**11**) 和 1 个木脂素 (7'S, 8S, 8'R)-4, 4'-dihydroxy-3, 3', 5, 5'-tetramethoxy-7, 9-epoxylignan-9'-ol-7-one (**12**)。通过纸片扩散法筛选了化合物 **1**~**12** 的抗菌活性, 并利用微量稀释法进行了最小抑制浓度测定。此外, 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对主要成分拉帕醇 (lapachol, **1**) 进行了含量测定。

## 1 仪器与材料

Bruker Avance 400 MHz 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 分析型高效液相色谱仪 Thermo Scientific UltiMate 3000 (Hypersil GOLDTM, 5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm); 旋转蒸发器 R-100 (BUCHI Labortechnik AG); 柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); 硅胶薄层层析板 (烟台江友硅胶开发有限公司); 葡聚糖凝胶 (25~100  $\mu$ m, GE Healthcare Bio-Sciences AB); 氘代试剂 (上海新铂化学有限公司); 石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇 (分析纯, 天津恒兴化学制造有限公司)。酵母提取物 (OXOID), 胰蛋白胨 (OXOID), 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司)。

流苏子根于 2020 年 10 月采集于广西防城港市

上思县南屏乡汪乐村向十万大山森林公园方向平龙山木材检查站 (北纬 21°51'47.37", 东经 107°53'0.85", 509 米处)。由中国科学院昆明植物研究所杨雪飞、杨锦超鉴定为流苏子 [*Coptosapelta diffusa* (Champ.ex Benth.) Steenis], 标本号为 yangxf0209, 收藏于中国科学院昆明植物研究所标本馆。抗菌实验所用病原指示菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup>155)、变形杆菌 (*Proteus bacillus vulgaris* CPCC160013) 和白色念珠菌 (*Candida albicans* 5314) 菌株均保存于山东大学天然产物化学生物学教育部重点实验室。

## 2 提取与分离

新鲜流苏子根剪成小段, 自然风干称重 (600.0 g)。用 95% 乙醇浸泡 1 周, 超声辅助提取 30 min, 共提取 3 次, 合并乙醇提取液, 40℃ 减压浓缩得提取物浸膏 (40.0 g)。该提取物首先经正相硅胶柱层析 (250.0 g), 石油醚-乙酸乙酯 (100:1~10:1, v/v) 梯度洗脱, 根据 TLC 检测 (紫外和磷钼酸显色) 结果分为 25 个组分 (Fr.A~Y)。

Fr.J (2.5 g) 经正相硅胶柱层析 (80.0 g), 石油醚-乙酸乙酯 (200:1~100:1) 梯度洗脱, 得到化合物 **1** (2.2 g)。Fr.K (104.9 mg) 经正相硅胶柱层析 (10.0 g), 石油醚-乙酸乙酯 (200:1~100:1) 梯度洗脱, 得到组分 Fr.K1~K3。Fr.K1 (36.8 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (1:3) 洗脱, 得到化合物 **3** (10.2 mg)。Fr.K2 (60.1 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (1:3) 洗脱, 得化合物 **7** (4.9 mg)。Fr.L (88.1 mg) 经葡聚糖凝胶柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (1:3) 洗脱, 得化合物 **4** (5.1 mg)。Fr.Q (25.8 mg) 经葡聚糖凝胶柱层析, MeOH 洗脱, 得化合物 **8** (1.7 mg)。Fr.R 经 Sephadex LH-20 柱层析, 甲醇洗脱, 得到 7 个组分 (Fr.R1~R7)。Fr.R2 (11.7 mg) 经正相硅胶柱层析 (2.5 g), 石油醚-乙酸乙酯 (30:1) 等度洗脱, 得到化合物 **6** (2.2 mg)。Fr.U (900.0 mg) 经 Sephadex LH-20 柱层析, MeOH 洗脱, 得到 19 个组分 (Fr.U1~U19)。Fr.U8 (270.0 mg) 经 Sephadex LH-20 柱层析, 甲醇洗脱合并后又经正相硅胶柱层析 (2.0 g), 二氯甲烷-甲醇 (500:1) 等度洗脱, 得到化合物 **2** (12.6 mg)、**5** (2.5 mg) 和 **11** (3.4 mg)。Fr.U13 (31.5 mg) 经正

相硅胶柱层析(2.0 g),二氯甲烷-甲醇(200:1)等度洗脱,得到化合物 **9**(9.9 mg)。Fr.W(0.6 g)经正相硅胶柱层析(12.0 g),石油醚-乙酸乙酯(15:1~1:2)梯度洗脱,得到 Fr.W1~W6。Fr.W2(106.5 mg)经 Sephadex

LH-20 柱层析,甲醇洗脱,得到化合物 **12**(2.2 mg)。Fr.W4(120.0 mg)经 Sephadex LH-20 柱层析,甲醇洗脱后又经正相硅胶柱层析(1.5 g),二氯甲烷-甲醇(100:1~50:1)梯度洗脱,得到化合物 **10**(7.8 mg)。

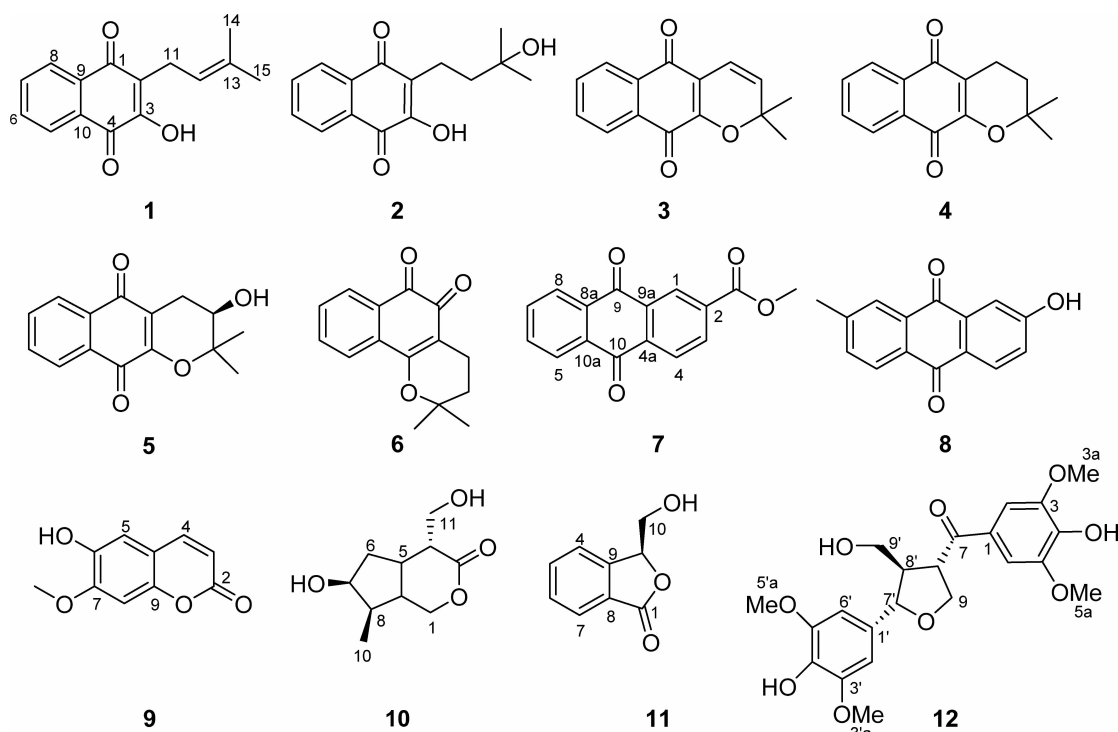


图1 化合物 1~12 的化学结构

### 3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色片状结晶,  $C_{15}H_{14}O_3$ 。 $^1H$  NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 8.11(1H, dd,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-8), 8.09(1H, dd,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-5), 7.74(1H, td,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-7), 7.67(1H, td,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-6), 7.30(1H, s, OH), 5.21(1H, m, H-12), 3.31(2H, d,  $J=7.3$  Hz, H-11), 1.79(3H, s,  $CH_3-14$ ), 1.68(3H, s,  $CH_3-15$ );  $^{13}C$  NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 184.5(C-1), 181.7(C-4), 152.7(C-3), 134.8(C-7), 133.8(C-13), 133.0(C-9), 132.8(C-6), 129.5(C-10), 126.8(C-8), 126.1(C-5), 123.5(C-2), 119.7(C-12), 25.7(C-15), 22.6(C-11), 17.9(C-14)。以上数据与文献[5]对比, 鉴定化合物为拉帕醇 lapachol。

化合物 **2**: 黄色粉末,  $C_{15}H_{16}O_4$ 。 $^1H$  NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 8.12(1H, dd,  $J=7.6, 1.5$  Hz, H-5), 8.08(1H, dd,  $J=7.6, 1.4$  Hz, H-8), 7.76(1H, td,  $J=7.6, 1.4$  Hz, H-6), 7.69(1H, td,  $J=7.6, 1.5$  Hz, H-7), 2.71(2H, t,  $J=6.6$  Hz, H-11), 1.70(2H, t,  $J=6.6$  Hz, H-12), 1.31

(6H, s,  $CH_3-14, CH_3-15$ );  $^{13}C$  NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 184.8(C-4), 181.3(C-1), 153.0(C-2), 134.9(C-6), 133.0(C-7), 129.5(C-9), 132.9(C-10), 126.8(C-5), 126.2(C-8), 124.7(C-3), 71.0(C-13), 41.6(C-12), 29.1(C-14, 15), 18.3(C-11)。以上数据与文献[6]对比, 鉴定化合物为 hydroxyhydrolapachol。

化合物 **3**: 黄色粉末,  $C_{15}H_{12}O_3$ 。 $^1H$  NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 8.10(2H, dd,  $J=7.0, 1.7$  Hz, H-5, 8), 7.71(1H, td,  $J=7.0, 1.7$  Hz, H-6), 7.68(1H, td,  $J=7.0, 1.7$  Hz, H-7), 6.66(1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-11), 5.73(1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-12), 1.56(6H, s,  $CH_3-14, 15$ );  $^{13}C$  NMR(100 MHz,  $CDCl_3$ ) $\delta$ : 181.9(C-1), 179.9(C-4), 152.5(C-3), 134.0(C-6), 133.2(C-7), 131.6(C-10), 131.5(C-9), 130.9(C-12), 126.3(C-5), 126.3(C-8), 117.9(C-2), 115.5(C-11), 80.5(C-13), 28.4(C-14, 15)。以上数据与文献[7]对比, 鉴定化合物为 dehydro- $\alpha$ -lapachone。

化合物 **4**: 黄色粉末,  $C_{15}H_{14}O_3$ 。 $^1H$  NMR(400

MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 8.09(1H, dd,  $J=6.6, 1.8$  Hz, H-8), 8.07(1H, dd,  $J=7.4, 1.7$  Hz, H-5), 7.68(1H, m, H-7), 7.66(1H, m, H-6), 2.63(2H, t,  $J=6.6$  Hz, C-11), 1.82(2H, t,  $J=6.6$  Hz, C-12), 1.44(6H, s, CH<sub>3</sub>-14, 15); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 184.4(C-1), 180.1(C-4), 154.7(C-3), 133.8(C-7), 132.8(C-6), 132.0(C-9), 131.2(C-10), 126.4(C-5), 126.0(C-8), 120.2(C-2), 78.2(C-13), 31.4(C-12), 26.5(C-14, 15), 16.8(C-11)。以上数据与文献[8]对比, 鉴定化合物为  $\alpha$ -lapachone。

化合物 5: 黄色粉末, C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 8.04(1H, m, H-5), 8.02(1H, m, H-8), 7.63(1H, m, H-6), 7.60(1H, m, H-7), 3.82(1H, m, H-12), 2.83(1H, m, H-12a), 2.65(1H, m, H-12b), 1.41(3H, s, CH<sub>3</sub>-14), 1.35(3H, s, CH<sub>3</sub>-15); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 184.8(C-1), 179.5(C-4), 153.8(C-3), 134.0(C-7), 133.2(C-6), 132.1(C-9), 131.2(C-10), 126.4(C-5), 126.0(C-8), 118.2(C-2), 80.2(C-13), 68.4(C-12), 25.4(C-11), 24.7(C-15), 21.7(C-14)。以上数据与文献[9]对比, 鉴定化合物为 rhinacantin A。

化合物 6: 黄色粉末, C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.91(1H, dd,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-8), 7.76(1H, dd,  $J=7.7, 1.3$  Hz, H-5), 7.63(1H, td,  $J=7.7, 1.4$  Hz, H-6), 7.48(1H, td,  $J=7.6, 1.3$  Hz, H-7), 2.44(2H, t,  $J=6.7$  Hz, C-11), 1.81(2H, t,  $J=6.6$  Hz, C-12), 1.40(6H, s, CH<sub>3</sub>-14, 15); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 179.9(C-1), 178.6(C-2), 162.1(C-4), 134.8(C-6), 132.7(C-10), 130.7(C-7), 130.2(C-9), 128.6(C-8), 124.1(C-5), 112.8(C-3), 79.3(C-13), 31.6(C-12), 26.8(C-14, 15), 16.2(C-11)。以上数据与文献[10]对比, 鉴定化合物为  $\beta$ -lapachone。

化合物 7: 黄色粉末, C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 8.95(1H, d,  $J=1.7$  Hz, H-1), 8.41(1H, dd,  $J=8.1, 1.7$  Hz, H-3), 8.39(1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-4), 8.36(1H, m, H-8), 8.35(1H, m, H-5), 7.84(1H, m, H-6), 7.83(1H, m, H-7), 4.02(3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 182.6(C-9), 182.3(C-10), 165.6(COO), 136.1(C-4a), 135.2(C-9a), 134.6(C-3), 134.5(C-6), 134.4(C-7), 133.6(C-2), 133.5(C-10a), 133.4(C-8a), 128.7(C-1), 127.6(C-4), 127.5

(C-8), 127.4(C-5), 52.8(OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[11]对比, 鉴定化合物为 2-carbomethoxyanthraquinone。

化合物 8: 黄色粉末, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ : 11.05(1H, s, OH), 8.09(1H, m, H-5), 8.07(1H, m, H-4), 7.97(1H, s, H-1), 7.71(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3), 7.50(1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-8), 7.24(1H, dd,  $J=8.6, 2.6$  Hz, H-6), 2.50(3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ : 183.3(C-9), 181.5(C-10), 163.5(C-7), 145.2(C-2), 135.7(C-3), 135.7(C-9a), 133.5(C-8a), 131.4(C-4a), 130.2(C-4), 127.3(C-1), 127.3(C-5), 125.7(C-10a), 122.0(C-6), 112.7(C-8), 21.8(CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[12]对比, 鉴定化合物为 7-hydroxy-2-methylanthraquinone。

化合物 9: 黄色粉末, C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ : 7.92(1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4), 7.22(1H, s, H-5), 6.79(1H, s, H-8), 6.22(1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3), 3.82(3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ : 161.2(C-2), 151.7(C-6), 150.0(C-9), 145.7(C-7), 144.9(C-4), 112.1(C-5), 110.9(C-10), 110.0(C-3), 103.2(C-8), 56.4(OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[13]对比, 鉴定化合物为 isoscooletin。

化合物 10: 白色粉末, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 4.39(1H, m, H-1a), 4.11(1H, m, H-7), 4.08(1H, m, H-1b), 3.80(1H, m, H-11a), 3.70(1H, m, H-11b), 2.56(1H, m, H-4), 2.55(1H, m, H-5), 2.22(1H, m, H-9), 2.16(1H, m, H-6a), 1.77(1H, m, H-8), 1.62(1H, m, H-6b), 1.05(3H, d,  $J=6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) $\delta$ : 176.0(C-3), 76.0(C-7), 69.5(C-1), 59.3(C-11), 46.3(C-4), 42.6(C-9), 42.2(C-8), 40.7(C-6), 35.4(C-5), 12.2(C-10)。以上数据与文献[14]对比, 鉴定化合物为 alyxialactone。

化合物 11: 黄色粉末, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 7.86(1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-4), 7.63(1H, m, H-5), 7.50(1H, t,  $J=7.6$  Hz, H-6), 7.45(1H, d,  $J=7.6$  Hz, H-7), 5.50(1H, m, H-3), 4.07(1H, dd,  $J=8.4, 3.4$  Hz, H-10a), 3.86(1H, dd,  $J=12.5, 5.6$  Hz, H-10b); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 170.4(C-1), 146.6(C-9), 134.3(C-5), 129.6(C-6), 126.5(C-8), 125.9(C-4), 122.1(C-7), 81.7(C-3), 64.0(C-10)。以

上数据与文献[15]对比,鉴定化合物为(3*S*)-3-(hydroxymethyl)-3*H*-isobenzofuran-1-one。

化合物 **12**: 白色粉末,  $C_{22}H_{26}O_9$ 。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ) $\delta$ : 7.40 (2H, s, H-2, H-6), 6.72 (2H, s, H-2', H-6'), 4.64 (1H, m, H-7'), 4.27 (1H, m, H-8), 4.22 (1H, m, H-9a), 4.19 (1H, m, H-9b), 3.92 (6H, s, H-3'a, H-5'a), 3.86 (6H, s, H-3a, H-5a), 3.67 (2H, m, H-9), 2.64 (1H, m, H-8');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ) $\delta$ : 198.9 (C-7), 147.8 (C-3), 147.8 (C-3'), 147.7 (C-5), 147.7 (C-5'), 141.3 (C-4), 141.3 (C-4'), 131.5 (C-1'), 127.3 (C-1), 106.3 (C-2), 106.3 (C-6), 103.8 (C-2'), 103.8 (C-6'), 84.0 (C-7'), 70.2 (C-9), 59.9 (C-9'), 55.5 (3'a, 5'a-OCH<sub>3</sub>), 55.5 (3a, 5a-OCH<sub>3</sub>), 53.4 (C-8')。以上数据与文献[16]对比,鉴定化合物为(7'*S*, 8*S*, 8'*R*)-4, 4'-dihydroxy-3, 3', 5, 5'-tetramethoxy-7', 9-epoxy lignan-9'-ol-7-one。

#### 4 抗菌活性筛选

4.1 纸片扩散法测抗菌活性 利用纸片扩散法<sup>[17]</sup>测定化合物 **1~12** 的抗菌活性。从-80 °C冰箱中取出保存于20%甘油管中的各指示菌,解冻后在LB平板上划线,37 °C培养10~12 h。挑取单克隆菌株分别接种于1 mL的LB液体培养基中,置于220 rpm, 37 °C摇床中培养过夜。取LB液体培养基将菌液稀释100倍,混匀后倒入灭菌的LB平板中,凝固后待用。用镊子将直径6 mm的圆形滤纸片夹起,加入2  $\mu$ L的化合物溶液(各化合物分别用甲醇溶解,浓度为20  $\mu$ g/ $\mu$ L),挥干溶剂后放置于含指示菌的LB平板上,倒置于37 °C的培养箱中培养,24 h后观察并记录抑菌圈有的有无及大小,结果见表1。

表1 抗菌结果(抑菌圈直径大小单位:mm;N:无抑菌圈)

化合物	耻垢分枝杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	变形杆菌
<b>1</b>	12	8	10	N
<b>2</b>	14	N	10	N
<b>3</b>	12	12	10	8
<b>4</b>	12	8	14	10
<b>6</b>	10	14	16	12
卡那霉素	20	14	20	12

4.2 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用微量肉汤稀释法<sup>[18]</sup>测定上述有抑菌活性化合物的MIC。将菌液用无菌的液体LB培养基稀释 $10^4$ 倍。首先,在96孔板中加入100  $\mu$ L的LB液体培养基,采用对倍稀释法加入药物,每个孔加入菌液100  $\mu$ L,重复3次。药物终浓度分别为128、64、32、16、8、4、2和1  $\mu$ g/mL。阴性对照:仅加LB液体培养基和菌液;阳性对照:加入卡那霉素,药物浓度分别为128、64、32、16、8、4、2和1  $\mu$ g/mL。37 °C培养16~24 h,没有可见菌生长的最低浓度即为MIC值。结果见表2。

表2 化合物对4种病原菌的MIC ( $\mu$ g/mL)

化合物	耻垢分枝杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	变形杆菌
<b>1</b>	32	128	64	/
<b>2</b>	8	/	64	/
<b>3</b>	32	32	64	>128
<b>4</b>	16	128	32	32
<b>6</b>	128	8	8	16
卡那霉素	4	4	4	8

#### 5 拉帕醇(lapachol, **1**)的含量测定

5.1 色谱条件 流动相由0.5%甲酸水溶液(A)和乙腈(B)组成,流速为1 mL/min,50% B(0~30 min)等度洗脱。柱温30 °C,进样量20  $\mu$ L,检测波长254 nm。

5.2 溶液的制备 对照品溶液:精密称取lapachol 3.500 mg,置入具塞的5 mL容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度定容,摇晃均匀,制成浓度为0.7 mg/mL的溶液。

供试品溶液:精密称取3.306 0 g流苏子干燥根,用95%乙醇浸泡1周,超声辅助提取30 min,共提取3次。合并提取液,40 °C减压浓缩得到184 mg乙醇提取物,甲醇溶解,置入具塞的10 mL容量瓶中,定容至刻度,摇晃均匀,通过0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤后,取滤液100  $\mu$ L稀释至1 mL为供试品溶液。

5.3 线性关系的考察 将对照品溶液用甲醇稀释成一系列不同浓度的对照品溶液(700、350、175、87.5、43.75和21.875 mg/L)进行测定。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归。测定一系列不同浓度的对照品溶液的峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,计算得到lapachol的线性回归方程:

$y=1.7239x+8.9959$ , 其中  $x$  为浓度,  $y$  为峰面积, 回归系数  $r=0.9999$  (图 2)。表明 lapachol 在 21.875~700 mg/L 范围内与峰面积呈现较好的线性关系。

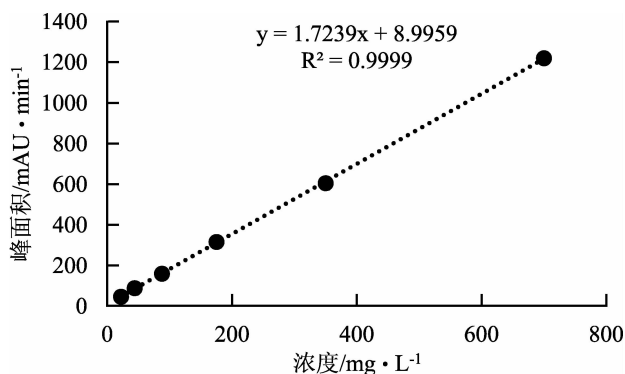


图 2 lapachol 的标准曲线

5.4 样品的含量测定 按外标法, 测得 lapachol 的峰面积为 211.9190, 计算出流苏子根中 lapachol 的含量为 3.56 g/kg(干重)。

## 6 结果与讨论

本研究对流苏子根的化学成分进行了系统分离, 共鉴定了 12 个化合物的结构, 其中 4~6 和 10~12 为首次从该植物中分离得到。采用纸片扩散法和微量稀释法进行了抗菌活性筛选, 结果表明: 1~4 对耻垢分枝杆菌表现出较好的抗菌活性, 其 MIC 值为 8~32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 化合物 6 对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和变形杆菌表现出较好的抗菌活性, 其 MIC 分别为 8、8 和 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过 HPLC 定量分析测定主要成分 lapachol 在根(干重)中的含量为 3.56 g/kg, 表明流苏子可以作为拉帕醇的资源植物。Lapachol 是一种天然存在的 1,4-萘醌类成分, 具有抗肿瘤<sup>[19]</sup>、抗寄生虫<sup>[20]</sup>、抗疟疾<sup>[21]</sup>、抗菌<sup>[22]</sup>等多种药理活性。该研究结果为流苏子根抗菌消炎的民间药用价值提供了科学依据, 并为其深入研究与开发利用提供了科学依据。

## 参考文献:

[1] VERELLEN J, SMETS E, HUYSMANS S. The remarkable genus *Coptosapelta* (Rubiaceae): pollen and orbicule morphology and systematic implications[J]. J Plant Res, 2004, 117(1): 57-68.

[2] 黄尉铭. 瓢箪藤全草化学与抗结核活性成分之研究[D]. 高雄: 高雄医学大学天然药物研究所, 2008.

[3] GAO R-R, LIU Z F, YANG X F, et al. Specialised meta-

bolites as chemotaxonomic markers of *Coptosapelta diffusa*, supporting its delimitation as sisterhood phylogenetic relationships with Rubioideae[J]. Phytochemistry, 2021, 192: 112929.

- [4] AIMI N, YAMAGUCHI K, TAKAHASHI M, et al. Thysonolactone: a novel triterpene from *Thyasanospermum diffusum* Champ. Var. longitubum Ohwi[J]. Tetrahedron, 1981, 37(5): 983-985.
- [5] KUMAGAI Y, SHINKAI Y, MIURA T, et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012, 52: 221-247.
- [6] PETTIT G R, HOUGHTON L E. Synthesis of hydroxyhydrolapachol and lapachol[J]. J Chem Soc C, 1971, 3: 503-511.
- [7] JUNG E J, PARK B H, LEE Y R. Environmentally benign, one-pot synthesis of pyrans by domino Knoevenagel/6 $\pi$ -electrocyclization in water and application to natural products[J]. Green Chem, 2010, 12(11): 2003.
- [8] BIAN J, LI X, WANG N, et al. Discovery of quinone-directed antitumor agents selectively bioactivated by NQO1 over CPR with improved safety profile[J]. Eur J Med Chem, 2017, 129: 27-40.
- [9] SCHMEDA-HIRSCHMANN G, PAPASTERGIOU F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "tayi pyta" (*Tabebuia hep taphylla*, Bignoniaceae)[J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2003, 58(7-8): 495-501.
- [10] WATSON R B, GOLONKA A N, SCHINDLER C S. Iron (III)chloride catalyzed formation of 3,4-dihydro-2H-pyrans from  $\alpha$ -alkylated 1,3-dicarbonyls selective synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone[J]. Org Lett, 2016, 18(6): 1310-1313.
- [11] LIOU M J, TENG C M, WU T S. Constituents from *Rubia Ustulata* Diels and *R. Yunnanensis* Diels and their antiplatelet aggregation activity[J]. J Chin Chem Soc, 2002, 49(6): 1025-1030.
- [12] KAWASAKI Y, GODA Y, YOSHIHIRA K. The mutagenic constituents of *Rubia tinctorum*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1992, 40(6): 1504-1509.
- [13] LU J, WANG P, HOU J, et al. An expedient method for regioselective methylation of catechol coumarins[J]. Chem Res Chin U, 2016, 32(5): 786-791.
- [14] LIU L F, YAO M J, LI M Y, et al. Iridoid derivatives

- with cytotoxic activity from *Pedicularis uliginosa* Bunge [J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16(2):e1800524.
- [15] LIU Y C, MERTEN C, DESKA J. Enantioconvergent biocatalytic redox isomerization[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(37):12151–12156.
- [16] XIONG L, ZHU C, LI Y, et al. Lignans and neolignans from *Sinocalamus affinis* and their absolute configurations[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(5):1188–1200.
- [17] RAAHAVE D. Paper disk–agar diffusion assay of penicillin in the presence of streptomycin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974, 6(5):603–605.
- [18] GEHRT A, PETER J, PIZZO P A, et al. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(5):1302–1307.
- [19] SHANKAR BABU M, MAHANTA S, LAKHTER A J, et al. Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2):e0191419.
- [20] STRAUCH M A, TOMAZ M A, MONTEIRO–MACHADO M, et al. Lapachol and synthetic derivatives: *in vitro* and *in vivo* activities against Bothrops snake venoms[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1):e0211229.
- [21] PÉREZ–SACAU E, ESTÉVEZ–BRAUN A, RAVELO A G, et al. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta–lapachone[J]. *Chem Biodivers*, 2005, 2(2):264–274.
- [22] DE SÁN P, CISALPINO P S, BERTOLLO C M, et al. Thiosemicarbazone of lapachol acts on cell membrane in *Paracoccidioides brasiliensis*[J]. *Med Mycol*, 2019, 57(3):332–339.