

钩藤水提取物中的微量三萜酸类

张 卿, 雷小强, 李若斐, 孙 华, 徐成博, 朱承根, 郭庆兰*, 石建功*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 运用大孔吸附树脂、MCI树脂、Sephadex LH-20、Toyopearl HW-40C、正相硅胶和C18反相硅胶等多种固定相柱色谱, 结合闪式色谱和高效液相色谱分离技术, 从常用中药钩藤水煎液中分离得到17个(1~17)微量三萜酸类化合物。通过HR-ESI-MS、UV、CD、IR及1D和2D NMR波谱数据解析鉴定了它们的结构, 其中8个为新化合物(1~8), 依次命名为钩藤酸Q~X, 且化合物2和7的结构得到单晶X-射线衍射分析的确证。在初步体外活性筛选中, 在5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 27-羟基齐墩果酸(17)对TGF- β 诱导的HSC-T6细胞活化有一定抑制作用。

关键词: 茜草科; 钩藤属; 钩藤; 水提取物; 三萜酸

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-0992-11

Minor triterpenoid acids from an aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*

ZHANG Qing, LEI Xiao-qiang, LI Ruo-fei, SUN Hua, XU Cheng-bo, ZHU Cheng-gen,
GUO Qing-lan*, SHI Jian-gong*

(Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Seventeen minor triterpenoid acids (1–17) were isolated from an aqueous decoction of *Uncaria rhynchophylla* by a combinatory application of column chromatography using multiple stationary phases, including macroporous adsorbent resin, MCI resin, Sephadex LH-20, Toyopearl HW-40C, silica gel, and C18 reversed phase silica gel, combined with separation techniques of flash chromatography (FC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Their structures were determined by analysis of HR-ESI-MS, UV, CD, and IR as well as 1D and 2D NMR spectroscopic data, of which eight new compounds (1–8) are named successively uncarinic acids Q–X, while the structures of 2 and 7 were confirmed by single crystal X-ray diffraction. In the *in vitro* assays, 27-hydroxyolean-12-en-28-oic acid (17) inhibited TGF- β -induced HSC-T6 cell activation at the concentration of 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: Rubiaceae; *Uncaria*; *Uncaria rhynchophylla*; aqueous extract; triterpenoid acid

茜草科 (Rubiaceae) 植物钩藤 *Uncaria rhyncho-*

phylla (Miq.) Miq ex Havil的干燥带钩茎枝为常用中药钩藤的主要基源^[1]。在临床应用中, 钩藤多以复方入药, 主要用于高血压、眩晕、惊厥、癫痫和震颤等病症^[2,3]。以往的研究报道显示生物碱、三萜和黄酮类化合物是钩藤及同属植物的主要活性成分^[4-10]。然而这些成分绝大多数是从钩藤药材的醇提取物中分离得到, 并且在提取和初步分离过程中经常用酸或碱(如氨水和盐酸等)处理^[11-13]。由于在临床实际应用中钩藤等传统中药多采用水煎煮的方式, 因此作者开展了

收稿日期: 2022-11-23; 修回日期: 2022-12-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82293685, 82293681, 82293680);
中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-028).

*通讯作者 Tel: 86-10-83154789, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: guonina@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63025166, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: shijg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1263

U. rhynchophylla 药用部位水煎煮提取物的研究, 并注重微量成分的系统分离和鉴定, 为更全面深入地揭示其化学成分组成和多样性药效作用奠定基础。前期作者课题组已从钩藤的同一水煎煮提取物中分离鉴定并先后报道了 30 个生物碱、2 个叶酸衍生物、30 个三萜酸、5 个 megastigmanes 和 7 个单萜衍生物及其初步活性筛选结果, 其中包括 29 个新的微量成分^[14-19]。本文继续报道该提取物中 8 个微量三萜酸类新成分 (**1**~**8**) 和 9 个已知化合物 (**9**~**17**) (图 1) 的分离和结构鉴定。

结果和讨论

化合物 **1** 为白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{20} +251.0$ (c 0.05, MeOH)。红外光谱显示分子结构中存在羟基 ($3\ 433\ \text{cm}^{-1}$) 和羰基 ($1\ 695\ \text{cm}^{-1}$)。根据 (+)-HR-ESI-MS m/z 509.324 2 $[M+Na]^+$ ($C_{30}H_{46}O_5Na$, 计算值 509.323 8) 和 NMR 谱数据 (表 1), 确定其分子式为 $C_{30}H_{46}O_5$, 具有 8 个不饱和度。化合物 **1** 的 NMR 谱数据与从该植物中提取分离的钩藤酸 P (uncarinic acid P)^[16] 的 NMR 数据相似, 比较二者显示主要区别是前者结构中的羟甲基 [δ_H 3.59 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23a) 和 3.45 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23b), δ_C 66.7 (C-23)] 替代了后者中的 23-醛基。因此, 确定化合物 **1** 为 3,6,23-三羟基-乌苏-12,18-二烯-28-酸, 并

通过 2D NMR 实验数据解析进行了证实 (图 2)。特别是在 HMBC 谱中, H_3 -24 和 H_2 -23 与 C-3、C-4 和 C-5, H-5 与 C-4、C-6、C-10 和 C-23, 以及 H-6 与 C-8 和 C-10 的远程异核相关信号, 结合它们的化学位移值, 表明 3 个羟基分别位于 C-3、C-6 和 C-23。同时, H_3 -29 与 C-18、C-19 和 C-20 及 H_3 -30 与 C-19、C-20 和 C-21 的 HMBC 相关信号, 证实两个甲基分别位于 C-19 和 C-20。此外, 根据 NOESY 谱中 H-5 与 H-3 和 H-9 及 H-6 与 H_2 -23 的信号交叉峰 (图 3), 结合 H-3 和 H-6 共振信号的偶合裂分特征及其偶合常数 (表 1), 确定了 $3\beta,6\beta$ -二羟基的取向。化合物 **1** 的 CD 谱给出一个源自异环顺式共轭二烯发色团的强 (+)-Cotton 效应峰 (λ_{\max} 234 nm, $\Delta\epsilon +30.06$) (图 4)。根据异环顺式共轭二烯的烯丙轴手性 (allylic axial chirality) 规则^[20], 推定 **1** 拥有与常见乌苏酸母核相同的绝对构型。因此, 化合物 **1** 的结构确定为 $3\beta,6\beta,23$ -三羟基-乌苏-12,18-二烯-28-酸, 命名为钩藤酸 Q (uncarinic acid Q)。

化合物 **2** 为无色针状结晶 (CH_3OH), $mp > 300\ ^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} +36.6$ (c 0.08, MeOH)。根据 (+)-HR-ESI-MS m/z 485.326 3 $[M+H]^+$ ($C_{30}H_{45}O_5$, 计算值 485.326 2) 和 NMR 谱数据 (表 1), 确定其分子式为 $C_{30}H_{44}O_5$, 较 **1** 少两个氢, 不饱和度为 9。比较 **2** 与 **1** 的 NMR 谱数据, 显示主

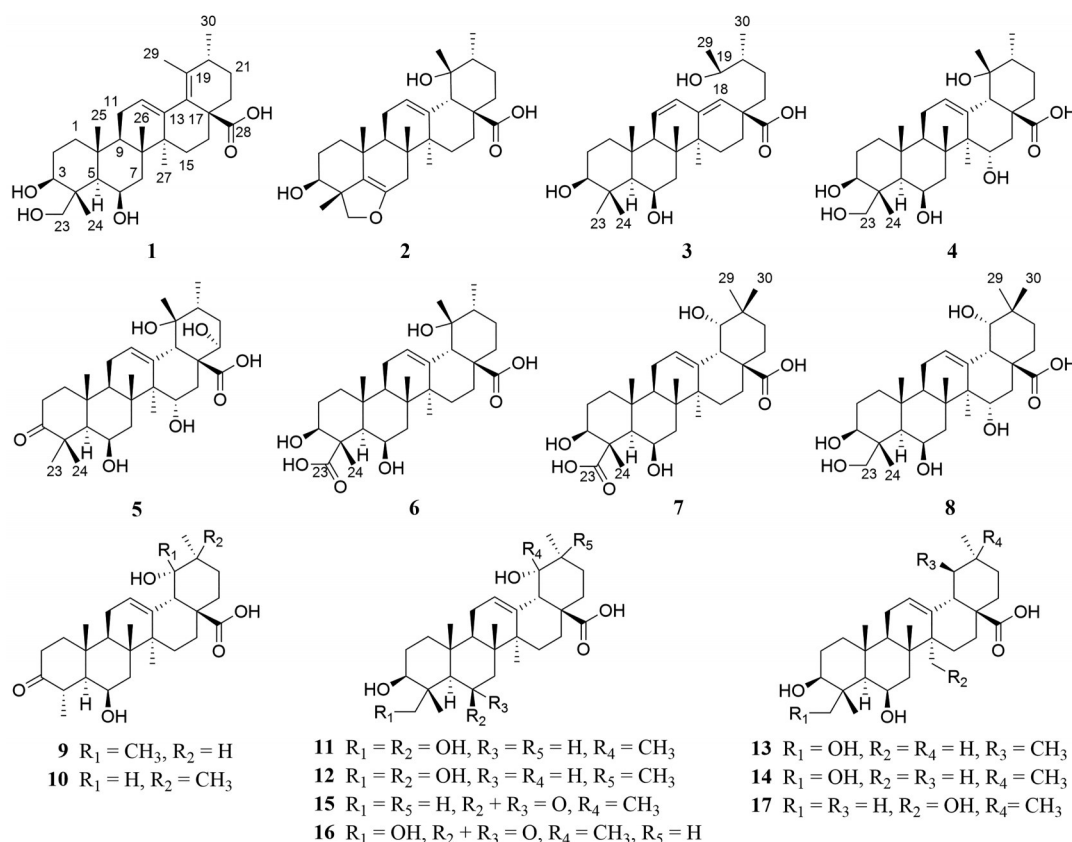


Figure 1 Structures of compounds 1-17

Table 1 NMR spectral data (δ) for compounds **1–3** in CD₃OD. Data (δ) were measured at 600 MHz for ¹H and at 150 MHz for ¹³C for **1** and **3**, and at 700 MHz for ¹H and at 175 MHz for ¹³C for **2**, respectively. Proton coupling constants (J) in Hz are given in parentheses. The assignments were based on ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiment

No.	1		2		3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1a	1.69 dt (12.6, 3.6)	42.2	1.81 dt (12.6, 3.5)	42.9	1.86 m	41.3
1b	1.01 dt (3.6, 12.6)		1.11 m		0.99 m	
2a	1.78 m	27.7	1.71 m	28.8	1.79 m	28.1
2b	1.60 m		1.57 m		1.62 m	
3	3.56 dd (12.0, 4.8)	73.7	3.48 dd (11.9, 4.2)	80.3	3.10 dd (12.0, 4.2)	80.1
4		44.2		50.5		40.8
5	1.19 brs	49.4		116.9	0.76 d (3.0)	56.8
6	4.36 brs	68.4		151.0	4.48 q (3.0)	68.8
7a	1.77 m	42.5	2.22 m	30.9	1.57 m	40.8
7b	1.62 m		1.51 m			
8		39.1		42.5		40.5
9	1.53 dd (12.0, 5.4)	49.6	1.86 m	45.1	2.02 brs	56.1
10		37.3		35.8		37.4
11a	2.08 ddd (18.0, 12.0, 2.4)	24.2	2.20 ddd (18.9, 10.5, 3.5)	24.4	5.67 dd (10.2, 1.8)	128.3
11b	2.00 dt (18.0, 5.4)		2.10 ddd (18.9, 7.7, 3.5)			
12	5.40 dd (5.4, 2.4)	127.5	5.33 t (3.5)	128.9	5.97 dd (10.2, 3.0)	130.9
13		139.4		139.4		143.7
14		46.1		42.0		42.7
15a	1.94 dt (4.2, 13.8)	29.8	1.86 m	29.2	1.88 m	27.1
15b	1.16 m		1.07 m		1.15 m	
16a	1.80 m	32.4	2.65 dt (4.2, 13.3)	26.3	2.17 dt (13.8, 3.0)	27.9
16b	1.64 m		1.53 m		1.47 dt (3.6, 13.8)	
17		50.4		48.9		48.3
18		134.6	2.52 brs	54.6	5.42 s	128.8
19		137.0		73.6	3.56 quintet (6.0)	72.1
20	2.17 m	35.7	1.35 m	43.0	1.40 m	41.7
21a	1.82 m	27.5	1.73 m	27.3	1.56 m	28.5
21b	1.35 m		1.23 m		1.01 m	
22a	2.16 m	36.0	1.74 m	39.0	1.76 dt (3.6, 13.8)	40.1
22b	1.38 m		1.63 m		1.40 m	
23a	3.59 d (11.4)	66.7	4.08 s	85.6	1.04 s	27.8
23b	3.45 d (11.4)					
24	1.05 s	14.2	1.23 s	20.8	1.14 s	17.1
25	1.36 s	18.3	1.11 s	21.1	1.25 s	19.9
26	1.16 s	20.2	0.86 s	18.8	1.02 s	17.4
27	0.96 s	22.4	1.30 s	25.6	0.93 s	290.3
28		180.4		182.2		179.5
29	1.73 s	19.8	1.20 s	27.0	1.08 d (6.0)	19.4
30	1.09 d (7.2)	19.1	0.93 d (6.3)	16.6	0.86 d (6.6)	15.0

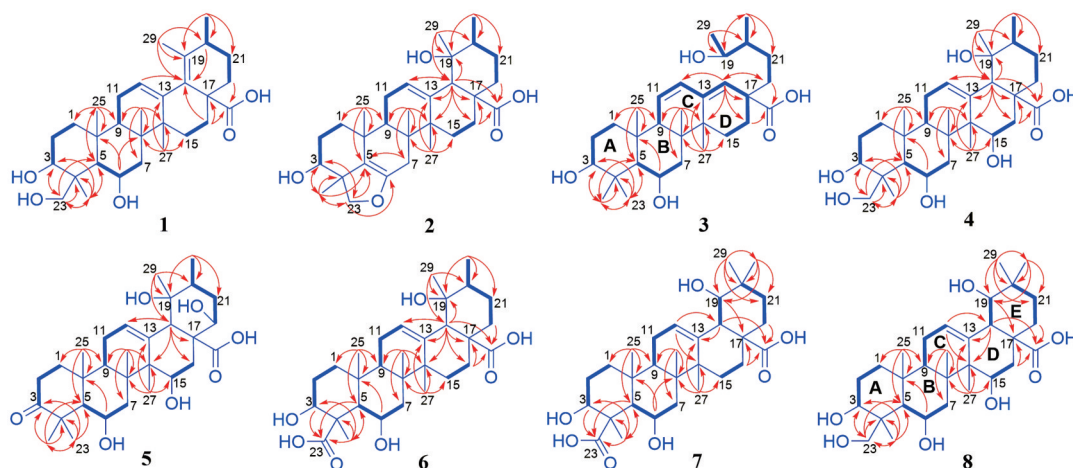


Figure 2 The ¹H-¹H COSY (thick lines), key HMBC (arrows) correlations of compounds **1–8**

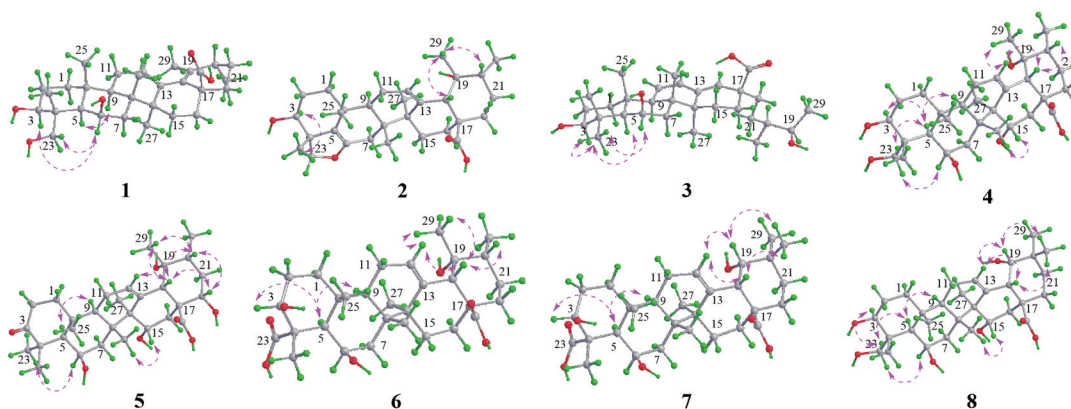


Figure 3 The NOESY correlations (pink double arrows) of compounds 1–8

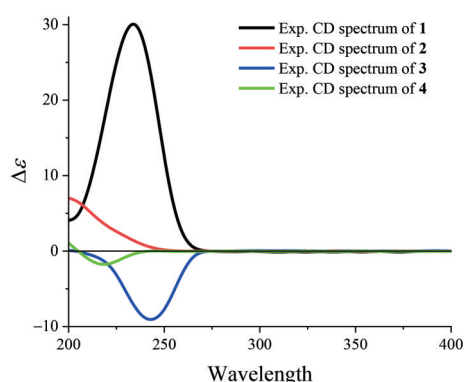


Figure 4 Overlaid CD spectra of compounds 1–4

要差别是 **2** 结构中的 1 个连氧季碳 [δ_c 73.6 (C-19)]、1 个四取代烯醚双键 [δ_c 116.9 (C-5) 和 151.0 (C-6)] 和 1 个与羟基同碳甲基 [δ_H 1.20 (3H, s, H₃-29) 和 δ_c 27.0 (C-29)], 分别替代了 **1** 中的羟基次甲基 (CH-6) 及 19-甲基-18,19-烯单元; 同时, **2** 结构中的羟亚甲基 [δ_H 4.08 (2H, s, H₂-23) 和 δ_c 85.6 (C-23)] 共振信号较 **1** 的显著向低场位移。由此推断 **2** 是 **1** 的 18,19-二氢-19-羟基-6,23-环氧-5-烯衍生物, 并得到 **2** 的 2DNMR 实验谱图解析的确证 (图 2 和 3)。特别是, 在 HMBC 谱中, H₂-23 与 C-5

和 C-6, H-18 与 C-12、C-13、C-14、C-16、C-17、C-19 和 C-28, 以及 H₃-29 和 H₃-30 与 C-19 的远程相关信号, 结合它们的化学位移, 确证化合物 **2** 结构中存在 6,23-环氧-5-烯结构单元。另外, 根据 NOESY 谱中 H-3 与 H₂-23 及 H-18 和 H-20 与 H₃-29 的 NOE 交叉峰信号, 结合 H-3 共振信号的偶合裂分峰型及其偶合常数 (表 1), 推定了 3 β ,19 α -二羟基的取向。因此, 推断 **2** 为 3 β ,19 α -二羟基-6,23-环氧-乌苏-5,12-二烯-28-酸。化合物 **2** 的甲醇溶液室温放置后, 得到适宜的单晶, 随即通过 Cu K α 射线辐照的 X-射线单晶射线散衍射分析, 进一步确证了 **2** 的结构及其绝对构型, 其 ORTEP 晶体结构如图 5 所示。因此, 化合物 **2** 的结构得到确定, 命名为钩藤酸 R (uncarinic acid R)。

化合物 **3** 为白色无定形粉末, 通过 (+)-HR-ESI-MS m/z 511.340 1 [M+Na]⁺ (C₃₀H₄₈O₅Na 计算值, 511.339 4) 和 NMR 谱数据分析 (表 1) 确定其分子式为 C₃₀H₄₈O₅, 不饱和度为 7。NMR 谱数据显示 **3** 的结构中存在特征的 1 个二取代双键、1 个三取代双键、3 个连氧的次甲基、1 个羧酸羰基、2 个仲甲基和 5 个叔甲基, 以及不连氧的 7 个亚甲基、3 个次甲基和 5 个季碳 (表 1)。根据这些数

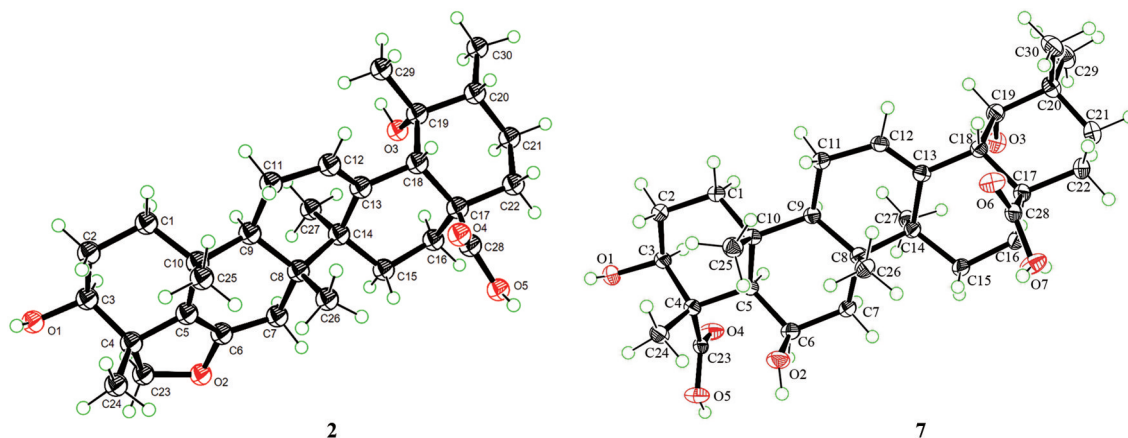


Figure 5 X-ray crystal structures for compounds 2 and 7

据初步推测**3**是一个罕见的含有1个额外双键的裂环三羟基-乌苏-二烯-28-酸衍生物,并通过2D NMR实验谱图分析对其结构进行了进一步确定。在2D NMR谱图中,除显示可确证**3**拥有3,6-二羟基-乌苏-二烯-28-酸母核A和B环的信号外(图2),H-9/H-11/H-12/H-18/H-16a依次偶合(包括烯丙和高烯丙位偶合)的¹H-¹H COSY交叉峰,H₃-26与C-7、C-8、C-9和C-14及H₃-27与C-8、C-13、C-14和C-15异核远程相关的HMBC信号,结合它们的化学位移,证明**3**的结构中还存在11,13(18)-二烯特征。同时,根据H₃-29/H-19/H-20/H₂-21/H₂-22依次偶合的¹H-¹H COSY交叉峰,H-16a和H-22b与C-28异核远程相关的HMBC信号,结合它们的化学位移,推定**3**为3,6,19-三羟基-18,19-裂-乌苏-11,13(18)-二烯-28-酸。进一步根据NOESY谱中H-3与H-5和H₃-23以及H-6与H₃-23的NOE交叉峰信号(图3),结合这些氢共振信号的偶合裂分峰型及其偶合常数(表1),指定了3β,6β-二羟基的取向。化合物**3**的CD谱显示反式共轭二烯发色团的强(-)-Cotton效应峰(λ_{max} 243 nm, Δε -9.06)(图4),根据环内反式共轭二烯的烯丙轴手性(allylic axial chirality)规则^[20],推测**3**拥有与常见乌苏酸母核相同的绝对构型。另外,根据该植物中分离鉴定的19-羟基乌苏烷-28-酸衍生物的19-羟基均具有α取向的情况,从生源考虑初步推定**3**也拥有19α-羟基。因此,化合物**3**的结构得以初步确定,命名为钩藤酸S(uncarinic acid S)。

化合物**4**为白色无定形粉末,根据(+)-HR-ESI-MS *m/z* 543.328 9 [M+Na]⁺ (C₃₀H₄₈O₇,Na 计算值, 543.329 2)和NMR谱数据分析(表2)确定分子式为C₃₀H₄₈O₇,不饱和度为7。化合物**4**和**2**的NMR谱数据相似,最明显的不同是前者NMR中可归属于1个次甲基[δ_H 1.18 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-5); δ_C 49.3 (C-5)]及2个羟次甲基[δ_H 4.38 (1H, brs, H-6)和4.20 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, H-15); δ_C 68.9 (C-6)和69.3 (C-15)]的信号,取代了后者中的四取代烯醚双键单元和1个亚甲基的信号。另外,前者孤立羟亚甲基[δ_H 3.59和3.47 (各1H, d, *J* = 10.8 Hz, H₂-23)及δ_C 66.9 (C-23)]信号明显移向高场,且呈典型的AB偶合系统而非后者的单峰信号。由此初步推断**4**是**2**被羟化的6,23-裂环-5,6-二氢衍生物,并通过**4**的2D NMR实验谱图解析对羟基化的位置及其构型进行了进一步推定。在2D NMR谱中,除显示可确证**4**是拥有**2**的6,23-裂环-5,6-二氢衍生物基本结构的信号外(图2),H-15/H₂-16偶合的¹H-¹H COSY交叉峰,H₃-27与C-8、C-13、C-14和C-15异核远程偶合相关的HMBC信号,以及H-15与H₃-26之间的NOESY交叉峰,结合这些氢和碳共振信号的化学位移和偶合

裂分峰型及其偶合常数(表2),推定**4**的结构中还存在15α-羟基。通过NOESY谱中H-3与H-5和H₃-23、H-6与H₃-23、H-12与H-18和H₃-29以及H-18与H-20的NOE交叉峰信号(图3),结合这些氢共振信号的偶合裂分峰型及其偶合常数(表1),指定了3β,6β,19α-二羟基的取向。根据前述该植物中分离鉴定乌苏-12-烯-28-酸衍生物母核的绝对构型保持,推测在不考虑取代基影响的情况下**4**母核骨架的绝对构型与**1**~**3**相同。故此,化合物**4**的结构确定为3β,6β,15α,19α,23-五羟基-乌苏-12-烯-28-酸,命名为钩藤酸T(uncarinic acid T)。

化合物**5**为白色无定形粉末,经(+)-HR-ESI-MS *m/z* 541.313 7 [M+Na]⁺ (C₃₀H₄₆O₇,Na 计算值, 541.313 6)和NMR谱数据分析(表2)确定其分子式为C₃₀H₄₆O₇,不饱和度为8。化合物**5**的波谱数显示其为另一个乌苏-12-烯-28-酸衍生物。比较**5**和**4**的NMR谱数据,显示**5**是**4**结构中多一个酮羰基而无23-羟基的四羟基-乌苏-12-烯-28-酸衍生物。经2D NMR实验谱图解析羰基和羟基的位置及其构型进行了推定。在2D NMR谱图中,除给出可确证**5**拥有乌苏-12-烯-28-酸母核的信号外(图2),H-5/H-6/H₂-7依次偶合相关的¹H-¹H COSY交叉峰,H₃-23和H₃-24与C-3、C-4和C-5异核远程偶合的HMBC信号,结合它们的化学位移,证明**5**具有6-羟基-3-酮取代特征。同时,根据H-15/H₂-16偶合的¹H-¹H COSY交叉峰,H₃-27与C-8、C-13、C-14和C-15异核远程相关的HMBC信号,结合它们的化学位移,推定**5**与**4**有相同的15-羟基取代。另外,借助¹H-¹H COSY交叉峰H₃-30/H-20/H₂-21/H-22, HMBC异核远程相关H₃-29/C-18、C-19和C-20以及H₃-30/C-19、C-20和C-21,结合它们的化学位移,推断**5**中有19,22-二羟基取代。进一步通过NOESY谱中H-6/H₃-23、H-15/H₃-26、H-18/H-22和H-18/H₃-29的NOE交叉峰,结合这些氢共振信号的偶合裂分峰型及其偶合常数^[21-23](表2),推定**5**拥有6β,15α,19α,22α-四羟基取代的构型。化合物**5**的CD谱显示可归属于酮羰基发色团的弱(-)-Cotton效应峰(λ_{max} 301 nm, Δε -0.07)(图6);运用酮羰基的八区律规则^[24],确证**5**母核骨架的绝对构型与常见乌苏酸的相同。因此,化合物**5**的结构得以确定,命名为钩藤酸U(uncarinic acid U)。

化合物**6**为白色无定形粉末,根据(-)-HR-ESI-MS *m/z* 517.316 9 [M-H]⁻ (C₃₀H₄₅O₇, 计算值 517.316 0)和NMR谱数据(表2)确定其分子式为C₃₀H₄₆O₇。化合物**6**的NMR谱数据与从同植物的95%乙醇提取物中分离到的3β,6β,19α-三羟基-乌苏-12-烯-28-酸-23-羧酸甲酯(3β, 6β, 19α -trihydroxy-23-methoxycarbonyl-urs-12-en-28-oic acid)^[25]的非常相似,文献^[26]中该结构绘制有

Table 2 NMR spectral data (δ) for compounds **4–6** in CD₃OD. Data (δ) were measured at 600 MHz for ¹H and at 150 MHz for ¹³C for **4** and **5**, and at 500 MHz for ¹H and at 125 MHz for ¹³C for **6**, respectively. Proton coupling constants (*J*) in Hz are given in parentheses. The assignments were based on ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiment

No.	4		5		6	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1a	1.56 m	41.7	1.93 m	43.0	1.64 m	41.8
1b	0.98 dt (3.0, 13.2)		1.33 m		1.08 m	
2a	1.72 m	27.6	2.82 m	35.7	1.72 m	27.7
2b	1.58 m		2.18 ddd (15.0, 4.8, 3.0)		1.61 m	
3	3.56 dd (12.0, 4.2)	74.0		219.9	3.91 dd (11.5, 4.0)	77.2
4		44.1		50.1		55.6
5	1.18 d (2.4)	49.3	1.21 brs	57.9	1.51 d (1.5)	53.5
6	4.38 brs	68.9	4.41 brs	69.6	4.03 brs	71.7
7a	1.97 dd (15.6, 4.2)	44.2	1.93 m	44.3	1.72 m	41.9
7b	1.71 m		1.80 m		1.46 m	
8		41.3		41.5		40.7
9	1.76 m	48.7	1.77 dd (11.4, 6.6)	48.1	1.79 dd (10.5, 6.5)	49.5
10		37.4		37.6		37.1
11a	2.05 m	24.7	2.11 m	24.8	2.05 m	24.6
11b						
12	5.38 t (4.2)	131.0	5.37 t (3.6)	130.8	5.31 t (4.0)	129.5
13		140.3		140.2		139.3
14		48.8		49.0		43.1
15a	4.20 dd (12.0, 6.0)	69.3	4.36 dd (11.4, 6.0)	69.1	1.86 dt (5.0, 14.0)	29.6
15b					0.97 brd (14.0)	
16a	2.68 t (12.0)	36.6	2.36 t (11.4)	29.6	2.55 dt (5.0, 14.0)	26.6
16b	1.72 m		2.07 m		1.48 m	
17		48.2		54.2		49.0
18	2.45 brs	55.4	2.42 brs	56.3	2.51 brs	55.1
19		73.4		73.0		73.6
20	1.35 m	42.9	1.48 m	41.3	1.35 m	43.1
21a	1.74 m	27.2	1.84 t (12.0)	35.4	1.72 m	27.3
21b	1.63 dd (13.2, 4.2)		1.42 m		1.61 m	
22a	1.73 m	38.7	3.70 dd (12.0, 4.8)	75.4	1.72 m	39.0
22b	1.58 m				1.60 m	
23a	3.59 d (10.8)	66.9	1.13 s	26.0		181.8
23b	3.47 d (10.8)					
24	1.07 s	14.1	1.42 s	24.4	1.46 s	12.7
25	1.32 s	17.7	1.52 s	16.8	1.32 s	17.4
26	1.10 s	19.0	1.20 s	19.2	1.07 s	18.5
27	1.28 s	18.8	1.30 s	19.1	1.31 s	24.8
28		181.7		179.9		182.3
29	1.19 s	26.9	1.16 s	26.5	1.19 s	27.0
30	0.92 d (6.6)	16.5	0.95 d (6.6)	16.3	0.92 d (6.5)	16.6

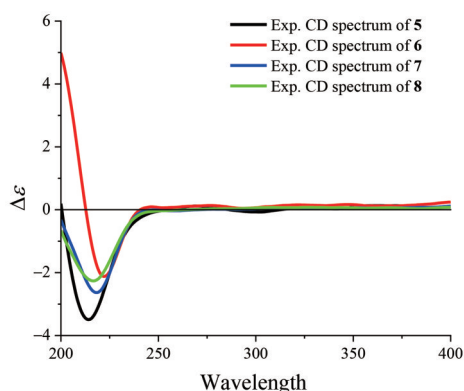


Figure 6 Overlaid CD spectra of compounds **5–8**

误。两者仅有的显著差别是在**6**的NMR谱中缺少酯甲基的信号。据此推测,**6**为3 β ,6 β ,19 α -三羟基-乌苏-

12-烯-23,28-二酸,且得到其2D NMR实验谱图解析的证实(图2);特别是,得到HMBC谱中H-3和H₃-24与C-23的异核远程相关信号,ROESY谱中H-3/H-5、H-5/H-9、H-12/H-18和H-12/H-19的NOE交叉峰信号,及其它们的化学位移和偶合裂分特征的证实。在化合物**6**的CD谱中,除缺少羰基发色团的特征Cotton效应峰外,烯键 π - π^* 跃迁的Cotton效应与**5**的相似(图6),据此推测**6**母核骨架的绝对构型与**5**的相同。因此,化合物**6**的结构得以确定,命名为钩藤酸V(uncarinic acid V)。

化合物**7**为无色簇状结晶, mp > 300 °C, UV、CD、IR、(-)-HR-ESI-MS和NMR谱图数据(表3和实验部分)显示其为**6**的同分异构体。特别是化合物**7**的NMR谱数据与前期从同一提取物中分离到的齐墩果烷型三萜

钩藤酸J (uncarinic acid J) 的很近似^[16,25], 仅有的显著差别是在7的NMR谱图中缺少酯甲基的信号。据此推测, 7为钩藤酸J (uncarinic acid J) 的23-羧酸衍生物, 并通过2D NMR实验谱图解析进行了证实(图2); 特别是, 得到HMBC谱中H-3和H₃-24与C-23的异核远程相关信号, ROESY谱中H-5与H-3以及H-18和H-19与H₃-30的NOE交叉峰信号的证实(图3)。化合物7和6的CD谱曲线近似(图6), 由此推测7母核骨架齐墩果-12-烯-28-酸的绝对构型与6的相似。化合物7在甲醇溶液中室温放置后, 得到适宜的单晶, 随即通过Cu K α 射线照射的X-射线单晶衍射分析, 进一步确证了7的结构及其绝对构型, 其ORTEP晶体结构如图5所示。因此, 化合物7确定为3 β ,6 β ,19 α -三羟基-齐墩果-12-烯-23,28-二酸, 命名为钩藤酸W (uncarinic acid W)。

化合物8为白色无定形粉末, 所有谱图数据(表3和实验部分)显示其为4的同分异构体。比较8和4的NMR谱数据显示, 二者的主要差异是前者结构中的1个叔甲基 [δ_{H} 0.96 (3H, s, H₃-30) 和 δ_{C} 25.0 (C-30)]、1个羟次甲基 [δ_{H} 3.25 (1H, brd, J = 4.2 Hz, H-19) 和 δ_{C} 82.3 (C-19)] 及1个季碳 [δ_{C} 36.1 (C-20)], 分别替代了后者的仲甲基 (CH₃-30)、羟基取代季碳 (C-19) 和次甲基 (CH-20)。据此推定, 8是4的齐墩果烷型三萜的同分异构体, 且得到8的2D NMR实验谱图解析的确证。在8的2D NMR谱中, 除显示能够确证8和4拥有完全相同的3 β ,6 β ,15 α ,23-四羟基取代A-D环部分的信号(图2和3)外, HMBC谱中H₃-29和H₃-30与C-19、C-20和C-21的异核远程相关信号, NOESY谱中H-18和H-19与H₃-30的NOE交叉峰信号, 以及这些氢和碳的化学位移和共振信号偶合裂分的峰型特征及其偶合常数, 证明8拥有齐墩果烷型三萜的19 α -羟基取代的E环部分。化合物8和7的CD谱曲线近似(图6), 推测它们共有齐墩果-12-烯-28-酸母核骨架的绝对构型。因此, 化合物8的结构确定为3 β ,6 β ,15 α ,19 α ,23-五羟基-齐墩果-12-烯-28-酸, 命名为钩藤酸X (uncarinic acid X)。

通过波谱数据解析, 并与文献报道相关化合物的数据比较, 已知化合物结构分别为: 6 β ,19 α -二羟基-3-氧-24-去甲基-乌苏-12-烯-28-酸 (6 β ,19 α -dihydroxy-3-oxo-24-norurs-12-en-28-oic acid)^[27](9)、6 β ,19 α -二羟基-3-氧-24-去甲基-齐墩果-12-烯-28-酸 (6 β ,19 α -dihydroxy-3-oxo-24-norolean-12-en-28-oic acid)^[27](10)、3 β ,6 β ,19 α ,23-四羟基-乌苏-12-烯-28-酸 (3 β ,6 β ,19 α ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid)^[22](11)、3 β ,6 β ,19 α ,23-四羟基-齐墩果-12-烯-28-酸 (3 β ,6 β ,19 α ,23-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic acid)^[28](12)、3 β ,6 β ,23-三羟基-乌苏-12-烯-28-酸 (3 β ,6 β ,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid)^[29](13)、3 β ,6 β ,23-三羟基-齐墩果-12-烯-28-酸 (3 β ,

Table 3 NMR spectral data (δ) for compounds 7 and 8 in CD₃OD. Data (δ) were measured at 500 MHz for ¹H and at 125 MHz for ¹³C for 7 and at 600 MHz for ¹H and at 150 MHz for ¹³C for 8, respectively. Proton coupling constants (J) in Hz are given in parentheses. The assignments were based on ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiment

No.	7		8	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1a	1.60 m	41.6	1.54 m	41.5
1b	1.06 m		0.96 m	
2a	1.72 m	27.6	1.72 m	27.5
2b	1.59 m		1.58 m	
3	3.90 dd (12.0, 4.0)	77.2	3.55 dd (11.4, 4.2)	74.1
4		55.6		44.1
5	1.51 d (2.0)	53.8	1.17 d (1.8)	49.6
6	4.04 brs	71.7	4.38 brs	69.0
7a	1.70 m	41.6	1.95 dd (15.0, 4.2)	44.3
7b	1.46 m		1.72 m	
8		40.4		41.2
9	1.82 dd (11.0, 7.0)	49.8	1.77 m	49.1
10		37.3		37.6
11a	2.06 ddd (18.5, 11.0, 4.0)	24.7	2.04 ddd (18.6, 10.2, 3.6)	24.8
11b	1.98 m		2.01 m	
12	5.34 t (4.0)	125.0	5.41 t (3.6)	126.5
13		143.9		145.6
14		43.1		48.9
15a	1.67 m	29.4	4.09 dd (12.0, 4.8)	69.6
15b	0.99 m			
16a	2.26 dt (4.0, 13.0)	28.6	2.43 t (12.0)	38.4
16b	1.58 m		1.74 m	
17		46.7		46.1
18	3.06 brs	45.2	3.01 brs	45.8
19	3.26 brd (4.0)	82.4	3.25 brd (4.2)	82.3
20		36.1		36.1
21a	1.68 m	29.5	1.74 m	29.3
21b	1.00 m		0.99 m	
22a	1.76 m	34.0	1.75 m	34.0
22b	1.61 m		1.59 m	
23a		181.7	3.59 d (10.8)	67.0
23b			3.48 d (10.8)	
24	1.46 s	12.7	1.07 s	14.0
25	1.31 s	17.2	1.31 s	17.5
26	1.06 s	18.4	1.10 s	19.1
27	1.27 s	25.1	1.25 s	19.4
28		182.3		182.3
29	0.93 s	28.7	0.93 s	28.7
30	0.96 s	25.2	0.96 s	25.0

acid)^[29](13)、3 β ,6 β ,23-三羟基-齐墩果-12-烯-28-酸 (3 β ,6 β ,23-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid)^[30](14)、3 β ,19 α -二羟基-6-氧-乌苏-12-烯-28-酸 (3 β ,19 α -dihydroxy-6-oxo-urs-12-en-28-oic acid)^[27](15)、3 β ,19 α ,23-三羟基-6-氧-乌苏-12-烯-28-酸 (3 β ,19 α -dihydroxy-6-oxo-urs-12-en-28-oic acid)^[31](16) 和 27-羟基齐墩果酸 (27-hydroxyolean-12-en-28-oic acid)^[32](17)。在氘代甲醇中, 9、10、12~14 和 16 与文献报道在相同溶剂中相应化合物NMR数据完全一致; 然而, 11、15 和 17 与文献报道相应化合物NMR数据的溶剂不同, 存在溶剂效应偏

差; 其中, **11**、**13**、**15**和**17**的结构及其NMR数据归属得到2DNMR实验谱图解析的确证。

对部分化合物在抑制TGF- β 诱导的HSC-T6细胞活化, 抑制RAW 264.7细胞分泌TNF- α , 抑制LPS诱导的原代小鼠腹腔巨噬细胞NO释放, 保护谷氨酸诱导的神经元损伤, 抑制HGC27、HCT-116、U87、MCF-7和HepG2肿瘤细胞增殖以及抑制Fe²⁺-半胱氨酸诱导的肝微粒体脂质过氧化等体外模型上进行了初步筛选, 仅发现化合物**17**在5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对TGF- β 诱导的HSC-T6细胞活化表现出一定抑制作用(表4)。另外, 发现化合物**13**、**14**和**16**显示抑制病毒复制的弱活性。以上结果, 结合本课题组之前所分离到的四对27-阿魏酰基反/顺互变异构体对APAP引起HepG2细胞损伤的保护作用^[16], 提示27-羟基及其阿魏酰可能为关键的药效基团^[33,34]。尽管本文报道的多数化合物在已使用的细胞水平等模型上未显示出强活性, 但不能排除在其他模型上显示更佳活性的潜在可能性。总之, 这些结构多样性微量成分的发现, 丰富了钩藤水提取物的化学成分; 它们是否对钩藤临床功效有贡献, 值得通过积累样品后进一步探究。

实验部分

AUTOPOL V型旋光测定仪(美国Rudolph公司), Nicolet impact 5700型傅立叶变换红外光谱仪(美国Thermo Electron Corporation公司), JASCO V-650型紫外光谱仪、JASCO J-815型CD测定仪(日本JASCO公司), X-5精密显微镜熔点测定仪(北京佳源兴业科技有限公司), Inova SYS 600型核磁共振仪(Varian Associates Inc., Palo Alto), Bruker 500、600和700型核磁共振仪(Bruker公司); 设定温度297 K; 其中, ¹H NMR以氘代甲醇 δ_{H} 3.300, 氘代丙酮 δ_{H} 2.050, ¹³C NMR以氘代甲醇 δ_{C} 49.00, 氘代丙酮 δ_{C} 29.80为参照, Thermo

QExactive Focus型质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。SEP LC-52型高效液相色谱仪配备有MWDUV紫外检测器(赛普锐思北京科技有限公司)。Sephadex LH-20(瑞典Amersham Pharmacia公司), Toyopearl HW-40C凝胶树脂(日本TOSOH公司), C18MGII反相色谱柱、PFP苯基柱和CD-Ph手性色谱柱(日本大阪曹达株式会社), GRACE C18反相色谱柱(美国Grace公司), 柱色谱硅胶(200~300目)及薄层色谱用硅胶GF₂₅₄(青岛海洋化工厂生产)。所有试剂若无特别说明, 均购自北京化工厂, 级别为分析纯或色谱纯。

钩藤(带钩茎枝)购于河北安国药材市场, 于2016年8月从中国湖南省衡东县采集, 由马林副研究员(中国医学科学院药物研究所)验证, 标本现存于中国医学科学院药物研究所植物标本室, 标本号为No. ID-S-2753。

1 提取与分离

干燥钩藤(97.0 kg)粉碎后, 用水加热回流提取3次, 减压浓缩至干, 得到浸膏。浸膏经HP-20大孔树脂柱色谱分离, 依次用水、50%乙醇和95%乙醇洗脱, 回收溶剂后得到A~C三部分。C流分(100 g)经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷和甲醇为溶剂(0%~100%, v/v), 梯度洗脱, 经薄层色谱检识, 合并后得到16个亚组分(Ca~Cp)(以上提取和初步分离工作由本课题组早期完成), Cb~Cd剩余样品合并后经Flash C18柱色谱分离, 0%~100%甲醇梯度洗脱得到Cb1~Cb26, Cb3~Cb9(1.5 g)后经Flash C18柱色谱分离, 0%~100%甲醇梯度洗脱得到Cb3-1~Cb3-41, Cb3-24(64.3 mg)经Toyopearl HW-40C凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到Cb3-24A~H, Cb3-24D(40.3 mg)经Sephadex LH-20凝胶柱色谱分离(石油醚-二氯甲烷-甲醇, 5:5:1, v/v/v), 得到Cb3-24D1~8, Cb3-24D7(20 mg)经过HPLC分离(GRACE C18, 68%甲醇, 3 mL·min⁻¹)得到化合物**15**

Table 4 Inhibition activity of TGF- β induced HSC-T6 cell activation. All compounds were tested at 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Results are expressed as means \pm SD ($n = 3$). ^{###} $P < 0.01$; ^{##} $P < 0.05$ vs Control; ^{**} $P < 0.05$ vs Model

Compound	OD value	Cell survival/%	Compound	OD value	Cell survival/%
Control	0.761 \pm 0.056	100.000	Control	0.796 \pm 0.015	100.000
Model (10 ng·mL ⁻¹)	1.057 \pm 0.036 ^{##}	138.918	Model (10 ng·mL ⁻¹)	1.053 \pm 0.034 ^{###}	132.222
1	1.080 \pm 0.032	141.875	4	1.182 \pm 0.015	148.453
2	1.050 \pm 0.056	137.972	8	1.170 \pm 0.029	146.970
9	1.002 \pm 0.036	131.647			
10	0.998 \pm 0.044	131.130			
11	1.095 \pm 0.035	143.833			
12	1.067 \pm 0.025	140.232			
13	1.073 \pm 0.059	141.007			
14	1.037 \pm 0.026	136.272			
15	1.019 \pm 0.023	133.850			
16	1.065 \pm 0.066	139.947			
17	0.963 \pm 0.019 ^{**}	126.592			

(1.88 mg, $t_r = 33.7$ min)、**9** (3.2 mg, $t_r = 39.8$ min) 和 **10** (3.2 mg, $t_r = 45.2$ min)。Cb3-34 (10.8 mg) 经 Toyopearl HW-40C 凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到 Cb3-34A~I, Cb3-34F (3.5 mg) 经过 HPLC 分离 (C18 MG II, 78% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到化合物 **17** (2.83 mg, $t_r = 29.6$ min)。

Cf (2.1 g) 经 Toyopearl HW-40C 柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到 Cf1~Cf11。Cf2 (846 mg) 经 Flash C18 柱色谱分离, 10%~100% 甲醇梯度洗脱得到 Cf2A~Cf2H。Cf2E (110 mg) 经 HPLC 分离 (GRACE C18, 65% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到一个混合物, 进一步经过 HPLC 分离 (CD-Ph, 64% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到化合物 **2** (0.82 mg, $t_r = 36.2$ min) 和 **16** (0.26 mg, $t_r = 22.1$ min)。

Ch (6.5 g) 用甲醇溶解, 经滤纸过滤后, 滤液经 Toyopearl HW-40C 凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到 Ch1~Ch10。Ch3 (3.7 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到 Ch3A~Ch3D。Ch3D (845 mg) 经 Flash C18 柱色谱分离, 0%~100% 甲醇 (含 0.5% 二乙胺) 梯度洗脱得到 Ch3D1~Ch3D14, Ch3D5 (450.6 mg) 经 Flash 正相硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇, 20:1~4:1 梯度洗脱得到 Ch3D5A~Ch3D5G。Ch3D5G (382.1 mg) 经过 HPLC 分离 (GRACE C18, 68% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到两个混合物 Ch3D5G1 ($t_r = 28.7$ min) 和 Ch3D5G2 ($t_r = 31.6$ min), Ch3D5G1 进一步经过 HPLC 分离 (PFP, 66% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到化合物 **12** (7.55 mg, $t_r = 24.1$ min)。Ch3D5G2 进一步经过 HPLC 分离 (PFP, 66% 甲醇, 3 mL·min⁻¹) 得到化合物 **11** (14.4 mg, $t_r = 17.8$ min)。Ch3D7 (70 mg) 进行制备 TLC (展开剂: 二氯甲烷-甲醇, 8:1, v/v) 得到一个混合物 ($R_f \approx 0.31$), 进一步经过 HPLC 分离 (PFP, 68% 甲醇, 含 0.5% 三氟乙酸, 3 mL·min⁻¹) 得到化合物 **1** (0.51 mg, $t_r = 21.3$ min)、**3** (0.42 mg, $t_r = 24.7$ min)、**13** (14.1 mg, $t_r = 39.5$ min) 和 **14** (9.3 mg, $t_r = 42.7$ min)。

Ck (3.7 g) 经 Flash C18 柱色谱分离, 0%~100% 甲醇 (含 0.5% 三氟乙酸) 得到 Ck1~Ck12。Ck8,9 合并 (477.3 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 2:1 洗脱, 得到 Ck8A~Ck8N。Ck8M (44 mg) 经过 HPLC 分离 (C18 MG II, 67% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到 Ck8M1~5, Ck8M5 ($t_r = 31.3$ min) 经过 HPLC 分离 (PFP, 65% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到 Ck8M5A~D, Ck8M5D ($t_r = 20.2$ min) 经过 HPLC 分离 (CD-Ph, 59% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到 Ck8M5D1~3, Ck8M5D3 ($t_r = 30.8$ min) 继续经过 HPLC 分离 (PFP, 63% 甲醇, 2 mL·min⁻¹), 并继续使用 HPLC 纯化 (GRACE C18, 66% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到化合物 **4** (0.75 mg, $t_r = 30.8$ min) 和 **8** (3.43 mg, $t_r = 27.0$ min)。Ck10 (181 mg)

经 LH-20 凝胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 2:1 洗脱, 得到 Ck10A~Ck10E, Ck10D (28.7 mg) 经过 HPLC 分离 (C18 MG II, 67% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到 Ck10D1~3, Ck10D3 (5.0 mg, $t_r = 35.4$ min) 再用 HPLC 分离 (GRACE C18, 61% 甲醇, 2 mL·min⁻¹), 并进一步用 HPLC 纯化 (PFP, 60% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到化合物 **5** (0.3 mg, $t_r = 50.1$ min)。Ck11 和 Ck12 合并, 称重 639 mg, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 2:1 洗脱, 得到 Ck11A 和 Ck11B, 其中 Ck11B (10.0 mg) 经 HPLC 纯化 (GRACE C18, 68% 甲醇, 2 mL·min⁻¹) 得到化合物 **6** (1.65 mg, $t_r = 34.3$ min) 和 **7** (1.92 mg, $t_r = 31.2$ min)。

化合物 **1**: 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20} +251.0$ (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.37), 222 (sh, 4.23) nm; CD (MeOH): 234 ($\Delta\epsilon +30.06$) nm; IR ν_{max} 3 433, 2 926, 1 695, 1 456, 1 379, 1 208, 1 145, 1 012, 857, 725 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz)、¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) 数据, 见表 1; (+)-HR-ESI-MS m/z 509.324 2 [M+Na]⁺ (C₃₀H₄₆O₅Na 计算值, 509.323 8)。

化合物 **2**: 针状结晶 (MeOH), mp > 300 °C; $[\alpha]_D^{20} +36.6$ (c 0.08, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 206 (3.48), 265 (2.93) nm; CD (MeOH): 200 ($\Delta\epsilon +7.02$) nm; IR ν_{max} 3 418, 2 931, 2 877, 1 687, 1 448, 1 383, 1 209, 1 145, 1 048, 845, 803, 728 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 700 MHz)、¹³C NMR (CD₃OD, 175 MHz) 数据, 见表 1; (+)-HR-ESI-MS m/z 485.326 3 [M+H]⁺ (C₃₀H₄₅O₅ 计算值, 485.326 2)。X-ray 单晶衍射数据: C₃₀H₄₄O₅·3 (CH₃OH), $M = 580.77$, 单斜晶系 (monoclinic), $a = 12.954 9$ (2) Å, $b = 7.972 70$ (10) Å, $c = 15.184 3$ (2) Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 91.954 0$ (10)°, $V = 1 567.41$ (4) Å³, $\rho = 1.231$ g·cm⁻³, space group P2₁ (no.4), $T = 100.00$ (10) K, $Z = 2$, μ (Cu K α) = 0.694, 收集 18 559 个单晶衍射数据, 其中 6 718 个独立衍射数据, $R_{int} = 0.031 2$, $R_1 = 0.030 1$ [$I > 2\sigma(I)$], $wR_2 = 0.079 2$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.031 5$ (all data), $wR_2 = 0.080 0$ (all data), $F^2 = 1.059$; CCDC 2 219 394。

化合物 **3**: 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20} -15.6$ (c 0.18, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 203 (4.07), 242 (4.34) nm; CD (MeOH): 243 ($\Delta\epsilon -9.06$) nm; IR ν_{max} 3 446, 2 931, 2 871, 1 690, 1 456, 1 372, 1 209, 1 145, 1 037, 802, 727 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz)、¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) 数据, 见表 1; (+)-HR-ESI-MS m/z 511.340 1 [M+Na]⁺ (C₃₀H₄₈O₅Na 计算值, 511.339 4)。

化合物 **4**: 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20} +8.0$ (c 0.08, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 203 (6.56), 284 (5.78); CD (MeCN): 219 ($\Delta\epsilon -1.76$) nm; IR ν_{max} 3 401, 3 000,

1 683, 1 447, 1 379, 1 206, 1 143, 1 034, 724 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz)、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) 数据, 见表 2; (+)-HR-ESI-MS m/z 543.328 9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7\text{Na}$ 计算值, 543.329 2)。

化合物 5: 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -4.1 (c 0.27, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 203 (6.68) nm; CD (MeCN): 214 ($\Delta\epsilon$ -3.49), 301 ($\Delta\epsilon$ -0.07) nm; IR ν_{max} 3 443, 2 973, 2 931, 1 697, 1 457, 1 383, 1 258, 1 199, 1 157, 1 110 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz)、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) 数据, 见表 2。(+)HR-ESI-MS m/z 541.313 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{Na}$ 计算值, 541.313 6)。

化合物 6: 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +23.6 (c 0.17, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 204 (6.58); CD (MeCN): 222 ($\Delta\epsilon$ -2.12) nm; IR ν_{max} 3 397, 2 936, 2 875, 1 689, 1 461, 1 400, 1 270, 1 234, 1 159, 1 075, 1 029, 1 004, 960 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz)、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据, 见表 2; (-)HR-ESI-MS m/z 517.316 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7$ 计算值, 517.316 0)。

化合物 7: 无色簇状结晶 (MeOH), mp > 300 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +24.0 (c 0.19, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 204 (6.58); CD (MeCN): 219 ($\Delta\epsilon$ -2.63) nm; IR ν_{max} 3 427, 2 935, 2 877, 1 698, 1 457, 1 380, 1 239, 1 203, 1 147, 1 069, 1 046, 1 028, 923 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz)、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) 数据, 见表 3; (-)HR-ESI-MS m/z 517.317 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7$ 计算值, 517.316 0)。X-ray 单晶衍射数据: $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7$, M = 518.67, 正交晶系(orthorhombic), a = 11.501 2 (2) \AA , b = 14.634 6 (2) \AA , c = 15.835 7 (2) \AA , $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$, V = 2 665.39 (7) \AA^3 , ρ = 1.293 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, space group P212₁2₁ (no.19), T = 100.00 (10) K, Z = 4, $\mu(\text{Cu K}\alpha)$ = 0.729, 收集 25 533 个单晶衍射数据, 其中 5 401 个独立衍射数据, R_{int} = 0.033 3, R_1 = 0.031 61 [$I > 2\sigma(I)$], wR_2 = 0.083 0 [$I > 2\sigma(I)$], R_1 = 0.033 2 (all data), wR_2 = 0.084 2 (all data), F^2 = 1.057; CCDC 2 219 393。

化合物 8: 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +7.0 (c 0.34, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 204 (6.80); CD (MeCN): 217 ($\Delta\epsilon$ -2.26) nm; IR ν_{max} 3 408, 2 934, 1 682, 1 455, 1 204, 1 144, 1 004, 807, 723 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz)、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) 数据, 见表 3; (+)HR-ESI-MS m/z 543.329 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7\text{Na}$ 计算值, 543.329 2)。

2 TGF- β 诱导HSC-T6细胞活化的抑制活性筛选

HSC-T6 细胞以每毫升 8×10^4 个接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL , 培养 24 h 后, 加入不同浓度的待测受试物, 同时设溶剂对照组。每组 3 个平行孔。

药物作用细胞 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入用无血清 DMEM 配制的 MTT (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 液 100 μL , 继续培养 4 h, 弃去 MTT 液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 振荡混合器振荡 10 min, 于酶标仪 (型号 Multiskan FC) 570 nm 波长处测定吸光度值。细胞存活率 (%) = 给药细胞 OD 平均值/溶剂对照细胞 OD 平均值 $\times 100\%$ 。

HSC-T6 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 加入无毒浓度的待测化合物及 TGF- β (终浓度 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 同时设溶剂空白对照组及模型组。继续作用细胞 24 h。弃去培养液, 每孔加入 MTT (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 液 100 μL , 继续培养 4 h, 弃去 MTT 液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 振荡混合器振荡, 于酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度值。细胞存活率 (%) = 给药组 OD 平均值/溶剂对照组 OD 平均值 $\times 100\%$ 。筛选化合物及实验结果见表 4。

作者贡献: 石建功负责实验设计、数据分析, 以及文章的修改及定稿; 郭庆兰负责实验指导、数据分析及文章的修改; 张卿负责化学实验实施及文章初稿的撰写; 雷小强负责化学实验指导; 李若斐参与了药材的初步分离实验; 孙华负责 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞活化活性评价; 徐成博和朱承根辅助开展化学实验。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020) (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 268.
- [2] Yu Q, Ye M, Zhang P, et al. Lingjiao gouteng decoction and its clinical application [J]. Chin Med Mod Distance Educ China (中国中医药现代远程教育), 2022, 20: 198-200.
- [3] Wu D, Guo X, Xie L. Effect of Tianma Gouteng decoction in the treatment of posterior circulation ischemic vertigo of liver-yang hyperactivity [J]. J Med Inform (医学信息), 2022, 35: 148-150.
- [4] Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae) [J]. Phytochemistry, 2005, 66: 5-29.
- [5] Ndagijimana A, Wang XM, Pan GX, et al. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies [J]. Fitoterapia, 2013, 86: 35-47.
- [6] Zhang Q, Zhao JJ, Xu J, et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria* [J]. J Ethnopharm, 2015, 173: 48-80.
- [7] Zhang JG, Chen JJ, Geng CA. Advances in indole alkaloids from traditional Chinese medicine of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* documented in Chinese Pharmacopoeia [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 685-695.
- [8] Liang JH, Wang C, Huo XK, et al. The genus *Uncaria*: a review

- on phytochemical metabolites and biological aspects [J]. *Fitoterapia*, 2020, 147: 104772.
- [9] Yang W, Ip SP, Liu L, et al. *Uncaria rhynchophylla* and its major constituents on central nervous system: a review on their pharmacological actions [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18: 346-357.
- [10] Qin N, Lu X, Liu Y, et al. Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 210: 112960.
- [11] Geng CA, Huang XY, Ma YB, et al. (±)-Uncarilins A and B, dimeric isoechinulin-type alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Nat Prod*, 2016, 80: 959-964.
- [12] Guo Q, Si X, Shi Y, et al. Glucoconjugated monoterpene indole alkaloids from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82: 3288-3301.
- [13] Zhou HF, Li WY, Peng LY, et al. Rhynchines A–E: Ca_v3.1 calcium channel blockers from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Org Lett*, 2021, 23: 9463-9467.
- [14] Wang Y, Guo QL, Li RF, et al. Two folate-derived analogues from an aqueous decoction of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17: 928-934.
- [15] Cai J, Guo QL, Li RF, et al. Alkaloids from an aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1075-1081.
- [16] Li RF, Guo QL, Zhu CG, et al. Minor triterpenes from an aqueous extract of the hook-bearing stem of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23: 307-317.
- [17] Li RF, Zhu CG, Xu CB, et al. Minor alkaloids from an aqueous extract of the hook-bearing stem of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23: 513-526.
- [18] Song LL, Wang Y, Li RF, et al. Megastigmanes from an aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1832-1839.
- [19] Song LL, Wang Y, Xu CB, et al. Minor monoterpene derivatives from an aqueous extract of the hook-bearing stem of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 24: 432-444.
- [20] Burgstahler AW, Barkhurst RC. π - π^* Region cotton effects of cyclic conjugated dienes and enones. Interpretation in terms of allylic axial chirality contributions [J]. *J Am Chem Soc*, 1970, 96: 7601-7603.
- [21] Wang R, Jin M, Jin C, et al. Three new ursane-type triterpenoids from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their cytotoxic activity [J]. *Phytochem Lett*, 2019, 32: 96-100.
- [22] Ma X, Yang C, Zhang Y. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data for three polyhydroxylated 12-ursen-type triterpenoids from *Dischidia esquirolii* [J]. *Magn Reson Chem*, 2008, 46: 571-575.
- [23] Abdjul DB, Yamazaki H, Maarisit W, et al. Oleanane triterpenes with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from aerial parts of *Lantana camara* collected in Indonesia and Japan [J]. *Phytochemistry*, 2017, 144: 106-112.
- [24] Moffitt W, Woodward RB, Moscovitz A, et al. Structure and the optical rotatory dispersion of saturated ketones [J]. *J Am Chem Soc*, 1961, 83: 4013-4018.
- [25] Zhang Y, Yang W, Yao C, et al. New triterpenic acids from *Uncaria rhynchophylla*: chemistry, NO-inhibitory activity, and tandem mass spectrometric analysis [J]. *Fitoterapia*, 2014, 96: 39-47.
- [26] Sun G, Zhang X, Xu X, et al. A new triterpene from the plant of *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Molecules*, 2012, 17: 504-510.
- [27] Wang ZW, Wang JS, Luo J, et al. α -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata* [J]. *Fitoterapia*, 2013, 90: 30-37.
- [28] Cao YG, Zhang YL, Zeng MN, et al. Renoprotective mono- and triterpenoids from the fruit of *Gardenia jasminoides* [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83: 1118-1130.
- [29] Yu Q, Gao W, Zhang Y, et al. Studies on chemical constituents in herb of *Centella asiatica* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 1182-1184.
- [30] Cuong LCV, Anh LT, Dat TTH, et al. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of secondary metabolites from *Ophiorrhiza baviensis* growing in Thua Thien Hue, Vietnam [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35: 4218-4224.
- [31] Kitajima M, Hashimoto K, Yokoya M, et al. Two new 19-hydroxy-ursolic acid-type triterpenoids from Peruvian 'Uña de Gato' (*Uncaria tomentosa*) [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 547-552.
- [32] Maillard M, Adewunmi CO, Hostemann K. A triterpene glycoside from the fruits of *Tetrapleura tetraptera* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1321-1323.
- [33] Darshani P, Sarma SS, Srivastava AK, et al. Anti-viral triterpenes: a review [J]. *Phytochem Rev*, 2022. DOI 10.1007/s11101-022-09808-1.
- [34] Yang D, Han N, Wang YW, et al. Pentacyclic triterpenoid saponins, poterinasides A–J, from *Silverweed cinquefoil* roots promising hepatoprotective and anti-inflammatory agents [J]. *J Org Chem*, 2021, 86: 11220-11236.