

九香虫水提取物中一对新颖 *Z/E* 异构化的吡啶季胺盐

王春江¹, 杨灿熙⁴, 任凌希⁵, 刘韶^{2,3*}, 蒋跃平^{2,3*}

(1. 中南大学湘雅三医院药学部, 湖南长沙 410013; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 湖南长沙 410008; 3. 中南大学湘雅医院, 国家老年疾病临床医学研究中心, 湖南长沙 410008; 4. 中国药科大学药学院, 江苏南京 210009; 5. 吉首大学药学院, 湖南吉首 416000)

摘要: 采用大孔吸附树脂、正相硅胶、反向半制备等色谱技术, 从中药九香虫水提取物中分离得到一对 *Z/E* 异构化吡啶季胺盐新颖碳骨架类化合物。通过核磁共振、红外、质谱等多种光谱技术鉴定了两个新化合物 **1** 和 **2** 的结构分别为 (*Z*)-3-(but-1"-en-1"-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, 命名为 aspongopyridine A 和 (*E*)-3-(but-1"-en-1"-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, 命名为 aspongopyridine B。此外, 还对化合物 **1** 和 **2** 的体外抗炎、抗肿瘤、乙酰胆碱酯酶抑制和丁酰胆碱酯酶抑制活性进行了评价, 结果表明化合物 **1** 和 **2** 有微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

关键词: 九香虫; 水提取物; 吡啶季胺盐; 新颖碳骨架; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0166-04

An unprecedented pair of *Z/E* isomeric pyridinium compound from the aqueous extract of *Aspongopus chinensis* Dallas

WANG Chun-jiang¹, YANG Can-xi⁴, REN Ling-xi⁵, LIU Shao^{2,3*}, JIANG Yue-ping^{2,3*}

(1. Department of Pharmacy, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Institute for Rational and Safe Medication Practices, National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 4. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 5. School of Pharmaceutical Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: A novel pair of *Z/E* isomeric compounds with unprecedented carbon skeleton were isolated from an aqueous extract of *Aspongopus chinensis* Dallas by macroporous resin, silica gel, and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC). Their structures were identified by nuclear magnetic resonance (NMR), Infrared spectroscopy (IR), Mass spectroscopy (MS) and other spectroscopic methods as (*Z*)-3-(but-1"-en-1"-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, namely aspongopyridine A, and (*E*)-3-(but-1"-en-1"-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, namely aspongopyridine B, respectively. Besides, the anti-inflammatory, anti-tumor, acetylcholinesterase inhibition and butyrylcholinesterase inhibition activities of the compounds **1** and **2** were evaluated. The results showed that compounds **1** and **2** have no anti-inflammatory, anti-tumor, and butyrylcholinesterase inhibition activities instead of weak acetylcholinesterase inhibition activity.

Key words: *Aspongopus chinensis* Dallas; aqueous extract; pyridinium; unprecedented carbon skeleton; acetylcholinesterase inhibition activity

收稿日期: 2023-04-03; 修回日期: 2023-05-15.

*通讯作者 Tel: 86-731-84327454, E-mail: liushao999@csu.edu.cn;

Tel: 86-731-84327460, E-mail: jiangyueping@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0400

九香虫为蝽科昆虫九香虫 (*Aspongopus chinensis* Dallas) 的干燥体, 主要分布在贵州、四川、广西和云南等省份, 它具有理气止痛, 温中助阳的功效, 常用于胃寒胀痛, 肝胃气痛, 肾虚阳痿, 腰膝酸痛^[1,2]。化学成分研究表明, 九香虫中含有脂肪酸类、核苷类、氨基酸类和肽类等成分^[3,4]。现代药理学研究表明, 九香虫具有抗癌、抗菌、抗炎、抗过敏、抗氧化和抗消化性溃疡等活性^[4-7]。九香虫除了药用价值外, 还富含蛋白质、脂肪酸、微量元素及维生素等营养物质, 在贵州、云南等地还常作为一种食物^[8]。但是目前对九香虫的药效成分挖掘还不够充分, 并且很多化学成分的研究都是针对九香虫的醇提取物, 对九香虫水提取物中化学成分的研究比较少。本研究利用多种分离手段和光谱技术从九香虫水提取物中分离了两个具有新颖碳骨架的吡啶季胺盐类化合物 (**1** 和 **2**), 并且对这两个化合物的体外抗炎, 抗肿瘤, 乙酰胆碱酯酶抑制和丁酰胆碱酯酶抑制活性进行了评价, 结果表明化合物 **1** 和 **2** 只表现出微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1**, 棕黄色不定形粉末, 易溶于甲醇和水, 通过高分辨质谱 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 m/z 220.170 5 $[M]^+$ (计算值 220.170 1, $C_{14}H_{22}NO^+$) 确定其分子式为 $C_{14}H_{22}NO$, 不饱和度为 5。红外光谱中 3 390、1 653、1 615 cm^{-1} 的吸收峰表明该化合物结构中存在羟基和苯环或者双键。在 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) 图谱中, 观察到 3 个芳香氢信号 (δ_H 8.69, d, $J = 6.0$ Hz, 1H; 8.61, s, 1H; 7.94, d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 2 个顺式双键氢信号 (δ_H 6.50, d, $J = 11.4$ Hz, 1H; 6.15, dt, $J = 11.4, 7.8$ Hz, 1H), 两个连氧或者氮的亚甲基信号 (δ_H 4.64, t, $J = 4.8$ Hz, 2H; 3.97, t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3 个脂肪族亚甲基信号 (δ_H 2.87, t, $J = 7.8$ Hz, 2H; 2.17, quin, $J = 7.8$ Hz, 2H; 1.71, m, 2H), 2 个甲基信号 (δ_H 1.50, t, $J = 7.8$ Hz, 3H; 1.02, t, $J = 7.8$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR 谱显示该化合物有 14 个碳信号, 其中芳香区 7 个碳信号 (δ_C 162.3, 144.9, 143.6, 142.1, 138.1, 128.8, 121.2), 2 个连氧或者氮碳信号 (δ_C 64.2, 61.7), 高场区 4 个碳信号 (δ_C 36.1, 23.4, 22.7, 14.0)。根据以上波谱学数据和质谱数据 (表 1), 推测该化合物可能是一个吡啶季胺盐类化合物。在 2D NMR 图谱中, HSQC 图谱对化合物 **1** 的直接连氢碳进行了准确归属。 1H - 1H COSY 中, H-1'/H-2' 相关; H-1''/H-2''/H-3''/H-4'' 相关; H-1'''/H-2'''/H-3''' 相关。HMBC 中的主要相关如下 (图 1): H-1' 与 C-2, C-6, C-2' 相关; H-2' 与 C-1' 相关; H-2 与 C-1'', C-1''', C-3, C-4, C-6

相关; H-5 与 C-3, C-6, C-1''' 相关; H-1'' 与 C-2'', C-3'', C-2, C-3, C-4 相关; H-2'' 与 C-3, C-1'', C-3'', C-4'' 相关; H-1''' 与 C-3, C-4, C-5, C-2''', C-3''' 相关; 其中 H-1' 与 C-2, C-6, C-2' 相关和 H-2' 与 C-1' 相关表明一个羟乙基连在吡啶氮原子上, 由于 H-1'' 与 H-2'' 之间的偶合常数为 11.4 Hz, 且 H-1'' 与 C-2'', C-3'', C-2, C-3, C-4 相关, 表明 (Z)-1-烯丁基连在吡啶 C-3 位上, H-1''' 与 C-3, C-4, C-5, C-2''', C-3''' 相关, 表明一个丙基连在吡啶 C-4 位上。综合以上信息, 化合物 **1** 的平面结构确定为 (Z)-3-(but-1''-en-1''-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, 命名为 aspongopyridine A。

Table 1 1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **1** and **2** in CD_3OD (J in Hz)

No.	Compound 1		Compound 2	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	8.61 s	144.9	8.90 s	142.6
3		138.1		139.0
4		162.9		160.4
5	7.94 d, $J = 6.0$ Hz	128.8	7.85, d, $J = 6.0$ Hz	128.8
6	8.69, d, $J = 6.0$ Hz	143.6	8.61, d, $J = 6.0$ Hz	142.8
1'	4.64, t, $J = 4.8$ Hz	64.2	4.63, t, $J = 4.8$ Hz	64.2
2'	3.97, t, $J = 4.8$ Hz	61.7	3.99, t, $J = 4.8$ Hz	61.6
1''	6.50, d, $J = 11.4$ Hz	121.1	6.69, d, $J = 15.6$ Hz	121.5
2''	6.15, dt, $J = 11.4, 7.8$ Hz	142.1	6.56, dt, $J = 15.6, 6.6$ Hz	143.5
3''	2.18 quin, $J = 7.8$ Hz	22.7	2.38, quin, $J = 6.6$ Hz	27.4
4''	1.05, t, $J = 7.8$ Hz	14.0	1.16, t, $J = 6.6$ Hz	13.4
1'''	2.87, t, $J = 7.8$ Hz	36.1	2.93, t, $J = 7.8$ Hz	35.8
2'''	1.71, m	23.4	1.72, m	23.4
3'''	1.02, t, $J = 7.8$ Hz	14.0	1.05, t, $J = 7.8$ Hz	14.0

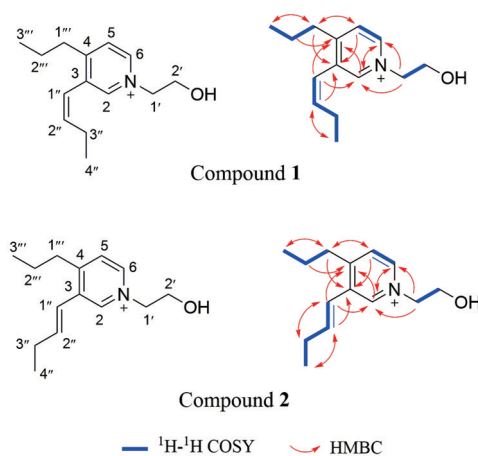


Figure 1 Structure and key HMBC and 1H - 1H COSY correlations of compounds **1** and **2**

化合物 **2**, 棕黄色不定形粉末, 易溶于甲醇和水, 通过高分辨质谱 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 m/z 220.170 5 $[M]^+$ (计算值 220.170 1, $C_{14}H_{22}NO^+$) 确定其分子式为 $C_{14}H_{22}NO$, 不饱和度为 5。化合物 **2** 的 IR、UV 和 NMR 波谱数据 (表 1) 与化合物 **1** 的波谱数据非常

相似, ^1H NMR 中除了在化合物 **2** 的 H-2, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'' 分别向低场移动 $\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.31, 0.19, 0.41, 0.20, 0.11 ppm 外, 其他氢信号变化不大。在 ^{13}C NMR 中除了在化合物 **2** 的 C-2, C-4 分别向高场移动 $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2.3, 2.5 ppm 外, C-3, C-2'', C-3'' 分别向低场移动 $\Delta\delta_{\text{C}}$ 1.0, 1.4, 4.7 ppm, 其他碳信号基本不变。由于 H-1'' 与 H-2'' 之间的偶合常数为 15.6 Hz, 在结合 2D NMR 波谱数据 (图 1), 化合物 **2** 的结构可以确定为 (*E*)-3-(but-1''-en-1''-yl)-1-(2'-hydroxyethyl)-4-propylpyridin-1-ium, 命名为 aspongopyridine B。

2 化合物活性评价

采用 Griess 法^[9]评价化合物 **1** 和 **2** 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放一氧化氮 (NO) 的影响。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 未表现出明显的对 NO 的释放抑制作用。

采用 MTS 方法^[10]评价化合物 **1** 和 **2** 对白血病 HL-60 细胞, 肺癌 A549 细胞, 肝癌 SMMC-7721 细胞, 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 结肠癌 SW480 细胞增殖抑制的影响。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 未表现出明显的 5 种肿瘤细胞增殖抑制活性。

采用 Ellman 等^[11]的方法评价化合物 **1** 和 **2** 对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶活性的影响。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 对丁酰胆碱酯酶未表现出明显的抑制活性。在乙酰胆碱酯酶抑制活性评价中, 阳性药物他克林 (浓度为 $0.333 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对乙酰胆碱酯酶的抑制率为 $63.20\% \pm 0.97\%$, 化合物 **1** 和 **2** (两个化合物浓度均为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 表现出微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 抑制率分别为 $22.47\% \pm 0.99\%$ 和 $26.44\% \pm 2.48\%$ 。

3 讨论

本实验从中药九香虫水提取中分离鉴定了 2 个吡啶季胺盐类新颖碳骨架化合物, 二者互为 *Z/E* 几何异构体, 两个化合物的碳骨架特征是在吡啶环的 3 位有一个 1'-丁烯基和 4 位有一个丙基, 另外吡啶环上的 N 原子上含有一个羟乙基形成 4 价 N 原子。由于实验过程中使用了唯一的酸-甲酸, 因此化合物 **1** 和 **2** 中的季 N 可能与甲酸根离子形成季胺盐。由于两个化合物是 *Z/E* 几何异构体, 其中化合物 **1** 位 *Z* 式双键, 从结构稳定性方面考虑, 化合物 **1** 有可能转化为双键结构更稳定的 *E* 式 (化合物 **2**), 因此, 化合物 **1** 可能不稳定, 这也是化合物 **1** 的图谱中存在明显杂质的原因之一。九香虫中富含脂肪酸、氨基酸类、核苷类及肽类化合物^[3,4], 但是很少报道吡啶季胺盐类成分, 这可能与以往的对九香虫的研究很少聚焦水提取物中大极性成分有关。化合物 **1** 和 **2** 的发现丰富了九香虫的化学成分的结构类型, 为后续九香虫的药效物质基础研究提供了线索。

另外, 本研究还对两个化合物进行了部分活性筛选, 结果表明化合物 **1** 和 **2** 未显示出明显的体外抗炎、抗肿瘤和丁酰胆碱酯酶抑制活性, 只表现出微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 其他生物活性的评价还需进一步研究。

实验部分

Nicolet IS50 FT-IR 光谱仪和 CO_2 细胞培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。Bruker-600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Agilent Q-TOF 6545 光谱仪测量、Agilent 1260 高效液相色谱仪、Zorbax SB-C8 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 9.4 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 美国 Agilent 公司; 柱层析采用硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); MCI 凝胶 (CHP20P, 日本三菱化学公司); 大孔吸附树脂 (HPD-300, 郑州化工科技有限公司); 薄层色谱硅胶 GF254 (青岛海洋化工厂)。甲醇 (色谱级)、乙腈 (色谱级), 美国 Tedia 公司; 其他所用试剂均为分析纯 (成都市科隆化学品有限公司); 新生牛血清 (批号 12B196, 浙江天杭生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基 (批号 8122184, 美国 Gibco 公司); Griess Reagent, 脂多糖及对照药物他克林购自美国 Sigma 公司。药材购买于安徽亳州药材市场, 经中南大学刘韶教授鉴定为九香虫 (*Aspongopus chinensis* Dallas), 九香虫标本 (ID 20200320) 存放于中南大学湘雅医院药学部。

1 提取分离

将干燥九香虫成体 500g 水煎煮提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩得到九香虫水提取物 (90 g), 水提物上大孔树脂色谱柱, 分别以水、50% 乙醇、80% 乙醇梯度洗脱, 减压浓缩分别得到九香虫水提取物大孔树脂水系统部位 (JXC-A), 50% 乙醇洗脱部位 (JXC-B) 和 80% 乙醇洗脱部位 (JXC-C)。JXC-A (20 g) 硅胶拌样, 干法上样进行正相硅胶柱色谱分离, 分别以二氯甲烷-甲醇系统 (50:1→0:1) 梯度洗脱, 硅胶点板合并得到 16 个组分 (JXC-A-1~JXC-A-16)。JXC-A-6 (150 mg) 经反向半制备色谱 (80% 乙腈:20% 水含 0.1% 甲酸) 制备得到化合物 **1** (16 mg, $t_{\text{R}} = 53.8 \text{ min}$) 和化合物 **2** (18 mg, $t_{\text{R}} = 64.5 \text{ min}$)。

2 结构鉴定

化合物 **1**, 棕黄色不定形粉末; UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 225.0 (3.64) nm; IR $_{\text{vmax}}$ 3 390, 2 928, 1 653, 1 615, 1 441, 1 228, 818 cm^{-1} ; (+)-HR-ESI-MS m/z 220.170 5 $[\text{M}]^+$ (计算值 220.170 1, $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}^+$); ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) 数据见表 1。

化合物 **2**, 棕黄色不定形粉末; UV (MeOH) λ_{max}

(log ϵ) 230 (3.73), 260 (3.38) nm; IR $_{\max}$ 3 385, 2 917, 1 649, 1 618, 1 385, 1 182, 834 cm^{-1} ; (+)-HR-ESI-MS m/z 220.170 1 [M]⁺ (计算值 220.170 1, C₁₄H₂₂NO⁺); ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) 数据见表 1。

3 化合物活性检测

采用 Ellman 等^[11]方法评价化合物 **1** 和 **2** 对乙酰胆碱酯酶活性的影响, 以他克林为阳性对照药物。用磷酸盐缓冲液将 AChE 稀释成 0.1 U·mL⁻¹ 工作液。化合物稀释成 1 mmol·L⁻¹ 工作液, 终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阳性对照为他克林终浓度为 0.333 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 阴性对照组 (NC 组) 为 2% DMSO 溶剂对照。反应在 96 孔板中进行, 向 96 孔板中依次加入下列试剂 (加入试剂的体积为一个反应的体积), 每个样品做 3 个重复。加入显色剂和底物后 1 h 内, 每 30 秒钟检测一次 405 nm 吸光值。选择 NC 组吸光值平均值约为 1 时的样品吸光值, 计算化合物吸光值平均值 (化合物测定值-背景值), 并按照 (NC-化合物吸光值平均值)/NC×100% 计算化合物 AChE 抑制率。

作者贡献: 蒋跃平负责谱图解析及文章的写作; 刘韶负责实验设计; 任凌希负责药材的提取和粗分; 杨灿熙负责化合物分离纯化; 王春江和蒋跃平负责生物活性评价及稿件修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 11.
- [2] Tan J, Tian Y, Cai R, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of a protein component purified from *Aspongopus chinensis* Dallas on cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 8934794.
- [3] Zhang FY, Li BC, Wen Y, et al. An integrated strategy for the comprehensive profiling of the chemical constituents of *Aspongopus chinensis* using UPLC-QTOF-MS combined with molecular networking [J]. Pharm Biol, 2022, 60: 1349-1364.
- [4] Li S, Li L, Peng HB, et al. Advances in studies on chemical constituents pharmacological effects and clinical application of *Aspongopus chinensis* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 45: 303-311.
- [5] Hou XH, Sun T, Li XF. Effects of *Aspongopus chinensis* Dallas extracts on cell proliferation and cell cycle of SGC-7901 and HepG2 cell lines [J]. Chin Tradit Patent Med (中成药), 2012, 34: 2278-2281.
- [6] Wu ML, Jin DC. The antibacterial activity of the haemolymph and the purified haemo-protein from *Aspongopus chinensis* [J]. Chin Bull Entomol (昆虫知识), 2005, 42: 315-318.
- [7] Xu ZJ. HPLC Fingerprint Identification and Anticoagulant Activity of *Aspongopus chinensis* (九香虫 HPLC 指纹特征鉴别与抗凝血活性研究) [M]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2019.
- [8] Zhang L, Guo JJ. A review on research and application on the resource of *Aspongopus chinensis* [J]. J Southwest China Norm Univ (Nat Sci Ed) (西南师范大学学报 自然科学版), 2011, 36: 151-155.
- [9] Zong MY. Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpenoids from Roots of *Daphne genkwa* and their Regulatory Mechanism on Inflammatory Signaling Pathways (芫花根中倍半萜类成分的抗炎活性及机制研究) [D]. Yantai: Yantai University, 2021.
- [10] Liao GF, Mo LY, Teng MX, et al. A new macrocyclic flavonoid from *Onychium japonicum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 423-428.
- [11] Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7: 88-95.