

角茴香中1个新的吡嗪类生物碱

刘云¹, 胡梦雅¹, 张文静¹, 范雨欣¹, 徐瑞雯¹, 朱登辉¹, 孙彦君^{1,2},
冯卫生^{1,2*}, 陈辉^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046)

摘要: 采用硅胶、ODS、MCI等柱色谱以及半制备液相等现代色谱分离技术对角茴香 (*Hypecoum erectum* L.) 正丁醇萃取部位的化学成分进行分离纯化, 得到4个吡嗪类生物碱。运用现代波谱学方法 (1D NMR、2D NMR、UV、IR、MS等) 鉴定结构分别为 hyperectpyrazin A (**1**)、1'S-(6-methylpyrazin-2-yl)-ethane-1',2'-diol (**2**)、2-hydroxymethyl-6-methylpyrazin (**3**) 和 pyrazine-2-carboxylic acid (**4**)。化合物**1**为1个新的吡嗪类生物碱, 化合物**2**~**4**为首次从角茴香中分离得到, 并首次通过 Mo₂(OAc)₄诱导的 CD 谱确定了化合物**2**的绝对构型。采用乙酰胆碱酯酶抑制模型和脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型, 对化合物**1**~**4**进行体外活性评价, 其中化合物**2**和**4**表现出一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性, 在终浓度为 50 μmol·L⁻¹时对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为 44.40% 和 43.99%。

关键词: 角茴香; 化学成分; 吡嗪类生物碱; hyperectpyrazin A; 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)01-0183-05

A new pyrazine from *Hypecoum erectum* L.

LIU Yun¹, HU Meng-ya¹, ZHANG Wen-jing¹, FAN Yu-xin¹, XU Rui-wen¹, ZHU Deng-hui¹,
SUN Yan-jun^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2*}, CHEN Hui^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Co-construction of Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Four pyrazines were isolated from the *n*-butanol fraction of *Hypecoum erectum* L. by using various chromatographic methods, including MCI gel, ODS, silica gel and semi-preparative HPLC. The structures of the isolated compounds were identified as hyperectpyrazin A (**1**), 1'S-(6-methylpyrazin-2-yl)-ethane-1',2'-diol (**2**), 2-hydroxymethyl-6-methylpyrazin (**3**) and pyrazine-2-carboxylic acid (**4**) by spectroscopy methods (1D NMR, 2D NMR, UV, IR, MS, etc.). The absolute configuration of compound **2** was determined by using the Mo₂(OAc)₄ induced CD analysis for the first time. Compound **1** was a new compound, compounds **2**–**4** were isolated from *H. erectum* for the first time. Compounds **1**–**4** were evaluated for their inhibition against acetylcholinesterase and nitric oxide generation induced by lipopolysaccharide-RAW264.7 macrophage cells. At a concentration of 50 μmol·L⁻¹, compounds **2** and **4** displayed inhibitory effects on acetylcholinesterase with the inhibition rates of 44.40% and 43.99%, respectively.

Key words: *Hypecoum erectum* L.; chemical constituent; pyrazines; hyperectpyrazin A; acetylcholinesterase inhibitory activity

收稿日期: 2023-04-18; 修回日期: 2023-07-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22177027).

*通讯作者 Tel: 86-371-65962746, E-mail: chenhuixy@hactcm.edu.cn;

Tel: 86-371-60190296, E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0475

角茴香为罂粟科 (Papaveraceae) 角茴香属 (*Hypecoum*) 植物角茴香 (*Hypecoum erectum* L.) 的全草, 别名咽喉草、麦黄草、黄花草等, 在我国华北、西北和东北等地大量分布^[1,2]。据《河南中草药手册》中记载: “角茴香, 味苦, 性寒, 具有清热解毒, 镇咳止痛的功效”, 主治咽喉肿痛、咳嗽、气管炎、肝炎、细菌性痢疾和目赤肿痛等症。现代药理活性研究表明角茴香主要表现为抗炎、保肝、退热和镇痛等作用^[3]。化学成分研究表明角茴香主要含有生物碱类成分, 尤以螺苜基异喹啉类生物碱研究最多^[4-6]。本课题组前期从角茴香脂溶性较强的二氯甲烷萃取部位分离得到2个骨架新颖的生物碱化合物^[7]。为进一步丰富角茴香不同萃取部位的药效物质基础研究, 本实验从角茴香正丁醇萃取部位分离得到4个吡嗪类生物碱 (图1), 包括1个新的吡嗪类生物碱 hyperectpyrazin A (**1**), 以及3个首次从角茴香中分离得到的吡嗪类生物碱 1'-S-(6-methylpyrazin-2-yl)-ethane-1', 2'-diol (**2**)、2-hydroxymethyl-6-methylpyrazin (**3**) 和 pyrazine-2-carboxylic acid (**4**)。

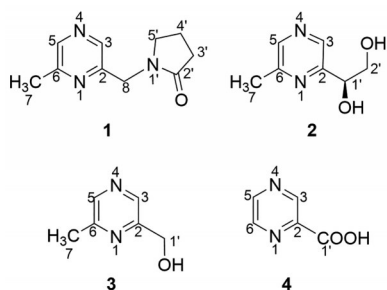


Figure 1 Structures of compounds 1-4

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1**为淡黄色油状, HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 214.095 2 $[M+Na]^+$, 计算值为 214.095 0 $[M+Na]^+$, 推测分子式为 $C_{10}H_{13}N_3O$, 不饱和度为6。化合物**1**的IR光谱数据显示其在 1 685、1 423 cm^{-1} 存在较强吸收, 表明化合物**1**的结构中可能存在吡咯烷酮片段^[8]。化合物**1**的¹H NMR (500 MHz, CD_3OD) 数据 (表1) 显示存在2个芳香氢信号 [δ_H 8.41 (1H, s, H-5), 8.35 (1H, s, H-3)], 4个亚甲基氢信号 [δ_H 4.59 (2H, s, H-8), 3.50 (2H, t, $J = 7.1$, H-5'), 2.45 (2H, t, $J = 8.1$, H-3'), 2.10 (2H, m, H-4')] 和1个甲基氢信号 [δ_H 2.55 (3H, s, H-7)]。其¹³C NMR (125 MHz, CD_3OD) 谱共显示10个碳信号, 进一步结合DEPT谱发现化合物**1**中存在1个羰基碳信号 [δ_C 178.1 (C-2')], 4个芳香碳信号 [δ_C 155.3 (C-6), 152.5 (C-2), 144.2 (C-5), 141.4 (C-3)], 4个亚甲基碳信号 [δ_C 49.2 (C-5'), 46.9 (C-8), 31.6 (C-3'), 18.9

(C-4')] 和1个甲基碳信号 [δ_C 21.4 (C-7)]。通过对比化合物**1**和已知化合物**3**的1D和2D NMR数据, 推断化合物**1**存在与化合物**3**相同的吡嗪母核。

Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of **1** (CD_3OD) and **2** ($DMSO-d_6$)

1		2	
No.	δ_H	No.	δ_C
1		1	
2		2	156.4
3	8.35 (1H, s)	3	140.1
4		4	
5	8.41 (1H, s)	5	142.7
6		6	152.0
7	2.55 (3H, s)	7	21.1
8	4.59 (2H, s)		
1'		1'	4.60 (1H, br s) 73.6
2'	178.1	2'	3.69 (1H, m) 65.7
			3.57 (1H, m)
3'	2.45 (2H, t, $J = 8.1$ Hz)	1'-OH	5.57 (1H, br s)
4'	2.10 (2H, m)	2'-OH	4.77 (1H, br s)
5'	3.50 (2H, t, $J = 7.1$ Hz)		
	49.2		

为了进一步确认化合物**1**的结构, 对化合物**1**进行了2D NMR测试。在¹H-¹H COSY谱中 (图2) 显示存在H-5'/H-4'、H-4'/H-3'的相关, 在HMBC谱中 (图2), 观察到H-3'/C-2'、H-4'/C-2'、H-5'/C-2'和C-8、H-8/C-2', C-5', C-2和C-3的相关信号, 证明化合物**1**中存在吡咯烷酮结构片段, 并通过亚甲基 (C-8) 与吡嗪母核的C-2位相连。此外, 还观察到在HMBC谱中 (图2) 存在H-7'/C-6和C-5、H-3/C-5的相关信号, 表明甲基连接在C-6位。综上所述, 化合物**1**的结构被确定为1'-((6-methylpyrazin-2-yl)methyl)-pyrrolidin-2'-one, 命名为 hyperectpyrazin A。

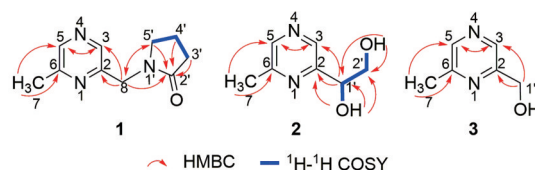


Figure 2 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compounds 1-3

化合物**2**为淡黄色油状, 其1D NMR数据在低场区与化合物**1**和**3**类似, 表明化合物**2**同样存在吡嗪母核。与化合物**1**相比, 其主要区别为化合物**2**的C-2位被乙二醇结构片段取代。其¹H-¹H COSY谱中 (图2) 存在H-1'/H-2'、H-1'/1'-OH、H-2'/2'-OH的相关, 在HMBC谱中 (图2), 观察到1'-OH/C-1'和C-2'、2'-OH/C-1'和C-2'的相关, 示为乙二醇结构片段的相关信号。此外, 在HMBC谱中 (图2) 还存在1'-OH/C-2、H-1'/C-2和C-3的相关信号, 证明化合物**2**中乙二醇结构片段连接在

吡嗪环的C-2位。在HMBC谱中还观察到存在H-7/C-6和C-5、H-3/C-5的相关信号,表明甲基连接在C-6位。化合物2的结构虽然可以在SCIFinder数据库中检索到^[9],但并未见有相关文献对其NMR数据进行详细归属,因此本文对化合物2的NMR数据进行了归属(表1)并表征了其绝对构型。

化合物2的绝对构型是通过 $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ 诱导CD实验确定的,化合物2经 $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ 试剂诱导的CD谱在315 nm处显示的正Cotton效应(图3),根据其(Mo-O)-C-C-(O-Mo)二面角扭角的符号与特定的310 nm附近谱带IV的符号相关联的螺旋规则^[10],最终将C-1'位的绝对构型指认为S。综上所述,化合物2被鉴定为1'S-(6-methylpyrazin-2-yl)-ethane-1',2'-diol。

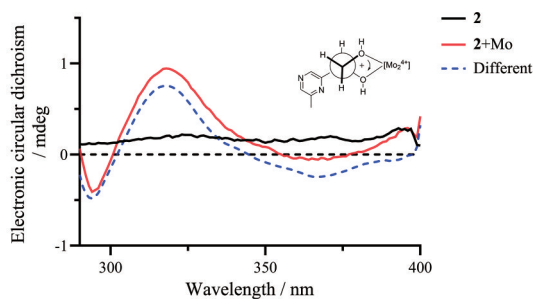


Figure 3 Induced CD spectra of compound 2

2 活性测试结果

2.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性 采用乙酰胆碱酯酶抑制模型,对化合物1~4进行乙酰胆碱酯酶抑制活性评价,在终浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,化合物2和4表现出一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性,对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为44.40%和43.99%;化合物1和3对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为28.04%和18.20%。

2.2 一氧化氮生成抑制活性 采用脂多糖诱导RAW264.7巨噬细胞炎症模型,对化合物1~4进行抗炎活性评价,在终浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,化合物1~4的一氧化氮生成抑制率分别为 $(3.99 \pm 2.09)\%$ 、 $(-0.29 \pm 1.85)\%$ 、 $(4.25 \pm 2.98)\%$ 和 $(4.99 \pm 2.00)\%$,结果表明化合物1~4均无抗炎活性。

实验部分

BrukerAM-500 MHz核磁共振谱用超导核磁共振仪(TMS做内标,德国Bruker公司);TripleTOF 6600型高效液相色谱-高分辨质谱联用仪(美国ABSCIEX);赛谱锐思LC-52型半制备液相色谱仪(中国赛谱锐思北京科技有限公司);Anton Paar MCP 5100型旋光仪(奥地利Anton Paar);Thermo EVO300紫外分光光度计和Thermo Nicolet IS10红外光谱仪(美国Thermo

Scientific);N-1100型旋转蒸发仪和EYELACA-3310型低温冷凝循环泵(日本东京理化器械株式会社);原子型1820C型纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司);MCI Gel CHP-20柱色谱材料(日本三菱化学公司);正相硅胶柱色谱材料(200~300目,青岛海洋化工厂);YMC-Pack ODS-A色谱柱(150 mm × 10 mm, 5 μm)和 C_{18} ODS柱色谱材料(50 μm,日本YMC有限公司),色谱纯及分析纯试剂(天津四友精细化学品有限公司); $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ 试剂(上海源叶生物科技有限公司)。小鼠单核巨噬细胞RAW264.7(中国科学院细胞库);DMEM培养基和胎牛血清(以色列Biological Industries公司)。Griess Reagent、脂多糖、对照药物 N^G -单甲基-L-精氨酸单乙酸盐(N^G -monomethyl-L-arginine, monoacetate salt, L-NMMA)、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)及他克林(德国Sigma公司);Multiskan FC(美国Thermo公司)。

角茴香药材于2019年9月购自河南省郑州市郑州市药材市场,经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为罂粟科角茴香属植物角茴香 *Hypecoum erectum* L. 的干燥全草。凭证样品(CH20190912J)存放于河南中医药大学中药化学研究室。

1 提取分离

角茴香干燥全草50.00 kg,95%乙醇回流提取2次,滤过,合并提取液,减压浓缩,得浸膏6.00 kg。浸膏加10倍量2%盐酸水溶液溶解,过滤得到酸水溶液和不溶物。酸水溶液以石油醚萃取得到石油醚层和酸水层。酸水层加氨水调至pH 9~10得到碱水溶液。碱水溶液依次用氯仿和正丁醇萃取得到氯仿萃取部位约330.00 g和正丁醇萃取部位约280.00 g。正丁醇萃取部位经硅胶柱色谱分离,依次用纯二氯甲烷、二氯甲烷-甲醇(50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1)和纯甲醇进行梯度洗脱,并经硅胶薄层检识,合并相同馏分得到8个组分(Fr.1~Fr.8)。Fr.3(12.25 g)经中压ODS柱色谱分离依次用甲醇-水(10%→100%)梯度洗脱并经硅胶薄层检识,合并相同馏分得到10个组分(Fr.3-B1~Fr.3-B10)。Fr.3-B6组分经硅胶柱色谱分离,依次用石油醚-乙酸乙酯(1:0、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1)进行梯度洗脱,并经硅胶薄层检识,合并相同馏分得到9个组分(Fr.3-B6-b1~Fr.3-B6-b9)。Fr.3-B6-b9组分经制备型HPLC制备(乙腈:水=12:88)得到化合物1(t_r =35.50 min;20.01 mg)。Fr.3-B2组分经制备型HPLC制备(甲醇:水=4:96)得到化合物4(t_r =19.85 min;6.00 mg)。Fr.3-B3组分经制备型HPLC制备(甲醇:水=5:95)得到化合物3(t_r =19.23 min;10.05 mg)。Fr.4(54.53 g)经中压MCI柱色谱分离依次用甲醇-水(10%→100%)

梯度洗脱并经硅胶薄层检识,合并相同馏分得到5个组分(Fr.4-C1~Fr.4-C5)。Fr.4-C1组分经硅胶柱色谱分离,依次用二氯甲烷-甲醇(1:0,30:1,20:1,10:1,5:1,2:1,1:1,0:1)进行梯度洗脱,并经硅胶薄层检识,合并相同馏分得到9个组分(Fr.4-C1-c1~Fr.4-C1-c9)。Fr.4-C1-c9组分经制备型HPLC制备(甲醇:水=5:95)得到化合物**2**($t_R = 36.12 \text{ min}; 18.13 \text{ mg}$)。

2 结构鉴定

化合物**1** 淡黄色油状,易溶于甲醇;UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 201 (3.49), 270 (3.18) nm; IR ν_{\max} 2 945, 1 685, 1 535, 1 494, 1 464, 1 423 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) 数据见表1, HR-ESI-MS m/z 214.095 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{ONa}^+$, 214.095 0)。

化合物**2** 淡黄色油状,易溶于甲醇;UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 203 (3.77), 271 (3.78) nm; IR ν_{\max} 3 336, 2 944, 1 537, 1 428, 1 162, 1 106, 1 027 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) 数据见表1, HR-ESI-MS m/z 177.063 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}^+$, 177.063 4)。

化合物**3** 黄色油状,易溶于甲醇,ESI-MS m/z 125 $[\text{M}+\text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ 。其 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} 8.51 (1H, s, H-3), 8.39 (1H, s, H-5), 4.72 (2H, s, H-1'), 2.53 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} 156.9 (C-2), 154.2 (C-6), 143.9 (C-5), 140.4 (C-3), 64.0 (C-1'), 22.2 (C-7)。以上数据与文献^[11]报道基本一致,并进一步经HMBC图谱证实(图2),确定化合物为2-hydroxymethyl-6-methylpyrazin。

化合物**4** 无色透明晶体,易溶于甲醇,ESI-MS m/z 125 $[\text{M}+\text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ 。其 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ_{H} 9.18 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, H-3), 8.85 (1H, s, H-5), 8.72 (1H, dd, $J = 2.5, 1.5 \text{ Hz}$, H-6); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ_{C} 165.1 (C-1'), 147.4 (C-5), 145.1 (C-3), 143.6 (C-6), 143.4 (C-2)。以上数据与文献^[12]报道基本一致,确定化合物为pyrazine-2-carboxylic acid。

3 $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ 诱导 CD 实验

将 0.9 mg 化合物**2** 加入到 1.8 mL 0.7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $[\text{Mo}_2(\text{OAc})_4]$ 的 DMSO 溶液中。混合后立即测定并记录第一张图谱,并监测其演变直至稳定(30~60 min),以得到稳定的诱导 CD 图谱。根据 $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ 诱导 CD 的螺旋规则分析得到的诱导 CD 图谱,最终确定化合物**2** 的构型。

4 活性测试

4.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性测试 采用 Ellman 等^[13]改进的分光光度法测定了化合物的乙酰胆碱酯酶抑制

活性。将待测的样品加二甲基亚砷溶解后加入 pH 8 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液,配制成 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的待测溶液。阴性对照采用二甲基亚砷,阳性对照采用他克林,空白对照采用磷酸缓冲液。测定时首先在 96 孔板上加入用待测样品 10 μL ,再依次加入 110 μL 磷酸缓冲液、20 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、40 μL 乙酰胆碱酯酶溶液,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 10 min,然后加入 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘化硫代乙酰胆碱 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,酶标仪测定 405 nm 吸收度 (OD) 值并计算样品对乙酰胆碱酯酶的抑制活性,计算公式:抑制率 (%) = $[(\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{反应本底}}) - (\text{OD}_{\text{待测样品}} - \text{OD}_{\text{反应本底}})] / (\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{反应本底}}) \times 100\%$ 。

4.2 一氧化氮生成抑制率测试 体外抗炎活性筛选采用小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 模型,将 RAW264.7 细胞接种至 96 孔板,用 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脂多糖进行诱导刺激,同时加入待测样品(终浓度 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),设置不含药物组和 L-NMMA 阳性药物组做对照。细胞过夜培养后取培养基检测一氧化氮生成,在 570 nm 处测定 OD 值,并计算样品对一氧化氮生成的抑制活性。在剩余培养基中加入 MTS 进行细胞存活率检测,排除化合物对细胞的毒性影响。抑制率 (%) = $(\text{OD}_{\text{非药物处理组}} - \text{OD}_{\text{待测样品组}}) / \text{OD}_{\text{非药物处理组}} \times 100\%$ 。

作者贡献: 陈辉负责实验设计;刘云负责实验实施、数据处理和论文撰写;张文静、胡梦雅、范雨欣、徐瑞雯、朱登辉参与实验实施;陈辉、孙彦君和冯卫生负责文章的审阅和提出论文写作的建议。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

References

- [1] Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 32. Beijing: Science Press, 1999: 80.
- [2] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Iconographia Cormophytorum Sinicorum Tomus (中国高等植物图鉴) [M]. Vol 2. Beijing: Science Press, 1972: 9.
- [3] Zhang RF, Cha S, Yi X, et al. Phytochemical and pharmacological progress on Tibetan medicine *Hypecoi Erecti Herba* and plants of *Hypecoum* L. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1217-1224.
- [4] Wang YM, Zhu FY, Zhang JZ, et al. Chemical constituents from *Hypecoum erectum* L. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1987, 18: 2-3.
- [5] Yuan HL, Zhao YL, Qin XJ, et al. Diverse isoquinolines with anti-inflammatory and analgesic bioactivities from *Hypecoum erectum* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113811.
- [6] Philipov S, Istatkova R, Denkova P, et al. Alkaloids from

- Mongolian species *Hypocoum lactiflorum* Kar. et Kir. Pazij [J]. Nat Prod Res, 2009, 23: 982-987.
- [7] Sun PT, Cao YG, Xue GM, et al. Hypeisoxazole A, a racemic pair of tetrahydroisoxazole-fused benzyloquinoline alkaloids from *Hypocoum erectum* and structural revision of hypecoleptopine [J]. Org Lett, 2022, 24: 1476-1480.
- [8] Klapars A, Huang X, Buchwald SL. A general and efficient copper catalyst for the amidation of aryl halides [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124: 7421-7428.
- [9] Patey AL, Startin JR, Rowbottom PM, et al. Identification of substituted hydroxypyridines and hydroxypyrazines in caramel food colourings [J]. Food Addit Contam, 1987, 4: 9-15.
- [10] Di BL, Pescitelli G, Pratelli C, et al. Determination of absolute configuration of acyclic 1,2-diols with $\text{Mo}_2(\text{AOc})_4$. 1. Snatzke's method revisited [J]. J Org Chem, 2001, 66: 4819-4825.
- [11] Ohta A, Imazeki A, Itoigawa Y, et al. Reactions of the monoxides of 2,6-disubstituted pyrazines with phosphoryl chloride and acetic anhydride [J]. J Heterocycl Chem, 1983, 20: 311-320.
- [12] Holzer W, Eller GA, Datterl B, et al. Derivatives of pyrazinecarboxylic acid: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopic investigations [J]. Magn Reson Chem, 2009, 47: 617-624.
- [13] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, et al. A new and rapid-colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7: 88-95.