

千层塔中一个新的生物碱及其生物活性研究

乔晓婷^{1,2}, 成欣欣¹, 王丹¹, 来美含², 王嘉琪², 王晓敏^{1,2}, 阮彩莲², 曹朵^{1*}

(1. 延安大学生命科学学院, 陕西省黄土高原资源植物研究与利用省市共建重点实验室, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000; 2. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000)

摘要: 采用 ODS 反相硅胶、AB-8 大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20、氧化铝柱层析和半制备液相制备色谱等方法, 对千层塔甲醇提取物进行较为系统的分离纯化, 通过 MS、IR、NMR 等方法, 对分离到的化合物进行结构鉴定。从千层塔中共分离鉴定了 4 个生物碱化合物, 分别为 serratinine C (1), lycobeline C (2), diphaladin A (3) 和 crenatine (4)。其中, 化合物 1 为新的生物碱类化合物, 化合物 2~4 是首次从千层塔中分离。体外生物活性实验表明, 化合物 1 能够明显降低脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的神经胶质细胞中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 具有显著抗氧化生物活性。

关键词: 千层塔; 化学成分; 生物碱; 结构鉴定; 抗氧化

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3342-05

A new alkaloid from *Huperzia serrata* and its biological activity

QIAO Xiao-ting^{1,2}, CHENG Xin-xin¹, WANG Dan¹, LAI Mei-han², WANG Jia-qi²,
WANG Xiao-min^{1,2}, RUAN Cai-lian², CAO Duo^{1*}

(1. Shaanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Resource Plants on the Loess Plateau, Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conservation and Utilization of Regional Biological Resources, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: The methanol extract of *Huperzia serrata* was separated and purified by ODS, AB-8 macroporous adsorption resin, dextran gel Sephadex LH-20 and silica gel column chromatography combined with the semi-pre HPLC. The chemical structures of the isolated compounds were identified by MS, IR, NMR, etc. Four compounds were isolated from *Huperzia serrata* and identified, named as serratinine C (1), lycobeline C (2), diphaladin A (3) and crenatine (4). Compound 1 is a new alkaloid, compounds 2-4 were isolated for the first time. *In vitro* biological activity experiments showed that compound 1 could significantly reduce the levels of nitric oxide and reactive oxygen species in glial cells induced by lipopolysaccharide and had significant antioxidant biological activity.

Key words: *Huperzia serrata*; chemical composition; alkaloid; structural identification; antioxidant

石杉科石杉属植物千层塔 (*Lycopodium serratum* Thunb) 在临床上被广泛用于治疗精神分裂症^[1]等神经系统性疾病。千层塔中有效成分石杉碱甲通过抑制乙

酰胆碱酯酶活性从而提高小鼠学习、记忆和活动能力, 其中石杉碱甲在中国被批准为治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 药物^[2]。然而, 石杉碱甲仅对轻度 AD 患者有效, 不能够阻止 AD 的病理进展, 同时伴有胃肠道不适、影响肝肾功能等明显不良反应^[3]。Hu 等^[4]报道中药复方千层塔合剂在临床上对 AD 患者具有显著治疗效果, 对血管性痴呆及帕金森病等均

收稿日期: 2024-08-30; 修回日期: 2024-10-18.

基金项目: 陕西省自然科学基金 (2024JC-YBQN-0920); 陕西省科协技术学会青年人才托举计划项目 (20220321).

*通讯作者 E-mail: duocao@yau.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0843

有效, 随后也有诸多有关千层塔提取物用于治疗 AD 的报道^[5]。因此, 本研究对传统抗神经退行性疾病药用植物千层塔进行了系统的分离研究, 得到 4 个生物碱化合物, 并用波谱学方法进行了结构鉴定。

结果与讨论

化合物 **1**, 白色粉末, 熔点为 202.6 °C, 可溶于甲醇、氯仿和丙酮等溶剂。ESI-MS 质谱中 $[M+Na]^+$ m/z 480.32 及 $[M+K]^+$ 496.30, 提示其相对分子质量为 457, 高分辨质谱 m/z 458.284 5 $[M+H]^+$ (calcd. for $C_{27}H_{40}O_5N$) 提示其分子式为 $C_{27}H_{39}O_5N$, 不饱和度为 9。¹H NMR 谱 (表 1) 在高场显示 4 个甲基氢质子信号 δ_H 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)、1.20 (3H, s)、1.23 (3H, s) 和 1.51 (3H, s), 低场区显示 1 个氢质子信号 δ_H 5.81 (1H, s)。¹³C NMR (表 1) 结合 DEPT 数据显示化合物 **1** 有 27 个碳信号, 其中 4 个甲基碳 (δ_C 18.5, 25.1, 25.7 和 30.2)、10 个亚甲基碳、6 个次甲基碳 (包含 1 个双键碳信号) 和 7 个季碳 (含 2 个羰基碳) 信号。HSQC 谱中显示 δ_H 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 与 δ_C 18.5 相关, 提示 δ_H 0.88 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) 为甲基氢质子, δ_H 2.93 (2H, t, $J = 11.0, 3.2$ Hz) 与 δ_C 40.1 相关, 提示 δ_H 2.93 (1H, t, $J = 11.0, 3.2$ Hz) 是 C-7 位 (δ_C 40.1) 氢质子信号, δ_H 3.56 (1H, dd, $J = 7.6, 3.0$ Hz) 与 δ_C 70.9 (C-8) 相关, δ_H 3.56 (1H, dd, $J = 7.6, 3.0$ Hz) 是 C-8 氢质子信号, δ_H 3.37 (1H, d, $J = 3.0$ Hz) 与 δ_C 73.1 (C-13) 相关, HMBC 谱中显示 δ_C 73.1 与 δ_H 2.93 (1H, t, $J = 11.0, 3.2$ Hz) 相关, δ_C 70.4 与 δ_H 2.93 (1H, t, $J = 11.0, 3.2$ Hz) 和 δ_H 0.88 (甲基氢质子信号) 相关, 以上信息与化合物 serratinine 基本一致, 提示化合物 **1** 结构中有 serratinine 母核结构 (不饱和度为 5), ¹H-¹H COSY 谱中 δ_H 2.09 (1H, m, H-15) 与 δ_H 3.37 (1H, d, $J = 3.0$ Hz) 和 δ_H 3.56 (1H, dd, $J = 7.6, 3.0$ Hz, H-8) 均相关, 且 δ_H 3.56 (1H, dd, $J = 7.6, 3.0$ Hz, H-8) 与 2.93 (1H, t, $J = 11.0, 3.2$ Hz) 相关, NOESY 谱中 H-15 与 H-8 相关、H-7 与 H-13 相关、H-15 与 H-13 不相关, H-8 与 H-7 不相关, 提示 C-15 位甲基与 C-8 位羟基在同侧、C-15 位甲基与 C-13 位羟基在异侧、H-8 氢质子与 C-7 位氢质子在异侧、C-7 位氢质子与 C-13 位氢质子在异侧, 化合物 **1** 母核结构的相对构型如图 1 所示。此外, 还有 11 个碳信号 (不饱和度为 4), 包含 2 个不饱和季碳 (δ_C 182.2 和 171.4)、1 个不饱和次甲基碳 (δ_C 112.8)、3 个饱和次甲基碳、2 个亚甲基碳和 3 个甲基碳信号, 由不饱和度推算得知化合物 **1** 取代基为二元环体系。HSQC 谱中显示 δ_H 1.20 (3H, s) 与 δ_C 25.1 相关、 δ_H 1.23 (3H, s) 与 δ_C 30.2 相关、 δ_H 1.51 (3H, s) 与 δ_C 25.7 相关, 为 3 个甲基信号; δ_H 5.81 (1H, s) 与 δ_C 112.8 相关, HMBC 中 δ_H 5.81

(1H, s) 与 2 个不饱和季碳 (δ_C 182.2, 171.4) 均相关, 提示存在 α,β -不饱和结构, δ_H 5.81 (1H, s) 为烯炔氢质子信号, 且在 HMBC 谱中显示与季碳 δ_C 86.9 均存在相关性。HSQC 谱中显示 δ_H 3.98 (1H, dd, $J = 7.4, 3.8$ Hz) 与 δ_C 63.4 相关, δ_H 1.88~1.90 (2H, m) 与 δ_C 50.1 相关, δ_H 1.28 (1H, m) 和 δ_H 2.35 (1H, ddd, $J = 11.5, 4.0, 2.0$ Hz) 分别与 δ_C 48.3 相关, HMBC 谱中显示 δ_C 63.4 与 δ_H 2.35 (1H, ddd, $J = 11.5, 4.0, 2.0$ Hz)、1.88~1.90 (2H, m), 1.23 (3H, s), 1.28 (H-5', 1H, m) 及与 δ_H 3.37 (C-13, 1H, d, $J = 3.0$ Hz) 均存在相关性, δ_H 3.98 (H-6', 1H, dd, $J = 7.4, 3.8$ Hz) 与 δ_C 48.3, 35.2, 73.1 (分别为 C-5'、C-7'、C-13) 相关, 以上信息提示化合物 **1** 中有 3 个甲基取代的降倍半萜内酯结构片段, 且与化合物 **1** 的 C-13 位相连。综合以上信息推测化合物 **1** 的结构如图 1 所示, SciFinder 数据库检索显示化合物 **1** 为新化合物, 命名为 serratinine C。体外生物活性实验表明, 化合物 **1** 能够明显降低 LPS 诱导的神经胶质细胞中 NO 和 ROS 水平, 具有显著抗氧化生物活性 (图 2)。

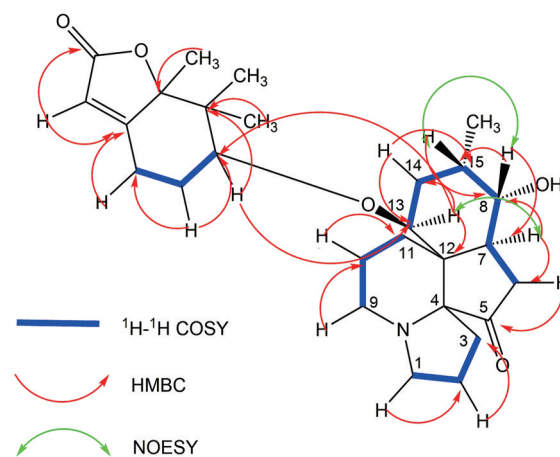


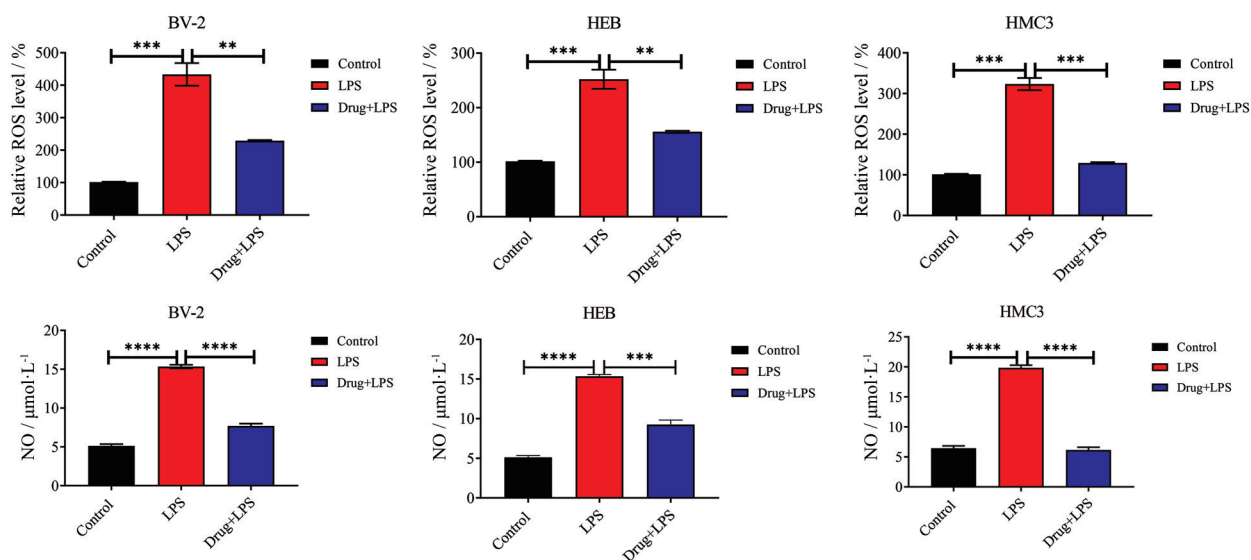
Figure 1 Structure of compound **1** and its key ¹H-¹H COSY, HMBC, and NOESY correlations

讨论

千层塔是石杉科石杉属药用植物^[6], 主要分布在亚洲东部、南部和东南部, 大洋洲和中美等地区^[7], 被广泛用于与胆碱酯酶活性有关的神经系统疾病的治疗^[8], 如重症肌无力^[9]、帕金森病^[10]、血管性痴呆^[11]和 AD^[12]等。本实验从千层塔全草甲醇提取物中分离得到 4 个化合物, 其中化合物 **1** 为一个新的生物碱类化合物, 3 个化合物首次从千层塔中分离。体外生物活性实验结果显示, 化合物 **1** 能够显著下调 LPS 诱导的神经胶质细胞中 NO 和 ROS 水平, 表明其具有显著抗氧化生物活性 (化合物 **2**~**4** 无显著抗氧化生物活性)。本实验进一步丰富了千层塔化学成分多样性, 为其

Table 1 ^1H NMR (800 MHz) and ^{13}C NMR (200 MHz) data of compound **1** in $\text{DMSO}-d_6$

No.	δ_c	δ_H (J in Hz, HSQC)	HMBC
5	213.2 (C)	–	H-3, 6
4	77.6 (CH)	–	H-3
13	73.1 (CH)	3.37 (1H, d, $J=3.0$ Hz)	H-14, 6', C-12, 14, 6'
8	70.9 (CH)	3.56 (1H, d, $J=7.6, 3.0$ Hz)	H-7, 15, C-7, 15
1	52.3 (CH_2)	2.43 (1H, m), 2.67 (1H, m)	H-2, C-2
9	50.4 (CH_2)	2.12 (1H, m), 2.59 (1H, m)	H-10, C-10
12	44.3 (C)	–	H-7, 11
7	40.1 (CH)	2.93 (1H, t, $J=11.0, 3.2$ Hz)	H-6, 8, C-6, 8, 12
6	37.8 (CH_2)	1.98–2.20 (2H, m)	H-7, C-5, 7
14	32.2 (CH_2)	1.58–1.69 (2H, m)	H13, 15, C13, 15
11	27.0 (CH_2)	2.11 (2H, m)	H-10, C-10, 12
15	24.1 (CH)	2.09 (1H, m)	H-8, 14, C-8, 14
2	21.2 (CH_2)	1.87 (2H, m)	H-1, 3, C-1, 3
3	21.1 (CH_2)	1.63 (2H, m)	H-2, C-2, 4
10	20.9 (CH_2)	1.36 (2H, d, $J=13.8$ Hz)	H-9, 11, C-9, 11
16	18.5 (CH_3)	0.88 (3H, d, $J=7.0$ Hz)	H-15, C-15
1'	182.2 (C)	–	H-2'
2'	112.8 (CH)	5.81 (1H, s)	C-1', 3'
3'	171.4 (C)	–	H-2', 4'
4'	50.1 (CH_2)	1.88–1.90 (2H, m)	H-5', C-3', 5'
5'	48.3 (CH_2)	1.28 (1H, m), 2.35 (1H, ddd, $J=11.5, 4.0, 2.0$ Hz)	H-4', 6', C-4', 6'
6'	63.4 (CH)	3.98 (1H, dd, $J=7.4, 3.8$ Hz)	H-5', 13, C-5', 7', 13
7'	35.2 (C)	–	H-6', C-6', 8'
8'	86.9 (C)	–	H-9'
9'	30.2 (CH_3)	1.23 (3H, s)	C-8'
10'	25.7 (CH_3)	1.20 (3H, s)	C-7'
11'	25.1 (CH_3)	1.51 (3H, s)	C-7'

**Figure 2** Compound **1** significantly reduced the levels of NO and ROS in glial cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

后续研究奠定了一定的物质基础。

实验部分

千层塔药材 (19 kg) 购于湖北省恩施市, 经西北大学生命科学学院郭斌研究员鉴定, 为千层塔 (*Lycopodium serratum* Thunb) 全株药材, 该中药标本 (编号: 17-03-10) 存放于西北大学生命科学院。

Agilent Series 1100 SL 液质联用仪 (高分辨 ESI), 美国安捷伦科技有限公司; D8 QUEST Bruker、Bruker Avance 500、AV 800 型核 1D 和 2D 核磁共振仪, 德国布鲁克公司; RE-6000A 及 RE3000A 型旋转蒸发器, 上海亚荣公司; DLSB-10/20 型低温冷却循环泵, 郑州长城科工贸有限公司; ST-07B 密闭式粉碎机, 北京京创泰宁伟业科技公司; BP221S 万分之一电子秤, 德国赛多利

斯集团; NP7000C 型泵、NU3000 型紫外检测器制备高效液相色谱、C18 色谱柱 (250 mm × 10 mm, 10 μm), 江苏汉邦科技有限公司; C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 日本 YMC Co., LTD. 公司; 100~200、200~300、300~400 目正相层析硅胶和 GF254 薄层层析硅胶, 青岛海洋化工厂; AB-8 大孔吸附树脂, 北京慧德易科技有限责任公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20、ODS 反相硅胶, 上海技舟化工科技有限公司; MCI 树脂 (型号 MCI Gel-CHP 20-P, 75~150 μm), 日本三菱公司; TLC 显色剂包括碘化铯钾溶液、5% 香草醛、10% 硫酸-乙醇溶液、固体碘和所使用有机溶剂石油醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、甲醇等, 天津科密欧化学试剂有限公司。

1 提取与分离

千层塔全株药材 (19 kg) 粉碎过筛 (100 目), 甲醇加热回流提取 4 次, 每次 2 h, 减压浓缩回收甲醇得提取浸膏约 5.5 kg。将浸膏分为 3 份, 每份加 5 L 的盐酸水溶液 (pH 2.5), 使其充分分散后过滤得酸水层 (含生物碱), 用氢氧化钠调节酸水 pH 值为 10~11, 合并碱水层, 加入等体积的有机相 (石油醚、氯仿、乙酸乙酯) 依次萃取, 减压回收有机相得氯仿萃取部位约 1.5 kg, 乙酸乙酯萃取部位约 500 g。

分别取千层塔氯仿萃取部位 (1.4 kg) 和乙酸乙酯萃取部位 (400 g) 进行大孔吸附树脂 AB-8 划段分离纯化。乙醇-水 (0:100、30:70、50:50、70:30、90:10 和 100:0) 梯度洗脱, TLC 检测合并相似流分, 氯仿层萃取部位 Fr.A~G, 乙酸乙酯萃取部位得 Fr.H~M。

Fr. B (302 g) 通过反相硅胶填料 ODS 常压柱层析分离, 甲醇-水 (30:70、40:60、50:50、60:40、70:20 和 90:0) 洗脱, TLC 检测合并得到 6 个流分 Fr.B1~B6。其中 Fr.B3 通过 MCI Gel 中低压 Flash 柱分离纯化, 甲醇-水洗脱 (40:60、50:50、60:40、70:30 和 80:20) 得到 5 个组分, Fr.B31~B35。Fr.B32 (320 mg) 再经常压反相硅胶 ODS 柱层析后得 6 个组分 Fr.B321~B326。其中 Fr.B323 (116.8 mg) 经半制备液相 HPLC (乙腈-水) 纯化得到化合物 1 (7.45 mg)。

Fr. L (约 89 g) 经氨基硅胶常压柱层析, TLC 检测合并得 7 个组分, Fr. L1~L7, 其中 Fr. L5 (约 340 mg) TLC 检测三个主要斑点, 经半制备液相 HPLC 制备得化合物 2 (17.01 mg) 和 4 (14.69 mg)。

Fr. M (约 80 g) 经中性氧化铝常压柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (100:0~0:100), TLC 检测合并后得四个流分 Fr.M1~M4。其中 Fr.M1 (约 13.5 g) 不能完全溶解于甲醇, 过滤后约剩 9.6 g, 再经氨基硅胶常压柱层析, 己烷-乙酸乙酯梯度 (100:0~0:100), TLC 检测合并相似

流分后得 7 个组分, Fr.M11~M17。Fr.M14 (416 mg) 和 Fr.M16 (117 mg) 经半制备液相 HPLC 制备得化合物 3 (17.20 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, 熔点为 202.6°C, 可溶于甲醇、氯仿和丙酮等溶剂。[α]_D²⁰ +32.1 (c 0.10, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} (log ε): 190 (4.56); IR ν_{max}: 3 348, 2 930, 1 800, 1 670, 1 200, 1 030 cm⁻¹, 提示分子中含有双键、羰基和羟基; ESI-MS 质谱中 [M+Na]⁺ m/z 480.32 及 [M+K]⁺ 496.30, 提示其相对分子质量为 457, 高分辨质谱 m/z 458.284 5 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₇H₄₀O₅N), 分子式为 C₂₇H₃₉O₅N, ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

化合物 2: 白色无定形粉末, ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ_C 53.9 (C-1, CH₂), 30.0 (C-2, CH₂), 28.1 (C-3, CH₂), 31.1 (C-4, CH₂), 25.0 (C-5, CH₂), 34.0 (C-6, CH₂), 41.6 (C-7, CH), 41.4 (C-8, CH₂), 48.1 (C-9, 47.3), 27.0 (C-10, CH₂), 29.4 (C-11, CH₂), 48.0 (C-12, CH), 60.5 (C-13, CH), 43.1 (C-14, CH₂), 29.9 (C-15, CH₂), 23.0 (C-16, CH), 36.7 (C-17, CH), 以上 ¹³C NMR 及 DEPT 谱数据与化合物 lycobeline C 一致^[13]。

化合物 3: ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 63.2 (C-1, CH₂), 21.1 (C-2, CH₂), 17.9 (C-3, CH₂), 48.5 (C-4, CH), 210.3 (C-5, C), 45.2 (C-6), 40.4 (C-7), 37.2 (C-8, CH₂), 55.5 (C-9, CH₂), 26.3 (C-10, CH₂), 71.5 (C-11, CH), 71.3 (C-12, CH), 72.8 (C-13, CH), 30.0 (C-14, CH₂), 24.7 (C-15), 222.9 (C-16, CH₃), 以上 ¹³C NMR 及 DEPT 谱数据与化合物 diphaladine A 一致^[14]。

化合物 4: ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 140.6 (C-1, C), 26.6 (C-1', CH₂), 13.4 (C-2', CH₃), 119.8 (C-3, CH), 150.3 (C-4, C), 120.3 (C-4a, CH), 116.7 (C-4b, CH), 123.6 (C-5, CH), 127.2 (C-6, CH), 120.8 (C-7, CH), 140.0 (C-8, C), 112.1 (C-8a, CH), 135.0 (C-9, C), 56.4 (C-OCH₃), 以上 ¹³C NMR 及 DEPT 谱数据与化合物 crenatine 一致^[15]。

3 抗氧化生物活性

3.1 细胞培养 BV-2 细胞在高糖 DMEM 培养液 (10% 胎牛血清) 培养, 补充 10% FBS, 青霉素 (100 u·mL⁻¹) 和链霉素 (100 μg·mL⁻¹), 并在 37 °C、5% CO₂ 的加湿培养箱中培养。HEB 和 HMC3 细胞在低糖 DMEM 中培养, 补充 10% FBS, 青霉素 (100 u·mL⁻¹) 和链霉素 (100 μg·mL⁻¹), 并在 37 °C、5% CO₂ 的加湿培养箱中培养。

3.2 NO 检测 将细胞按照每孔 2×10⁵ 个铺至 48 孔板, 每孔培养基 300 μL。次日进行相关处理。分为空白对照组 (Control 组)、LPS 组 (200 ng·mL⁻¹)、溶剂组 (加 LPS 刺激 6 h 后换为含 0.01% DMSO 培养基, 即 DMSO+

LPS组)和给药组(加LPS刺激6 h后换为含 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物1的培养基,即Drug+LPS组),处理后在48孔板中作用24 h,然后依据碧云天S0023试剂盒说明书检测细胞上清中NO含量。

3.3 ROS检测 向各组细胞中加入适当体积稀释好的DCFH-DA, $37\ ^\circ\text{C}$ 细胞培养箱内孵育20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。刮取细胞,荧光酶标仪上机检测。

3.4 统计学分析 本文实验数据采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析,组间差异分析采用非配对Student's *t*检验比较,数据采用平均值 $\bar{x} \pm s$ 表示。

作者贡献: 乔晓婷为本文第一作者,负责化合物的分离、鉴定和文章撰写;王嘉琪和王晓敏对提取分离和结构鉴定提供了一定帮助;成欣欣、来美含和王丹负责细胞实验、数据分析及作图;曹朵负责实验的设计,对实验中遇到的问题给予指导;阮彩莲负责相关稿件的修改等工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang BY, Guo LF. A preliminary report on the treatment of schizophrenia by *Huperzia serrata* [J]. J New Med (新医学), 1976, 4: 221-222.
- [2] Yu PN, Terry C, Tsun O, et al. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int, 2015, 89: 260-270.
- [3] Li CD. Research progress in drugs for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 1996, 5: 177-180.
- [4] Hu YP, Yuan DP. Effect of *Huperzia serrata* mixture on learning and memory ability and apoptosis in AD model rats [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med (陕西中医), 2009, 30: 1416-1419.
- [5] Thu DK, Vui DT, Nguyen TNH, et al. The use of *Huperzia* species for the treatment of Alzheimer's disease [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2019. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0159.
- [6] Cao D, Li JH, Hou MY, et al. Anti-tumor activity of aliphatic compounds from *Huperzia serrata* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 40-46.
- [7] Luo YC, Li QJ, Yang YF, et al. Research on the chemical composition of *Huperzia serrata* produced in Guizhou [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2010, 21: 3172-3173.
- [8] Wen MH, Yang ZW, Gou HY, et al. HPLC method was used to determine the content of huperzine A in *Huperzia serrata* produced in Enshi prefecture [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med (成都中医药大学学报), 2014, 37: 8-10.
- [9] Li XY, Chen FY, Xu SF, et al. Study on the chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of endogenous fungi G324-4 in *Huperzia serrata* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2013, 31: 89-90.
- [10] Pei GY. Study of the Chemical Composition of Alkaloids in *Huperzia serrata* (锯齿石杉中生物碱化学成分的研究) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [11] Zhang XY, Wang HK, Qi YP. Study of the chemical composition of *Huperzia serrata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1990, 21: 46.
- [12] Xu CY, Chen XJ, Xia J, et al. Preparation of sulfated polysaccharides of *Huperzia serrata* and their antioxidant activity [J]. J Wuhan Polytech Univ (武汉轻工大学学报), 2019, 38: 24-26.
- [13] Hirasawa Y, Matsuya R, Shaari K, et al. Lycobelines A-C, novel C_{16}N_2 -type *Lycopodium* alkaloids from *Huperzia Goebelii* [J]. Tetrahedron Lett, 2012, 53: 3971-3973.
- [14] Wu XD, Juan HE, Gang XU, et al. Diphaldine A, a new lycopodium alkaloid from *Diphasiastrum complanatum* (Lycopodiaceae) [J]. Acta Bot Yunn, 2009, 31: 93-96.
- [15] Sudmeijer O, Wilson AE, Hays GR. Calculation of ^{13}C NMR chemical shifts for aromatic carbons in polyalkylated benzenes [J]. Org Magn Reson, 1984, 22: 459-463.