

## 加拿大一枝黄花中一个新的六取代异戊酰基蔗糖衍生物

钱启超<sup>1</sup>, 董俊芳<sup>2</sup>, 史路利<sup>1</sup>, 乔温皓<sup>1</sup>, 李世香<sup>1</sup>, 胡炜彦<sup>2</sup>, 张荣平<sup>1</sup>, 陈兴龙<sup>1\*</sup>

(1. 云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500; 2. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 本文对加拿大一枝黄花的化学成分进行研究, 运用硅胶、微孔树脂、Rp-18、Sephadex LH-20 柱色谱等技术, 从加拿大一枝黄花的甲醇提取物中分离得到一个新的蔗糖衍生物。利用一维、二维核磁共振波谱、高分辨质谱和酸水解等方法将其鉴定为 2,4,6,1',3',6'-O-六异戊酰基蔗糖 (2,4,6,1',3',6'-O-hexaisovaleryl sucrose)。并运用高分辨质谱对其质谱裂解行为进行解析, 发现化合物 **1** 容易断裂糖苷键, 产生分子量为  $m/z$  415 的碎片离子。碎片离子  $m/z$  415 继续以中性或者非中性的形式丢失异戊酰基碎片, 产生一系列子离子。化合物 **1** 在 5、10 和 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下能够抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小胶质细胞 (BV2) 炎症损伤模型的 NO 生成, 表现出神经保护作用, 测得其 NO 半数抑制率 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $13.96 \pm 0.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 加拿大一枝黄花; 化学成分; 异戊酰基蔗糖衍生物; MS/MS 裂解行为; 神经保护作用

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1052-07

## A new hexa-substituted isovaleryl sucrose derivative from *Solidago canadensis* Lour.

QIAN Qi-chao<sup>1</sup>, DONG Jun-fang<sup>2</sup>, SHI Lu-li<sup>1</sup>, QIAO Wen-hao<sup>1</sup>, LI Shi-xiang<sup>1</sup>, HU Wei-yan<sup>2</sup>,  
ZHANG Rong-ping<sup>1</sup>, CHEN Xing-long<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica & Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** It aimed to research the chemical constituents of *Solidago canadensis* Lour. A new sucrose derivative was isolated from the the methanol extract of *Solidago canadensis* Lour. with the technologies of silica gel, microporous resin, Rp-18, and Sephadex LH-20 column chromatography. It was identified as 2,4,6,1',3',6'-O-hexaisovaleryl sucrose by 1D NMR, 2D NMR, high-resolution mass spectrometry, and acid hydrolysis method. Its mass spectrometry fragmentation behaviors were analyzed using high-resolution mass spectrometry and found that compound **1** was easy to break the glycosidic bond to produce the fragment at  $m/z$  415. The ion at  $m/z$  415 continued to eliminate the isovaleryl group as neutral or non-neutral form to generate a series of daughter ions. Compound **1** could inhibit NO production on LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells at the concentrations of 5, 10, and 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to exhibit neuroprotective effect. Its half maximal inhibition rate of NO was measured to be  $13.96 \pm 0.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2024-12-24.

基金项目: 云南省兴滇英才-青年人才项目 (XDYC-QNRC-2022-0271); 云南省基础研究计划-中医联合专项-面上项目 (202101AZ070001-222); “云岭学者”支持计划 (YNWR-YLXZ-2019-019); 云南省重点领域科技计划项目 (202303AC100025); 云南省南药可持续利用重点实验室开放课题 (202105AG070012XS23086).

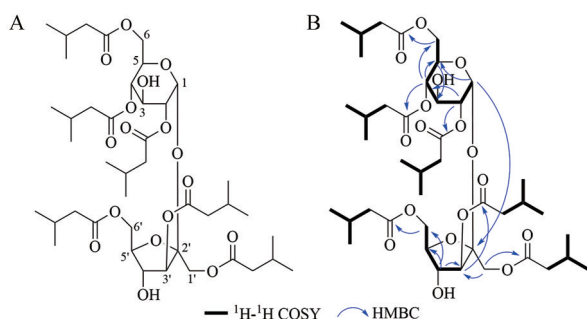
\*通讯作者 Tel: 86-871-65922812, E-mail: chxkib@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1032

**Key words:** *Solidago canadensis* Lour.; chemical constituent; isovaleryl sucrose derivative; MS/MS fragmentations; neuroprotective effect

加拿大一枝黄花 (*Solidago canadensis* Lour.) 为菊科一枝黄花属的多年生草本植物<sup>[1]</sup>。原产北美洲, 于20世纪30年代作为观赏花卉引入中国, 后来逸生野外, 成为一种具有较强入侵性的恶性杂草, 破坏本地生态平衡并对本地生物多样性造成威胁<sup>[2,3]</sup>, 2023年初被列入中国《重点管理外来入侵物种名录》。研究表明, 加拿大一枝黄花含有二萜、三萜、黄酮、皂苷、苯丙素、多炔、酚酸和挥发油等多种次生代谢产物<sup>[4-6]</sup>。加拿大一枝黄花在欧洲被用于治疗尿结石、慢性肾炎、膀胱炎和糖尿病等疾病<sup>[7,8]</sup>。研究发现加拿大一枝黄花具有抗菌<sup>[9]</sup>、抗炎<sup>[10]</sup>、抗突变<sup>[9,11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>、抗氧化<sup>[13]</sup>、抗抑郁<sup>[14]</sup>、肝肾脏保护<sup>[15]</sup>、抗寄生虫<sup>[16-19]</sup>和化感作用<sup>[20]</sup>等多种生物活性。加拿大一枝黄花因其较强的繁殖能力和生存适应能力, 入侵后对当地的自然生态系统平衡和生物多样性造成了较大危害和经济损失<sup>[21]</sup>。因此, 国内外学者对加拿大一枝黄花侧重于在植物保护及环境科学方面开展研究, 对加拿大一枝黄花的化学成分及生物活性研究较少, 不利于加拿大一枝黄花药用价值的挖掘, 阻碍了其开发利用。

本课题组长期致力于挖掘天然产物中具有神经保护作用的活性分子, 并对迷迭香<sup>[22]</sup>、高良姜<sup>[23]</sup>、益智<sup>[24]</sup>、樟叶越桔<sup>[25]</sup>等药用植物的化学成分及神经保护作用进行了系统性研究, 从中发现了多个具有神经保护作用的天然活性小分子, 为开发对神经退行性疾病具有潜在治疗作用的药物奠定了基础。为进一步促进加拿大一枝黄花的开发利用, 本研究对加拿大一枝黄花的化学成分和生物活性开展研究, 从中发现了一个新的六取代异戊酰基蔗糖衍生物 (图1A), 对其质谱裂解行为进行解析, 利用LPS诱导的BV2炎症损伤模型评价其神经保护作用, 并测定IC<sub>50</sub>。本文报道了该化合物的分离纯化、结构鉴定过程、质谱裂解行为以及神经保护作用。



**Figure 1** The chemical structure (A) and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations (B) of compound 1

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物1为无色油状物, 高分辨电喷雾质谱 (HR-ESI-MS) 测得  $m/z$  864.496 6 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (计算值为864.495 1), 预测其分子式为C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>17</sub>, 不饱和度为8, 化合物1的<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) 在高场区显示了12个重叠的甲基上的氢信号  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (36H, overlapped), 6个次甲基氢信号  $\delta_{\text{H}}$  2.09 (6H, overlapped), 以及6个亚甲基上的氢信号  $\delta_{\text{H}}$  2.24 (12H, overlapped)。分析其<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) 图谱, 结合DEPT谱低场区显示6个数值相近的羰基碳信号, 依次为  $\delta_{\text{C}}$  173.4×2, 172.9×2, 172.8, 172.2; 高场区显示6个化学位移相近的次甲基碳信号, 依次为  $\delta_{\text{C}}$  43.4, 43.3, 43.2×2, 43.1, 43.0; 还有6个化学位移相近的亚甲基碳信号, 依次为  $\delta_{\text{C}}$  25.9×2, 25.8, 25.7×2, 25.6; 同时还有多个化学位移相近, 信号重叠的甲基碳信号, 结合<sup>1</sup>H NMR信号, 应当为12个化学环境相似的甲基。由此推断化合物1的结构中含有6个结构相同, 化学环境类似的取代基, 综合氢谱和碳谱数据, 推测该基团为异戊酰基。

此外, <sup>13</sup>C NMR及DEPT谱上还有12个其他碳原子信号, 分别是位于  $\delta_{\text{C}}$  63.9 (C-6), 62.3 (C-1') 和 63.8 (C-6') 的3个仲碳信号, 位于  $\delta_{\text{C}}$  89.2 (C-1), 72.3 (C-2), 70.4 (C-3), 70.9 (C-4), 68.6 (C-5), 78.3 (C-3'), 73.3 (C-4'), 80.6 (C-5') 的8个叔碳信号, 以及位于  $\delta_{\text{C}}$  102.6 (C-2') 的1个季碳信号。同时分析<sup>1</sup>H NMR谱中低场区从  $\delta_{\text{H}}$  3.99 到  $\delta_{\text{H}}$  5.57 的系列连氧次甲基信号, 结合文献<sup>[26,27]</sup>, 除去6个异戊酰基后剩余的部分结构信号为蔗糖的特征信号 (表1)。说明该化合物为6个异戊酰基取代的蔗糖衍生物 (图1A)。在<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY谱中, H-1/H-2/H-3/H-4/H-5/H-6 相关, H-3'/H-4'/H-5'/H-6' 相关; 在HMBC谱中, H-1和C-5/C-2'相关, H-2和C-4相关, H-3和C-6相关, H-4和C-5相关, H-5和C-3相关, H-6和C-4相关, H-1'和C-3'相关, H-3'和C-4'相关, H-4'和C-3'/C-5'相关, H-5'和C-3'相关, H-6'和C-4'相关, 由此确定了蔗糖上的碳原子位置信息。同时, HMBC谱中H-2/H-4/H-6/H-1'/H-3'/H-6'与羰基碳原子信号簇  $\delta_{\text{C}}$  173.4×2, 173.0, 172.9×2, 172.8, 172.3 相关, 可知6个异戊酰基分别与蔗糖的C-2/C-4/C-6/C-1'/C-3'/C-6'位置连接 (图1B)。由于6个羰基碳原子信号值差异较小, 无法具体区分, 但是不影响结构解析。

运用酸水解试验, 通过带有蒸发光散射检测器的

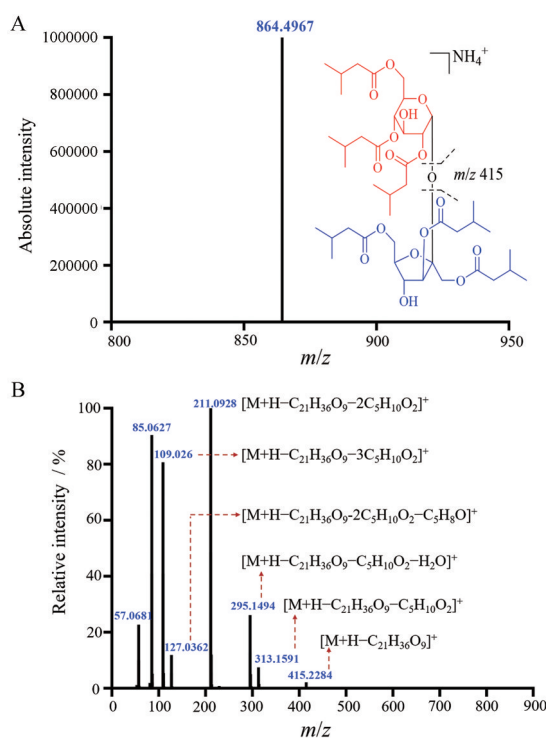
**Table 1** The  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) data of compound **1** in  $\text{CDCl}_3$ 

No.	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5.57 (1H, d, 3.8)	89.2 (d)
2	4.82 (1H, dd, 10.2, 3.8)	72.3 (d)
3	3.99 (1H, d, 11.8)	70.4 (d)
4	4.92 (1H, t, 10.0)	70.9 (d)
5	4.19 (1H, m)	68.6 (d)
6	4.33 (2H, m)	63.9 (t)
1'	4.20 (1H, overlapped), 4.14 (1H, m)	62.3 (t)
2'	–	102.6 (s)
3'	5.24 (1H, d, 8.4)	78.3 (d)
4'	4.28 (1H, t, 8.4)	73.3 (d)
5'	4.04 (1H, m)	80.6 (d)
6'	4.03 (1H, m), 4.05 (1H, m)	63.8 (t)
6×Isovaleryl	2.24 (12H, overlapped, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )	173.4×2, 172.9×2, 172.8, 172.2 (s, C-2/4/6/1'/3'/6'- $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )
	2.09 (6H, overlapped, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )	43.4, 43.3, 43.2×2, 43.1, 43.0 (d, C-2/4/6/1'/3'/6'- $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )
	0.95 (36H, overlapped, $-\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )	25.9×2, 25.8, 25.7×2, 25.6 (t, C-2/4/6/1'/3'/6'- $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )
		22.5×12 (q, C-2/4/6/1'/3'/6'- $\text{OCOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )

高效液相色谱仪进行分析,与糖标准品进行对照,确定了糖单元的组成为葡萄糖和果糖<sup>[28,29]</sup>。综上所述,将该化合物鉴定为2,4,6,1',3',6'-*O*-六异戊酰基蔗糖(2,4,6,1',3',6'-*O*-hexaisovaleryl sucrose)。

## 2 MS/MS裂解行为

对化合物**1**进行MS/MS分析,解析其质谱裂解规律(表2)。化合物的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰为 $m/z$  864.496 7,表明其分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{17}$ (图2A)。以 $m/z$  864.496 7为母离子进行MS/MS分析,发现其容易产生碎片离子 $m/z$  415.228 4。该碎片为蔗糖断裂糖苷键所得,即C-1与C-2'之间断裂(图2B)。该糖苷键断裂以后生成的两部分碎片离子的分子式和分子量一致,均为 $m/z$  415 ( $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_8$ ),是异戊酰基葡萄糖或异戊酰基果糖碎片。该碎片离子的异戊酰基以中性丢失方式裂解( $-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$ ),或进一步丢失一分子水,产生 $m/z$  313.159 1, 211.092 8, 295.149 4和109.026 0等碎片;或者异戊酰基以非中性丢失的方式裂解( $-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$ ),产生 $m/z$  127.036 2等碎片。 $m/z$  85.062 7和57.068 1为异戊酰基自身裂解所得。以上MS/MS裂解行为进一步证明了化合物**1**的结构是正确的。



**Figure 2** The (+) HR-ESI-MS spectrum (A) and MS/MS spectrum (B) of compound **1**

**Table 2** HR-ESI-MS/MS data analysis of compound **1** in positive ion mode

MS/MS	Precursor ion ( $m/z$ )	Product ion ( $m/z$ )	Elemental composition	Measured ( $m/z$ )	Calculated ( $m/z$ )	Error/mDa
(+) MS	846	864	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{17}$	864.496 7	864.495 1	+1.57
MS/MS	864	415	$\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_8$	415.228 4	415.232 6	-4.24
		313	$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_6$	313.159 1	313.164 6	-5.49
		295	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_5$	295.149 4	295.154 0	-4.60
		211	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4$	211.092 8	211.096 5	-3.69
		127	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3$	127.036 2	137.039 0	-2.77
		109	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$	109.026 0	109.028 4	-2.41
		85	$\text{C}_5\text{H}_9\text{O}$	85.062 7	85.064 8	-2.09
		57	$\text{C}_4\text{H}_9$	57.068 1	57.069 9	-1.78

### 3 神经保护作用

建立 LPS 诱导的 BV2 炎症损伤模型评价化合物 **1** 的神经保护作用。首先通过 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法测试化合物 **1** 对 BV2 细胞的细胞毒性。在给予化合物 **1** 后, 在低、中、高三个浓度下 BV2 的细胞存活率均达到 80% 以上, 说明化合物 **1** 对 BV2 细胞没有毒性 (图 3A)。神经保护作用测试表明: LPS 组和对照组对比, NO 显著升高 (图 3B), 说明 LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型造模成功。与 LPS 组相比, 阳性药米诺环素 (MINO) 和化合物 **1** 作用于模型细胞后, NO 含量明显降低 (图 3B), 且呈剂量依赖关系, 表明化合物 **1** 对 LPS 诱导 BV2 细胞具有保护作用, 呈现抗神经炎症功能。进一步测试化合物 **1** 在多个浓度下对 LPS 诱导 BV2 细胞神经炎症保护作用, 测得其抑制 NO 释放的半数抑制率为  $13.96 \pm 0.78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 3C), 阳性对照为米诺环素, 其  $\text{IC}_{50}$  为  $16.26 \pm 4.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 讨论

加拿大一枝黄花次生代谢产物种类丰富, 生物活性多样, 在欧洲药用历史悠久, 被收录于欧洲药典<sup>[30]</sup>。加拿大一枝黄花在我国的民间药用情况暂无报道, 但其同属植物一枝黄花 (*Solidago decurrens* Lour.) 被收录于 2020 版中国药典中, 具有清热解毒、疏风散热的功效, 用于治疗喉痹、乳蛾、咽喉肿痛、疮疖肿毒和风热感冒<sup>[31]</sup>。这提示加拿大一枝黄花的基础研究依然不够深入, 致使其开发利用受到限制。随着人口老龄化加剧, 神经退行性疾病的患病率逐年增加<sup>[32]</sup>。神经退行性疾病是一类由神经元的退行性损害导致神经系统功能逐渐丧失的疾病, 包括帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿舞蹈病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等, 这类疾病损害患者的认知功能或运动协调能力, 严重危害人类的健康和生活质量<sup>[33-35]</sup>。氧化应激和神经炎症是导致神经退行性疾病的主要机制, 另外还与患者年龄、兴奋

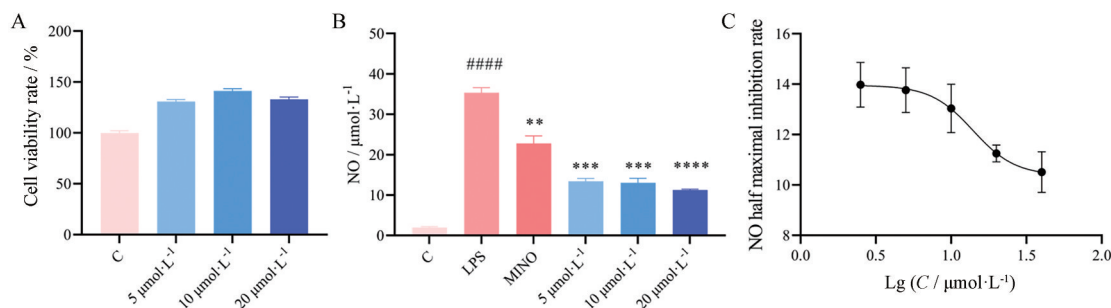
性毒素、线粒体功能障碍等因素相关<sup>[36]</sup>。目前临床上治疗神经退行性疾病的药物主要是改善症状, 无法逆转或者阻止疾病的进一步发展, 同时其安全性和有效性还有待考证, 开发满足神经退行性疾病治疗需求的新药至关重要<sup>[37]</sup>。天然活性产物因为其复杂多变的结构和丰富的药理活性成为了新药研发过程中先导化合物的重要来源。从天然活性产物中发现能够改善细胞内部环境, 降低氧化应激和减轻神经炎症的神经保护剂, 有望为治疗神经退行性疾病的新药研究开发提供新的思路和参考。

本研究从加拿大一枝黄花中分离鉴定出一个新的化合物: 2,4,6,1',3',6'-O-异戊酰基蔗糖, 同时通过高分辨质谱对化合物 **1** 的 MS/MS 裂解规律进行了解析, 发现在正离子模式下化合物 **1** 容易断裂葡萄糖和果糖之间的糖苷键, 产生异戊酰基葡萄糖或者异戊酰基果糖的碎片, 继续以中性或者非中性的形式丢失异戊酰基碎片, 产生一系列子离子, 为后续解析该类型化合物提供参考。该化合物在 5、10 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下具有较好的神经保护作用且均无细胞毒性, 测得其 NO 的  $\text{IC}_{50}$  为  $13.96 \pm 0.78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在后续工作中, 将持续对加拿大一枝黄花开展研究, 丰富加拿大一枝黄花的化学成分, 挖掘具有神经保护作用的活性小分子, 推动加拿大一枝黄花和治疗神经退行性疾病药物的研究。

### 实验部分

加拿大一枝黄花药材于 2021 年 9 月采自云南省昆明市滇池周边区域, 经云南中医药大学中药学院邱斌教授鉴定为菊科植物加拿大一枝黄花 (*Solidago canadensis* Lour.) 的干燥全株, 样品编号 (No. 2021-0920), 保存于云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室。

LC-MS-Q-TOF G6530 高分辨率质谱、1260 Infinity II 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Bruker



**Figure 3** The cell viability rates of BV2 cells by treated with compound **1** (A); the NO concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-induced BV2 cells after treated with compound **1** (B); the  $\text{IC}_{50}$  calculation of compound **1** (C).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . #####  $P < 0.0001$  vs control (C) group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs LPS group

AV 600/800 型核磁共振波谱仪 [布鲁克 (北京) 科技有限公司]; NICOLET iS10 型红外光谱仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; Jasco model 1020 旋光仪 (日本 Horiba 公司); ME204E 分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 蒸发光散射检测器 ELSD 6100 来自昆明德冠科技有限公司; 葡萄糖标准品 (S17HB195198) 购自上海源叶生物科技有限公司; 果糖标准品 (BBP04081) 购自云南西力生物技术股份有限公司; 氘代试剂购自北京伊诺凯有限公司; 薄层色谱硅胶板和柱色谱硅胶购自上海皓鸿生物医药科技有限公司; BV2 细胞株来自普诺赛科技有限公司; 常用有机试剂为国产 AR 级试剂购自云南利妍科技有限公司; 显色方法为 10% 硫酸-乙醇溶液加热后显色。

### 1 提取与分离

33.0 kg 干燥的加拿大一枝黄花全株粉碎后以 120 L 甲醇室温浸泡 3 d, 共 3 次, 合并提取液并浓缩至无甲醇味, 得到浸膏 3.2 kg, 将其分散在 10 L 水中, 用 3 倍量乙酸乙酯萃取, 共三次, 合并浓缩后得乙酸乙酯部位 1.1 kg。经硅胶柱色谱 (6.0 kg, 20 cm × 40 cm, 石油醚-乙酸乙酯 30:1、15:1、9:1、8:2、7:3) 洗脱获得 8 个流分 Fr.1~Fr.8。

Fr.6 (136.0 g) 经反相 MCI 柱色谱 (1.2 kg, 15 cm × 30 cm, 甲醇-水 50:50、60:40、70:30、80:20、90:10) 洗脱得到 6 个流分 Fr.6-1~Fr.6-6; 其中 Fr.6-4 (70.0 g) 再使用 Rp-18 柱色谱分离 (500 g, 5 cm × 18 cm, 甲醇-水 40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10), 洗脱得到 7 个流分 Fr.6-4-1~Fr.6-4-7。Fr.6-4-5 (17.0 g) 通过硅胶柱色谱 (170.0 g, 5 cm × 25 cm, 石油醚-乙酸乙酯 30:1、15:1、10:1、9:1、8:2、7:3) 进一步分离纯化得到 7 个流分 Fr.6-4-5-1~Fr.6-4-5-7。Fr.6-4-5-1 (0.5 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱得到化合物 **1** (24.5 mg)。

### 2 结构鉴定

化合物 **1**, 无色油状物,  $[\alpha]_D^{20} = +11.33$  ( $c$  0.150, CH<sub>3</sub>OH); HR-ESI-MS  $m/z$  864.496 7 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (计算值: 864.495 1), 分子式: C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>17</sub>。IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3 448, 2 961, 1 744, 1 386, 1 370, 1 295, 1 188, 1 166, 1 099, 1 019 cm<sup>-1</sup>, 核磁数据见 (表 1)。

酸水解试验: 取 5 mg 化合物 **1** 溶于 5 mL 5% KOH 溶液中, 在 95 °C 条件下加热回流 3 h, 待冷却后将反应产物调至 pH 4.0。用等量氯仿及正丁醇分别萃取三次, 减压干燥后, 得到氯仿层和正丁醇层。将正丁醇层用少量甲醇溶解后加入 5 mL 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸, 在 95 °C 的条件下加热回流 4 h, 待反应产物冷却后用正丁醇萃取三次。将水层减压干燥后, 用水溶解制成待测样品,

葡萄糖和果糖标准品用超纯水溶解, 配成待测样品。用带有蒸发光检测器的高效液相色谱仪进行分析: 采用 BDS HYPERSIL-C18 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 洗脱系统为: 流动相 A (乙腈), 流动相 B (磷酸缓冲液 pH 6.8), 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 梯度洗脱条件: 起始梯度 17% A, 0~22 min; 17%~19% A, 22~24 min; 19% A, 24~55 min。蒸发光检测器条件: 进样量 10 μL, 增益因子 1, 漂移管温度 110 °C, 气体体积流量 2.7 L·min<sup>-1</sup>。

### 3 MS/MS 分析

色谱条件: MS/MS 分析在安捷伦 LC-MS-Q-TOF G6530 质谱仪上进行, 采用 Eclipse XDB-C18 柱 (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm)。化合物 **1** 用甲醇配制成浓度为 0.05 mg·mL<sup>-1</sup> 备用。洗脱系统为: 流动相 A: 甲酸-水 (0.05:100, v/v), 流动相 B: 乙腈, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 梯度洗脱条件: 起始梯度 5%~90% B, 0~8 min; 90% B, 8~10 min; 90%~2% B, 10~11 min; 2% B, 11~14 min。

质谱条件: 离子源为 ESI 源, 三氟乙酸钠校正, 电喷雾负离子模式检测。分析条件如下: 喷雾电压为 4.00 kV 或 -3.50 kV; 干燥气压力为 35.0 kPa; 喷雾气为氮气, 流速为 8.0 L·min<sup>-1</sup>; 曲形裂解器温度为 350 °C; 加热模块温度为 280 °C; 母离子选择范围为  $m/z \pm 0.2$  Da; 裂解能量为 10、20、30 和 40 eV; 裂解气为氦气, 扫描范围为  $m/z$  50~1 500, 自动模式进行 MS/MS 分析。Agilent Qualitative Analysis 10.0 软件用于预测分子式, 其他质谱条件参照文献<sup>[25]</sup>进行设置。

### 4 神经保护作用

使用 CCK-8 法测试化合物 **1** 对 BV2 细胞的细胞毒性, 并在 LPS 诱导的 BV2 炎症损伤模型上进行神经炎症活性测试, 米诺环素为阳性对照药。小鼠小胶质细胞接种于含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 u·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 高糖培养基中, 放置于 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱 37 °C 条件下培养。接种后, 让细胞生长 24 h, 直到达到 80%~90% 的最终密度, 用于后续研究。

将细胞分为对照组、给药组。将 BV2 细胞接种于 96 孔细胞培养板上, 密度为每毫升  $5 \times 10^4$  个。① 对照组分为溶剂对照组和空白对照组; ② 给药组用 BV2 培养 24 h 后, 弃去旧培养基, 药物以含有不同浓度 (5、10 和 20 μmol·L<sup>-1</sup>) 药物处理 24 h, 将细胞培养基更换为孔中含有 10% CCK-8 的 DMEM, 孵育 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 处读取每个孔的吸光度值 ( $A$ ), 计算各组细胞存活率, 实验重复 3 次。用于评价化合物对神经细

胞有无毒性。细胞存活率 (%) =  $(A1 - A3) / (A2 - A3) \times 100\%$ , 其中  $A1$  为药物组的吸光度;  $A2$  为溶剂对照组的吸光度;  $A3$  为空白对照组的吸光度。

采用 NO 试剂盒检测化合物 **1** 对 LPS 诱导 BV2 细胞炎症活性。将细胞分为对照组、LPS 组、MINO 组和给药组。将 BV2 细胞接种于 96 孔细胞培养板上, 密度为每毫升  $25 \times 10^4$  个。① LPS 组用 BV2 培养 24 h 后, 弃去旧培养基, 用  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 处理 24 h; ② MINO 组使用  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  米诺环素预处理 2 h 后, 用  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 处理 24 h; ③ 给药组以含有不同浓度 (5、10 和  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 化合物 **1** 预处理 2 h, 用  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 处理 24 h。给予对应药物分组处理后收集细胞上清液, 按要求加入 NO 试剂盒 I 和 II 的相应溶液, 用酶标仪在 540 nm 处读取每个孔的  $A$  值, 将其代入标准曲线  $y = 163.59(A) - 6.5159$  中计算 NO 含量, 实验重复 3 次。用于评价化合物对受损的神经细胞有无降低 NO 浓度抗炎保护作用。

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析, 结果采用平均值  $\pm$  SEM 表示。三组数据使用单因素方差分析, 然后进行 Tukey 的事后检验。所有检验均采用双侧  $P$  值, 认为  $P < 0.05$  有统计学意义。

**作者贡献:** 钱启超负责化合物的分离、结构鉴定及文章的撰写; 董俊芳负责化合物的生物活性测试; 史路利负责药材提取; 乔温皓负责部分数据分析; 李世香负责协助化合物分离; 胡炜彦、张荣平和陈兴龙负责设计实验、提供实验指导、审阅文章并最终定稿。

**利益冲突:** 作者声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Zhu XZ, Li WJ, Shao H, et al. Selected aspects of invasive *Solidago canadensis* with an emphasis on its allelopathic abilities: a review [J]. Chem Biodivers, 2022, 19: 200728.
- [2] Wang CY, Wei M, Wang S, et al. *Erigeron annuus* (L.) Pers. and *Solidago canadensis* L. antagonistically affect community stability and community invasibility under the co-invasion condition [J]. Sci Total Environ, 2020, 716: 137128.
- [3] Jiao XY, Li JY, Yang QY, et al. Spread dynamics and driving factors of alien invasive plant *Solidago canadensis* in Hubei Province [J]. Guihaia (广西植物), 2023, 44: 1481-1494.
- [4] Wen DX, Chai C, Cui XB. Research progress of *Solidago canadensis* L. [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2012, 21: 51-52.
- [5] Wang WJ, Ma T, Bai, H, et al. Review on the study of diterpenes constituents and their pharmacological activities of *Solidago* [J]. J Pharm Res (药学研究), 2011, 30: 349-352.
- [6] Mishra D, Joshi S, Bisht G, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* Linn. root essential oil [J]. J Basic Clin Pharm, 2010, 1: 187-190.
- [7] Huang Y, Hao YL, Mai XY. Chemical constituents from *Solidago canadensis* with hypolipidemic effects in HFD-fed hamsters [J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15: 319-324.
- [8] Wei DD, Liu JY, Xu MM, et al. Research progress and resource utilization strategy of invasive alien plant of *Solidago canadensis* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2023, 25: 1853-1865.
- [9] Elshafie HS, Gruřová D, Baranová B, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Solidago canadensis* L. growing wild in Slovakia [J]. Molecules, 2019, 24: 071206.
- [10] Valverde SS, Santos BCS, Oliveira TB, et al. Solidagenone from *Solidago chilensis* Meyen inhibits skin inflammation in experimental models [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2021, 128: 91-102.
- [11] Nkuimi Wandjou JG, Quassinti L, Gudžinskas Z, et al. Chemical composition and antiproliferative effect of essential oils of four *Solidago* species (*S. canadensis*, *S. gigantea*, *S. virgaurea* and *S. ×niederederi*) [J]. Chem Biodivers, 2020, 17: 000685.
- [12] Liu XY, Zhu HK, Wu SH, et al. Antitumor activity of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. [J]. J Zhejiang Univ Sci Ed (浙江大学学报 理学版), 2007, 34: 661-664.
- [13] Wang KJ, Cheng LZ, Li L, et al. Antioxidant and radical-scavenging activity of flavonoids from *Solidago canadensis* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 41: 493-497.
- [14] Locateli G, Oliveira AB, Miorando D, et al. Antidepressant-like effects of solidagenone on mice with bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced depression [J]. Behav Brain Res, 2020, 395: 112863.
- [15] Rahimi O, Asadi LN, Salehi A, et al. Hepatorenal protective effects of hydroalcoholic extract of *Solidago canadensis* L. against paracetamol-induced toxicity in mice [J]. J Toxicol, 2022, 2022: 091605.
- [16] Bruna BSDT, Barbosa MD, Daele MG, et al. Solidagenone *in vivo* leishmanicidal activity acting in tissue repair response, and immunomodulatory capacity in *Leishmania amazonensis* [J]. Chem Biol Interact, 2022, 361: 109969.
- [17] Silva DTBB, Daele MG, Fernanda T, et al. Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation [J]. Phytomedicine, 2021, 85: 153536.
- [18] Gan XF, Song XH, Zhang, HY, et al. Preventing carassius auratus gibelio from *Trichodina* spp. by extracts from *Solidago canadensis* [J]. J Anhui Agric Univ (安徽农业大学学报), 2007, 34: 515-519.
- [19] Li SL, Shen X, Zou ZR. Effect of petroleum ether extract from *Solidago canadensis* on liver of *Pomacea canaliculate* [J]. Chin Agric Sci (中国农业科学), 2019, 52: 2624-2635.
- [20] Kato-Noguchi H, Kato M. Allelopathy and allelochemicals of

- Solidago canadensis* L. and *S. altissima* L. for their naturalization [J]. *Plants* (Basel), 2022, 11: 233235.
- [21] Poljuha D, Sladonja B, Božac UM, et al. The invasive alien plant *Solidago canadensis*: phytochemical composition, ecosystem service potential, and application in bioeconomy [J]. *Plants* (Basel), 2024, 13: 1745.
- [22] Zhou T, Wang J, Lin ZQ, et al. Abietane diterpenoids with anti-neuroinflammation activity from *Rosmarinus officinalis* [J]. *Fitoterapia*, 2024, 174: 105866.
- [23] Mu LP, Wang J, Zhou T, et al. Diarylheptanoids with neuroprotective effects from *Alpinia officinarum* rhizomes [J]. *Fitoterapia*, 2024, 175: 105980.
- [24] Qiu CX, Wang J, Mu LP, et al. Chemical constituents from the fruits of *Alpinia oxyphylla* and their neuroprotective effects [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2023, 58: 2746-2753.
- [25] Zhou T, Wang J, Qiao WH, et al. The phenols from *Vaccinium dunalianum*: MS/MS fragmentations and neuroprotective effects [J]. *Food Sci* (食品科学), 2024, 45: 140-149.
- [26] Zana A, Hajdú Z, Jedlinszki N, et al. Isolation and structural determination of new metabolites from *Artemisia asiatica* roots [J]. *Tetrahedron*, 2015, 71: 4817-4820.
- [27] Murakami N, Tamura S, Iwata E, et al. Facilely accessible multidrug resistance modulator derived from sucrose [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 3267-3270.
- [28] Xue SJ, Chen Y, Chen SQ, et al. Simultaneous determination of eight saccharides contents in *Radix rehmanniae* and its different processed products by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2023, 43: 939-949.
- [29] Zhang WD, Sheng YT, Fang X, et al. A kind of sucrose derivative, preparation method thereof and use as anticancer drug: CN, ZL201610344978.9 [P]. 2016-05-23.
- [30] Sheng X, Zou ZR. Review on research progress of chemical constituents and bioactivities of *Solidago* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41: 4303-4313.
- [31] Xiao WY, Liu MH, Liu ZZ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Solidago* species [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1607-1617.
- [32] Singh A, Agarwal S, Singh S, et al. Age related neurodegenerative Alzheimer's disease: usage of traditional herbs in therapeutics [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 717: 134679.
- [33] Tang ZY, Wang FQ, Liao SY, et al. Progress in the study of axonal damage and repairment in neurodegenerative diseases [J]. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2024, 36: 607-618.
- [34] Wu Y, Ma B, Liu C, et al. Pathological involvement of protein phase separation and aggregation in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 15: 810187.
- [35] Qu Y, Wu H, Zhu GQ, et al. The improving effect and mechanisms of Anshen Dingzhi Prescription on Alzheimer's disease-like behavior induced by *D*-galactose combined with  $A\beta$ O in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2024, 59: 119-134.
- [36] Claudia R, Filomena N, Daniela M, et al. Nanoparticle-guided brain drug delivery: expanding the therapeutic approach to neurodegenerative diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 111897.
- [37] Justyna ŁW, Mariola H. Acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative diseases and the role of acetylcholinesterase in their pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 179290.