钩藤水提取物中的微量木脂素类非等量对映异构体和消旋体

任金秋, 韦芳婷, 雷小强, 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: 采用大孔树脂、MCI和HW 40系列等不同型号的树脂, 以及Sephadex LH-20及硅胶等柱色谱, 结合闪式色谱和手性柱HPLC技术, 从钩藤水煎提取物中分离、拆分得到8对微量木脂素类非等量对映体 (+)-/(−)-**1**～(+)-/(−)-**6**、(+)-/(−)-**9** 和 (+)-/(−)-**10**, 以及两对外消旋对映体 (+)-/(−)-**7** 和 (+)-/(−)-**8**。借助波谱数据分析和电子圆二色谱 (ECD) 理论计算, 确定了所有对映体的结构和绝对构型。其中, (+)-/(−)-**1**～(+)-/(−)-**7** 为首次拆分并确定绝对构型的光学活性化合物, (+)-/(−)-**9** 和 (+)-/(−)-**10** 为首次在自然界中发现以非等量对映体形式存在。初步药理活性评价发现, (+)-**8** 和 (−)-**8** 在 10 μmol·L^{-1}浓度下, 可以抑制对乙酰氨基酚 (APAP) 引起的HepG2细胞损伤。

关键词: 茜草科; 钩藤属; 钩藤; 水提取物; 木脂素; 对映体手性拆分; 绝对构型确定; APAP引起的HepG2细胞损伤保护

中图分类号: R284 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1816-12

Scalamic enantiomers and racemates of minor lignanoid from an aqueous extract of the stems with hooks of *Uncaria rhynchophylla*

REN Jin-qiu, WEI Fang-ting, LEI Xiao-qiang, 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: From an aqueous extract of the stems with hooks of *Uncaria rhynchophylla*, eight pairs of scalemic enantiomers of minor lignanoid (+)-/(−)-**1** − (+)-/(−)-**6**、(+)-/(−)-**9**, and (+)-/(−)-**10** as well as two pairs of racemic enantiomers (+)-/(−)-**7** and (+)-/(−)-**8** were isolated and chirally separated by column chromatographic techniques over macroporous adsorbent resin, MCI resin, Toyopearl HW-40, silica gel, and Sephadex LH-20, together with flash and chiral HPLC techniques. Their structures including the absolute configurations were determined by spectroscopic data analysis and theoretic calculations of electronic circular dichroism (ECD) spectra. Among them, chiral separation and absolute configurational determination of the optical active compounds (+)-/(−)-**1** − (+)-/(−)-**7** are reported for the first time, while the occurrence of scalemic enantiomers (+)-/(−)-**9** and (+)-/(−)-**10** in nature are discovered for the first time. Preliminary bioassay showed that (+)-**8** and (−)-**8** inhibited acetaminophen (APAP) induced HepG2 cell damage at a concentration of 10 μmol·L^{-1}.

Key words: Rubiaceae; *Uncaria*; *Uncaria rhynchophylla*; aqueous extract; lignanoid; chiral separation of enantiomers; determination of absolute configurations; APAP induced HepG2 cell damage inhibition

收稿日期: 2025-04-22; 修回日期: 2025-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 [82293681, 82293685 (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.0513-4870.2025-0454

茜草科 (Rubiaceae) 钩藤属植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq ex Havil 的干燥带钩茎枝是常用中药钩藤, 具有息风定惊、清热平肝等功效[1], 多用于治疗高血压、癫痫、中枢神经系统及心血管疾病等[1,2]。药理学和化学研究显示, 钩藤提取物中主要化学成分及活性成分包括生物碱、黄酮和三萜等[3-8], 但大多数成分是从醇提取物中分离得到。由于醇提取与钩藤以水煎煮为主的用药方式不同, 因此作为对若干常用中药材化学成分及其药理活性多样性系统研究的内容之一[9-13], 作者课题组聚焦微量成分的分离和结构鉴定, 系统开展了钩藤水煎煮提取物的研究, 为较全面地揭示钩藤临床用水煎液中的化学成分及其后续药理活性的深入研究奠定基础。前文[14-21]已报道了 37 个生物碱[14,16,21]、2 个叶酸衍生物[15]、47 个三萜类化合物[17,20]、5 个紫罗兰酮衍生物[18]和 7 个单萜衍生物[19], 以及部分化合物的初步药理活性筛选结果。本文继续报道同一提取物中的 10 对木脂素类化合物对映异构体的分离、手性拆分、绝对构型确定和初步药理活性, 包括 8 对非等量对映异构体 [(+)-/(−)-**1**～(+)-/(−)-**6**、(+)-/(−)-**9** 和 (+)-/(−)-**10**], 以及两对外消旋体 [(+)-/(−)-**7** 和 (+)-/(−)-**8**] (图 1), 均为通过手性拆分获得的光学活性化合物。

结果和讨论

非等量对映异构体混合物 **1** 为白色无定型粉末, 红外光谱显示其分子结构中存在羟基 (3 364 cm^{-1})、共轭羰基 (1 683 cm^{-1}) 和苯环 (1 609 和 1 519 cm^{-1})。根据 (−)-HR-ESI-MS *m/z* 315.087 1 $[M-H]^-$ ($C_{17}H_{15}O_6$, 计算值 315.087 4) 和 NMR 谱数据 (表 1、2) 确定其分子式为 $C_{17}H_{16}O_6$, 不饱和度为 10。在甲醇-d_4 中, 该化合物的 ^{1}H NMR 谱显示其结构中存在两个间−对−位双取代的苯环 [δ_H 7.96 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2′), 7.93 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz, H-6′), 6.93 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 6.87 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5′), 6.82 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5)], 1 个取代在芳环上的甲氧基 [δ_H 3.82 (3H, s, 3-OCH_3)], 两个 sp^3 杂化次甲基 [δ_H 5.58 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-7) 和 3.54 (1H, ddd, J = 6.3, 6.3, 5.6 Hz, H-7)], 以及 1 个 sp^3 杂化亚甲基 [δ_H 3.86 (1H, dd, J = 11.2, 5.6 Hz, H-9a) 和 3.83 (1H, dd, J = 11.2, 6.3 Hz, H-9b)]。该化合物的 ^{13}C NMR 和 DEPT 给出与以上结构单元完全对应的碳共振信号, 包括 1 个共轭羧羰基碳 [δ_C (170.0, C-7′)] 信号。根据以上数据初步推断 **1** 为一个降碳的木脂素类化合物。

在利用 HSQC 实验图谱分析准确归属 NMR 谱中氢和碳共振信号的基础上, 根据 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中 H-2/H-6/H-5、H-2′/H-6′/H-5′和 H_2-9/H-8/H-7 的交叉峰, 确定了化合物 **1** 分子中氢之间存在相互偶合的结构片段 (图 2)。在 HMBC 谱中, H-2 与 C-4、C-6 和 C-7, H-5 与 C-1, H-6 与 C-2、C-4 和 C-7, H-7 与 C-2、C-6 和 C-9, H-8 与 C-1、C-7 和 C-9, H_2-9 与 C-7 和 C-8, 以及 3-OCH_3 与

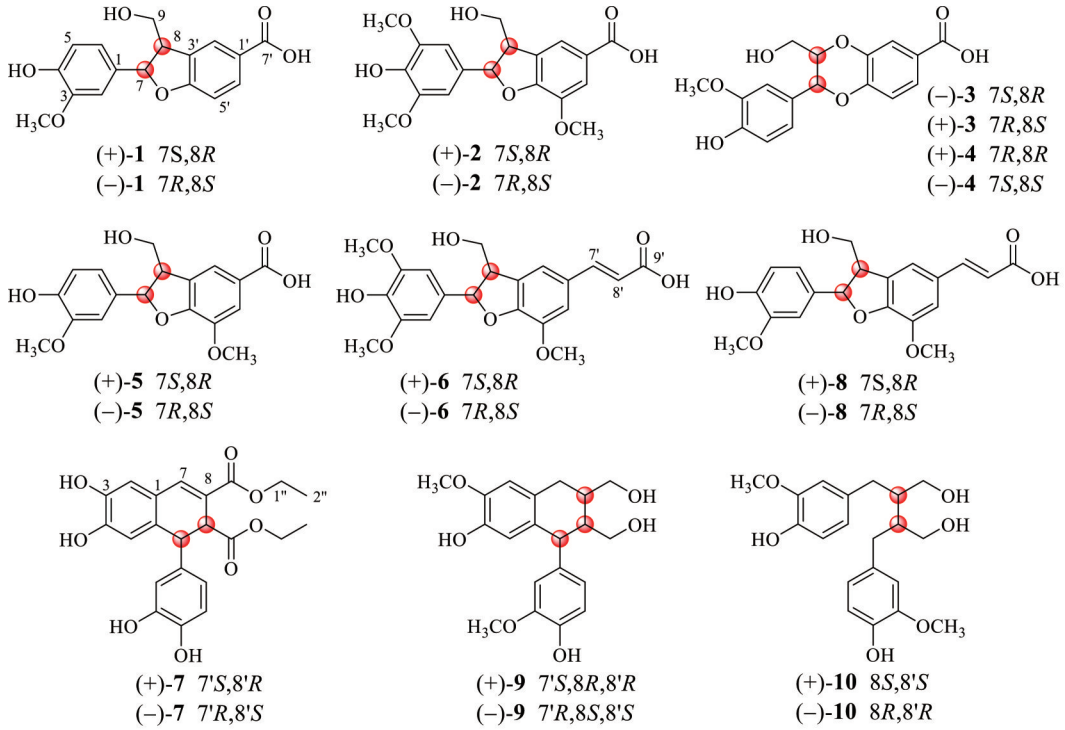


Figure 1 The structures of **1**−**10**

Table 1 ^{1}H NMR spectroscopic data of **1**−**7**. Data (δ_H) were measured in methanol-d_4 (references: δ_{HCD3OD} = 3.310 for ^{1}H) at 700 MHz for **1**−**7**. Proton coupling constants (*J*) in Hz are given in parentheses. The assignments were based on ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC, and HMBC experiments. * δ_H for -OEt in **7**: 4.18 (2H, m, H-1″), 1.28 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2″), 4.04 (2H, m, H-1‴), 1.12 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2‴)

No.	1	2	3	4	5	6	7*
2	6.93 d (2.1)	6.68 s	7.02 d (2.1)	7.03 d (2.1)	6.95 d (2.1)	6.68 s	6.48 s
5	6.78 d (8.4)		6.85 d (8.4)	6.85 d (8.4)	6.78 d (8.4)		6.82 s
6	6.82 dd (8.4, 2.1)	6.68 s	6.91 dd (8.4, 2.1)	6.92 dd (8.4, 2.1)	6.82 dd (8.4, 2.1)	6.68 s	
7	5.58 d (6.3)	5.63 d (6.3)	4.98 d (8.4)	4.93 d (8.4)	5.61 (6.3)	5.59 d (6.3)	7.56 s
8	3.54 ddd (6.3, 6.3, 5.6)	3.57 ddd (7.0, 6.3, 6.3)	4.09 ddd (7.7, 4.9, 2.8)	4.14 ddd (7.7, 4.9, 2.8)	3.56 ddd (6.3, 6.3, 5.6)	3.55 ddd (7.0, 6.3, 5.6)	
9a	3.86 dd (11.2, 5.6)	3.87 dd (11.2, 6.3)	3.73 dd (12.6, 2.8)	3.73 dd (12.6, 2.8)	3.84 dd (11.2, 5.6)	3.88 dd (11.2, 5.6)	
9b	3.83 dd (11.2, 6.3)	3.83 dd (11.2, 7.0)	3.49 dd (12.6, 4.9)	3.49 dd (12.6, 4.9)	3.82 dd (11.2, 6.3)	3.83 dd (11.2, 7.0)	
2′	7.96 d (2.1)	7.63 d (1.4)	7.64 d (2.1)	7.57 d (2.1)	7.63 brd (2.1)	7.19 s	6.44 d (2.1)
5′	6.87 d (8.4)		6.97 d (8.4)	7.02 d (8.4)			6.63 d (8.4)
6′	7.93 dd (8.4, 2.1)	7.58 d (1.4)	7.56 dd (8.4, 2.1)	7.58 dd (8.4, 2.1)	7.56 dd (8.4, 2.1)	7.16 s	6.38 dd (8.4, 2.1)
7′						7.63 d (16.1)	4.34 d (4.2)
8′						6.35 d (16.1)	3.83 d (4.2)
3-OCH$_3$	3.82 s	3.82 s	3.88 s	3.88 s	8.32 s	3.82 s	
5-OCH$_3$		3.82 s				3.82 s	
5′-OCH$_3$		3.92 s			3.89 s	3.92 s	

Table 2 ^{13}C NMR spectroscopic data of **1**−**7**. Data (δ_C) were measured in methanol-d_4 (reference: δ_{CD3OD} = 49.000 for ^{13}C) at 175 MHz for **1**−**7**. Proton coupling constants (*J*) in Hz are given in parentheses. The assignments were based on HSQC, and HMBC experiments. * δ_C for -OEt of **7**: 62.1 (C-1‴), 14.4 (C-2‴), 61.8 (C-1″), 14.6 (C-2″)

No.	1	2	3/4	5	6	7*
1	134.2	133.2	128.9	133.9	133.4	124.9
2	110.5	104.2	112.1	110.6	104.2	117.0
3	149.2	149.4	149.3	149.1	149.4	149.1
4	147.7	136.7	148.5	147.8	136.6	145.6
5	116.2	149.4	116.3	116.2	149.4	117.0
6	119.7	104.2	121.7	119.8	104.2	131.3
7	89.7	90.3	78.2	90.2	90.0	139.5
8	54.2	54.7	79.9	54.6	55.0	123.3
9	64.7	64.6	62.0	64.6	64.6	168.7
1′	124.4	125.2	125.0	125.1	129.9	135.6
2′	128.1	120.8	119.8	120.8	119.0	115.9
3′	129.7	130.3	144.7	130.4	130.9	145.1
4′	165.4	153.9	149.7	153.9	151.9	146.1
5′	109.9	145.3	117.9	145.2	145.9	116.2
6′	133.0	115.3	124.5	115.2	113.7	120.1
7′	170.0	169.8	169.6	169.8	146.8	47.3
8′					116.5	49.5
9′					170.9	174.8
3-OCH$_3$	56.4	56.8	56.5	56.4	56.8	
5-OCH$_3$		56.8			56.8	
5′-OCH$_3$		56.7		56.7	56.8	

C-3的异核远程相关信号 (图2), 结合这些氢和碳的化学位移, 推断出3-甲氧基-4,7,9-三氧-8-取代的苯丙基单元。同时, 通过H-2′与C-4′、C-6′和C-7′, H-5′与C-1′和C-3′, 以及H-6′与C-2′、C-4′和C-7′的HMBC信号, 结合它们的化学位移, 推断出4′-氧-3′-取代的苯甲酸单元。另外, 根据H-7和H-8与C-3′和C-4′, H_2-9与C-3′, 以及H-2′与C-8的HMBC信号, 确定2个单元之间通过C-7−O−C-4′和C-8−C-3′连接。因此, 化合物**1**的平面结构确定为3,5′-二甲氧基-4,9-二羟基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3-新木脂烷-7′-羧酸。

通过NOESY谱中H-7与H_2-9的NOE相关信号 (图3), 以及C-8的化学位移值δ_C 54.2[22], 确证H-7与H-8为反式取向。由于**1**的比旋光值较小, 因此对其进行了手性柱HPLC分析, 结果显示积分面积接近5:4的两个色谱峰, 进一步经手性色谱柱HPLC拆分得到 (+)-**1** {$[\alpha]_D^{20}$ = +153.9 (*c* 0.01, CH_3OH)} 和 (−)-**1** {$[\alpha]_D^{20}$ −154.6 (*c* 0.01, CH3OH)}, 二者的^{1}H NMR谱数据相同但CD谱曲线呈镜像关系, 确证为对映体。在 (+)-**1**的CD谱中, $^{1}L_b$吸收带 (λ_{max} 260 nm) 的Cotton效应为正 ($\Delta\varepsilon$ = +5.21), 根据2-芳基取代的[2,3]-二氢苯并呋喃发色团$^{1}L_b$吸收带的反螺旋规则[23], 确定其具有7*S*,8*R*构型; 同理, 确定 (−)-**1**的构型为7*R*,8*S*。同时, 在 (+)-**1**和

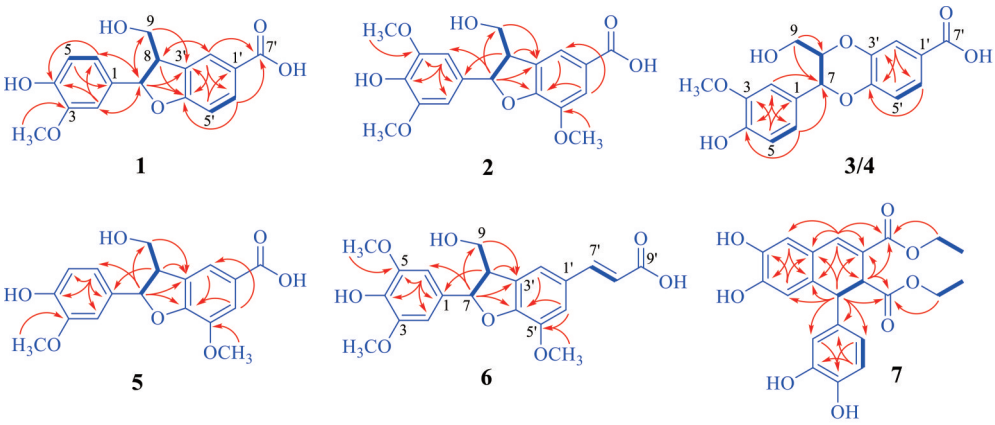


Figure 2 The ^{1}H-^{1}H COSY (thick lines) and key HMBC (arrows) correlations of **1**−**7**

(−)-**1** 的 CD 谱中, $^{1}L_a$ 吸收带 (λ_{max} 223.5 ± 0.5 nm) 的 Cotton 效应分别为负 ($\Delta\varepsilon$ = −2.27) 和正 ($\Delta\varepsilon$ = +3.06), 应用芳香环的象限规则[24], 也支持以上绝对构型的确定。此外, 通过实测 CD 和计算 ECD 的比较, 也支持 (+)-**1** 和 (−)-**1** 的绝对构型分别为 7*S*,8*R* 和 7*R*,8*S* (图 4)。因此, (+)-**1** 和 (−)-**1** 的结构分别确定为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-3,5′-二甲氧基-4,9-二羟基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3-新木脂烷-7′-羧酸, 并命名为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-钩藤降新木脂酸 A [(+)-(7*S*,8*R*)-/(−)-(7*R*,8*S*)-uncarnorneolignic acid A]。

非等量对映异构体混合物 **2** 为白色无定形粉末, 通过 (+)-HR-ESI-MS *m/z* 377.122 4 $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{21}O_8$,

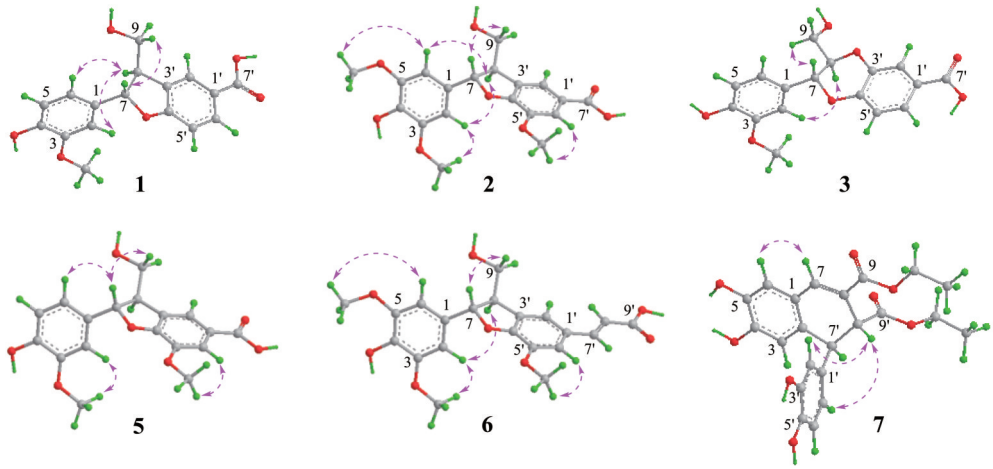


Figure 3 The key NOESY correlations (pink double arrows) of compounds **1**−**3** and **5**−**7**

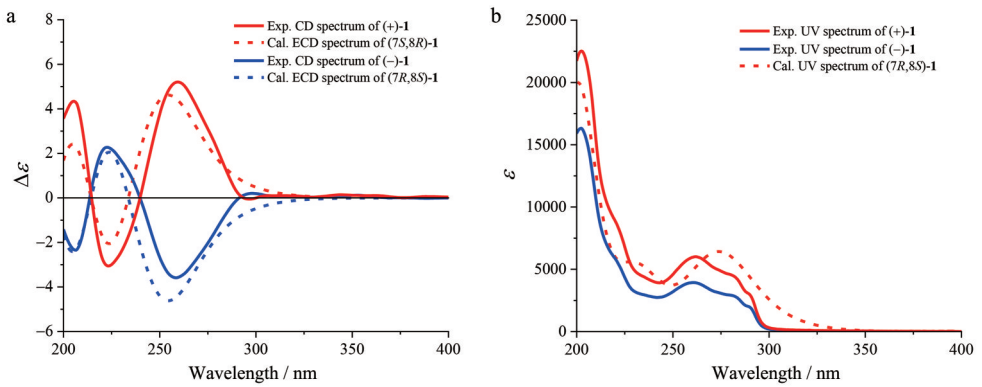


Figure 4 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**1** (red) and (−)-**1** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*S*,8*R*)-**1** (red) and (7*R*,8*S*)-**1** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**1** (red) and (−)-**1** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*R*,8*S*)-**1**. (Blue-shifted by 20 nm)

计算值 377.123 1) 和 NMR 谱数据 (表 1、2) 分析, 确定其分子组成为 $C_{19}H_{20}O_8$。比较 **2** 和 **1** 的 NMR 数据显示, 二者的结构差异在于 **2** 中的 3,5-二甲氧基-4-羟基苯基单元取代了 **1** 中的 3-甲氧基-4-羟基苯基单元。同时, **2** 的 NMR 数据与文献[25]报道 5′-甲氧基肥牛木素在相同溶剂中的相应数据一致, 并通过 2D NMR 数据分析确证 **2** 与文献报道化合物拥有相同的平面结构和相对构型 (图 2、3)。**2** 经手性柱 HPLC 分析显示面积比接近 3:2 的两个色谱峰, 通过手性色谱柱 HPLC 拆分得到化合物 (+)-**2** {$[\alpha]_D^{20}$ = +23.1 (*c* 0.02, CH_3OH)} 和 (−)-**2** {$[\alpha]_D^{20}$ = −23.1 (*c* 0.01, CH_3OH)}, 二者的 ^{1}H NMR 谱数据相同、CD 曲线呈镜像关系, 且 (+)-**2** 的 Cotton 效应与文献报道 5′-甲氧基肥牛木素的一致。因此确定 (+)-**2** 的绝对构型与文献[25]报道 5′-甲氧基肥牛木素相同的 7*S*,8*R* 构型; 相应地, (−)-**2** 的绝对构型确定为 7*R*,8*S*, 并经实测 CD 与计算 ECD 比较的方法进行了进一步确证 (图 5)。因此, 化合物 (+)-和 (−)-**2** 的结构分别确定为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-5-甲氧基肥牛木素 [(+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-5-methoxyceplignan]。然而, 需要指出, 尽管文献[25]中通过 CD 谱中 220 nm 处的 Cotton 效应确定了 5′-甲氧基肥牛木素的绝对构型为 7*S*,8*R*, 但是未报道该化合物的比旋光 $[\alpha]_D^{20}$ 数值, 其手性特征与旋光性的关系无法对应。另外, 文献[25]中显示的分子结构标识的原子编号, 与 IUPAC 建议新木脂素的命名规则不一致[26], 故根据相关规则, 在命名中已将 5′-甲氧基肥牛木素 (5′-methoxyceplignan) 修改为 5-甲氧基肥牛木素 (5-methoxyceplignan)。

混合物 **3** 和 **4** 为常规非手性 HPLC 难以分离的棕色无定形粉末, $[\alpha]_D^{20}$ +10.0 (*c* 0.01, CH_3OH)。根据 (−)-HR-ESI-MS *m/z* 331.082 1 $[M-H]^-$ ($C_{17}H_{15}O_7$, 计算值 331.082 3) 和 NMR 谱数据 (表 1、2), 确定它们的分子组成均为 $C_{17}H_{16}O_7$。在甲醇-d_4 中, **3** 和 **4** 的 ^{1}H NMR 谱显示化学位移差异小、部分可分辨且强度比约为 3∶1 的两组共振信号峰; 然而, ^{13}C NMR 谱只显示一组共振信号峰。进一步经 2D NMR 数据分析 (图 2、3), 可以确定混合物中占比高的 **3** 拥有平面结构 4,9-二羟基-3-甲氧基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-7′-羧酸。根据这些信息, 推测该混合物是难以分离且 ^{13}C NMR 信号重叠的非对映异构体混合物, 并对其进行了手性 HPLC 分析, 结果显示出强度不同的 4 个色谱峰。随即利用手性 HPLC 分离拆分得到 (−)-**3** {$[\alpha]_D^{20}$ = −33.3 (*c* 0.01, CH_3OH)}、(+)-**3** {$[\alpha]_D^{20}$ = +33.3 (*c* 0.01, CH_3OH)}、(+)-**4** {$[\alpha]_D^{20}$ = +6.7 (*c* 0.01, CH_3OH)} 和 (−)-**4** {$[\alpha]_D^{20}$ = −6.7 (*c* 0.01, CH_3OH)}。其中, (−)-**3** 和 (+)-**3** 的 ^{1}H NMR 谱数据完全相同但 CD 曲线呈镜像关系, 而 (+)-**4** 和 (−)-**4** 的 ^{1}H NMR 谱数据完全一致但 CD 曲线相反。由此确定 (+)-**3**/(−)-**3** (HPLC 色谱峰面积积分比为 3∶4) 和 (+)-**4**/(−)-**4** (HPLC 色谱峰面积积分比为 3∶4) 为两组对映体异构体; 尤其是, (+)-**4** 的 ^{1}H NMR 谱数据和比旋光值与文献[27]报道 (+)-(7*R*,8*R*)-4,9-二羟基-3-甲氧基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-7′-羧酸的相应数据完全一致 (差异在实验误差范围内)。因此, 确定 (+)-**4** 和 (−)-**4** 的结构分别为 (+)-(7*R*,8*R*)-和 (−)-(7*S*,8*S*)-8′,9′-二降碳-4,9-二羟基-3-甲氧基-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-7′-羧酸, 并得到实测 CD 谱与计算 ECD 谱一致性的支持 (图 6)。

与 (+)-**4**/(−)-**4** 的 ^{1}H NMR 谱数据比较, 在拆分后的主要对映体 (−)-**3**/(+)-**3** 中, H-2′的共振信号相对向低场位移约 $\Delta\delta_H$ +0.08, 相反 H-5′共振信号相对向高场位移约 $\Delta\delta_H$ −0.06, 且与拆分前混合物 ^{1}H NMR 谱中可分辨的数据能够完全对应。由此确证 (−)-**3**/(+)-**3** 是 (+)-**4**/(−)-**4** 的非对映异构体。在 (−)-**3** 和 (+)-**3** 的 CD 谱中, 均呈现出典型的源于两个苯环发色团 π-π*跃迁的激子偶合 Cotton 效应, 且 (−)-**3** 在 264 ($\Delta\varepsilon$ −0.43) 和 240 ($\Delta\varepsilon$

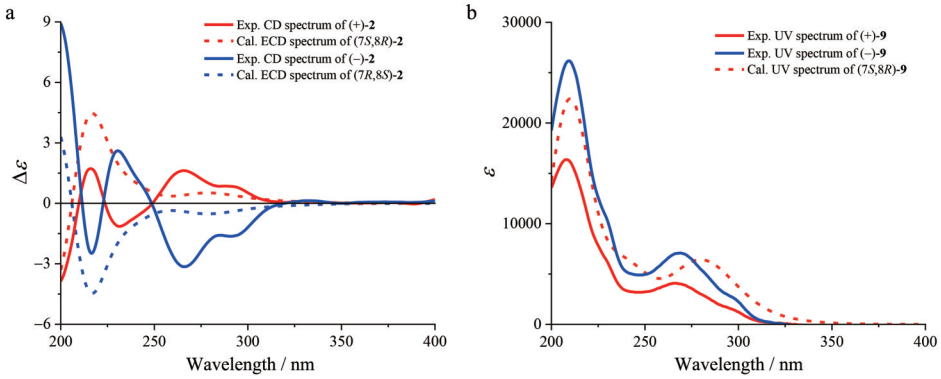


Figure 5 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**2** (red) and (−)-**2** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*S*,8*R*)-**2** (red) and (7*R*,8*S*)-**2** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**2** (red) and (−)-**2** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*S*,8*R*)-**2**

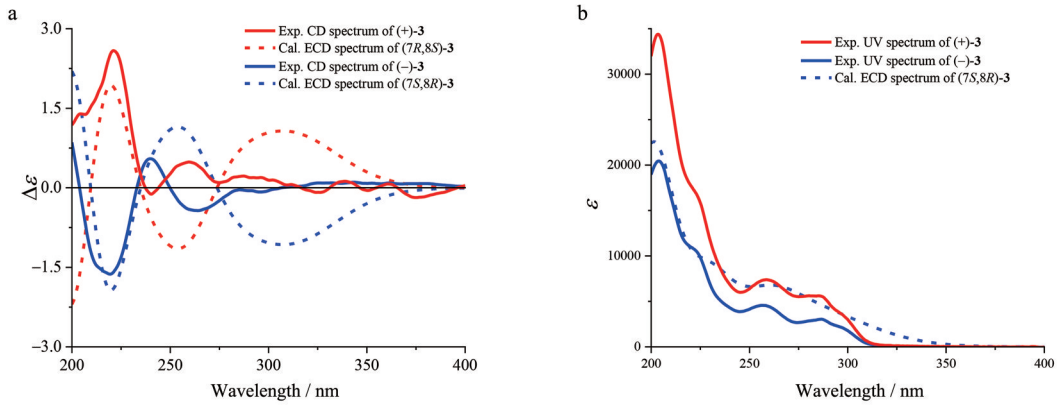


Figure 6 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**3** (red) and (−)-**3** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*R*,8*S*)-**3** (red) and (7*S*,8*R*)-**3** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**3** (red) and (−)-**3** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*S*,8*R*)-**3** (blue). (Red-shifted by 4 nm)

+0.55) nm处分别呈现负的和正的Cotton效应, 应用激子偶合规则[23], 两个发色团的偶极距之间应为逆时针排列, 指定其绝对构型为7*S*,8*R*; 相应地, 确定其对映体(+)-**3**的构型为7*R*,8*S*。该推论也得到实测CD与计算ECD谱一致性的支持 (图7)。因此, 化合物 (+)-**3**、(−)-**3**、(+)-**4**和 (−)-**4**的结构依次确定为 (+)-(7*R*,8*S*)-、(−)-(7*S*,8*R*)-、(+)-(7*R*,8*R*)-和 (−)-(7*S*,8*S*)-4,9-二羟基-3-甲氧基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-7′-羧酸, 分别命名为 (+)-(7*R*,8*S*)-、(−)-(7*S*,8*R*)-、(+)-(7*R*,8*R*)-和 (−)-(7*S*,8*S*)-钩藤降氧新木脂酸A (uncarnoroxyneolignic acid A)。

需要指出, 根据IUPC关于木脂素和新木脂素的命名规则[26], 在以上描述中, 对文献[27]报道化合物 (+)-**4**的命名 (+)-(7*R*,8*R*)-3-甲氧基-1′-羧基-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-4,9-二醇 [(+)-(7*R*,8*R*)-3-methoxy-1′-carboxy-4′,7-epoxy-8,3′-oxyneolignan-4,9-diol] 修改为 (+)-(7*R*,8*R*)-4,9-二羟基-3-甲氧基-8′,9′-二降碳-4′,7-环氧-8,3′-氧新木脂烷-7′-羧酸 [(+)-(7*R*,8*R*)-4,9-dihydroxy-3-methoxy-8′,9′-dinor-4′,7-epoxy-8,3′-oxyneolignan-7′-oic acid]。

非等量对映异构体混合物**5**为白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{20}$ +8.7 (*c* 0.25, CH_3OH)。通过 (+)-HR-ESI-MS 和NMR谱数据 (表1、2) 分析, 确定其分子组成为$C_{18}H_{18}O_7$。在甲醇-d_4中, **5**的NMR谱数据与肥牛木素 (ceplignan, 未报道光学活性和构型)[28]在相同溶剂中的相应数据一致, 并通过2D NMR数据分析 (图2、3) 确证**5**拥有与肥牛木素相同的平面结构和相对构型。**5**经手性色谱柱HPLC分析和拆分得到色谱峰面积比接近1.2∶1的化合物 (+)-**5** {$[\alpha]_D^{20}$ = +43.3 (*c* 0.10, CH_3OH)}和 (−)-**5** {$[\alpha]_D^{20}$ = −43.1 (*c* 0.06, CH_3OH)}, 二者的^{1}H NMR数据相同但CD谱曲线呈镜像关系, 证明 (+)-**5**和 (−)-**5**是对映异构体。根据CD谱中^1L_b吸收带 (λ_{max} 260～300 nm) Cotton效应的反螺旋规则[23]以及^1L_a吸收带 (λ_{max} 220～240 nm) 的象限规则[24], 确定 (+)-**5**和 (−)-**5**的绝对构型分别为7*S*,8*R*和7*R*,8*S*, 并得到实测CD和计算ECD一致的支持 (图8)。因此, 化合物 (+)-**5**和 (−)-**5**的结构分

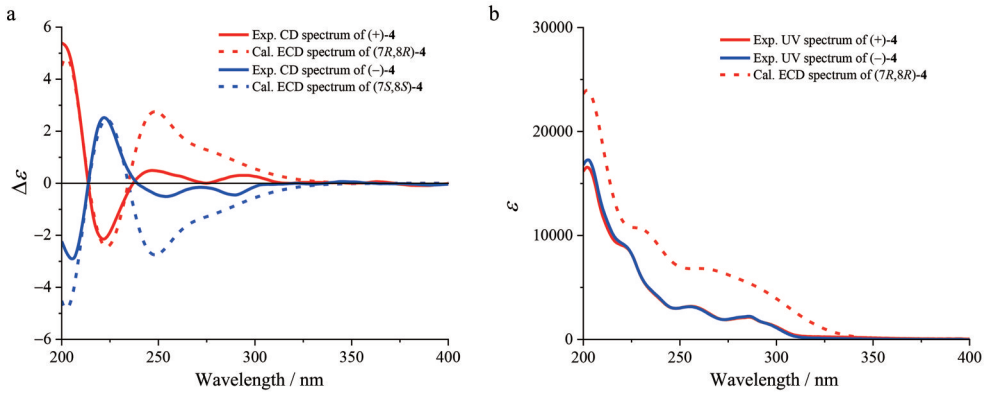


Figure 7 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**4** (red) and (−)-**4** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*R*,8*R*)-**4** (red) and (7*S*,8*S*)-**4** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**4** (red) and (−)-**4** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*R*,8*R*)-**4**. (Red-shifted by 4 nm)

别确定为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-肥牛木素 [(+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-ceplignan]。需要强调, 尽管文献[29]从石菖蒲中分离并报道了 (+)-(2*S*,3*R*)-/(−)-(2*R*,3*S*)-肥牛木素 [(+)-(2*S*,3*R*)-/(−)-(2*R*,3*S*)-ceplignan], 但是在相关结构鉴定中, 描述二者为差向异构体, 且引用的比旋光值差异较大。进一步查阅文献[29]的支撑资料显示, 两个构型异构体的 CD 谱差异显著, 波长小于 250 nm 的 Cotton 效应曲线的趋势相同, 二者的 NMR 谱存在明显差异, 实验过程未显示用手性柱 HPLC 分离。这些均与 (+)-/(−)-**5** 的情况不同。因此, 文献[29]报道 (+)-(2*S*,3*R*)-和(−)-(2*R*,3*S*)-肥牛木素 [(+)-(2*S*,3*R*)-/(−)-(2*R*,3*S*)-ceplignan] 的构型确定存疑。

非等量对映异构体混合物 **6** 为白色无定形粉末, 通过 (+)-HR-ESI-MS 和 NMR 谱数据 (表 1、2) 分析, 确定其分子组成为 $C_{21}H_{22}O_8$。在甲醇-d_4 中, **6** 的 NMR 谱数据与从江南卷柏中分离报道的 (7*R**,7′*E*,8*S**)-4,9-二羟基-3,5,5′-三甲氧基-4′,7-环氧-8,5′-新木脂烷-7′-烯-9′-羧酸 [*rel*-(7*R*,7′*E*,8*S*)-4,9-dihydroxy-3,3′,5-trimethoxy-4′,7-epoxy-8,5′-neolign-7′-en-9′-oic acid][22]的相应数据一致, 表明 **6** 与文献报道化合物拥有相同的平面结构和相对构型, 并通过 **6** 的 2D NMR 数据分析进行了确证 (图 2、3)。**6** 经手性色谱柱 HPLC 分析和拆分得到色谱峰面积比接近 2∶3 的化合物 (+)-**6** {$[\alpha]_D^{20}$ = +136.4 (*c* 0.01, CH_3OH)} 和 (−)-**6** {$[\alpha]_D^{20}$ = −133.3 (*c* 0.01, CH_3OH)}, 它们的 ^{1}H NMR 数据一致但 CD 谱曲线呈镜像关系, 确证 (+)-**6** 和 (−)-**6** 是对映异构体。进一步地, 根据 (+)-**6** 和 (−)-**6** 的 CD 谱中 ^1L_b 吸收带 (λ_{max} 260～300 nm) Cotton 效应的反螺旋规则[23]以及 ^1L_a 吸收带 (λ_{max} 220～240 nm) 的象限规则[24], 确定 (+)-**6** 和 (−)-**6** 的绝对构型分别为 7*S*,8*R* 和 7*R*,8*S*, 并得到实测 CD 和计算 ECD 一致的支持 (图 9)。因此, 化合物 (+)-**6** 和 (−)-**6** 的结构分别确定为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-4,9-二羟基-3,5,5′-三甲氧基-7,4′-环氧-8,3′-新木脂素-7′-烯-9′-酸 [(+)-(7*S*,8*R*)-/(−)-(7*R*,8*S*)-4,9-dihydroxy-3,5,5′-trimethoxy-7,4′-epoxy-8,3′-neolign-7′-en-9′-oic acid], 命名为 (−)-(7*R*,8*S*)-和 (+)-(7*S*,8*R*)-钩藤新木脂酸 A [(−)-(7*R*,8*S*)-/(+)-(7*S*,8*R*)-uncarneolignic acid A)。需要指出, 根据 IUPAC 关于木脂素和新木脂素的命名规则[26], 在 (+)-/(−)-**6** 的系统命名中, 对文献[22]报道相关化合物的原子编号和命名进行了修正。

外消旋体 **7** 为白色无定形粉末; (+)-HR-ESI-MS *m/z* 415.137 6 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{23}O_8$, 计算值 415.138 7) 和 NMR 谱数据分析 (表 1、2), 确定其分子组成为 $C_{22}H_{22}O_8$。在甲醇-d_4 中, **7** 的 NMR 谱数据与文献报道 (7′*S*,8′*R*)-4,5,3′,4′-四羟基-2,7′-环木脂烷-7-烯-9,9′-二羧酸二乙醇酯[30]和二乙基 1-(3,4-二羟基苯基)-6,7-二羟基-1,2-二氢萘-2,3-二羧酸酯[31]的相应数据一致, 差别可归属于溶剂效应。由此推定 **7** 与文献报道化合物具有相同的平面结构和相对构型, 并进一步通过 2D NMR 实验数据分析进行了确证 (图 2、3)。特别是, 在 **7** 的 NOESY 谱中, H-8′与 H-2′和 H-6′之间的交叉峰确证 H-7′与 H-8′具有反式取向。由于 **7** 的比旋光值接近零, 与 (7′*S*,8′*R*)-4,5,3′,4′-四羟基-2,7′-环木脂烷-7-烯-9,9′-二羧酸二乙醇酯的比旋光值 {$[\alpha]_D^{20}$ −82.3 (*c* 0.10, CH_3OH)}[30]之间存在很大差异, 推测 **7** 为外消旋体混合物, 并进一步用手性正相半制备 HPLC 进行了分析确认。随后, 经制备拆分获得色谱峰面积积分比接近 1∶1 的化合物 (+)-**7** {$[\alpha]_D^{20}$ = +120.1 (*c* 0.09, CH_3OH)} 和 (−)-**7** {$[\alpha]_D^{20}$ = −120.0 (*c* 0.06, CH_3OH)}, 它们的 ^{1}H NMR 数据一致, CD 谱曲线呈镜像关系, 证明 (+)-**7** 和 (−)-**7** 是对映异构体。同时, (+)-**7** 和 (−)-**7** 的 CD 谱显示典型的源于两个苯环发色团 π-π*跃迁的激子偶合 Cotton 效应, 应用激子偶合规则[23], 指定其绝对构型分别为 7′*S*,8′*R* 和 7′*R*,8′*S*, 并得到计算 ECD 的支持 (图 10)。因此, (+)-**7** 和 (−)-**7** 的结

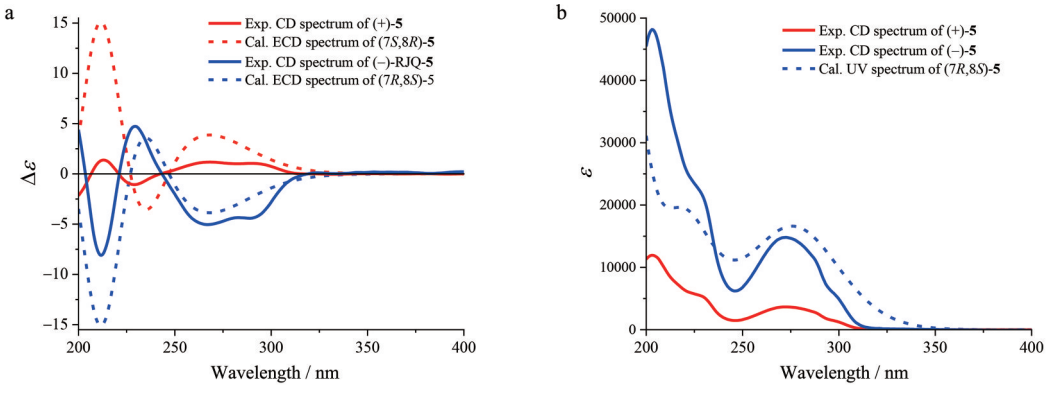


Figure 8 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**5** (red) and (−)-**5** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*S*,8*R*)-**5** (red) and (7*R*,8*S*)-**5** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**5** (red) and (−)-**5** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*R*,8*S*)-**5**. (Blue-shifted by 10 nm)

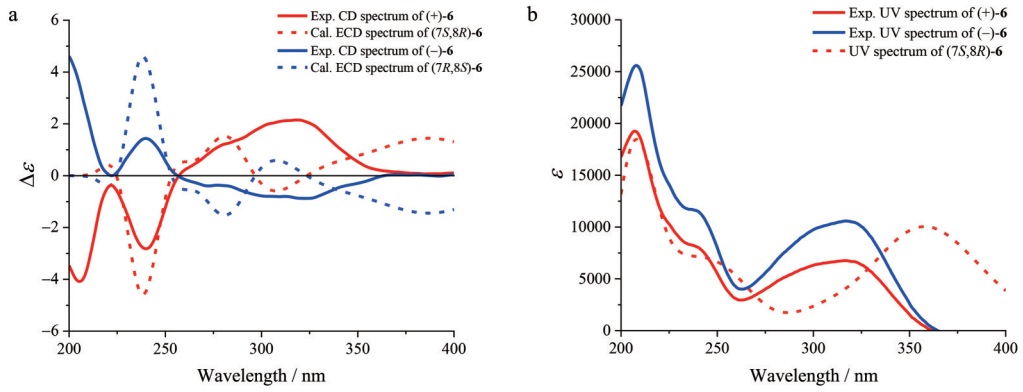


Figure 9 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**6** (red) and (−)-**6** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7*S*,8*R*)-**6** (red) and (7*R*,8*S*)-**6** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**6** (red) and (−)-**6** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7*S*,8*R*)-**6**

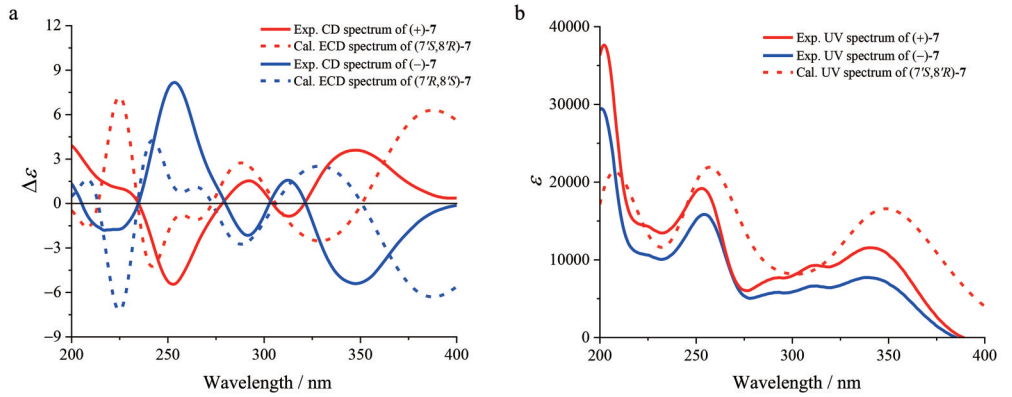


Figure 10 a: The overlaid experimental CD spectra (full lines) of (+)-**7** (red) and (−)-**7** (blue) and calculated ECD spectra (dash lines) of (7'*S*,8'*R*)-**7** (red) and (7'*R*,8'*S*)-**7** (blue). b: The overlaid experimental UV spectra (full lines) of (+)-**7** (red) and (−)-**7** (blue) and calculated UV spectrum (dash line) of (7'*S*,8'*R*)-**7**

构确定为 (+)-(7′*S*,8′*R*)-和 (−)-(7′*R*,8′*S*)-4,5,3′,4′-四羟基-2,7′-环木脂烷-7-烯-9,9′-二羧酸二乙醇酯, 命名为 (+)-(7′*S*,8′*R*)-和 (−)-(7′*R*,8′*S*)-钩藤环木脂酸 A 二乙酯 [(+)-(7′*S*,8′*R*)-/(−)-(7′*R*,8′*S*)-uncarcycolignic acid diethyl ester]。需要指出, 文献[30]报道的 (7′*S*,8′*R*)-4,5,3′,4′-四羟基-2,7′-环木脂烷-7-烯-9,9′-二羧酸二乙醇酯 [(7′*S*,8′*R*)-4,5,3′,4′-tetrahydroxy-2,7′-cyclolign-7-ene-9,9′-dioic acid diethyl ester] 与 (+)-**7** 的绝对构型相同, 但比旋光值符号相反, 仔细查阅文献[30]的支撑材料显示, 相关化合物的 CD 谱图与 (+)-**7** 和 (−)-**7** 的差异显著, NMR 谱图显示样品中含有杂质, 故文献报道化合物构型确定的可靠性存疑。

通过 $[\alpha]_D^{20}$、CD、HR-ESI-MS 和 NMR 谱数据分析, 并与文献报道化合物的数据比较, 确证其他 3 对已知对映体分别为 (+)-(7*S*,8*R*)-和 (−)-(7*R*,8*S*)-当归木脂素 [(+)-/(−)-angelignanine M[32], (+)-/(−)-**8**]、(+)-(7′*S*,8*R*,8′*R*)-和 (−)-(7′*R*,8*S*,8′*S*)-异落叶松脂醇 [(+)-(7′*S*,8*R*,8′*R*)-/(−)-(7′*R*,8*S*,8′*S*)-isolariciresinol[11,33], (+)-/(−)-**9**], 以及 (+)-(8*S*,8′*S*)-和 (−)-(8*R*,8′*R*)-开环异落叶松脂醇 [(+)-(8*S*,8′*S*)-/(−)-(8*R*,8′*R*)-secoisolariciresinol[34], (+)-/(−)-**10**]。

对部分化合物在抑制 APAP 引起 HepG2 细胞损伤、抑制 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 炎症因子、抗流感病毒 A/汉防/359/95 (H3N2) 及柯萨奇病毒 B3 型 (CVB3)、抑制 A549、H460 和 MC38 肿瘤细胞增殖, 以及抑制 Fe^{2+}-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 (+)-**8** 和 (−)-**8** 在 10 μmol·L^{-1} 浓度下, 可以抑制 APAP 引起的 HepG2 细胞损伤, 细胞存活率从 57.60% 分别提高至 69.06% 和 76.29% (阳性药: 双环醇, 细胞存活率提高至 65.87%)。

总之, 在前期研究基础上, 作者从钩藤水提取物中通过进一步分离和手性拆分得到并鉴定了 10 对木脂素类对映体, 除两对以对映体等量的外消旋体存在外, 其他均为以不同比例存在的非等量对映体。这一现象足以说明在钩藤中相关木脂素的生物合成或代谢过程

潜在对映体部分调控的独特选择性, 这种选择性的生物控制机制及其生物学意义值得探究。另外, 光学活性或手性作为天然产物的普遍特性, 不但具有十分重要的生物学和药学价值, 而且是后续深入研究的基础。同时, 有关木脂素类化合物的命名IUPAC已有明确的建议和规定[26], 相关结构命名的规范性是避免引起同名异物和同物异名等的关键。因此, 本文重点指出了部分文献中出现的相关木脂素类化合物的构型确定和规范命名问题, 力求为后续研究提供参考。另外, 以往关于钩藤化学成分的研究, 多集中于生物碱类, 木脂素类化合物报道较少[35,36], 本研究发现木脂素类也是钩藤水提物的重要组成部分; 尽管本研究初步筛选仅发现 (+)-**8** 和 (−)-**8** 对APAP致HepG2细胞损伤有一定保护活性, 但不能排除它们在其他模型或体内的潜在作用。特别是, 这些木脂素多数以酸的形式存在, 它们与钩藤中生物碱类成分之间的相互作用, 及其对生物体电解质平衡和功能等的潜在影响, 值得探究。这或许是单一化合物与提取物或混合物功效作用不同的重要原因之一。

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), Bruker 700型核磁共振仪 (德国Bruker公司), 设定温度297 K; 其中, ^{1}H NMR以氘代甲醇 δ_H 3.310, ^{13}C NMR以氘代甲醇 δ_C 49.00为参照, Q Exactive 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-40S凝胶树脂 (日本TOSOH公司), HP-20型大孔吸附树脂、CHP 20P型MCI树脂 (日本Mitsubishi Chemical公司), MGII C18和PFP半制备色谱柱以及CD-Ph手性半制备色谱柱 (日本大阪曹達株式会社), XSelect C18半制备色谱柱 (美国Waters公司), AD-H和IG手性半制备色谱柱 (日本大赛璐化学工业株式会社), 柱色谱硅胶 (200～300目) 及薄层色谱用硅胶 GF_{254} (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, 由中国医学科学院药物研究所马林副研究员鉴定为钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks., 生药样品标本现存于中国医学科学院药物研究所药用植物标本室, 标本号为No. ID-S-2753。

1 提取与分离

提取和初步分离过程见前文[20]。B3组分 (223 g) 经Sephadex LH-20凝胶柱色谱, 丙酮−水 (1∶1) 为流动相, 分离获得组分B3-1～B3-15。其中, B3-12 (7.0 g) 经正相Flash分离, 二氯甲烷−甲醇 (0%～100%, *v*/*v*) 梯度洗脱, 得到B3-12-1～B3-12-31。B3-12-3 (391 mg) 经Toyopearl HW-40S凝胶柱色谱 (二氯甲烷−甲醇, 1∶1, *v*/*v*), 得到B3-12-3-1～B3-12-3-9, 其中B3-12-3-4 (110 mg) 经反相半制备HPLC (MGII C18色谱柱, 56%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到B3-12-3-4-1～B3-12-3-4-3。B3-12-3-4-3 (24.8 mg) 经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 50%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离, 得到化合物 **10** (t_R = 31.0 min, 0.2 mg), 并用手性正相半制备HPLC (IG手性色谱柱, 正己烷−乙醇2∶1, 3.0 mL·min^{-1}) 拆分, 获得 (+)-**10** (t_R = 7.1 min, 0.06 mg) 和 (−)-**10** (t_R = 8.2 min, 0.14 mg)。B3-12-3-5 (120.1 mg) 经反相半制备HPLC (MGII C18色谱柱, 61%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到B3-12-3-5-1～B3-12-3-5-5, B3-12-3-5-3 (20.1 mg) 经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 58%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到B3-12-3-5-3-1～B3-12-3-5-3-4。B3-12-3-5-3-2 (9.2 mg) 经反相半制备HPLC (XSelect C18色谱柱, 53%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到化合物 **7** (t_R = 14.7 min, 4.1 mg), 用手性正相半制备HPLC (AD-H手性色谱柱正己烷−乙醇3∶1, 3.0 mL·min^{-1}) 拆分, 获得 (+)-**7** (t_R = 11.8 min, 1.4 mg) 和 (−)-**7** (t_R = 35.2 min, 1.4 mg)。B3-12-4 (817 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B3-12-4-1和B3-12-4-2, 其中B3-12-4-2 (810 mg) 经Toyopearl HW-40S凝胶柱色谱分离 (二氯甲烷−甲醇, 1∶1, *v*/*v*) 获得B3-12-4-2-1～B3-12-4-2-9。B3-12-4-2-3 (156.7 mg) 经反相半制备HPLC (MGII C18色谱柱, 54%甲醇, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到B3-12-4-2-3-1～B3-12-4-2-3-4, B3-12-4-2-3-1 (14.8 mg) 经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 54%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1}) 分离得到B3-12-4-2-3-1-1、B3-12-4-2-3-1-2和化合物 **2** (t_R = 24.5 min, 0.8 mg)。化合物**2**经反相半制备HPLC (CD-Ph C18色谱柱, 59%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1}) 手性分离得到 (+)-**2** (t_R = 46.2 min, 0.45 mg) 和 (−)-**2** (t_R = 48.4 min, 0.35 mg)。B3-12-4-2-3-1-1 (3.3 mg) 进一步经反相半制备HPLC (XSelect C18色谱柱, 45%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1}) 纯化得到 **9** (t_R = 10.6 min, 1.6 mg), 并用手性正相半制备HPLC (Chiralpak AD-H手性色谱柱, 正己烷−乙醇3∶1, 3.0 mL·min^{-1}) 拆分得到 (+)-**9** (t_R = 13.6 min, 0.96 mg) 和 (−)-**9** (t_R = 15.9 min, 0.64 mg)。B3-12-4-2-3-2 (28.4 mg) 经反相半制备HPLC

(PFP色谱柱, 54%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离得到B3-12-4-2-3-2-1～B3-12-4-2-3-2-3, B3-12-4-2-3-2-3 (2.3 mg)经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 3.0 mL·min^{-1})反复纯化, 得到化合物**6** (t_R = 40.1 min, 1.0 mg), 并进一步用手性正相半制备HPLC (Chiralpak AD-H手性色谱柱, 正己烷−乙醇4∶1, 3.0 mL·min^{-1})拆分获得(−)-**6** (t_R = 40.8 min, 0.65 mg)和(+)-**6** (t_R = 44.8 min, 0.35 mg)。B3-12-4-2-4 (143.4 mg)经反相半制备HPLC (MGII C18色谱柱, 54%甲醇, 3.0 mL·min^{-1})分离得到B3-12-4-2-4-1～B3-12-4-2-4-5, B3-12-4-2-4-2 (46.3 mg)经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 54%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离得到**5** (t_R = 18.3 min, 35.1 mg), 再经手性正相半制备HPLC (Chiralpak AD-H手性色谱柱, 正己烷−乙醇3∶1, 3.0 mL·min^{-1})拆分获得(+)-**5** (t_R = 26.6 min, 20.3 mg)和(−)-**5** (t_R = 30.3 min, 14.0 mg)。B3-12-4-2-4-3 (23.5 mg)经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 54%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离得到B3-12-4-2-4-3-1～B3-12-4-2-4-3-4。B3-12-4-2-4-3-4 (9.0 mg)经反相半制备HPLC (CD-Ph C18色谱柱, 53%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})纯化, 得到**8** (t_R = 63.6 min, 8.0 mg), 并用手性正相半制备HPLC (Chiralpak AD-H手性色谱柱), 以正己烷−乙醇(2∶1, 3.0 mL·min^{-1})为流动相, 分离得到(+)-**8** (t_R = 19.0 min, 4.0 mg)和(−)-**8** (t_R = 23.2 min, 4.0 mg)。B3-12-4-2-5 (56.3 mg)经反相半制备HPLC (MGII C18色谱柱, 55%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离, 得到亚组分B3-12-4-2-5-1～B3-12-4-2-5-5。B3-12-4-2-5-4 (1.1 mg)经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 55%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离, 并用反相半制备HPLC (XSelect C18色谱柱, 32%乙腈, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})纯化得到**1** (t_R = 17.8 min, 0.3 mg), 随后经手性正相半制备HPLC (Chiralpak IG手性色谱柱, 正己烷−乙醇2∶1, 3.0 mL·min^{-1})拆分获得(−)-**1** (t_R = 7.0 min, 0.15 mg)和(+)-**1** (t_R = 20.0 min, 0.18 mg)。B3-12-4-2-5-5 (1.9 mg)经反相半制备HPLC (PFP色谱柱, 64%甲醇, 0.1‰三氟乙酸, 3.0 mL·min^{-1})分离得到**3**和**4**的混合物(t_R = 17.7 min, 0.8 mg), 继续用手性正相半制备HPLC (Chiralpak AD-H手性色谱柱, 正己烷−乙醇2∶1, 3.0 mL·min^{-1})分离, 依次获得(+)-**4** (t_R = 10.1 min, 0.12 mg)、(+)-**3** (t_R = 11.3 min, 0.21 mg)、(−)-**3** (t_R = 15.6 min, 0.37 mg)和(−)-**4** (t_R = 10.0 min, 0.14 mg)。

2 结构鉴定

非等量对映体混合物**1**: 白色无定形粉末; UV (CH$_3$OH) λ_{max} (log ε) 205 (5.20), 262 (4.66), 283 (4.53) nm; IR ν_{max} 3 364, 2 954, 2 925, 2 871, 2 854, 1 683, 1 609, 1 557, 1 519, 1 490, 1 450, 1 436, 1 380, 1 329, 1 256, 1 206, 1 180, 1 163, 1 126, 1 098, 1 067, 1 033, 973, 930, 801, 776, 724, 648 cm^{-1}; ^{1}H NMR (CD$_3$OD, 700 MHz)数据, 见表1; ^{13}C NMR (CD$_3$OD, 175 MHz)数据, 见表2; (−)-HR-ESI-MS *m/z* 315.0871 [M−H]$^-$ (C$_{17}$H$_{15}$O$_6$, 计算值315.087 4)。化合物(+)-**1**: $[\alpha]_D^{20}$ = +153.9 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 206 ($\Delta\varepsilon$ +4.34), 224 ($\Delta\varepsilon$ −3.06), 260 ($\Delta\varepsilon$ +5.21), 297 ($\Delta\varepsilon$ −0.05), 344 ($\Delta\varepsilon$ +0.14) nm; 化合物(−)-**1**: $[\alpha]_D^{20}$ = −154.6 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 207 ($\Delta\varepsilon$ −2.35), 223 ($\Delta\varepsilon$ +2.27), 259 ($\Delta\varepsilon$ −3.59), 298 ($\Delta\varepsilon$ +0.20), 353 ($\Delta\varepsilon$ +0.12) nm。

非等量对映体混合物**2**: 黄色无定形粉末; UV (CH$_3$OH) λ_{max} (log ε) 208 (4.69), 270 (4.11), 299 (3.71) nm; IR ν_{max} 3 352, 2 959, 2 924, 2 873, 2 854, 1 685, 1 616, 1 603, 1 568, 1 522, 1 498, 1 465, 1 429, 1 405, 1 377, 1 326, 1 260, 1 207, 1 186, 1 142, 1 117, 1 065, 1 029, 945, 901, 840, 801, 774, 724, 686, 667 cm^{-1}; ^{1}H NMR (CD$_3$OD, 700 MHz)数据, 见表1; ^{13}C NMR (CD$_3$OD, 175 MHz)数据, 见表2; (+)-HR-ESI-MS *m/z* 377.122 4 [M+H]$^+$ (C$_{19}$H$_{21}$O$_8$, 计算值377.123 1)。化合物(+)-**2**: $[\alpha]_D^{20}$ = +23.1 (*c* 0.02, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 216 ($\Delta\varepsilon$ +1.72), 232 ($\Delta\varepsilon$ −1.15), 266 ($\Delta\varepsilon$ +1.62), 292 ($\Delta\varepsilon$ +0.83), 333 ($\Delta\varepsilon$ +0.12) nm; 化合物(−)-**2**: $[\alpha]_D^{20}$ = −23.1 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 217 ($\Delta\varepsilon$ −2.48), 231 ($\Delta\varepsilon$ +2.61), 266 ($\Delta\varepsilon$ −3.15), 294 ($\Delta\varepsilon$ −1.60), 332 ($\Delta\varepsilon$ +0.13) nm。

混合物**3**和**4**: 棕色无定形粉末; UV (CH$_3$OH) λ_{max} (log ε) 205 (4.98), 222 (4.80), 258 (4.32), 288 (4.12), 299 (3.95) nm; IR ν_{max} 3 341, 2 955, 2 925, 2 854, 1 688, 1 608,1 593, 1 551, 1 521, 1 508, 1 448, 1 434, 1 383, 1 316, 1 275, 1 239, 1 204, 1 161, 1 129, 1 093, 1 033, 945, 898, 859, 824, 801, 786, 771, 749, 724, 686, 636 cm^{-1}; ^{1}H NMR (CD$_3$OD, 700 MHz)数据, 见表1; ^{13}C NMR (CD$_3$OD, 175 MHz)数据, 见表2; (−)-HR-ESI-MS *m/z* 331.082 1 [M−H]$^-$ (C$_{17}$H$_{15}$O$_7$, 计算值331.082 3)。化合物(+)-**3**: $[\alpha]_D^{20}$ = +33.3 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 221 ($\Delta\varepsilon$ +2.59), 241 ($\Delta\varepsilon$ −0.12), 260 ($\Delta\varepsilon$ +0.49) nm; 化合物(−)-**3**: $[\alpha]_D^{20}$ = −33.3 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 220 ($\Delta\varepsilon$ −1.63), 240 ($\Delta\varepsilon$ +0.55), 264 ($\Delta\varepsilon$ −0.43) nm; 化合物(+)-**4**: $[\alpha]_D^{20}$ = +6.7 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 222 ($\Delta\varepsilon$ −2.15), 247 ($\Delta\varepsilon$ +0.49), 296 ($\Delta\varepsilon$ +0.30) nm; 化合物(−)-**4**: $[\alpha]_D^{20}$ = −6.7 (*c* 0.01, CH$_3$OH); CD (CH$_3$OH): 206 ($\Delta\varepsilon$ −2.90), 222 ($\Delta\varepsilon$ +2.52), 254 ($\Delta\varepsilon$ −0.51), 290 ($\Delta\varepsilon$ −0.45) nm。

非等量对映体混合物**5**: 黄色无定形粉末; UV (CH$_3$OH) λ_{max} (log ε) 205 (5.67), 229 (5.32), 272 (5.15),

301 (4.67) nm; IR ν_{max} 3 363, 2 942, 2 838, 2 639, 1 683, 1 612, 1 602, 1 519, 1 499, 1 464, 1 429,1 385, 1 323, 1 276, 1 243, 1 207, 1 184, 1 162, 1 115, 1 061, 1 032, 966, 935, 895, 855, 808, 773, 749, 700, 665, 631 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, 700 MHz) 数据, 见表 1; ^{13}C NMR (CD_3OD, 175 MHz) 数据, 见表 2; (−)-HR-ESI-MS: *m/z* 345.097 5 $[M-H]^-$ ($C_{18}H_{17}O_7$ 计算值, 345.098 0)。化合物 (+)-**5**: $[\alpha]_D^{20}$ = +43.3 (*c* 0.10, CH_3OH); CD (CH_3OH): 213 (Δε +1.38), 229 (Δε −1.07), 269 (Δε +1.17), 291 (Δε +1.04) nm; 化合物 (−)-**5**: $[\alpha]_D^{20}$ = −43.1 (*c* 0.06, CH_3OH); CD (CH_3OH): 212 (Δε −8.10), 256 (Δε +4.73), 304 (Δε −5.04), 234 (Δε −4.40) nm。

非等量对映体混合物 **6**: 白色无定形粉末; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ε) 207 (5.28), 240 (4.90), 321 (4.88) nm; IR ν_{max} 3 358, 2 926, 2 852, 1 684, 1 637, 1 611, 1 520, 1 497, 1 465, 1 430, 1 376, 1 330, 1 274, 1 262, 1 206, 1 145, 1 117, 1 065, 1 028, 985, 949, 903, 841, 826, 801, 771, 723 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, 700 MHz) 数据, 见表 1; ^{13}C NMR (CD_3OD, 175 MHz) 数据, 见表 2; (+)-HR-ESI-MS *m/z* 403.138 1 $[M+H]^+$ ($C_{21}H_{23}O_8$, 计算值 403.138 7)。化合物 (+)-**6**: $[\alpha]_D^{20}$ = +136.4 (*c* 0.01, CH_3OH); CD (CH_3OH): 240 (Δε +1.43), 324 (Δε −0.88) nm; 化合物 (−)-**6**: $[\alpha]_D^{20}$ = −133.3 (*c* 0.01, CH_3OH); CD (CH_3OH): 206 (Δε −4.08), 240 (Δε −2.82), 319 (Δε +2.15) nm。

外消旋体 **7**: 白色无定形粉末; UV (CH_3OH) λ_{max} (log ε) 204 (4.46), 255 (4.23), 289 (3.80), 311 (3.87), 342 (3.94) nm; IR ν_{max} 3 356, 2 981, 2 933, 1 699, 1 635, 1 609, 1 586, 1 519, 1 447, 1 372, 1 258, 1 200, 1 115, 1 079, 1 023, 924, 867, 816, 776, 719 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, 700 MHz) 数据, 见表 1; ^{13}C NMR (CD_3OD, 175 MHz) 数据, 见表 2; (+)-HR-ESI-MS *m/z* 415.137 6 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{23}O_8$, 计算值 415.138 7)。化合物 (+)-**7**: $[\alpha]_D^{20}$ = +120.1 (*c* 0.09, CH_3OH); CD (CH_3OH): 253 (Δε −5.45), 292 (Δε +1.53), 313 (Δε −0.85), 348 (Δε +3.60) nm; 化合物 (−)-**7**: $[\alpha]_D^{20}$ = −120.0 (*c* 0.06, CH_3OH); CD (CH_3OH): 217 (Δε −1.81), 254 (Δε +8.17), 292 (Δε −2.15), 313 (Δε +1.57), 348 (Δε −5.41) nm。

3 ECD 和 UV 谱计算

应用 Gaussian 16 软件的 GMMX 模块, 在 MMFF94 分子力场中采用蒙特卡洛方式对化合物的构象进行搜索, 得到相对能量小于 3.0 kcal·mol^{-1} 的优势构象。应用 Gaussian 16[37] 程序、密度泛函算法和 CPCM 模型 (conductor-like polarizable continuum model) 模拟溶剂效应, 在 B3LYP/6-31+G(d,p) 水平上, 对搜索获得的构象进一步优化得到优化构象及其玻尔兹曼分布。在 B3LYP/6-311++G(d,p) 水平上, 计算 Gibbs 自由能在 3.0 kcal·mol^{-1} 以内的优化构象的各激发态能量、振子强度和转子强度。根据优化构象的玻尔兹曼分布概率, 通过加权平均化, 拟合得到理论计算的 ECD 和 UV 谱图 (σ = 0.30 eV)。

作者贡献: 石建功负责实验设计、数据分析, 以及稿件修改及定稿; 郭庆兰负责实验指导、数据分析及稿件的撰写和修改; 任金秋负责主要化学实验实施; 韦芳婷负责部分化学实验实施; 雷小强负责化学实验指导。

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) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2020: 276.

[2] Wu DW, Guo XP, Xie LY. Effect of Tianma gouteng decoction in the treatment of posterior circulation ischemic vertigo of liver-yang hyperactivity type [J]. J Med Inf (医学信息), 2022, 35: 148-150.

[3] Cao R, Wang Y, Zhou Y, et al. Advanced researches of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of medical *Uncariae Ramulus* Cum Uncis [J]. J Ethnopharm, 2024, 325: 117848.

[4] Chen L, Liu Y, Xie J. The beneficial pharmacological effects of *Uncaria rhynchophylla* in neurodegenerative diseases: focus on alkaloids [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1436481.

[5] 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.

[6] Liang JH, Wang C, Huo XK, et al. The genus *Uncaria*: a review on phytochemical metabolites and biological aspects [J]. Fitoterapia, 2020, 147: 104772.

[7] Lobine D, Mahomoodally MF. Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease: chapter 3.2.21 - *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks [M]. Amsterdam: Elsevier, 2021: 437-452.

[8] 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.

[9] Zhang XY, Xia Z, Lei XQ, et al. Isolation, chiral separation and absolute configuration determination of lignanoids from an aqueous extract of the *Angelica sinensis* root head [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 2077-2086.

[10] Hao WS, Zhu CG, Lei XQ, et al. Triterpenoids from an aqueous extract of the *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* seeds [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 2734-2745.

[11] Wang L, Chen MH, Liu YF, et al. Lignans and a neolignan from an aqueous extract of *Isatis indigotica* roots [J]. J Asian Nat Prod

Res, 2023, 25: 205-217.

[12] Zhang JF, Lei XQ, Wei YZ, et al. Two unique C_{21}-diterpenoid alkaloids from *Aconitum carmichaelii* [J]. Chen Chem Lett, 2022, 33: 5047-5050.

[13] Wang YN, Zhang M, Zhou X, et al. Insight into medicinal chemistry behind traditional Chinese medicines: *p*-hydroxybenzyl alcohol-derived dimers and trimers from hydroxybenzyl alcohol-*Gastrodia elata* [J]. Nat Prod Bioprospect, 2021, 11: 31-50.

[14] Cai J, Guo QL, Li RF, et al. Alkaloids from an aqueous; extract of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2019, 54: 1075-1081.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] Song LL, Wang Y, Li RF, et al. Megastigmanes from an aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 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, 2022, 24: 432-444.

[20] Zhang Q, Lei XQ, Li RF, et al. Minor triterpenoid acids from an aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 993-1002.

[21] Zhang Q, Lei XQ, Wei FT, et al. Minor alkaloids from an aqueous extract of the hookbearing stem of *Uncaria rhynchophylla* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2024, 26: 4-17.

[22] Wang YH, Sun QY, Yang FM, et al. Neolignans and caffeoyl derivatives from *Selaginella moellendorffii* [J]. Helv Chim Acta, 2010, 93: 2467-2477.

[23] Antus S, Kurtan T, Juhasz L, et al. Chiroptical properties of 2,3-dihydrobenzo[b]furan and chromane chromophores in naturally occurring O-heterocycles [J]. Chirality, 2001, 13: 493-506.

[24] Kim TH, Ito H, Hayashi K, et al. Aromatic constituents from the heartwood of *Santalum album* L. [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53: 641-644.

[25] Li HB, Yang Y, Wang ZZ, et al. Research on chemical constituents from Re-Du-Ning Injection (III) [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2016, 47: 1643-1649.

[26] Moss GP. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000) [J]. Pure Appl Chem, 2000, 72: 1493-1523.

[27] Nguyen PH, Yang JL, Uddin MN, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from *Morinda citrifolia* (Noni) and their insulin mimetic activity [J]. J Nat Prod, 2013, 76: 2080-2087.

[28] Mei WL, Dai HF, Wu DG. A new norneolignan from *Cephalomapa sinensis* [J]. Chem J Chin Univ, 2006, 27:1480-1481.

[29] Liang S, Ying SS, Wu HH, et al. A novel sesquiterpene and three new phenolic compounds from the rhizomes of *Acorus tatarinowii* Schott [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 4214-4218.

[30] Xiao L, Huang Y, Wang Y, et al. Anti-neuroinflammatory benzofurans and lignans from *Praxelis clematidea* [J]. Fitoterapia, 2020, 140: 104440.

[31] Belozerova OA, Osmakov DI, Vladimirov A, et al. Sevanol and its analogues: chemical synthesis, biological effects and molecular docking [J]. Pharmaceuticals, 2020, 13: 163.

[32] Xia Z, Chen YZ, Xu CB, et al. Diverse neolignans and lignans from an aqueous extract of the *Angelica sinensis* root head [J]. J Asian Nat Prod Res, 2023, 25: 919-940.

[33] Okuyama E, Suzumura K, Yamazaki M. Pharmacologically active components of todopon puok (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo [J]. Chem Pharm Bull, 1995, 12: 2200-2204.

[34] Umezawa T, Shimada M. Formation of the lignan (+)-secoisolariciresinol by cell-free extracts of *Arctium lappa* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60: 736-737.

[35] Zhang Y, Xu J, Tian Z, et al. Chemical constituents of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Chem Nat Comp, 2022, 58: 129-131.

[36] Sun GL, Yang JS, Si YK, et al. The isolation and identification of structure of chemical constituents of lignans from *Uncaria sinensis* [C]//Proceeding of the 2011 Chinese Pharmaceutical Association Annual Symposium (2011年中国药学大会暨第11届中国药师周论文集). Yantai: Chinese Pharmaceutical Meeting and the 11th Chinese Pharmacist Week, 2011: 1-9.

[37] Gaussian 16, Revision B. 01. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2016. www. gaussian.com.