

三脉马钱茎枝中酚苷类成分及其生物活性研究

潘其明, 马双刚, 李 勇, 张 丹, 孙 华, 侯 琦, 陈晓光, 庾石山*

(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: 应用大孔树脂、硅胶、ODS、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备 HPLC 对三脉马钱茎枝 95% 乙醇提取物的正丁醇部位进行分离纯化, 分离得到 14 个化合物, 通过高分辨质谱、核磁共振波谱和文献数据分析, 分别鉴定为: 4-*O*- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸乙酯 (1)、4-*O*- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯 (2)、4-*O*-(6'-*O*-丁香酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯 (3)、4-*O*-(6'-*O*-香草酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯 (4)、4-*O*-(6'-*O*-丁香酰基)- β -D-吡喃葡萄糖基香草酸正丁酯 (5)、4-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基丁香酸正丁酯 (6)、3-甲氧基-4- β -D-吡喃阿洛糖氧基苯甲酸甲酯 (7)、金钱松苷 B (8)、丁香酸丁酯 (9)、丁香酸葡萄糖苷 (10)、丁香酸甲酯 (11)、香草酸甲酯 (12)、威灵仙苷 C (13) 和小木通苷 A (14), 其中化合物 1~6 为酚酸乙酯或正丁酯的人工产物。需要指出的是, 化合物 3 和 4 的生源前体 4-*O*-(6'-*O*-丁香酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸和 4-*O*-(6'-*O*-香草酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸均为新化合物。化合物 1~13 的体外活性评价表明, 在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 1、2 和 6~10 均具有潜在的肝细胞保护活性, 细胞存活率由扑热息痛模型组的 45.4% 提高到 53.6%~55.5%; 化合物 4 具有一定的抗炎作用, 其一氧化氮生成抑制率为 74.6%; 化合物 3 和 5 具有潜在抗氧化活性, 在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 丙二醛生成抑制率分别为 53.2% 和 56.1%。

关键词: 三脉马钱; 酚苷; 肝保护; 抗炎; 抗氧化

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)01-0170-10

Phenolic glycosides from the stems and twigs of *Strychnos cathayensis* and their biological activities

PAN Qi-ming, MA Shuang-gang, LI Yong, ZHANG Dan, SUN Hua, HOU Qi,
CHEN Xiao-guang, YU Shi-shan*

(State 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: Fourteen compounds were isolated from the *n*-butanol fraction of the 95% aqueous ethanol extract of the stems and twigs of *Strychnos cathayensis* by D101 macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography, and semipreparative RP-HPLC. Their structures were elucidated as ethyl 4-*O*- β -D-allopyranosyl-vanillate (1), *n*-butyl 4-*O*- β -D-allopyranosyl-vanillate (2), *n*-butyl 4-*O*-(6'-*O*-syringoyl)- β -D-allopyranosyl-vanillate (3), *n*-butyl 4-*O*-(6'-*O*-vanilloyl)- β -D-allopyranosyl-vanillate (4), *n*-butyl 4-*O*-(6'-*O*-syringoyl)- β -D-glucopyranosyl-vanillate (5), *n*-butyl 4-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-syringate (6), methyl 3-methoxy-4-(β -D-allopyranosyloxy) benzoate (7), pseudolaroside B (8), butyl syringate (9), glucosyringic acid (10), methyl syringate (11), methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate (12), clemochinenoside C (13), and clemoarmanoside A (14), respectively, on the basis of spectroscopic data interpretation and by comparison with literature information. Compounds 1~6 are artificial products of phenolic acid esterified by ethanol or *n*-butanol. It is noted that the precursors (4-*O*-(6'-*O*-syringoyl)- β -D-allopyranosyl-vanillic acid and 4-*O*-(6'-*O*-vanilloyl)- β -D-allopyranosyl-vanillic acid) of compounds

收稿日期: 2022-06-30; 修回日期: 2022-08-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21732008).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165326, E-mail: yushishan@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0797

3 and **4** are new compounds. The hepatoprotective, anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities of compounds **1–13** were evaluated *in vitro* at a concentration of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compounds **1**, **2** and **6–10** exhibited potential hepatic protection effects with cell survival rates ranging from 53.6% to 55.5% (acetaminophen, 45.4% at $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Compound **4** demonstrated anti-inflammatory activity with nitric oxide inhibitory rate of 74.6%. Compounds **3** and **5** showed potential antioxidant activities with malondialdehyde inhibitory rates of 53.2% and 56.1%, respectively.

Key words: *Strychnos cathayensis*; phenolic glycosides; hepatoprotective activity; anti-inflammatory activity; antioxidant activity

三脉马钱 (*Strychnos cathayensis* Merr.), 别名华马钱, 为马钱科 (Loganiaceae) 马钱属植物, 为木质藤本, 产于广东、广西、海南、云南、台湾等地, 民间用以镇痛^[1]。果实是杀鼠药, 并可用来毒杀害兽, 为有毒植物^[2]。目前对该植物化学成分及药理活性研究的报道仅3篇。1985年, 陆仁荣等^[1]对华马钱种子中生物碱成分的研究报道了3个 diabolone 型生物碱, 其中 henningsoline 以 $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射时对小白鼠有明显镇痛作用。2001和2008年, Cheng等^[3]和Chen等^[4]分别对三脉马钱茎的甲醇提取物和根甲醇提取物的乙酸乙酯部位进行了研究, 从中分离得到裂环烯醚萜类、生物碱类、香豆素类、单苯环类等成分, 其中 11-methoxyhenningsamine 和 aesculetin dimethyl ether 能够抑制超氧阴离子生成和胰肽酶E释放, 具有潜在的抗炎活性。为了进一步探究三脉马钱的化学成分及药理活性, 本文对三脉马钱茎枝95%乙醇提取物的正丁醇部位进行了研究, 从中分离得到14个化合物 (**1–14**), 结构见图1, 其中化合物**1–6**为酚酸酯化(乙酯或正丁酯)的人工产物, 首次发现化合物**3**和**4**的生源前体4-O-(6'-O-丁香酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸和4-O-(6'-O-香草酰基)- β -D-吡喃阿洛糖基香草酸均为新化合物。对化合物**1–13**进行了肝保护、抗炎、抗氧化和细胞毒的体外活性筛

选, 结果表明在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物**1、2**和**6–10**对扑热息痛 (APAP) 诱发的肝细胞损伤均有一定的保护作用, 细胞存活率由模型组的45.4% (APAP, $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 提高到53.6%~55.5%; 化合物**4**具有一定的抗炎作用, 对脂多糖 (LPS) 诱导原代小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮 (NO) 生成的抑制率为74.6%; 化合物**3**和**5**具有潜在抗氧化活性, 对 Fe^{2+} -半胱氨酸诱导大鼠肝微粒体脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 生成的抑制率分别为53.2%和56.1%; 化合物**1–13**未显示细胞毒活性 ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

结果与讨论

1 新化合物结构鉴定

化合物**1** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -63.7$ (c 0.11, MeOH); UV光谱在204、215、255、292 nm处有最大吸收; IR光谱显示羟基 (3447 cm^{-1})、芳香酯基 (1710 、 1274 、 1108 cm^{-1}) 和苯环 (1603 、 1511 、 1465 cm^{-1}) 的特征吸收。HR-ESI-MS显示阳离子准分子离子峰 m/z : 381.1151 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (计算值为381.1156), 结合¹H NMR和¹³C NMR数据(表1和2), 确定其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 不饱和度 $\Omega = 6$ 。

¹H NMR谱(表1)显示一组ABX偶合芳香质子信号: δ_{H} 7.58 (1H, d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, H-2)、7.21 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$,

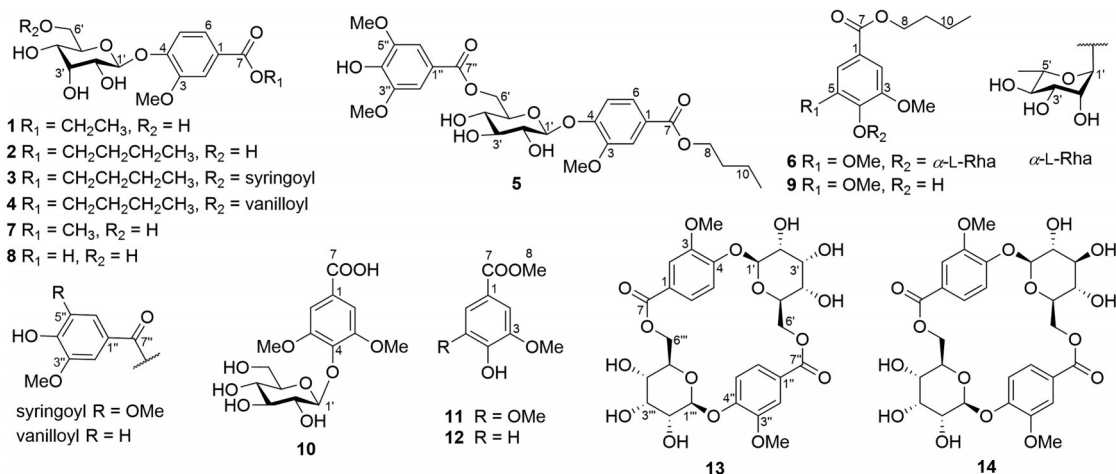


Figure 1 Structures of compounds **1–14**

Table 1 ^1H NMR (600 MHz) data of compounds **1–6** in methanol- d_4 (J in Hz)

No.	1	2	3	4	5	6
2	7.58, d (1.9)	7.57, d (1.8)	7.52, d (2.0)	7.53, d (2.0)	7.53, d (2.0)	7.31, s
5	7.21, d (8.5)	7.21, d (8.5)	7.07, d (8.5)	7.10, d (8.5)	7.06, d (8.5)	
6	7.63, dd (8.5, 1.9)	7.62, dd (8.5, 1.8)	7.26, dd (8.5, 2.0)	7.34, dd (8.5, 2.0)	7.25, dd (8.5, 2.0)	7.31, s
8	4.33, q (7.1)	4.27, t (6.6)	4.27, m	4.27, td (6.6, 1.4)	4.27, m	4.30, t (6.7)
9	1.37, t (7.1)	1.73, m	1.73, m	1.73, m	1.73, m	1.75, m
10		1.49, m	1.49, m	1.49, m	1.45, m	1.48, m
11		0.99, t (7.4)	0.98, t (7.4)	0.99, t (7.4)	0.98, t (7.4)	0.99, t (7.4)
1'	5.36, d (7.8)	5.36, d (7.8)	5.34, d (7.8)	5.35, d (7.8)	5.03, d (7.5)	5.34, d (1.7)
2'	3.67, overlap	3.67, overlap	3.71, dd (7.8, 3.0)	3.72, dd (7.8, 3.0)	3.56, dd (9.1, 7.4)	4.13, dd (3.4, 1.7)
3'	4.15, t (3.0)	4.15, t (3.0)	4.18, t (3.0)	4.18, t (3.0)	3.52, t (8.9)	3.89, dd (9.6, 3.4)
4'	3.60, dd (9.7, 3.0)	3.60, dd (9.5, 3.0)	3.63, dd (9.7, 3.0)	3.63, dd (9.7, 3.0)	3.43, t (9.4, 8.8)	3.43, t (9.6)
5'	3.86, overlap	3.86, overlap	4.22, m	4.22, m	3.81, m	4.23, dd (9.6, 6.3)
6'	3.86, overlap	3.86, overlap	4.65, dd (11.8, 2.3)	4.63, dd (11.8, 2.3)	4.69, dd (12.0, 1.8)	1.20, d (6.3)
	3.67, overlap	3.67, overlap	4.40, dd (11.8, 8.0)	4.36, dd (11.8, 8.0)	4.41, dd (12.0, 7.8)	
2''			7.28, s	7.48, d (2.0)	7.28, s	
5''				6.84, d (8.3)		
6''			7.28, s	7.54, dd (8.3, 2.0)	7.28, s	
3-OMe	3.88, s	3.88, s	3.86, s	3.86, s	3.86, s	3.87, s
5-OMe						3.87, s
3''-OMe			3.82, s	3.83, s	3.82, s	
5''-OMe			3.82, s		3.82, s	

Table 2 ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **1–6** in methanol- d_4

No.	1	2	3	4	5	6
1	125.5	125.5	125.5	125.5	125.7	127.4
2	114.1	114.0	114.0	114.0	114.0	107.6
3	150.4	150.4	150.1	150.4	150.5	154.6
4	152.4	152.4	152.1	152.0	151.7	140.0
5	116.2	116.2	116.2	116.3	116.4	154.6
6	124.5	124.5	124.2	124.3	124.2	107.6
7	167.8	167.9	167.8	167.9	167.7	167.6
8	62.1	65.9	65.7	65.6	65.1	66.2
9	14.6	31.9	31.9	31.9	31.9	31.9
10		20.3	20.3	20.3	20.3	20.3
11		14.1	14.1	14.1	14.1	14.1
1'	99.9	99.9	99.8	99.7	101.7	103.4
2'	71.9	71.9	71.9	71.8	74.7	71.4
3'	72.9	72.9	72.8	72.9	77.8	72.2
4'	68.6	68.6	69.6	69.5	72.1	73.7
5'	75.9	75.9	73.6	73.5	74.7	72.0
6'	62.8	62.8	65.9	65.9	66.0	17.9
1''			121.2	122.3	121.2	
2''			108.4	113.7	108.4	
3''			148.9	148.8	148.9	
4''			142.3	153.2	142.3	
5''			148.9	116.0	148.9	
6''			108.4	125.2	108.4	
7''			167.7	167.7	167.8	
3-OMe	56.7	56.7	56.9	56.6	56.7	56.6
5-OMe						56.6
3''-OMe			56.9	56.5	56.9	
5''-OMe			56.9	56.9	56.9	

H-5)、7.63 (1H, dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz, H-6), 一个糖端基质子信号 δ_{H} 5.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1') 和一个甲氧基质子信号 δ_{H} 3.88 (3H, s, 3-OMe)。将化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据与同时分离得到的已知化合物金钱松

昔 **B** (**8**)^[5] 的数据比较, 发现化合物 **1** 比金钱松昔 **B** 多了一组乙氧基信号: δ_{H} 4.33 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-8)、1.37 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-9); δ_{C} 62.1 (C-8)、14.6 (C-9), 且羰基碳信号向高场位移 C-7 ($\Delta\delta = -2.8$ ppm), 其余信号与金钱松昔 **B** 一致, 提示化合物 **1** 为金钱松昔 **B** 的乙酯衍生物。HMBC 谱中 H₂-8 (δ_{H} 4.33) 和 C-7 (δ_{C} 167.8) 的远程相关进一步确定乙氧基与香草酰基的 7 位酰基碳原子相连。糖单元的 H-3' (δ_{H} 4.15, t, $J = 3.0$ Hz) 与 H-2'、H-4' 之间较小的偶合常数表明 H-3' 位于糖基六元环的平伏键上, 提示分子结构中糖基为葡萄糖 C-3 差向异构体。酸水解化合物 **1** 得到糖单元, 衍生化后经高效液相色谱分析确定该糖基为 *D*-阿洛糖, 糖端基氢较大的偶合常数 ($J_{1,2'} = 7.8$ Hz) 确定 *D*-阿洛糖的端基为 β 构型。因此, 化合物 **1** 的结构鉴定为 4-*O*- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸乙酯。

化合物 **2** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -65.6$ (c 0.10, MeOH); HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 409.146 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 409.146 9), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (表 1 和 2), 确定其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_9$, 分子组成上比化合物 **1** 多 2 个 CH_2 。化合物 **2** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据与化合物 **1** 的数据非常相似, 不同的是化合物 **1** 的核磁波谱中的乙氧基信号在化合物 **2** 中被一组正丁氧基信号取代: δ_{H} 4.27 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-8)、1.73 (2H, m, H-9)、1.49 (2H, m, H-10)、0.99 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-11); δ_{C} 65.9 (C-8)、31.9 (C-9)、20.3 (C-10)、14.1 (C-11), 提示化合物 **2** 为金钱松昔 **B** 的正丁酯衍生物。 ^1H - ^1H COSY 谱中 H-8 (δ_{H} 4.27)/H-9 (δ_{H} 1.73)/H-10 (δ_{H} 1.49)/

H-11 (δ_{H} 0.99) 的一组相关信号进一步确定了正丁氧基的存在, HMBC 谱中 H₂-8 (δ_{H} 4.27) 和 C-7 (δ_{C} 167.9) 的远程相关确定正丁氧基与香草酰基的 7 位酰基碳原子相连。因此, 化合物 **2** 确定为 4-*O*- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯。

化合物 **3** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -52.8 (*c* 0.11, MeOH); HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 *m/z*: 565.192 6 [M-H]⁻ (计算值为 565.192 7), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据 (表 1 和 2), 确定其分子式为 C₂₇H₃₄O₁₃, 不饱和度 $\Omega = 11$ 。化合物 **3** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与化合物 **2** 的数据相似, 对比分析发现化合物 **3** 比化合物 **2** 多了一组丁香酰基信号: δ_{H} 7.28 (2H, s, H-2'', 6''), 3.82 (6H, s, 3'', 5''-OMe); δ_{C} 121.2 (C-1''), 108.4 (C-2'', 6''), 148.9 (C-3'', 5''), 142.3 (C-4''), 167.7 (C-7''), 56.9 (3'', 5''-OMe), 且阿洛糖 6 位氢和 5 位氢信号均向低场位移 H-6'a ($\Delta\delta = +0.79$ ppm)、H-6'b ($\Delta\delta = +0.73$ ppm)、H-5' ($\Delta\delta = +0.36$ ppm); 6 位碳和 5 位碳信号分别向低场 C-6' ($\Delta\delta = +3.1$ ppm) 和高场位移 C-5' ($\Delta\delta = -2.3$ ppm), 推测化合物 **3** 为化合物 **2** 的碳 6' 位羟基被丁香酸酯化的衍生物。HMBC 谱中 H-2'', 6'' (δ_{H} 7.28) 和 C-4'' (δ_{C} 142.3)/C-7'' (δ_{C} 167.7)、3'', 5''-OMe (δ_{H} 3.82) 和 C-3'', 5'' (δ_{C} 148.9) 的远程相关证明了丁香酰基的存在。H₂-6' (δ_{H} 4.65, 4.40) 和 C-7'' (δ_{C} 167.7) 的远程相关表明丁香酰基与阿洛糖的碳 6 位相连。因此, 化合物 **3** 确定为 4-*O*-(*6'*-*O*-丁香酰基)- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯。需要指出的是, 化合物 **3** 的生源前体 4-*O*-(*6'*-*O*-丁香酰基)- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸为新化合物。

化合物 **4** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -26.7 (*c* 0.27, MeOH); HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 *m/z*: 535.182 1 [M-H]⁻ (计算值为 535.182 1), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据 (表 1 和 2), 确定其分子式为 C₂₆H₃₂O₁₂, 分子组成上比化合物 **3** 少 1 个 OCH₃。化合物 **4** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与化合物 **3** 的数据非常相似, 不同之处在于化合物 **3** 的核磁波谱中的阿洛糖碳 6 位上的丁香酰基信号在化合物 **4** 中被香草酰基信号取代: ¹H NMR 谱中 δ_{H} 7.48 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2''), 6.84 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5''), 7.54 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, H-6'') 和 3.83 (3H, s, 3''-OMe) 的信号; ¹³C NMR 谱中 δ_{C} 122.3 (C-1''), 113.7 (C-2''), 148.8 (C-3''), 153.2 (C-4''), 116.0 (C-5''), 125.2 (C-6''), 167.7 (C-7'') 和 56.5 (3''-OMe) 的信号, 结合 HMBC 谱中存在 H-2'' (δ_{H} 7.48)、H-6'' (δ_{H} 7.54) 和 C-4'' (δ_{C} 153.2)/C-7'' (δ_{C} 167.7)、H-5'' (δ_{H} 6.84) 和 C-3'' (δ_{C} 148.8)、3''-OMe (δ_{H} 3.83) 和 C-3'' (δ_{C} 148.8) 的远程相关, 进一步证明了该香草酰基的存在。HMBC 谱中 H₂-6' (δ_{H} 4.63, 4.36) 和 C-7'' (δ_{C} 167.7) 的远程相关确定

该香草酰基连接于阿洛糖的碳 6 位。因此, 化合物 **4** 确定为 4-*O*-(*6'*-*O*-香草酰基)- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸正丁酯。文献检索发现化合物 **4** 的生源前体 4-*O*-(*6'*-*O*-香草酰基)- β -*D*-吡喃阿洛糖基香草酸亦为新化合物。

化合物 **5** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -43.4 (*c* 0.11, MeOH); HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 *m/z*: 565.192 7 [M-H]⁻ (计算值为 565.192 7), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据 (表 1 和 2), 确定其分子式为 C₂₇H₃₄O₁₃, 与化合物 **3** 具有相同的分子式。除糖单元 (1'-6' 位) 的核磁数据外, 化合物 **5** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与化合物 **3** 的数据 (表 1 和 2) 一致, 提示含有香草酰基 (1-7 位)、正丁氧基 (8-11 位) 和丁香酰基 (1''-7'' 位)。化合物 **5** 糖单元的 H-3' (δ_{H} 3.52, t, *J* = 8.9 Hz) 与 H-2'、H-4' 之间较大的偶合常数表明 H-3' 位于糖基六元环的直立键上, 推测含有葡萄糖结构单元。化合物 **5** 经酸水解得到糖单元, 衍生化后经 HPLC 分析确定为 *D*-葡萄糖, 糖端基氢较大的偶合常数 (*J*_{1,2'} = 7.5 Hz) 确定 *D*-葡萄糖端基为 β 构型。化合物 **5** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据和文献^[6]报道的 4-[6-*O*-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl)- β -*D*-glucopyranosyloxy]-3-methoxy-benzoic acid 的数据极其相似, 不同之处在于化合物 **5** 多了一个正丁氧基, 推测化合物 **5** 为该化合物的正丁酯衍生物。HMBC 谱中 H₂-8 (δ_{H} 4.27) 和 C-7 (δ_{C} 167.7) 的远程相关进一步证实了上述推论。因此, 化合物 **5** 确定为 4-*O*-(*6'*-*O*-丁香酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖基香草酸正丁酯。

化合物 **6** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -88.2 (*c* 0.15, MeOH); HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 *m/z*: 423.162 6 [M+Na]⁺ (计算值为 423.162 6), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据 (表 1 和 2), 确定其分子式为 C₁₉H₂₈O₉。化合物 **6** 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据与 syringic acid-4-*O*- α -*L*-rhamnopyranoside^[7] 的数据非常相似, 不同之处在于化合物 **6** 多了一组正丁氧基信号: δ_{H} 4.30 (2H, t, *J* = 6.7 Hz, H-8)、1.75 (2H, m, H-9)、1.48 (2H, m, H-10)、0.99 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-11); δ_{C} 66.2 (C-8)、31.9 (C-9)、20.3 (C-10)、14.1 (C-11)。此外, ¹H-¹H COSY 谱中 H-8 (δ_{H} 4.30)/H-9 (δ_{H} 1.75)/H-10 (δ_{H} 1.48)/H-11 (δ_{H} 0.99) 的一组相关信号, 以及 HMBC 谱中 H₂-8 (δ_{H} 4.30) 与羰基碳 C-7 (δ_{C} 167.6) 的远程相关, 确定正丁氧基与羰基碳 C-7 相连。因此, 化合物 **6** 确定为 4-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基丁香酸正丁酯。

2 生物活性

2.1 肝保护活性

采用甲基噻唑蓝 (MTT) 法测定化合物 **1**~**13** 对肝细胞增殖的影响及对 APAP 引起的体外肝细胞损伤的保护作用。实验结果显示在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 所有化合物对 HepG2 细胞无明显毒性 (细胞存活率均大于 90%), 化合物 **1**、**2** 和 **6**~**10** 对 APAP 导致

的 HepG2 细胞损伤均有一定的保护作用, 细胞存活率由模型组的 45.4% (APAP, $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 提高到 53.6%~55.5%, 与模型组比较有极显著差异 (图 2)。

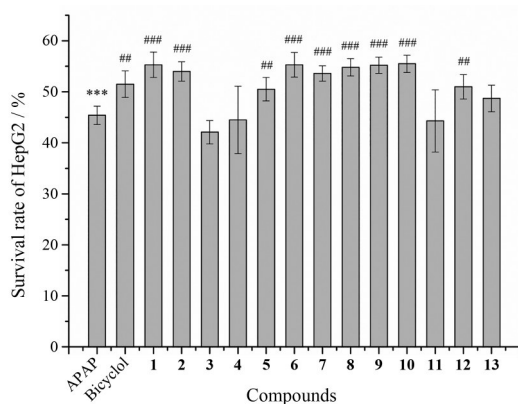


Figure 2 Hepatoprotective effects of compounds **1–13** against acetaminophen (APAP) induced damage in HepG2 cells. The isolated compounds (**1–13**) and acetaminophen were added in the culture medium to give final concentrations of $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$); *** $P < 0.001$ vs solvent control group; # $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs APAP group; bicyclol ($20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was used as the positive control

2.2 抗炎活性 用 LPS 诱导原代小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型, 使用 Griess 试剂法对化合物 **1–13** 抑制细胞炎症因子 NO 生成进行了测定, 并采用 MTT 法评价了它们对原代小鼠腹腔巨噬细胞生长的抑制作用。实验结果 (表 3) 显示在 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 **4** 对 NO 生成具有明显抑制活性, 抑制率为 74.6%, 同时对细胞生长无抑制活性 (抑制率为 -1.0%), 提示化合物 **4** 具有一定的抗炎作用。

Table 3 Cytotoxicity and inhibitory activities of compounds **1–13** against LPS induced NO production in primary mouse peritoneal macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). The NO inhibitory rates of the rest compounds were under 40% at the concentration of $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. *Dexamethasone (DEX) was used as the positive control

Compounds	Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition of NO production/%	Inhibition of cell growth/%
3	10	53.4	9.7
4	10	74.6	-1.0
12	10	45.8	0.1
DEX*	10	94.9	8.3

2.3 抗氧化活性 利用抑制 Fe^{2+} -半胱氨酸诱导肝微粒体脂质过氧化模型, 测定化合物 **1–13** 对大鼠肝微粒体脂质过氧化物 MDA 生成的抑制作用。实验结果 (表 4) 显示在 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 **3** 和 **5** 对

Table 4 Inhibitory activities of compounds **1–13** against MDA production ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). The MDA inhibitory rates of the rest compounds were under 20% at the concentration of $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. *Positive control

Compounds	Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition of MDA production/%
3	10	53.2
5	10	56.1
9	10	35.7
Curcumin*	10	95.9

MDA 生成具有抑制作用, 抑制率分别为 53.2% 和 56.1%, 提示化合物 **3** 和 **5** 具有潜在抗氧化活性。

2.4 细胞毒活性 采用 MTT 法测定化合物 **1–13** 对人肺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7、人结肠癌细胞 HCT-116、人肝癌细胞 HepG2 和人胰腺癌细胞 Capan2 五种人肿瘤细胞的细胞毒活性。实验结果显示化合物 **1–13** 在 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下未显示细胞毒活性。

3 小结

本研究从三脉马钱茎枝 95% 乙醇提取物的正丁醇部位分离得到 14 个化合物 (**1–14**), 其中化合物 **1–6** 可能为酚酸酯化 (乙酯或正丁酯) 的人工产物。值得一提的是本文中的化合物 **2–6** 和 **9** 均为含正丁氧基的酚酸酯类化合物, 本研究在萃取过程中先以饱和碳酸钠水溶液调节水相的 pH 至 9~10 后再以正丁醇萃取 (见实验部分), 并从该正丁醇萃取物中分离得到 6 个含正丁氧基的酚酸正丁酯类化合物 **2–6** 和 **9**。尽管根据有机化学酸催化酯化反应的常识, 本实验萃取过程中 pH 值 9~10 的碱性条件不利于酯的生成, 但不能排除后续分离等其他因素导致此类含正丁氧基的酚酸酯类人工产物生成。此外, 首次发现化合物 **3** 和 **4** 分别为金钱松昔 B (4-*O*- β -D-allopyranosyl-vanillic acid, 化合物 **8**) 的阿洛糖的碳 6 位羟基被丁香酰氧基、香草酰氧基取代的酯化产物。化合物 **1–13** 的体外活性评价表明, 在 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 **1, 2** 和 **6–10** 均具有潜在的肝保护活性 (细胞存活率由 APAP 组的 45.4% 提高到 53.6%~55.5%); 化合物 **4** 具有一定的抗炎作用 (NO 生成抑制率为 74.6%); 化合物 **3** 和 **5** 具有潜在抗氧化活性 (MDA 生成抑制率分别为 53.2% 和 56.1%)。本研究在一定程度上丰富了三脉马钱的化学成分结构类型和生物活性, 可为后续进一步开展该植物的活性成分研究提供有益参考。

实验部分

AUTOPOL V 旋光测定仪 (美国 Rudolph 公司); V-

650 紫外光谱测定仪 (日本 Jasco 公司); Nicolet iS50 FT-IR 红外光谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Thermo Scientific Q Exactive Focus 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Bruker Avance III HD 500 MHz/600 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 岛津分析型高效液相色谱仪 (日本岛津公司): Shimadzu LC-20AT, SPD-M20A 紫外检测器, SIL-20A 自动进样器, CTO-10AS VP 柱温箱, DGU-20A₅ 除气泡装置; Waters e2695 分析型高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); 2489 紫外/可见光检测器; 制备型高效液相色谱仪 (日本岛津公司): Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪, SPD-20A 紫外检测器; YMC-Triart C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、YMC C-18 (250 mm × 20 mm, 5 μm) 色谱柱、YMC-Triart C18 (250 mm × 10 mm, 5 μm) 色谱柱 (日本株式会社 YMC 公司); Welch Ultimate AQ-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 (美国 Welch 公司); GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶及柱色谱硅胶 (200~300 目) 均为青岛海洋化工厂生产; 反相柱色谱硅胶 RP-18 (50 μm) 为 YMC 公司生产; 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB 公司生产; D101 型大孔树脂为南开大学化工厂生产; 香草酸、丁香酸、标准单糖、L-半胱氨酸甲酯盐酸盐、邻甲苯异硫氰酸酯均购于上海麦克林生化科技有限公司; 其他分析纯试剂均为北京化工厂生产; 色谱纯试剂为 Thermo Fisher 科技有限公司或百灵威科技有限公司生产; 娃哈哈或屈臣氏纯净水。

C57BL/6J 雄性小鼠购于军事医学科学院实验动物中心; 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Revco 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 低温常速离心机 (日本 Hitachi 公司); 96 孔细胞培养板 (美国 Costar 公司); 硫代乙醇酸钠 (美国 Difco 公司); 胎牛血清、青霉素、链霉素、RPMI-1640 (美国 Gibco 公司); LPS、MTT、地塞米松、对氨基苯磺酰胺 (美国 Sigma 公司); 荼乙二胺为北京化工厂生产。

三脉马钱茎枝于 2016 年 6 月采于海南霸王岭, 经中国医学科学院药物研究所马林教授鉴定为三脉马钱 *Strychnos cathayensis* Merr. 的茎枝, 标本 (No. ID-S-2016020) 保存于中国医学科学院药物研究所植物标本室。

1 提取与分离

三脉马钱干燥茎枝 45 kg, 粉碎, 用 95% EtOH (10 L·kg⁻¹) 浸泡一夜后, 加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 提取液经减压浓缩得到 2.4 kg 浸膏。将浸膏溶于 3% 的酒石酸水溶液 (pH = 2~3), 用乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩得到乙酸乙酯萃取物 357.1 g。萃取后的酸水液用饱和的碳酸钠水溶液调 pH 至 9~10, 依次用二

氯甲烷、正丁醇萃取 3 次, 浓缩得到二氯甲烷萃取物 30.3 g, 正丁醇萃取物 428.7 g。

正丁醇部分经 D101 大孔吸附树脂柱色谱 (乙醇-水, 0:100, 30:70, 50:50, 95:5) 梯度洗脱得到 Frs. N1~N4。Fr. N2 (106.0 g) 经中压 ODS 柱色谱分离, 以甲醇-水 (5:95~100:0) 梯度洗脱得到 Frs. N2a~N2d 4 个流分。Fr. N2b (24.7 g) 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (300:1~5:1) 梯度洗脱得到 5 个流分 (Frs. N2b1~N2b5)。Fr. N2b3 (160.5 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 35:65) 分离得到化合物 **7** (8.9 mg, $t_R = 16.0$ min) 和 **1** (20.0 mg, $t_R = 33.9$ min); Fr. N2b4 (232.0 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 32:68) 分离得到化合物 **11** (18.8 mg, $t_R = 26.8$ min) 和 **12** (19.9 mg, $t_R = 33.4$ min)。Fr. N3 (115.4 g) 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (500:1~1:1) 梯度洗脱得到 Frs. N3a~N3e 5 个流分。Fr. N3b (7.2 g) 放置后有白色甲醇不溶物析出, 甲醇不溶物 (80.2 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 43:57) 纯化得到化合物 **14** (5.0 mg, $t_R = 29.6$ min) 和 **13** (10.8 mg, $t_R = 33.1$ min); 清洗白色甲醇不溶物的液体旋干后 (40.9 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 53:47) 分离得到化合物 **2** (8.0 mg, $t_R = 25.8$ min)。Fr. N3d (15.7 g) 反复经 Sphadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化后得到 8 个流分 (Frs. N3d1~N3d8)。Fr. N3d3 (1.9 g) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 15:85, 水中含 0.1% 三氟乙酸) 分离得到化合物 **8** (12.6 mg, $t_R = 28.2$ min); Fr. N3d4 (720.6 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 19:81, 水中含 0.1% 三氟乙酸) 分离得到化合物 **10** (1.4 mg, $t_R = 29.1$ min)。Fr. N4 (29.5 g) 经 Sphadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (37.5:62.5) 洗脱得到 5 个流分 (Frs. N4a~N4e)。Fr. N4e (4.5 g) 经中压 ODS 柱色谱 (乙腈-水, 20:80~80:20) 纯化后得到 9 个流分 (Frs. N4e1~N4e9)。Fr. N4e3 (163.0 mg) 经 Sphadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化得到 4 个流分 (Frs. N4e3a~N4e3d)。Fr. N4e3b (34.5 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 62:38) 分离得到化合物 **6** (13.0 mg, $t_R = 37.9$ min); Fr. N4e3c (23.9 mg) 经半制备 RP-HPLC (甲醇-水, 58:42) 分离得到化合物 **5** (6.4 mg, $t_R = 28.9$ min)。Fr. N4e4 (358.6 mg) 经 Sphadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化后再经半制备 RP-HPLC (乙腈-水, 38:62) 分离得到化合物 **3** (12.7 mg, $t_R = 27.8$ min) 和 **4** (15.0 mg, $t_R = 37.1$ min)。Fr. N4e5 (225.3 mg) 经 Sphadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化后再经半制备 RP-HPLC (乙腈-水, 40:60) 分离得到化合物 **9** (15.0 mg, $t_R = 39.6$ min)。

2 化合物 1~6 的酸水解和糖的衍生化反应^[8]

取化合物 **1~6** 约 2 mg 分别溶于 2 mol·L⁻¹ HCl-H₂O

(3 mL) 溶液中, 90 °C 加热搅拌反应 9 h, 反应液加入 EtOAc 萃取 (3 × 3 mL)。为鉴定化合物 **1**~**6** 中酚酸结构单元, EtOAc 萃取物减压蒸干后用于液相色谱分析。EtOAc 萃取物 HPLC 分析条件: Welch Ultimate AQ-C18 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸水 (15%~75%, 30 min) 梯度洗脱, 检测波长 250 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 28 °C。通过与香草酸 (保留时间为 13.66 min) 和丁香酸 (保留时间为 14.68 min) 对照品的保留时间对比确定化合物 **1**、**2** 和 **4** 中的酚酸结构单元均为香草酸, 化合物 **3** 和 **5** 中的酚酸结构单元均为香草酸和丁香酸, 化合物 **6** 中的酚酸结构单元为丁香酸。水层减压蒸干, 加水反复蒸至无酸味 (中性), 得单糖。单糖加入 1 mL 无水吡啶和 2 mg *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐, 60 °C 加热搅拌反应 1 h 后, 再加入 2 mg 邻甲苯异硫氰酸酯 (*o*-tolyl isothiocyanate), 60 °C 加热搅拌反应 1 h。反应液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于液相色谱分析鉴定。按同样的方法制备化合物 **1**~**6** 对应的 *D*-/*L*-构型标准单糖衍生物, 用于液相分析。糖 HPLC 分析条件: Welch Ultimate AQ-C18 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 25% 乙腈-0.1% 磷酸水, 检测波长 250 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 28 °C, 采集时间 35 min。通过与对应标准单糖衍生物保留时间对比确定化合物 **1**~**4** 中的糖均为 *D*-阿洛糖 (保留时间为 16.16 min), 化合物 **5** 和 **6** 中的糖分别为 *D*-葡萄糖 (保留时间为 15.84 min) 和 *L*-鼠李糖 (保留时间为 25.14 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -63.7 (*c* 0.11, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.40)、215 (4.38)、255 (4.12)、292 (3.84) nm; IR ν_{max} 3 447、2 935、1 710、1 603、1 511、1 465、1 420、1 297、1 274、1 217、1 108、1 075、1 039、763 cm⁻¹; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 381.115 1 [M+Na]⁺ (C₁₆H₂₂O₉Na, 计算值 381.115 6)。

化合物 **2** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -65.6 (*c* 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.55)、215 (4.52)、255 (4.27)、290 (4.05) nm; IR ν_{max} 3 454、2 959、1 713、1 603、1 511、1 466、1 420、1 293、1 273、1 216、1 181、1 107、1 077、1 039、762 cm⁻¹; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 409.146 4 [M+Na]⁺ (C₁₈H₂₆O₉Na, 计算值 409.146 9)。

化合物 **3** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -52.8 (*c* 0.11, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 205 (4.63)、215 (4.70)、258 (4.33)、284 (4.26) nm; IR ν_{max} 3 456、2 958、1 708、1 604、1 512、1 464、1 422、1 337、1 274、1 216、1 184、1 115、764 cm⁻¹;

¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 565.192 6 [M-H]⁻ (C₂₇H₃₃O₁₃, 计算值 565.192 7)。

化合物 **4** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -26.7 (*c* 0.27, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.52)、254 (4.15)、292 (3.97)、324 (3.67) nm; IR ν_{max} 3 424、2 959、1 701、1 605、1 513、1 464、1 278、1 218、1 186、1 115、1 034、765 cm⁻¹; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 535.182 1 [M-H]⁻ (C₂₆H₃₁O₁₂, 计算值 535.182 1)。

化合物 **5** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -43.4 (*c* 0.11, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.51)、215 (4.53)、257 (4.07)、285 (3.98) nm; IR ν_{max} 3 421、2 960、1 713、1 604、1 514、1 463、1 422、1 337、1 274、1 217、1 115、1 073、763 cm⁻¹; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 565.192 7 [M-H]⁻ (C₂₇H₃₃O₁₃, 计算值 565.192 7)。

化合物 **6** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -88.2 (*c* 0.15, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 214 (4.42)、265 (3.92) nm; IR ν_{max} 3 391、2 960、2 937、1 716、1 593、1 500、1 463、1 417、1 336、1 220、1 131、1 161、967、767 cm⁻¹; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) 数据见表 1 和 2; HR-ESI-MS m/z 423.162 6 [M+Na]⁺ (C₁₉H₂₈O₉Na, 计算值 423.162 6)。

化合物 **7** 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 367.099 6 [M+Na]⁺ (计算值为 367.100 0), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱数据, 确定其分子式为 C₁₅H₂₀O₉。 ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) δ_{H} : 7.62 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, H-6), 7.58 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.21 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 5.36 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.15 (1H, t, *J* = 2.8 Hz, H-3'), 3.88 (3H, s, 3-OMe), 3.87 (3H, s, H₃-8), 3.87~3.85 (2H, m, H-5', 6'a), 3.68 (2H, m, H-2', 6'b), 3.61 (1H, dd, *J* = 9.7, 2.7 Hz, H-4'); ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ_{C} : 168.3 (C-7), 152.5 (C-4), 150.4 (C-3), 125.2 (C-1), 124.6 (C-6), 116.2 (C-5), 114.1 (C-2), 99.9 (C-1'), 75.9 (C-5'), 73.0 (C-3'), 71.9 (C-2'), 68.6 (C-4'), 62.8 (C-6'), 56.7 (3-OMe), 52.6 (C-8)。以上数据结合文献^[9]确定该化合物为 3-甲氧基-4-β-*D*-吡喃阿洛糖氧基苯甲酸甲酯 [methyl 3-methoxy-4-(β-*D*-allopyranosyloxy) benzoate]。

化合物 **8** 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 353.083 7 [M+Na]⁺ (计算值为 353.084 3), 结合 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱数据, 确定其分子式为 C₁₄H₁₈O₉。 ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) δ_{H} : 7.63 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 7.59 (1H, d, *J* = 2.0 Hz,

H-2), 7.20 (1H, $J = 8.5$ Hz, H-5), 5.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.15 (1H, t, $J = 2.8$ Hz, H-3'), 3.88 (3H, s, 3-OMe), 3.87~3.85 (2H, m, H-5', 6'a), 3.68 (2H, m, H-2', 6'b), 3.61 (1H, dd, $J = 9.7, 2.7$ Hz, H-4'); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 150 MHz) δ_{C} : 169.5 (C-7), 152.3 (C-4), 150.3 (C-3), 125.8 (C-1), 124.8 (C-6), 116.2 (C-5), 114.3 (C-2), 99.9 (C-1'), 75.9 (C-5'), 73.0 (C-3'), 71.9 (C-2'), 68.6 (C-4'), 62.8 (C-6'), 56.7 (3-OMe)。以上数据结合文献^[5]确定该化合物为金钱松昔 B (pseudolaroside B)。

化合物 9 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 255.122 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 255.122 7), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (chloroform- d , 500 MHz) δ_{H} : 7.32 (2H, s, H-2, 6), 5.92 (1H, br s, 4-OH), 4.30 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-8), 3.94 (6H, s, 3, 5-OMe), 1.75 (2H, m, H-9), 1.46 (2H, m, H-10), 0.98 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (chloroform- d , 125 MHz) δ_{C} : 166.5 (C-7), 146.6 (C-3, 5), 139.1 (C-4), 121.5 (C-1), 106.6 (C-2, 6), 64.9 (C-8), 56.4 (3, 5-OMe), 30.8 (C-9), 19.3 (C-10), 13.8 (C-11)。以上数据结合文献^[10]确定该化合物为丁香酸丁酯 (butyl syringate)。

化合物 10 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 383.094 5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 383.094 9), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 。 ^1H NMR (methanol- d_4 , 600 MHz) δ_{H} : 7.35 (2H, s, H-2, 6), 5.06 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 3.88 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.77 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, H-6'a), 3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 5.3$ Hz, H-6'b), 3.49 (1H, m, H-2'), 3.43 (2H, m, H-3', 4'), 3.22 (1H, ddd, $J = 9.16, 5.2, 2.2$ Hz, H-5'); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 150 MHz) δ_{C} : 169.2 (C-7), 154.1 (C-3, 5), 140.1 (C-4), 127.7 (C-1), 108.6 (C-2, 6), 104.5 (C-1'), 78.5 (C-3'), 77.9 (C-5'), 75.7 (C-2'), 71.4 (C-4'), 62.5 (C-6'), 57.0 (3, 5-OMe)。以上数据结合文献^[11]确定该化合物为丁香酸葡萄糖苷。

化合物 11 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 m/z : 211.061 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 211.061 2), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (methanol- d_4 , 600 MHz) δ_{H} : 7.23 (2H, s, H-2, 6), 3.84 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.83 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 150 MHz) δ_{C} : 168.5 (C-7), 148.8 (C-3, 5), 141.8 (C-4), 121.2 (C-1), 108.0 (C-2, 6), 56.7 (3, 5-OMe), 52.4 (C-8)。以上数据结合文献^[12]确定该化合物为丁香酸甲酯。

化合物 12 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阴离子准分子离子峰 m/z : 181.050 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (计算值为 181.050 6),

结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (methanol- d_4 , 600 MHz) δ_{H} : 7.54 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 7.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 3.88 (3H, s, 3-OMe), 3.85 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 150 MHz) δ_{C} : 168.7 (C-7), 152.9 (C-4), 148.8 (C-3), 125.0 (C-6), 122.5 (C-1), 115.9 (C-5), 113.5 (C-2), 56.4 (3-OMe), 52.4 (C-8)。以上数据结合文献^[13]确定该化合物为香草酸甲酯。

化合物 13 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 625.176 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 625.176 3), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) 谱显示一组香草酰基 (vanilloyl) 的质子信号: δ_{H} : 7.79 (2H, dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, H-6, 6''), 7.40 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2''), 7.31 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5, 5''), 3.78 (6H, s, 3, 3''-OMe); 以及一组 *D*-阿洛糖基 (*D*-Allo) 的质子信号: δ_{H} : 5.37 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1', 1'''), 4.35 (2H, dd, $J = 11.3, 1.7$ Hz, H-6'a, 6'''), 4.24 (2H, td, $J = 10.3, 1.7$ Hz, H-5', 5'''), 4.10 (2H, t, $J = 11.0$ Hz, H-6'b, 6'''), 3.97 (2H, q, $J = 3.0$ Hz, H-3', 3'''); 3.57 (2H, td, $J = 7.8, 3.0$ Hz, H-2', 2'''), 3.43 (2H, ddd, $J = 9.9, 7.4, 2.7$ Hz, H-4', 4'''); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) 谱显示一组香草酰基 (vanilloyl) 的碳信号: δ_{C} : 165.3 (C-7, 7''), 150.1 (C-4, 4''), 148.4 (C-3, 3''), 123.3 (C-6, 6''), 122.4 (C-1, 1''), 114.3 (C-5, 5''), 112.1 (C-2, 2''), 55.5 (3, 3''-OMe); 以及一组 *D*-阿洛糖基 (*D*-Allo) 的碳信号: δ_{C} : 96.7 (C-1', 1'''), 71.7 (C-3', 3'''), 71.2 (C-5', 5'''), 69.8 (C-2', 2'''), 68.2 (C-4', 4'''), 65.5 (C-6', 6''')。以上数据结合文献^[14]确定该化合物为威灵仙昔 C (clemochinenside C)。

化合物 14 白色粉末; HR-ESI-MS 显示阳离子准分子离子峰 m/z : 625.176 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值为 625.176 3), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱数据, 确定其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) 谱显示两组香草酰基 (vanilloyl) 的质子信号: δ_{H} : 7.75 (1H, dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, H-5), 7.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.32 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-6), 3.78 (3H, s, 3-OMe); δ_{H} : 7.77 (1H, dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, H-5''), 7.41 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2''), 7.36 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6''), 3.78 (3H, s, 3''-OMe); 一组 *D*-葡萄糖基 (*D*-Glc) 的质子信号: δ_{H} : 5.23 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.40 (1H, dd, $J = 11.5, 1.5$ Hz, H-6'a), 3.18 (1H, m, H-4'); 以及一组 *D*-阿洛糖基 (*D*-Allo) 的质子信号: δ_{H} : 5.37 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'''), 4.36 (1H, dd, $J = 11.3, 1.5$ Hz, H-6'''), 3.57 (1H, td, $J = 7.7, 2.9$ Hz, H-2'''), 3.45 (1H, m, H-4'''); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) 谱显示两组香草酰基 (vanilloyl) 的碳信

号: δ_c : 165.2 (C-7), 149.8 (C-4), 148.5 (C-3), 123.1 (C-6), 122.5 (C-1), 114.4 (C-5), 112.1 (C-2), 55.5 (3-OMe); δ_c : 165.1 (C-7''), 150.1 (C-4''), 148.4 (C-3''), 123.0 (C-6''), 122.4 (C-1''), 114.3 (C-5''), 112.1 (C-2''), 55.5 (3''-OMe); 一组D-葡萄糖基 (D-Glc) 的碳信号: δ_c : 98.3 (C-1'), 76.9 (C-3'), 73.5 (C-5'), 72.8 (C-2'), 70.6 (C-4'), 65.1 (C-6'); 以及一组D-阿洛糖基 (D-Allo) 的碳信号: δ_c : 96.8 (C-1'''), 71.7 (C-3'''), 71.2 (C-5'''), 69.8 (C-2'''), 68.2 (C-4'''), 65.5 (C-6''')。以上数据结合文献^[15]确定该化合物为小木通昔 A (clemoarmanoside A)。

4 生物活性实验

4.1 肝保护、抗氧化和细胞毒活性实验 本实验参照文献^[16]报道的MTT法测定化合物**1~13**对肝细胞增殖的影响及对APAP引起的体外肝细胞损伤的保护作用。利用抑制Fe²⁺-半胱氨酸诱导肝微粒体脂质过氧化模型,测定化合物**1~13**对大鼠肝微粒体脂质过氧化物MDA生成的抑制作用^[17,18]。用文献^[19,20]中报道的MTT法,测定化合物**1~13**对A549、MCF-7、HCT-116、HepG2和Capan2五种人肿瘤细胞的细胞毒活性。所有实验均重复3次。

4.2 抗炎活性实验^[21] 利用LPS诱导原代小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型,使用Griess试剂法对化合物**1~13**抑制细胞炎症因子NO生成进行了测定,并采用MTT法评价了它们对原代小鼠腹腔巨噬细胞生长的抑制作用。实验方法如下: C57BL/6J雄性小鼠(20~22 g)按照5 mL·100 g⁻¹剂量腹腔注射4%的硫代乙醇酸钠,3天后,将小鼠脱颈椎断头处死,75%乙醇浸泡5 min。然后在无菌条件下,腹腔注射5~8 mL PBS生理缓冲液,揉捏腹部数次后,吸出腹腔中液体,重复上述操作3次,所得细胞悬浮液以1 000 r·min⁻¹离心5 min后,弃去上清液,腹腔巨噬细胞用含有5%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素和100 μ g·mL⁻¹链霉素的RPMI-1640培养基重悬,计数细胞。以每孔1×10⁵个细胞的浓度接种细胞到96孔细胞培养板中,37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱内培养使细胞贴壁。2 h后,倾去培养基,用PBS生理缓冲液洗板两次,除去未贴壁细胞,每孔加入新鲜的含5%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素和100 μ g·mL⁻¹链霉素的RPMI-1640培养基200 μ L,然后加入或不加入待测药物及阳性对照药。实验设置空白对照组、LPS组、给药组和阳性对照组,每组设置3个复孔(即平行3次)。给药组和阳性对照组分别加入待测药物和阳性对照药地塞米松(终浓度均为10 μ mol·L⁻¹),培养1 h后,再加入LPS(终浓度为1 μ g·mL⁻¹),空白对照组只加入培养基,LPS组加LPS(终浓度为1 μ g·mL⁻¹)。37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱内继续培养。24 h后,取100 μ L

上清液与等量Griess试剂混匀,550型酶标仪测定570 nm波长处吸光度值,根据NaNO₂标准曲线计算NO的含量。原96孔继续加入5 mg·mL⁻¹(PBS配制)的MTT 20 μ L,在37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱内孵育4 h后,弃去上清液,每孔加入150 μ L DMSO溶解formazan颗粒,摇床轻度振荡10 min后,用550型酶标仪在570 nm波长处检测吸光度值,测试药物对细胞的增殖毒性。结果计算:根据不同浓度的NaNO₂以Griess试剂法显色后所得到的吸光度值绘制标准曲线,样品吸光度值均按此标准曲线换算成NO。动物实验经中国医学科学院、北京协和医学院实验动物管理和使用委员会批准(批准号:00004610)。

致谢:核磁数据由中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所分析测试中心测试;生物活性由中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所药理室测试。

作者贡献:通讯作者庾石山负责选题、实验设计和指导、稿件修改,并最终定稿等工作;潘其明完成化合物的提取与分离、结构鉴定及文章撰写等工作;马双刚协助指导化学实验、稿件修改等工作;李勇协助指导化学成分分离纯化等工作;张丹协助抗氧化活性测定实验;孙华协助肝保护活性测定实验;侯琦协助抗炎活性测定实验;陈晓光协助细胞毒活性测定实验。

利益冲突:作者声明本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Lu RR, Liu LD. Studies on the alkaloids of *Strychnos cathayensis* Merr [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 1985, 43: 775-777.
- [2] Chen JS, Zheng S. Toxic Plants in China (中国有毒植物) [M]. Beijing: Science Press, 1987: 383-384.
- [3] Cheng MJ, Tsai IL, Chen IS. Chemical constituents from *Strychnos cathayensis* [J]. J Chin Chem Soc, 2001, 48: 235-239.
- [4] Chen JJ, Luo YT, Hwang TL, et al. A new indole alkaloid and anti-inflammatory constituents from *Strychnos cathayensis* [J]. Chem Biodivers, 2008, 5: 1345-1352.
- [5] Liu P, Guo HZ, Tian Y, et al. Benzoic acid allopyranosides from the bark of *Pseudolarix kaempferi* [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 1395-1398.
- [6] Akihito Y, Yoshihiro M. New glycosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri* [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55: 273-279.
- [7] Ran XH, Ni W, Wei G, et al. A new phenolic glycoside from *Chloranthus multistachys* (Chloranthaceae) [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2010, 32: 83-86.
- [8] Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, et al. Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55: 899-901.
- [9] Li YL, Sun JS, Gong YQ, et al. Synthesis of oligomeric 4-(glycosyloxy)benzoate macrocyclic glycosides [J]. J Org Chem, 2011,

- 76: 3654-3663.
- [10] Furukawa T, Iimura K, Kimura T, et al. Inhibitory activities of alkyl syringates and related compounds on aflatoxin production [J]. *Toxins*, 2016, 8: 177.
- [11] Wang YZ, Zeng G, Zhang M, et al. Chemical constituents from rhizoma of *Anemone altaica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 1219-1222.
- [12] Li YP, Li DD, Ding LQ, et al. Non-alkaloids components from *Phellodendri cortex* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47: 2621-2626.
- [13] Feng WS, Wang JC, He YH, et al. Chemical constituents from the flower buds of *Magnolia biondii* Pamp. [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2015, 50: 2103-2106.
- [14] Qiu L, Yuan HM, Liang JM, et al. Clemochinensides C and D, two new macrocyclic glucosides from *Clematis chinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20: 1038-1044.
- [15] Yan LH, Yang SL, Zou ZM, et al. Two new macrocyclic compounds from the stems of *Clematis armandii* [J]. *Heterocycles*, 2006, 68: 1917-1924.
- [16] He HK, Sun H, Yang SL, et al. Studies on active aromatic constituents from rhizomes of *Sophora tonkinensis* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 4481-4485.
- [17] Gao PP, Ren YT, Ma J, et al. Two new labdane diterpenoids from the leaves of *Callicarpa formosana* Rolfe [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1448-1451.
- [18] Wang RZ, Zhou J, Shi GR, et al. Aporphine and phenanthrene alkaloids with antioxidant activity from the roots of *Stephania tetrandra* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 143: 104551.
- [19] Huang YY, Jia XG, Deng FS, et al. Two new triterpenes from *Maytenus guangxiensis* with their antiproliferative activity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 441-445.
- [20] He DH, Liu J, Fang DM, et al. Study on alkaloid constituents of *Stephania tetrandra* S. Moore [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 3503-3510.
- [21] Tang WB, Xie JL, Xu S, et al. Novel nitric oxide-releasing derivatives of brusatol as anti-inflammatory agents: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 7600-7612.