

• 化学成分 •

钩藤叶化学成分研究

李汝鑫, 程锦堂, 焦梦娇, 章 军, 陈 莎, 郭 丛, 刘 安*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 研究钩藤 *Uncaria rhynchophylla* 叶的化学成分及抗氧化活性。方法 采用多种色谱技术对其进行分离纯化, 应用 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS、HR-MS 等波谱学方法进行结构鉴定; 利用 DPPH 法进行抗氧化活性测定。结果 从钩藤叶 95%乙醇提取物中分离得到 17 个化合物, 分别鉴定为 18,19-hydroxyvincosamide (1)、 α -生育酚 (2)、 α -tocospiro A (3)、二氢猕猴桃内酯 (4)、乌苏酸内酯 (5)、3,4-dehydrotheaspiron (6)、chakunglupulin A (7)、乌苏酸 (8)、原儿茶酸 (9)、槲皮素 (10)、表儿茶素 (11)、绿原酸乙酯 (12)、槲皮素-3-*O*-洋槐糖苷 (13)、芦丁 (14)、咖啡酸甲酯 (15)、strictosamide (16)、vincosamide (17); 其中化合物 10、11、13~15 抗氧化活性 IC_{50} 值分别为 7.52、8.21、8.14、2.13、5.35 $\mu\text{mol/L}$, 优于阳性药维生素 E (IC_{50} 值为 9.53 $\mu\text{mol/L}$)。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为喜果昔 A; 化合物 2~7、9、12、13、15 为首次从该属植物中分离得到; 并且化合物 10、11、13~15 抗氧化活性良好。

关键词: 钩藤; 二氢猕猴桃内酯; 乌苏酸; 槲皮素; 咖啡酸甲酯; 抗氧化; 喜果昔 A

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)08-1499-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.003

Chemical constituents from leaves of *Uncaria rhynchophylla*

LI Ru-xin, CHENG Jin-tang, JIAO Meng-jiao, ZHANG Jun, CHEN Sha, GUO Cong, LIU An

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the leaves of *Uncaria rhynchophylla* and their antioxidant activities. **Methods** The compounds were isolated by various column chromatography. Their structures were identified by spectroscopic methods including $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS, HR-MS, etc. The antioxidant activities were evaluated by DPPH radical scavenging assay. **Results** Seventeen compounds were isolated from the leaves of *U. rhynchophylla*, and identified as 18,19-hydroxyvincosamide (1), α -tocopherol (2), α -tocospiro A (3), dihydroactinidiolide (4), ursolic acid lactone (5), 3,4-dehydrotheaspiron (6), chakunglupulin A (7), ursolic acid (8), protocatechuic acid (9), quercetin (10), epicatechin (11), chlorogenic acid ethyl ester (12), quercetin-3-*O*-robinobioside (13), rutin (14), methyl caffeate (15), strictosamide (16), and vincosamide (17). The anti-oxidative IC_{50} values of compounds 10, 11, and 13—15 were 7.52, 8.21, 8.14, 2.13, and 5.35 $\mu\text{mol/L}$, respectively, which were better than the positive control Vit E (IC_{50} value was 9.53 $\mu\text{mol/L}$). **Conclusion** Compound 1 is a new compound named as vincosamide A, and compounds 2—7, 9, 12, 13, and 15 are isolated from genus *Uncaria* Schreber nom. cons. for the first time. Moreover, compounds 10, 11, and 13—15 have the certain prospects in the development of natural anti-oxidative agents.

Key words: *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.; dihydroactinidiolide; ursolic acid; quercetin; methyl caffeate; anti-oxidation; vincosamide A

钩藤始载于《名医别录》,为茜草科(Rubiaceae)植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsute* Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil. 或无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 的干燥带钩茎枝^[1]。其主要分布于江西、广东、广西、湖南、云南等地,

具有清热平肝、熄风定惊之功效,用于头痛眩晕、感冒夹惊、惊痫抽搐、妊娠子痫、高血压等症^[2]。钩藤主要含有生物碱、萜类、黄酮类等化学成分。现代药理研究显示其具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗病毒等作用^[3-5],具有很高的药用价值。由于钩藤的传统药用部位为带钩茎枝,资源有限,且不利于

收稿日期: 2016-12-23

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307-001); 中国中医科学院自主选题研究项目(ZXKT15032)

作者简介: 李汝鑫(1986—),男,助理研究员,研究方向为天然药物化学。

*通信作者 刘 安(1976—),男,研究员,研究方向为中药化学和质量控制。Tel: (010)64013996 E-mail: la62@163.com

可持续利用,因此,扩大钩藤的药用资源,是非常必要的。基于此,本实验对钩藤叶进行了化学成分研究,利用各种色谱分离方法从其 95%乙醇提取液中分离鉴定了 17 个化合物,分别为 18,19-hydroxyl-vincosamide (1)、 α -生育酚 (α -tocopherol, 2)、 α -tocospiro A (3)、二氢猕猴桃内酯 (dihydro-actinidiolide, 4)、乌苏酸内酯 (ursolic acid lactone, 5)、3,4-dehydrotheaspirone (6)、chakyunglupulin A (7)、乌苏酸 (ursolic acid, 8)、原儿茶酸 (protocatechuic acid, 9)、槲皮素 (quercetin, 10)、表儿茶素 (epicatechin, 11)、绿原酸乙酯 (chlorogenic acid ethyl ester, 12)、quercetin-3-*O*-robinobioside (13)、芦丁 (rutin, 14)、咖啡酸甲酯 (methyl caffeate, 15)、strictosamide (16)、vincosamide (17)。其中,化合物 1 为新化合物,命名为喜果昔 A (vincosamide A),化合物 2~7、9、12、13、15 为首次从该属植物中分离得到。

1 仪器与材料

EYELA SB-1100 旋转蒸发仪 (日本东京理化器械); DF 200A 电子天平 (常熟市衡器厂); KQ-250DB 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); 柱色谱硅胶 (160~200、200~300、300~400 目), 薄层硅胶板 (200 mm×200 mm, 青岛海洋化工厂); RP-C₁₈ 柱色谱填料 (40~75 μ m); RP-C₁₈ 高效薄层铝板 (200 mm×200 mm, 德国 Merk 公司); 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 瑞典 GE Healthcare 公司); 制备 HPLC 采用 LC3000 制备型高效液相色谱仪 (北京创新通恒有限公司), 色谱柱 YMC-Pack ODS-A (150 mm×20 mm, 5 μ m); 有机试剂均为分析纯。

钩藤叶于 2014 年 3 月采集于贵州省贵阳市,经中国中医科学院中药研究所李西文副研究员鉴定为钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的叶,凭证样本 (No. 201403M) 存放于中国中医科学院中药研究所。

2 提取与分离

取干燥的钩藤叶 7.5 kg, 用 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 减压浓缩干燥后得浸膏 1 200 g, 加适量水混悬后, 依次用等体积的氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到氯仿部分 560 g、醋酸乙酯部分 80 g、正丁醇部分 90 g。取氯仿部分, 经硅胶柱色谱 (石油醚-二氯甲烷 1:1→0:1, 二氯甲烷-甲醇 50:1→1:4) 梯度洗脱得 8 个流分

Fr. 1~8, Fr. 2 部分经硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 20:1→5:1 梯度洗脱), Sephadex LH-20 (石油醚-二氯甲烷-甲醇 5:5:1), 制备 TLC (石油醚-丙酮 10:1) 得化合物 2 (2.4 mg)。Fr. 3 部分经硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯 1:0→4:1) 梯度洗脱, Sephadex LH-20 (石油醚-二氯甲烷-甲醇 5:5:1), 制备 HPLC (92%甲醇) 纯化得化合物 3 (3.2 mg, t_R =36.2 min)。Fr. 4 部分经 PRP-512B 大孔树脂柱色谱 (甲醇-水 40:60→90:10) 梯度洗脱得 Fr. 4-1~4-4, 其中 Fr. 4-3 经硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 6:1→0:1) 梯度洗脱得 Fr. 4-3-1~4-3-4。Fr. 4-3-2 经 ODS 柱色谱, 制备 HPLC (50%甲醇) 纯化得化合物 4 (1.8 mg, t_R =19.8 min)。Fr. 4-3-3 经 Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 制备 HPLC (85%甲醇) 纯化得化合物 5 (5.6 mg, t_R =23.1 min)。Fr. 5 部分经硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮 3:1→0:1) 梯度洗脱, MCI CHP-20P gel 柱色谱 (甲醇-水 20:80→100:0) 梯度洗脱, 制备 HPLC (14%乙腈) 纯化得化合物 6 (1.6 mg, t_R =18.4 min) 和 7 (2.3 mg, t_R =24.7 min)。

醋酸乙酯部分经硅胶柱色谱 (醋酸乙酯-甲醇 50:1→0:1) 梯度洗脱得 4 个流分 Fr. B1~B4, Fr. B2 部分经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 100:1→0:1) 梯度洗脱得 Fr. B2-1~B2-4, Fr. B2-3 经反复重结晶得化合物 8 (6.4 mg)。Fr. B2-4 经 ODS 柱色谱 (甲醇-水 20:80→100:0) 梯度洗脱, 反复重结晶得化合物 9 (8.8 mg)。Fr. B3 部分经 ODS 柱色谱 (甲醇-水 30:70→100:0), Sephadex LH-20 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 制备 HPLC (26%乙腈) 纯化得化合物 10 (2.2 mg, t_R =21.3 min)。

正丁醇部分经 PRP-512B 大孔树脂柱色谱 (乙醇-水 40:60→100:0) 梯度洗脱得 Fr. C1~C4, Fr. C2 部分经 MCI CHP-20P gel 柱色谱 (乙醇-水 1:1→9:1) 梯度洗脱得 Fr. C2-1~C2-4, Fr. C2-2 经 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (30:70→100:0) 梯度洗脱得 Fr. C2-2-1~C2-2-5, Fr. C2-2-3 部分经 Sephadex LH-20 (甲醇), 制备 HPLC (30%甲醇) 纯化得化合物 11 (2.8 mg, t_R =11.7 min)。Fr. C2-2-4 部分经 Sephadex LH-20 (甲醇-水 1:1) 得 Fr. C2-2-4-1~C2-2-4-7, Fr. C2-2-4-3 经制备 HPLC (35%甲醇) 纯化得化合物 12 (1.2 mg, t_R =16.1 min)。Fr. C2-2-4-5 经制备 HPLC (15%乙腈) 纯化得化合物 13 (3.2 mg, t_R =25.5 min) 和 14 (2.8 mg, t_R =27.6 min)。Fr. C2-3 经制备 HPLC (35%甲醇) 纯化得化

合物 **15** (2.9 mg, $t_R=31.2$ min) 和 **1** (6.7 mg, $t_R=38.1$ min)。Fr. C2-4 经 ODS 柱色谱(甲醇-水 1:1→1:0) 梯度洗脱, 制备 HPLC (54% 甲醇) 纯化得化合物 **16** (4.2 mg, $t_R=10.5$ min) 和 **17** (4.8 mg, $t_R=19.2$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色油状物 (甲醇)。 $[\alpha]_D^{25} -205.2^\circ$ (c 0.10, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 226 (4.58); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 410, 2 920, 1 660, 1 580; HR-ESI-MS m/z : 533.211 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{10}$, 计算值 533.213 7), 结合其核磁数据确定分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{10}$, 不饱和度为 12。

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) 数据见表 1, 结合

表 1 化合物 **1** 的 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) 数据

Table 1 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) and ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) data of compound **1**

碳位	δ_{C} (DEPT)	δ_{H}
2	134.6, C	
3	55.2, CH	4.80 (m)
5	41.1, CH_2	5.05 (dd, $J=12.6, 3.7$ Hz) 2.93 (dt, $J=12.6, 4.2$ Hz)
6	22.0, CH_2	2.76 (m); 2.76 (m)
7	110.5, C	
8	127.9, C	
9	118.8, CH	7.41 (d, $J=6.0$ Hz)
10	119.9, CH	6.99 (t, $J=6.0$ Hz)
11	122.4, CH	7.07 (t, $J=6.0$ Hz)
12	111.9, CH	7.31 (d, $J=6.0$ Hz)
13	138.2, C	
14	33.3, CH_2	2.68 (dt, $J=13.2, 3.6$ Hz) 1.84 (q, $J=13.2$ Hz)
15	28.0, CH	3.36 (m)
16	108.9, C	
17	149.0, CH	7.42 (s)
18	65.1, CH_2	3.61 (m); 3.58 (m)
19	70.0, CH	3.57 (m)
20	41.9, CH	2.25 (m)
21	94.8, CH	5.71 (d, $J=1.4$ Hz)
22	166.1, C	
1'	99.4, CH	4.67 (d, $J=7.9$ Hz)
2'	74.7, CH	3.21 (t, $J=8.1$ Hz)
3'	78.3, CH	3.33 (m)
4'	71.5, CH	3.29 (m)
5'	77.9, CH	3.38 (m)
6'	62.7, CH_2	3.90 (dd, $J=12.0, 1.9$ Hz) 3.68 (dd, $J=12.0, 5.8$ Hz)

HSQC 图谱分析显示, 化合物 **1** 中含有 4 个吲哚环芳香质子信号 δ 7.41 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-9), 6.99 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-10), 7.07 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-11), 7.31 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-12); 1 个糖端基质子信号 δ 4.67 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'); 1 个乙缩醛质子信号 δ 5.71 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-21) 和 1 个烯烃质子信号 δ 7.42 (1H, s, H-17)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) 谱图中显示了 26 个碳信号, 包括 10 个不饱和碳原子信号, 1 个缩醛碳信号 δ 94.8 (C-21), 1 个糖端基碳信号 δ 99.4 (C-1') 和 1 个羰基碳信号 δ 166.1 (C-22)。通过对其 NMR 数据分析发现化合物 **1** 与文献报道的 vincosamide 波谱数据相似^[6], 除了 C-18 与 C-19 化学位移不同。结合 DEPT 谱图, 确定 C-18 (δ 65.1) 为连氧亚甲基, C-19 (δ 70.0) 为连氧次甲基, 根据不饱和度要求, 提示 C-18 与 C-19 均被羟基取代。通过分析 HSQC、HMBC、 ^1H - ^1H COSY 谱, 归属了所有的氢和碳信号。对比文献报道^[6]可知, 当 H-3 为 α 构型时, C-5 的化学位移为 45 左右, C-14 的化学位移为 27 左右, 当 H-3 为 β 构型时, C-5 的化学位移为 41 左右, C-14 的化学位移为 33 左右, 该化合物 C-5 的化学位移为 41.1, C-14 的化学位移为 33.3, 可推断 H-3 为 β 构型。由于天然存在的这类吲哚类生物碱糖苷 H-15 为 β 构型, H-20 为 β 构型, H-21 为 α 构型, 同时 NOESY 谱显示, δ_{H} 3.36 (m, H-15) 与 δ_{H} 2.25 (m, H-20) 有相关, 与 δ_{H} 5.71 (d, $J=1.4$ Hz, H-21) 没有相关, 表明 H-15 与 H-21 位于吡喃环的两侧, 因此可推断 C-3、C-15、C-20、C-21 构型均与 vincosamide 一致。故推断化合物 **1** 的化学结构如图 1 所示, 命名为喜果苷 A。

化合物 **2**: 黄色油状物, ESI-MS m/z : 431 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 2.16 (3H, s,

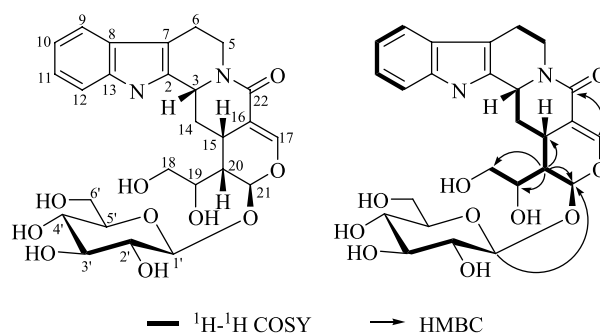


图 1 化合物 **1** 的结构及主要 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关
Fig. 1 Structure and key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

H-2'), 2.11 (6H, s, H-1', 3'), 1.23 (3H, s, H-4'), 0.87 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13''), 0.85 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-14''), 0.84 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-15''); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 118.4 (C-1), 144.5 (C-2), 121.0 (C-3), 122.6 (C-4), 145.5 (C-4a), 74.5 (C-6), 31.5 (C-7), 20.7 (C-8), 117.3 (C-8a), 11.7 (C-1'), 12.2 (C-2'), 11.3 (C-3'), 23.8 (C-4'), 39.8 (C-1''), 21.0 (C-2''), 37.5 (C-3''), 32.7 (C-4''), 37.3, 37.4, 37.4 (C-5'', 7'', 9''), 24.8 (C-6''), 32.8 (C-8''), 24.4 (C-10''), 39.4 (C-11''), 28.0 (C-12''), 22.6 (C-13''), 19.6, 19.7 (C-14'', 15''), 22.7 (C-16''). 以上数据与文献报道一致^[7], 鉴定化合物 **2** 为 α -生育酚。

化合物 **3**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 463 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 4.72 (1H, s, OH), 2.43 (1H, dt, $J = 13.2, 7.2$ Hz, H-7b), 2.02 (3H, s, H-3a), 1.90 (1H, dt, $J = 12.0, 7.2$ Hz, H-8a), 1.83 (3H, s, H-6a), 1.82 (3H, s, H-5a), 1.79 (1H, dt, $J = 13.2, 7.2$ Hz, H-7a), 1.70 (1H, dt, $J = 12.0, 7.2$ Hz, H-8b), 1.05 (3H, s, H-9a), 0.85 (6H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21a, 22), 0.84 (3H, d, $J = 3.6$ Hz, H-13a), 0.83 (3H, d, $J = 3.6$ Hz, H-17a); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 204.9 (C-1), 92.1 (C-2), 207.1 (C-3), 24.8 (C-3a), 89.0 (C-4), 163.0 (C-5), 11.8 (C-5a), 139.3 (C-6), 8.7 (C-6a), 32.8 (C-7), 36.1 (C-8), 87.0 (C-9), 25.4 (C-9a), 41.4 (C-10), 22.4 (C-11), 37.5 (C-12), 32.8 (C-13), 19.6 (C-13a), 37.4 (C-14), 24.8 (C-15), 37.4 (C-16), 32.7 (C-17), 19.7 (C-17a), 37.2 (C-18), 24.4 (C-19), 39.3 (C-20), 28.0 (C-21), 22.7 (C-21a), 22.6 (C-22)。 以上数据与文献报道一致^[8], 鉴定化合物 **3** 为 α -tocospiro A。

化合物 **4**: 淡黄色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.64 (1H, s, H-3), 2.24 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-7a), 1.74 (1H, m, H-7b), 1.72 (2H, m, H-6), 1.55 (3H, s, H-10), 1.47 (2H, m, H-5), 1.27 (3H, s, H-8), 1.22 (3H, s, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 182.4 (C-2), 112.3 (C-3), 171.9 (C-3a), 36.4 (C-4), 40.0 (C-5), 19.6 (C-6), 41.6 (C-7), 87.2 (C-7a), 24.3 (C-8), 24.1 (C-9), 29.8 (C-10)。 以上数据与文献报道一致^[9], 鉴定化合物 **4** 为二氢猕猴桃内酯。

化合物 **5**: 白色针晶 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应阳性, ESI-MS m/z : 455 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.96 (1H, d, $J = 10.3$

Hz, H-12), 5.53 (1H, dd, $J = 10.3, 3.1$ Hz, H-11), 3.22 (1H, dd, $J = 11.5, 4.7$ Hz, H-3), 1.15 (3H, s, 27-Me), 1.04 (3H, s, 26-Me), 0.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 29-Me), 0.98 (3H, s, 25-Me), 0.93 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, 30-Me), 0.90 (3H, s, 23-Me), 0.78 (3H, s, 24-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.2 (C-1), 26.9 (C-2), 78.8 (C-3), 38.9 (C-4), 54.7 (C-5), 17.6 (C-6), 31.3 (C-7), 41.9 (C-8), 53.0 (C-9), 36.3 (C-10), 128.8 (C-11), 133.4 (C-12), 89.6 (C-13), 41.6 (C-14), 25.5 (C-15), 22.7 (C-16), 45.0 (C-17), 60.5 (C-18), 40.2 (C-19), 38.1 (C-20), 30.7 (C-21), 31.2 (C-22), 27.7 (C-23), 14.9 (C-24), 19.1 (C-25), 18.8 (C-26), 16.1 (C-27), 179.9 (C-28), 17.8 (C-29), 17.8 (C-30)。 以上数据与文献报道一致^[10], 鉴定化合物 **5** 为乌苏酸内酯。

化合物 **6**: 黄色油状物 (甲醇), ESI-MS m/z : 207 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.86 (1H, brs, H-7), 5.80 (1H, dd, $J = 15.5, 5.4$ Hz, H-3), 5.76 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-4), 4.30 (1H, m, H-2), 2.47 (1H, brd, $J = 17.1$ Hz, H-9b), 2.15 (1H, brd, $J = 17.1$ Hz, H-9a), 1.90 (3H, s, H-14), 1.24 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11), 1.03 (3H, s, H-13), 1.00 (3H, s, H-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 68.6 (C-2), 136.9 (C-3), 129.9 (C-4), 79.9 (C-5), 167.4 (C-6), 127.1 (C-7), 201.2 (C-8), 50.7 (C-9), 42.4 (C-10), 24.5 (C-11), 23.8 (C-12), 23.4 (C-13), 19.5 (C-14)。 以上数据与文献报道一致^[11], 鉴定化合物 **6** 为 3,4-dehydrotheaspirone。

化合物 **7**: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 25.8^\circ$ (c 0.1, MeOH), ESI-MS m/z : 215 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.77 (1H, s, H-2), 4.09 (1H, m, H-6), 2.46 (1H, ddd, $J = 11.0, 3.0, 2.5$ Hz, H-5b), 2.00 (1H, ddd, $J = 12.5, 2.5, 2.0$ Hz, H-7b), 1.58 (3H, s, H-11), 1.41 (1H, dd, $J = 12.0, 11.0$ Hz, H-5a), 1.30 (3H, s, H-10), 1.28 (1H, overlap, H-7a), 1.28 (3H, s, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 183.5 (C-1), 113.3 (C-2), 173.6 (C-3), 88.2 (C-4), 48.5 (C-5), 64.9 (C-6), 50.3 (C-7), 35.8 (C-8), 24.9 (C-9), 29.9 (C-10), 25.4 (C-11)。 以上数据与文献报道一致^[12], 鉴定化合物 **7** 为 chakyunglupulin A。

化合物 **8**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 5.49 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, H-12), 3.44 (1H, dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, H-3), 1.24 (3H, s, H-27), 1.22 (3H, s, H-25), 1.05 (3H, s, H-24),

1.02 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-30), 0.94 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-29), 0.88 (3H, s, H-26); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 39.0 (C-1), 28.1 (C-2), 78.1 (C-3), 39.4 (C-4), 55.8 (C-5), 18.8 (C-6), 33.6 (C-7), 39.9 (C-8), 48.0 (C-9), 37.3 (C-10), 23.6 (C-11), 125.6 (C-12), 139.2 (C-13), 42.5 (C-14), 28.7 (C-15), 24.9 (C-16), 48.0 (C-17), 53.5 (C-18), 39.4 (C-19), 39.5 (C-20), 31.1 (C-21), 37.4 (C-22), 28.9 (C-23), 16.6 (C-24), 15.7 (C-25), 17.5 (C-26), 23.9 (C-27), 179.9 (C-28), 17.5 (C-29), 21.4 (C-30)。以上数据与文献报道一致^[13], 鉴定化合物 **8** 为乌苏酸。

化合物 **9**: 白色方晶 (水), ESI-MS m/z : 155 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.43 (1H, brs, H-2), 7.42 (1H, dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 123.1 (C-1), 117.7 (C-2), 146.0 (C-3), 151.5 (C-4), 115.7 (C-5), 123.8 (C-6), 170.2 (COOH)。以上数据与文献报道一致^[14], 鉴定化合物 **9** 为原儿茶酸。

化合物 **10**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 303 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.73 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 148.0 (C-2), 137.3 (C-3), 177.4 (C-4), 158.2 (C-5), 99.3 (C-6), 165.6 (C-7), 94.5 (C-8), 162.5 (C-9), 104.5 (C-10), 124.2 (C-1'), 116.0 (C-2'), 146.3 (C-3'), 148.8 (C-4'), 116.2 (C-5'), 121.7 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[15], 鉴定化合物 **10** 为槲皮素。

化合物 **11**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 291 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.96 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 5.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 4.82 (1H, brs, H-2), 4.16 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 4.6, 16.7$ Hz, H-4b), 2.72 (1H, dd, $J = 2.8, 16.7$ Hz, H-4a); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 79.8 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4), 157.7 (C-5), 96.3 (C-6), 157.4 (C-7), 95.8 (C-8), 158.0 (C-9), 100.0 (C-10), 132.3 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.7 (C-3'), 145.9 (C-4'), 115.8 (C-5'), 119.4 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[16-17], 鉴定化合物 **11** 为表儿茶素。

化合物 **12**: 淡黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z :

383 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 7.04 (1H, brs, H-2'), 6.94 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 6.23 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-3), 4.15 (2H, m, H-8), 4.15 (1H, m, H-5), 3.74 (1H, m, H-4), 2.09~2.20 (2H, m, H-6), 1.97~2.24 (2H, m, H-2), 1.24 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 75.7 (C-1), 37.8 (C-2), 72.1 (C-3), 72.6 (C-4), 70.4 (C-5), 37.9 (C-6), 174.9 (C-7), 62.5 (C-8), 14.2 (C-9), 127.6 (C-1'), 115.1 (C-2'), 146.8 (C-3'), 149.6 (C-4'), 116.5 (C-5'), 122.9 (C-6'), 147.1 (C-7'), 115.0 (C-8'), 168.3 (C-9')。以上数据与文献报道一致^[18], 鉴定化合物 **12** 为绿原酸乙酯。

化合物 **13**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 611 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.87 (1H, s, H-2'), 7.59 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, brs, H-8), 6.19 (1H, brs, H-6), 5.05 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.52 (1H, brs, H-1'''), 3.82 (1H, m, H-2''), 3.80 (1H, m, H-4''), 3.74 (1H, m, H-6''b), 3.65 (1H, m, H-5''), 3.58 (1H, m, H-2'''), 3.55 (1H, m, H-3''), 3.52 (1H, m, H-5'''), 3.48 (1H, m, H-3'''), 3.40 (1H, m, H-6''a), 3.29 (1H, m, H-4'''), 1.18 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 158.6 (C-2), 135.9 (C-3), 179.5 (C-4), 163.0 (C-5), 100.3 (C-6), 167.0 (C-7), 95.1 (C-8), 158.9 (C-9), 106.1 (C-10), 122.9 (C-1'), 118.0 (C-2'), 145.9 (C-3'), 150.1 (C-4'), 116.2 (C-5'), 123.1 (C-6'), 105.4 (C-1''), 74.0 (C-2''), 75.2 (C-3''), 70.3 (C-4''), 75.4 (C-5''), 67.4 (C-6''), 102.0 (C-1'''), 72.2 (C-2'''), 72.4 (C-3'''), 73.3 (C-4'''), 69.8 (C-5'''), 18.1 (C-6''')。以上数据与文献报道一致^[19], 鉴定化合物 **13** 为槲皮素-3-*O*-洋槐糖苷。

化合物 **14**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 611 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.66 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 5.10 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.50 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1'''), 1.12 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 159.6 (C-2), 135.9 (C-3), 179.5 (C-4), 163.2 (C-5), 100.2 (C-6), 166.2 (C-7), 95.1 (C-8), 158.7 (C-9), 105.9 (C-10), 123.3 (C-1'), 116.3 (C-2'), 146.0 (C-3'), 150.0 (C-4'), 117.9 (C-5'), 123.8 (C-6'),

105.0 (C-1''), 76.0 (C-2''), 78.4 (C-3''), 71.6 (C-4''), 77.4 (C-5''), 68.8 (C-6''), 102.7 (C-1'''), 72.5 (C-2'''), 72.3 (C-3'''), 74.1 (C-4'''), 69.8 (C-5'''), 18.1 (C-6'''). 以上数据与文献报道一致^[20], 鉴定化合物 **14** 为芦丁。

化合物 **15**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 195 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, acetone- d_6) δ : 7.53 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.16 (1H, brs, H-2), 7.03 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.86 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 3.71 (3H, s, 9-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, acetone- d_6) δ : 127.4 (C-1), 115.1 (C-2), 146.3 (C-3), 148.8 (C-4), 116.3 (C-5), 122.4 (C-6), 145.7 (C-7), 115.0 (C-8), 167.7 (C-9), 51.4 (9-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[21], 鉴定化合物 **15** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **16**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 499 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.37 (1H, brs, H-17), 7.36 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-9), 7.32 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.07 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-11), 6.98 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-10), 5.63 (1H, dt, $J = 17.1, 10.1$ Hz, H-19), 5.40 (1H, brs, H-21), 5.35 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-18b), 5.30 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-18a), 5.04 (1H, m, H-3), 4.93 (1H, dd, $J = 12.3, 5.7$ Hz, H-5b), 4.56 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 3.85 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-6'b), 3.62 (1H, dd, $J = 11.8, 5.8$ Hz, H-6'a), 3.16~3.30 (3H, m, H-3'~5'), 3.07 (1H, dt, $J = 12.3, 4.4$ Hz, H-5a), 2.96 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 2.94~2.97 (1H, m, H-6b), 2.78 (1H, m, H-15), 2.63~2.69 (1H, m, H-20), 2.63~2.68 (1H, m, H-6a), 2.44 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-14b), 2.00 (1H, dt, $J = 13.8, 5.9$ Hz, H-14a); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD) δ : 134.7 (C-2), 55.1 (C-3), 44.7 (C-5), 22.1 (C-6), 110.3 (C-7), 128.7 (C-8), 118.7 (C-9), 120.1 (C-10), 122.4 (C-11), 112.2 (C-12), 137.7 (C-13), 27.3 (C-14), 24.9 (C-15), 109.2 (C-16), 149.1 (C-17), 120.5 (C-18), 134.3 (C-19), 44.7 (C-20), 98.0 (C-21), 166.0 (C-22), 100.5 (C-1'), 74.3 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.2 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[6], 鉴定化合物 **16** 为 strictosamide。

化合物 **17**: 黄色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z : 499 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.44 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-17), 7.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 7.29 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-12), 7.07 (1H, t, $J = 7.2$ Hz,

H-11), 6.98 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10), 5.54 (1H, dt, $J = 17.1, 10.2$ Hz, H-19), 5.50 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-21), 5.28 (1H, dd, $J = 17.1, 1.7$ Hz, H-18b), 5.18 (1H, dd, $J = 10.2, 1.7$ Hz, H-18a), 5.07 (1H, dd, $J = 12.2, 3.5$ Hz, H-5b), 4.92 (1H, m, H-3), 4.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 3.89 (1H, dd, $J = 11.9, 1.8$ Hz, H-6'b), 3.68 (1H, dd, $J = 11.9, 5.6$ Hz, H-6'a), 3.29~3.39 (3H, m, H-3'~5'), 3.21 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-2'), 3.19~3.30 (1H, m, H-15), 2.95 (1H, dt, $J = 12.2, 4.3$ Hz, H-5a), 2.78 (1H, m, H-6a), 2.78 (1H, m, H-6b), 2.72 (1H, m, H-20), 2.46 (1H, dt, $J = 13.1, 3.5$ Hz, H-14b), 1.46 (1H, q, $J = 13.1$ Hz, H-14a); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD) δ : 134.5 (C-2), 54.8 (C-3), 41.2 (C-5), 22.0 (C-6), 109.0 (C-7), 127.9 (C-8), 118.8 (C-9), 120.0 (C-10), 122.5 (C-11), 111.9 (C-12), 138.2 (C-13), 32.6 (C-14), 27.3 (C-15), 109.3 (C-16), 149.0 (C-17), 120.5 (C-18), 133.9 (C-19), 44.5 (C-20), 97.4 (C-21), 166.0 (C-22), 99.6 (C-1'), 74.8 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[6], 鉴定化合物 **17** 为 vincosamide。

4 DPPH 自由基清除实验

根据文献报道的实验方法^[22]进行适当改进, 精密称取适量 DPPH, 用乙醇配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 避光备用。将单体样品用乙醇配成系列质量浓度梯度 (2~200 $\mu\text{g/mL}$) 溶液, 各取 20 μL 加入 180 μL DPPH 溶液于 EP 管中混匀, 于室温条件下避光反应 20 min。反应结束后, 于 517 nm 波长处检测吸光度 (A_s) 值。同时测定空白对照体系, 即 20 μL 乙醇溶剂与 180 μL DPPH 溶液混合后的 A_c 值, 以及背景信号纯乙醇 200 μL 的 A_b 值, 每个浓度重复测定 3 次, 根据公式计算清除率, 以清除率为纵坐标 (Y), 化合物的浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 以清除率为 50% 时待测样品浓度 (IC_{50}) 为评价指标, 以维生素 E 为阳性对照。结果显示, 化合物 **10**、**11**、**13**~**15** 具有较强的抗氧化能力, IC_{50} 值分别为 7.52、8.21、8.14、2.13、5.35 $\mu\text{mol/L}$, 优于阳性药维生素 E (IC_{50} 值 9.53 $\mu\text{mol/L}$); 其余化合物未表现出抗氧化活性 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$)。

$$\text{清除率} = 1 - (A_s - A_b) / (A_c - A_b)$$

5 讨论

本研究对钩藤叶的乙醇提取物进行了系统的分离, 鉴定了 17 个化合物, 化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2**~**7**、**9**、**12**、**13**、**15** 为首次从该属植物中

分离得到。DPPH 抗氧化活性测试结果显示, 化合物 10、11、13~15 具有较强的抗氧化能力, IC_{50} 值分别为 7.52、8.21、8.14、2.13、5.35 $\mu\text{mol/L}$, 优于阳性药维生素 E。此外, 文献研究^[23-24]表明, 钩藤叶的化学成分与传统药用部位带钩茎枝相似, 主要为生物碱、萜类、黄酮类化合物。从本实验结果来看, 化合物 1、16、17 为生物碱类化合物, 5、8 为三萜类化合物, 10、11、13、14 为黄酮类化合物, 这些化合物均为钩藤属中主要化学成分。这些发现为开发钩藤叶作为新的药用资源提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘 佳, 富志军. 钩藤的研究概况 [J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 90-93.
- [3] Lee J S, Kim J, Kim B Y, *et al.* Inhibition of phospholipase C γ 1 and cancer cell proliferation by triterpene esters from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(6): 753-756.
- [4] Wirth C, Wagner H. Pharmacologically active procyanidines from the bark of *Uncaria tomentosa* [J]. *Phytomedicine*, 1997, 4(3): 265-266.
- [5] Sandoval M, Okuhama N N, Zhang X J, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(4): 325-337.
- [6] Erdelmeier C A J, Wright A D, Orjala J, *et al.* New indole alkaloid glycosides from *Nauclea orientalis* [J]. *Planta Med*, 1991, 57(2): 149-152.
- [7] Kitajima J, Kimizuka K, Arai M, *et al.* Constituents of *Ficus pumila* leaves [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(10): 1647-1649.
- [8] Chiang Y M, Kuo Y H. Two novel α -tocopheroids from the aerial roots of *Ficus microcarpa* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44(27): 5125-5128.
- [9] 魏 倩, 杨建波, 王爱国, 等. 茶茺地上部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 1980-1983.
- [10] 柏玉冰, 李 春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [11] Moujir L M, Seca A M L, Araujo L, *et al.* A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(2): 225-229.
- [12] Kim K H, Clardy J, Senger D, *et al.* Chakylunglupulins A and B, two novel 4,8,8-trimethylcyclooct-2-enone derivatives from *Barleria lupulina* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2015, 56(21): 2732-2734.
- [13] 张仕瑾, 谢运飞, 谭玉柱, 等. 桦褐孔菌三萜类化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2355-2360.
- [14] 王雪松, 车庆明, 李艳梅, 等. 山楂核化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 739-740.
- [15] 周先礼, 秦长红, 梅 莹, 等. 髯花杜鹃叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 206-208.
- [16] Sun J, Jiang Y, Wei X, *et al.* Identification of (-)-epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase isolated from litchi pericarp [J]. *Food Res Int*, 2006, 39(8): 864-870.
- [17] Fan P H, Lou H X, Yu W T, *et al.* Novel flavanol derivatives from grape seeds [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45(15): 3163-3166.
- [18] 翁裕馨, 陈湘宏, 刘占厚, 等. 细毡毛忍冬叶绿原酸类化学成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16566-16568.
- [19] Nam T G, Lee S M, Park J H, *et al.* Flavonoid analysis of buckwheat sprouts [J]. *Food Chem*, 2015, 170: 97-101.
- [20] 王雪晶, 罗 鑫, 周建明, 等. 大株红景天化学成分及其心肌细胞保护活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2822-2826.
- [21] Stefaan M O, Van D, Guy L F L, *et al.* Synthesis of 4-O-methylcedrusin. Selective protection of catechols with diphenyl carbonate [J]. *Molecules*, 2000, 5(2): 153-161.
- [22] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [23] Laus G. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria* [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(4): 259-274.
- [24] Heitzman M E, Neto C C, Winarz E, *et al.* Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(1): 5-29.