

• 化学成分 •

巴山花椒根中的生物碱类成分研究

桑宜宁, 唐思琦, 周田歌, 张 鹏*

华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430000

摘要: 目的 研究巴山花椒 *Zanthoxylum pashanense* 根的醋酸乙酯部位的化学成分及其抗炎活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、MCI 以及半制备高效液相色谱等多种分离手段进行分离纯化, 并结合化合物的理化性质、质谱以及核磁数据进行结构鉴定。采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型评价其抗炎活性。结果 从巴山花椒根的醋酸乙酯部位中分离出 7 个生物碱化合物, 分别鉴定为 15-羟基-柄果花椒酰胺 (1)、柄果花椒酰胺 (2)、beeheyamide (3)、(-)-*N*-acetylanonaine (4)、(-)-*N*-acetylxylopine (5)、白鲜碱 (6)、 γ -崖椒碱 (7)。化合物 1~5 均具有不同程度的抗炎活性, 其中化合物 4 的抗炎活性最强, 其对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞所释放的炎症因子一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 以及白细胞介素 (interleukin-1 β , IL-1 β) 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 分别为 (13.64 $\pm$ 0.32)、(27.27 $\pm$ 2.86)、(29.54 $\pm$ 0.20) μ mol/L。结论 化合物 1 为新的酰胺类化合物, 命名为 15-羟基-柄果花椒酰胺, 并首次对其氢谱和碳谱数据进行归属。其中, 化合物 5 为首次从芸香科植物中分离得到, 化合物 2~4 为首次从该植物中分离得到。化合物 1~5 均对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞所释放的炎症因子 NO、TNF- α 、IL-1 β 具有不同程度的抑制作用。

关键词: 花椒属; 巴山花椒; 酰胺类生物碱; 抗炎活性; 15-羟基-柄果花椒酰胺

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)05-1354-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.009

Research on alkaloids constituent from root of *Zanthoxylum pashanense*

SANG Yi-ning, TANG Si-qi, ZHOU Tian-ge, ZHANG Peng

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the ethyl acetate extract from the roots of *Zanthoxylum pashanense* and their anti-inflammatory effects. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica, MCI and column chromatography (CC), and the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties, HRESIMS and spectral data. All of the compounds were evaluated for anti-inflammatory activity against the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. **Results** Seven compounds were isolated and identified as 15-hydroxy-podocarpamide (1), podocarpamide (2), beeheyamide (3), (-)-*N*-acetylanonaine (4), (-)-*N*-acetylxylopine (5), γ -fagarine (6), and dictamnine (7). The experiment of anti-inflammatory effects showed that compounds 1—5 had different inhibitory effects on the production of inflammatory factors. **Conclusion** Compound 1 was a new amide alkaloid named 15-hydroxy-podocarpamide. Its ¹H-NMR and ¹³C-NMR data was completely assigned on the basis of 1D and 2D NMR spectroscopic evidence for the first time. Activity assay showed that compounds 1—5 inhibited for NO, TNF- α and IL-1 β at different levels. Among them, compound 4 presented strong inhibitory effect on NO, TNF- α , IL-1 β production with IC₅₀ values of (13.64 $\pm$ 0.32), (27.27 $\pm$ 2.86), (29.54 $\pm$ 0.20) μ mol/L, respectively.

Key words: *Zanthoxylum* L.; *Zanthoxylum pashanense* N. Chao; amide alkaloids; anti-inflammation; 15-hydroxy-podocarpamide

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774002)

作者简介: 桑宜宁 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学活性成分的基础研究。Tel: 15002755650 E-mail: 565600334@qq.com

*通信作者: 张 鹏, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为天然药物化学活性成分的研究以及中药新药的开发。E-mail: zhangpeng@hust.edu.cn

花椒属 *Zanthoxylum* L. 植物为芸香科 (Rutaceae) 灌木、小乔木或木质藤本。目前, 该属药用植物在我国约有 18 种, 其果实、根、茎和叶均可作药用, 主要含有生物碱、木脂素和香豆素等化学成分, 具有镇痛、麻醉、抑菌和抗血小板凝集等活性^[1-3]。巴山花椒 *Zanthoxylum pashanense* N. Chao 为芸香科花椒属植物, 主要分布于我国四川和湖北, 其在湖北恩施地区常做药用, 又称为“三百棒”, 主要用于治疗风湿性关节炎疼痛^[4]。目前, 有关巴山花椒化学成分及生物活性的研究鲜见报道。为了进一步研究巴山花椒根中化学成分的组成及其生物活性, 本实验对巴山花椒根部的醋酸乙酯提取物进行了系统的分离纯化, 从中分离并鉴定了 7 个生物碱类化合物, 分别为 15-羟基-柄果花椒酰胺 (15-hydroxy-

podocarpamide, **1**)、柄果花椒酰胺 (podocarpamide, **2**)、beeheyamide (**3**)、(-)-*N*-acetylanonaine (**4**)、(-)-*N*-acetylxylopine (**5**)、白鲜碱 (dictamnine, **6**)、 γ -崖椒碱 (γ -fagarine, **7**)。其中化合物 **1** 为新的酰胺类生物碱, 命名为 15-羟基-柄果花椒酰胺 (图 1); 化合物 **5** 为首次从芸香科植物中分离得到; 化合物 **2**~**4** 为首次从巴山花椒中分离得到。此外, 本研究还对分离鉴定的 7 个化合物的体外抗炎活性进行了测试, 结果表明化合物 **1**~**5** 均对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的 RAW264.7 细胞释放的炎症因子一氧化氮 (NO), 促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin-1 β , IL-1 β) 具有不同程度的抑制作用。其中, 化合物 **1** 具有中等强度的抗炎活性, 化合物 **4** 的抗炎活性最强。

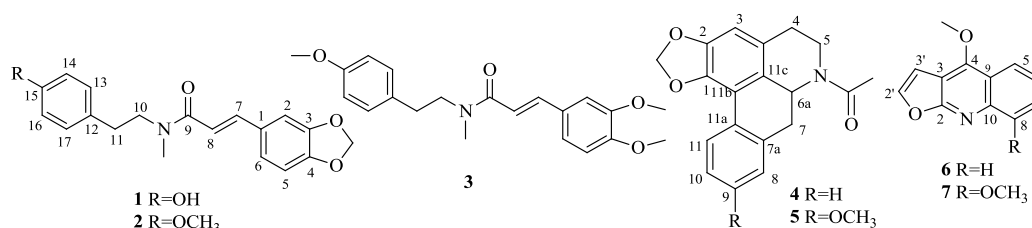


图 1 化合物 1~7 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—7

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); Bruker AM-400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Sephadex LH-20 (瑞士 GE Healthcare 公司); MCI-ODS (日本三菱化工); 柱色谱用硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工集团); 噻唑蓝 (MTT) 购买于德国 BIOFROX 公司; 胎牛血清 (FBS) 和 DEME 培养基 (美国 Gibco 公司); NO 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); ELISA 试剂盒 (伊莱瑞特生物科技有限公司); 实验所用化学试剂均购于国药化试集团, 均为分析纯或色谱纯。

巴山花椒药材于 2016 年 5 月采自湖北省恩施建始县, 经湖北省鄂西自治州建始县药监局王从荣主任药师鉴定为芸香科植物巴山花椒 *Z. pashanense* N. Chao 的干燥根, 标本 (TG201608021) 保存于华中科技大学同济医学院药学院。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的巴山花椒根 10 kg, 粉碎, 95%乙醇水溶液热回流提取 3 次, 每次 1.5 h。合并提取液, 减压浓缩得总浸膏 (1.8 kg)。总浸膏加 4 L 水混悬分散

后, 依次加入等体积的石油醚、醋酸乙酯以及正丁醇萃取、浓缩, 分别得到萃取物 235.0、305.0、453.0 g。取 305.0 g 醋酸乙酯萃取物加硅胶适量拌样, 进行硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (40:1→1:4) 梯度洗脱, 得到 14 个流分 (Fr. 1~14)。

Fr. 6 (33 g) 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (20:1→1:2) 梯度洗脱, 得到 7 个亚流分 (Fr. 6-1~6-7)。Fr. 6-2 (4 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 得到化合物 **6** (6 mg)。

Fr. 9 (30 g) 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (10:1→1:5) 梯度洗脱, 得到 13 个亚流分 (Fr. 9-1~9-13)。Fr. 9-9 (6.9 g) 和 Fr. 9-13 (5 g) 分别经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 以及半制备 HPLC (流动相分别为 90%、55%甲醇溶液) 纯化分离得到化合物 **2** (7 mg)、**4** (6.8 mg)、**7** (10 mg) 和 **3** (5.1 mg)。

Fr. 10 (20 g) 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (2:1→1:2) 梯度洗脱, 得到 11 个亚流分 (Fr. 10-1~10-11)。Fr. 10-6 (7.5 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1), 以及半制备 HPLC (流动相为 65%甲醇溶液) 纯化分离得到化

合物 **1** (8 mg) 和 **5** (3 mg)。

2.2 抗炎活性测定

2.2.1 细胞活力实验 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 按 1×10^6 个/mL 浓度稀释, 细胞稀释液加至 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液。用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后弃培养基, 分别加入不同浓度的待测样品, 继续培养 24 h, 每组设 3 个复孔, MTT 法测定细胞存活率。在确保细胞存活率不低于 90% 的条件下, 设置化合物的抗炎实验浓度梯度。

2.2.2 抗炎活性筛选 取对数生长期的 RAW264.7 细胞用 0.25% 胰酶消化约 1 min, 吸去胰酶, 用含有 10% 进口 FBS 的 DMEM 培养基中和胰酶作用, 轻轻吹打成单细胞悬液, 离心弃上清液。用完全培养基重悬细胞并计数后, 调整细胞悬液至 1×10^6 个细胞/mL, 按每孔 100 μ L 的培养体积接种至 96 孔培养板, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养 12 h, 然后饥饿处理 12 h, 吸去每孔上清液。每孔再加入 100 μ L 无血清 DMEM 培养基配制的相应分组培养液, 随机分为空白对照组 (FBS)、LPS (1 μ g/mL) 组、LPS (1 μ g/mL) + 地塞米松 (6.25、12.5、25、50 μ mol/L) 组和 LPS (1 μ g/mL) + 化合物 **1**~**7** (6.25、12.5、25、50、100 μ mol/L) 组。加入相应药物后, 每组设 3 个复孔, 置于 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件下培养 24 h 后, 取上清液用于 NO、TNF- α 、IL-1 β 炎症因子的表达情况检测, 并最终计算化合物的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z : 348.120 3 [M+Na]⁺ (计算值 348.121 2, C₁₉H₁₉NO₄Na), 确定该化合物的分子式为 C₁₉H₁₉NO₄, 不饱和度为 11。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3223, 1643, 1515; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 218, 285, 325。根据红外光谱中 1645 cm⁻¹ 处的酰胺基团特征吸收, 推测可能存在酰胺结构。

化合物 **1** 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱中存在 2 套谱图 (即 **1a** 和 **1b**), 这与文献中报道的长链酰胺类化合物在溶液中存在顺/反 2 种异构体的互变现象相吻合^[5-6], 根据氢谱中的积分比例确定化合物 **1** 在溶液中的 2 种构型比例为 3 : 2。¹³C-NMR (表 1)、HSQC 以及 DEPT 数据中, 可以观察到化合物 **1a**

中有 19 个碳信号, 包括 6 个季碳 (其中 1 个羰基季碳、5 个不饱和季碳), 9 个不饱和和次甲基, 3 个饱和和亚甲基 (其中 1 个二氧亚甲基) 和 1 个与氮原子相连的甲基。

¹H-NMR (表 1) 和 ¹H-¹H COSY 谱 (图 2) 中显示, 化合物 **1a** 在低场区有 2 组苯环氢信号, 其中 δ_{H} 6.85 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 6.74 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.86 (1H, m, H-6) 为 ABX 偶合关系, 表明存在 1 个 1, 3, 4-三取代苯环结构; δ_{H} 7.05 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-13, 17), 6.80 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-14, 16) 为 AA'BB'偶合关系, 表明存在 1 个 1,4-二取代苯环结构。 δ_{H} 7.43 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-7), 6.34 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-8) 相互偶合, 表明存在 1 个反式烯烃结构。此外, 结构中还具有 1 个 -CH₂-CH₂-片段 [δ_{H} 3.62 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-10), 2.81 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-11)]、1 个二氧亚甲基 δ_{H} 5.96 (2H, s, OCH₂O) 以及 1 个氮甲基 δ_{H} 3.00 (3H, s, N-CH₃)。

从 HMBC 谱 (图 2) 中可知, 化合物 **1a** 的 H-11 分别与 C-12 (δ_{C} 129.9)、C-17 (δ_{C} 130.0) 相关, H-10 分别与 C-11 (δ_{C} 34.6)、C-12 (δ_{C} 129.9) 相关, 表明结构中存在苯乙基片段。H-7 分别与 C-1 (δ_{C} 129.1)、C-2 (δ_{C} 106.5) 和 C-6 (δ_{C} 123.9) 相关, H-7 和 H-8 与 C-9 (δ_{C} 167.5) 相关, 表明结构中存在桂皮酰片段。N-CH₃ 与 C-9 (δ_{C} 167.5), C-10 (δ_{C} 52.2) 相关, 表明上述 2 个片段通过氮原子相连。

上述结构片段的谱学数据与已知化合物柄果花椒酰胺 (podocarpamide, **2**)^[5] 基本一致, 差异仅仅在于 C-15 位取代基不同。化合物 **1** 中 C-15 (δ_{C} 155.5) 较柄果花椒酰胺 (**2**) C-15 位化学位移向高场移动, 并结合二者分子式差异, 推测化合物 **1** 中 C-15 位为羟基取代, 化合物 **2** 中 C-15 位为甲氧基取代。综上所述, 化合物 **1** 的结构鉴定为 15-羟基-柄果花椒酰胺 (15-hydroxy-podocarpamide, **1**)。化合物 **1** 在溶液状态下, 存在酰胺键的顺/反构型互变现象, 根据 NOESY 谱 (图 2) 中, H-8 (δ 6.34) 与 H-10 (δ 3.62) 相关信号确认了 **1a** 为反式, 而 **1b** 为顺式, 结合 1D 和 2D NMR 谱, 完成了对化合物 **1** 的 **1a**(*E*) 和 **1b**(*Z*) 2 种构型的碳氢信号归属。

化合物 **2**: 淡黄色油状液体; 其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱中均包含 2 套信号: 其中 **2a** 的 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.77 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-2), 6.80 (2H, m, H-5, 6), 7.19 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-7),

表 1 化合物 1 的氢谱和碳谱数据 (400/100MHz, CDCl₃)
Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound 1 (400/100MHz, CDCl₃)

碳位	1a 优势构象 (E)		1b 次要构象 (Z)	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1		129.1		129.1
2	6.85 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	106.5	7.01 (1H, d, <i>J</i> = 2.8 Hz)	106.5
3		149.2		149.0
4		148.2		148.3
5	6.74 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	108.6	6.74 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	108.5
6	6.98 (1H, m)	123.9	6.86 (1H, m)	124.1
7	7.43 (1H, d, <i>J</i> = 15.3 Hz)	142.1	7.59 (1H, d, <i>J</i> = 15.3 Hz)	142.7
8	6.34 (1H, d, <i>J</i> = 15.4 Hz)	115.6	6.66 (1H, d, <i>J</i> = 15.3 Hz)	115.5
9		167.5		166.8
10	3.62 (2H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz)	52.2	3.62 (2H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz)	50.8
11	2.81 (2H, t, <i>J</i> = 6.4 Hz)	34.6	2.81 (2H, t, <i>J</i> = 6.4 Hz)	33.1
12		129.9		129.8
13	7.05 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	130.0	6.80 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	129.9
14	6.80 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	116.1	6.80 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	115.7
15		155.5		156.1
16		116.1		115.7
17		130.0		129.9
<i>N</i> -CH ₃	3.00 (3H, s)	34.7	3.04 (3H, s)	36.2
OCH ₂ O	5.96 (2H, s)	101.5	5.98 (2H, s)	101.5

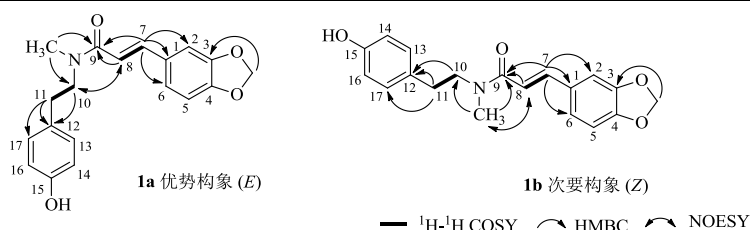


图 2 化合物 1 的 HMBC, ¹H-¹H COSY 和 NOESY 关键相关信号

Fig. 2 Key HMBC, ¹H-¹H COSY and NOESY correlations of compound 1

6.47 (1H, d, *J* = 15.3 Hz, H-8), 3.55 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10), 2.68 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-11), 7.16 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-13, 17), 6.84 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-14, 16), 2.99 (3H, s, *N*-CH₃), 3.72 (3H, s, 15-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 130.8 (C-1), 109.1 (C-2), 149.4 (C-3), 149.3 (C-4), 108.8 (C-5), 116.7 (C-6), 134.4 (C-7), 124.4 (C-8), 171.3 (C-9), 50.2 (C-10), 34.4 (C-11), 131.4 (C-12), 159.8 (C-15), 130.9 (C-13, 17), 115.0 (C-14, 16), 102.7 (OCH₂O), 32.9 (*N*-CH₃), 55.6 (OCH₃). **2b** 的 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.77 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-2), 7.01 (1H, m, H-5), 6.80 (1H, m, H-6), 7.49 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-7), 6.66 (1H, d,

J = 15.4 Hz, H-8), 3.61 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10), 2.81 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-11), 7.01 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-13, 17), 6.84 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-14, 16), 2.87 (3H, s, *N*-CH₃), 3.76 (3H, s, 15-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 130.8 (C-1), 109.1 (C-2), 149.5 (C-3), 149.4 (C-4), 108.8 (C-5), 116.7 (C-6), 134.6 (C-7), 124.7 (C-8), 171.6 (C-9), 53.5 (C-10), 36.7 (C-11), 132.1 (C-12), 159.9 (C-15), 131.0 (C-13, 17), 115.0 (C-14, 16), 102.7 (OCH₂O), 33.1 (*N*-CH₃), 55.6 (OCH₃). 以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 **2** 为柄果花椒酰胺。

化合物 **3**: 淡黄色油状液体; 其 ¹H-NMR 和

^{13}C -NMR 谱中均包含 2 套信号: 其中 **3a** 的 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.93 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-2), 6.75 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 6.99 (1H, m, H-6), 7.17 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-7), 6.93 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-8), 3.64 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-10), 2.85 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-11), 7.23 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-13, 17), 6.84 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-14, 16), 3.02 (3H, s, $N\text{-CH}_3$), 3.60 (3H, s, 15- OCH_3), 3.87 (6H, s, 3, 4- OCH_3);

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 129.7 (C-1), 112.6 (C-2), 152.1 (C-3), 150.6 (C-4), 111.6 (C-5), 116.4 (C-6), 142.7 (C-7), 123.3 (C-8), 169.8 (C-9), 53.0 (C-10), 34.9 (C-11), 131.8 (C-12), 160.0 (C-15), 131.2 (C-13, 17), 115.1 (C-14, 16), 33.7 ($N\text{-CH}_3$), 55.5 (15- OCH_3), 56.4 (3, 4- OCH_3)。 **3b** 的 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.09 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-2), 6.75 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 6.99 (1H, m, H-6), 7.50 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-7), 6.43 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-8), 3.64 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-10), 2.85 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-11), 7.17 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-13, 17), 6.84 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-14, 16), 3.10 (3H, s, $N\text{-CH}_3$), 3.75 (3H, s, 15- OCH_3), 3.85 (6H, s, 3, 4- OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 129.6 (C-1), 112.6 (C-2), 152.4 (C-3), 150.7 (C-4), 111.6 (C-5), 116.4 (C-6), 144.0 (C-7), 123.6 (C-8), 169.1 (C-9), 51.8 (C-10), 34.7 (C-11), 132.4 (C-12), 159.8 (C-15), 130.8 (C-13, 17), 115.0 (C-14, 16), 36.8 ($N\text{-CH}_3$), 55.6 (15- OCH_3), 56.6 (3, 4- OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 **3** 为 beecheyamide。

化合物 **4**: 无色透明方晶 (甲醇); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -359.0^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.98 (2H, s, OCH_2O), 6.59 (1H, s, H-3), 2.70 (2H, m, H-4), 3.29 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 4.94 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 5.19 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-6a), 3.13 (1H, m, H-7), 2.81 (1H, m, H-7), 6.87 (3H, m, H-8~10), 8.04 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-11), 2.22 (3H, s, CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 143.3 (C-1), 147.3 (C-2), 107.4 (C-3), 129.0 (C-3a), 30.9 (C-4), 42.3 (C-5), 50.6 (C-6a), 33.7 (C-7), 135.9 (C-7a), 128.5 (C-8), 128.0 (C-9), 127.5 (C-10), 127.2 (C-11), 130.7 (C-11a), 117.7 (C-11b), 127.1 (C-11c), 101.0 (OCH_2O), 167.0 (C=O), 22.5 (CH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **4** 为 (-)- N -acetylanonaine。

化合物 **5**: 无色透明针晶 (甲醇); $[\alpha]_{\text{D}}^{26.3} -222.0^\circ$

(c 1.0, CHCl_3); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.97 (2H, s, OCH_2O), 6.58 (1H, s, H-3), 2.64~2.76 (2H, m, H-4), 3.99 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 3.30 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 5.21 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-6a), 2.77~2.82 (1H, m, H-7), 3.16 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-7), 6.87 (1H, dd, $J = 14.0, 3.0$ Hz, H-8), 6.82 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-10), 8.04 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-11), 3.84 (3H, s, 9- OCH_3), 2.21 (3H, s, CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 137.5 (C-1), 146.6 (C-2), 106.3 (C-3), 128.3 (C-3a), 30.7 (C-4), 42.1 (C-5), 50.3 (C-6a), 33.8 (C-7), 134.2 (C-7a), 113.8 (C-8), 159.0 (C-9), 112.6 (C-10), 128.3 (C-11), 125.2 (C-11a), 126.8 (C-11b), 125.2 (C-11c), 100.7 (OCH_2O), 55.2 (9- OCH_3), 169.3 (C=O), 22.6 (CH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **5** 为 (-)- N -acetylxylopine。

化合物 **6**: 淡黄色针晶 (甲醇); ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.37 (1H, ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.4$ Hz, H-5), 7.62 (1H, ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.1$ Hz, H-6), 7.77 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7), 8.14 (1H, dd, $J = 9.0, 1.0$ Hz, H-8), 7.71 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-2'), 7.23 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3'), 4.38 (3H, s, 4- OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 165.1 (C-2), 119.7 (C-3), 158.8 (C-4), 123.6 (C-5), 124.9 (C-6), 131.0 (C-7), 127.4 (C-8), 146.1 (C-9), 104.6 (C-10), 145.0 (C-2'), 106.3 (C-3'), 60.0 (4- OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为白鲜碱。

化合物 **7**: 淡黄色粉末; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.23 (1H, m, H-6), 7.55 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-7), 8.03 (1H, dd, $J = 9.0, 1.0$ Hz, H-5), 7.71 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-2'), 7.23 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-3'), 4.28 (3H, s, 4- OCH_3), 4.62 (3H, s, 8- OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.3 (C-2), 107.8 (C-3), 157.0 (C-4), 119.8 (C-5), 114.2 (C-6), 123.5 (C-7), 154.7 (C-8), 144.0 (C-9), 104.0 (C-10), 137.6 (C-2'), 104.7 (C-3'), 56.1 (4- OCH_3), 59.1 (8- OCH_3)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为 γ -崖椒碱。

3.2 抗炎实验结果评价

抗炎活性实验结果见表 2。结果表明, 化合物 **1**~**5** 均对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放的炎症因子 NO、促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 具有不同程度的抑制作用, 显示出较好的体外抗炎活性。其中, 化合物

表 2 化合物 1~5 对 NO、TNF- α 以及 IL-1 β 释放的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Inhibitory activity of compounds 1-5 on NO, TNF- α and IL-1 β production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	NO	TNF- α	IL-1 β
1	30.08 $\pm$ 4.12	23.91 $\pm$ 0.22	63.44 $\pm$ 5.07
2	28.08 $\pm$ 3.11	28.84 $\pm$ 1.98	69.70 $\pm$ 4.89
3	45.04 $\pm$ 0.80	38.46 $\pm$ 0.17	62.60 $\pm$ 2.41
4	13.64 $\pm$ 0.32	27.27 $\pm$ 2.87	29.54 $\pm$ 0.20
5	19.60 $\pm$ 0.70	29.84 $\pm$ 1.66	48.29 $\pm$ 0.65
地塞米松	18.65 $\pm$ 0.47	14.42 $\pm$ 0.76	35.75 $\pm$ 0.94

4 的抗炎活性较为显著, 其对 NO、TNF- α 和 IL-1 β 的 IC₅₀ 分别为 (13.64 $\pm$ 0.32)、(27.27 $\pm$ 2.87)、(29.54 $\pm$ 0.20) $\mu\text{mol/L}$ 。而化合物 1 则具有中等强度的抗炎活性, 对 NO、TNF- α 和 IL-1 β 的 IC₅₀ 分别为 (30.08 $\pm$ 4.12)、(23.91 $\pm$ 0.22)、(63.44 $\pm$ 5.07) $\mu\text{mol/L}$ 。

4 讨论

本实验对巴山花椒根的醋酸乙酯部位进行了化学成分的研究, 共分离和鉴定了 7 个生物碱类化合物, 包括 1 个新的苯环酰胺生物碱 (1) 以及 2 个已知苯环酰胺生物碱 (2、3)、2 个阿朴菲类生物碱 (4、5) 和 2 个喹啉类生物碱 (6、7)。对化合物的体外抗炎活性测试发现, 化合物 1~5 均对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放的炎症因子 NO、促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 具有不同程度的抑制作用, 显示出较好的体外抗炎活性。其中, 阿朴菲类生物碱的抗炎活性总体上优于其他类型生物碱。本研究丰富了巴山花椒的化学成分基础, 为进一步开发利用巴山花椒提供了相关的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Su G Y, Wang K W, Wang X Y, *et al.* Bioactive lignans from *Zanthoxylum planispinum* with cytotoxic potential [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 11: 120-126.
- [2] 刘媛媛, 曹蔚, 张雅, 等. 花椒属植物化学成分及其活性研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21(3): 28-30.

- [3] 钟莉沙, 钟雨禅, 赵军宁, 等. 基于川产道地药材及经典名方的美国膳食补充剂开发思路与路径 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(2): 191-199.
- [4] 方志先, 廖朝林. 湖北恩施药用植物志 (下册) [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006: 577.
- [5] Chen J J, Chung C Y, Hwang T L, *et al.* Amides and benzenoids from *Zanthoxylum ailanthoides* with inhibitory activity on superoxide generation and elastase release by neutrophils [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(1): 107-111.
- [6] 任丽娟, 谢凤指, 谢晶曦. 柄果花椒酰胺的化学结构 [J]. *药学学报*, 1989, 24(1): 67-70.
- [7] Cheng M J, Wu C C, Tsai I L, *et al.* Chemical and antiplatelet constituents from the stem of *Zanthoxylum beecheyanum* [J]. *Jnl Chin Chemical Soc*, 2004, 51(5A): 1065-1072.
- [8] Nonato M G, Garson M J, Truscott R J W, *et al.* 1H-nmr assignments of anonaine and xylopin derivatives from *Talauma gitingensis* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(6): 1623-1627.
- [9] Lo W L, Chang F R, Wu Y C. Alkaloids from the leaves of *Fissistigma glaucescens* [J]. *Jnl Chin Chemical Soc*, 2000, 47(6): 1251-1256.
- [10] 肖灿, 袁园, 丁扬洲, 等. 单面针茎中生物碱类成分研究 [J]. *中药材*, 2011, 34(4): 551-553.
- [11] 李翔, 汤华钊, 苟小军, 等. 白鲜皮的化学成分研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(12): 1816-1819.

[责任编辑 王文倩]