

牛耳枫的化学成分及抗胆碱酯酶活性分析

王永丽^{1,2}, 刘伟^{1,3}, 尉小慧¹, 俞桂新^{1,2*}

(1. 上海中医药大学 中药研究所, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 上海中医药大学 附属曙光医院 肝病研究所, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究牛耳枫水提物的化学成分及其抗胆碱酯酶活性。**方法:**采用硅胶柱色谱, Sephadex LH-20 柱色谱, MCI 柱色谱和制备液相色谱等方法对牛耳枫的化学成分进行分离纯化, 并根据理化性质、核磁共振谱法、质谱法以及参考相关文献鉴定化合物结构; 采用 UPLC-MS/MS 方法测定化合物的抗乙酰胆碱酯酶 (AChE) 及丁酰胆碱酯酶 (BChE) 活性。**结果:**从牛耳枫乙酸乙酯部位和正丁醇部位分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为 5-oxymaltol (**1**), secodaphniphylline (**2**), 2,6-dimethyl-3-hydroxychromone (**3**), deoxycalcyciphylline B (**4**), calcyciphylline A (**5**), daphnezzomine M (**6**), deoxyisocalcyciphylline B (**7**)。其中化合物 **4** 和 **7** 具有抗 AChE 活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 (128.83 ± 21.41) μmol·L⁻¹ 和 (56.15 ± 11.02) μmol·L⁻¹; 化合物 **2, 4, 5** 和 **7** 具有抗 BChE 酶活性, IC₅₀ 分别为 (0.31 ± 0.15), (54.53 ± 3.33), (811.17 ± 22.49) μmol·L⁻¹ 和 (8.13 ± 0.78) μmol·L⁻¹。**结论:**化合物 **1** 和 **3** 为首次从该植物中分离获得, 化合物 **2** 和化合物 **7** 具有较强的抗 BChE 活性, 具有开发为胆碱酯酶抑制剂的潜力。

[关键词] 牛耳枫; 化学成分; 乙酰胆碱酯酶; 丁酰胆碱酯酶; 胆碱酯酶抑制剂

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0053-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200053

Chemical Constituents from *Daphniphyllum calycinum* and Their Anti-Cholinesterase Activity

WANG Yong-li^{1,2}, LIU Wei^{1,3}, WEI Xiao-hui¹, CHOU Gui-xin^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China; 3. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical components of *Daphniphyllum calycinum* and their anti-cholinesterase activity. **Method:** The chemical constituents of *D. calycinum* were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, MCI column chromatography and preparative HPLC. Their structures were identified according to their physicochemical properties, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), mass-spectrography (MS) and literature analysis. Furthermore, the anti-acetylcholinesterase and anti-butyrylcholinesterase activities of compounds were measured by UPLC-MS/MS method. **Result:** Eight compounds were isolated from *D. calycinum* and their structures were identified as 5-oxymaltol (**1**), secodaphniphylline (**2**), 2,6-dimethyl-3-hydroxychromone (**3**), deoxycalcyciphylline B (**4**), calcyciphylline A (**5**), daphnezzomine M (**6**), and deoxyisocalcyciphylline B (**7**). Compound **4** and **7** were showed anti-acetylcholinesterase activity, the IC₅₀ values of compound **4** and **7** were (128.83 ± 21.41) μmol·L⁻¹ and (56.15 ± 11.02) μmol·L⁻¹, respectively. And compound **2, 4, 5** and **7** were showed anti-butyrylcholinesterase

[收稿日期] 20160619(007)

[基金项目] 中医药行业科研专项(201307002)

[第一作者] 王永丽, 硕士, 助理实验师, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel:021-50271706, E-mail: ylwang521@126.com

[通讯作者] * 俞桂新, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel:021-50271706, E-mail: chouguxinzyb@126.com

activity, the IC_{50} values of compound **2**, **4**, **5** and **7** were $(0.31 \pm 0.15) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(54.53 \pm 3.33) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(811.17 \pm 22.49) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(8.13 \pm 0.78) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Compound **1** and **3** were isolated from this plant for the first time. Compound **2** and **7** were showed strong anti-butyrylcholinesterase activity, and were the potential of cholinesterase inhibitors.

[**Key words**] *Daphniphyllum calycinum*; chemical constituents; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; cholinesterase inhibitors

阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的老年性神经退行性疾病, 表现为认知和神经精神方面的症状。最近研究表明, AD 患者认知功能衰退的主要原因是大脑皮质等区域胆碱能神经递质 (乙酰胆碱 ACh) 持续下降^[1-2]。乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) 是水解突触间隙中胆碱能神经递质乙酰胆碱 (ACh) 的水解酶。尽管病因尚不明确, 但在 AD 发展的不同阶段控制胆碱酯酶 (ChE) 的活性是非常有必要的。其中有效的治疗策略是通过抑制 AChE 和 BChE 的活性从而提高脑内 ACh 的水平。目前, AChE 和 BChE 的抑制剂已被批准用于治疗 AD, 如他克林、多奈哌齐、新斯的明、加兰他敏^[3]。从天然植物中分离或对活性化合物进行结构修饰是发现和获得新的胆碱酯酶抑制剂最主要的方式, 发现具有防止和延迟神经退化病理过程及副作用更小的候选药物一直是医药化学家的目标。

牛耳枫 (*Daphniphyllum calycinum*) 又称南岭虎皮楠、老虎耳、牛耳铃, 为虎皮楠科植物^[4]。常绿灌木, 主要分布于云贵、海南、两广等地, 是我国传统的民间药用植物。其功效为祛风止痛、解毒消肿, 主治风湿骨痛、跌打骨折、无名肿痛、毒蛇咬伤、久痢^[5-6]。临床多用于急性肠胃炎、急性湿疹等的治疗^[7]。文献报道牛耳枫的化学成分主要为生物碱和黄酮类成分, 其中生物碱为其主要的化学成分, 具有复杂的多环结构和新颖的骨架, 并且这种结构的化合物仅在虎皮楠属植物中发现, 具有较强的专属性。对牛耳枫药理活性的研究主要集中在生物碱的抗肿瘤活性和黄酮类化合物的抗氧化性研究方面, 但并未发现活性很好的化合物^[8-9]。课题组前期预实验发现牛耳枫水提取物具有显著的抗 AChE 及抗 BChE 活性, 具有开发成为胆碱酯酶抑制剂用于 AD 防治的潜力。因此本研究将对牛耳枫水提取物化学成分进行分离制备, 并评价其抗 AChE 及抗 BChE 活性, 以期发现活性较好的候选或先导化合物。最终本实验从牛耳枫水提取物中分离鉴定了 5 个生物碱类成分和 2 个其他类成分, 分别为 5-

oxymaltol (**1**), secodaphniphylline (**2**), 2,6-dimethyl-3-hydroxyc hromone (**3**), deoxycalyciphylline B (**4**), calyciphylline A (**5**), daphnezzomine M (**6**), deoxyisocalyciphylline B (**7**)。通过 UPLC-MS/MS 法对分离获得的化合物抗 AChE 及抗 BChE 活性进行测定, 发现化合物 **4** 和 **7** 具有一定的抗 AChE 活性, 化合物 **2, 4, 7** 表现出较强的抗 BChE 活性。

1 材料

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 来自于电鳗 *Electrophorus electricus*, 丁酰胆碱酯酶 (BChE, 批号 078K7015) 来自于马血清、氯化乙酰胆碱 (ACh, 批号 100909957), 氯化丁酰胆碱 (BCh, 批号 SLBB084), 氯化胆碱 (Ch, 批号 101244069), 矮壮素 (内标, IS 批号 007-003-00-6) 和加兰他敏 (galanthamine, 批号 PHR1623) 均购买于 Sigma 公司。

ACQUITY™ UPLC 系统 (美国 Waters), Micromass Quattro Premier XE 型串联三重四级杆质谱 (美国 Waters), ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)。Finnigan LCQ™ 离子阱质谱仪 (ESI 离子源, 美国 Thermo Finnigan), AV-400, 500 型核磁共振光谱仪 (Germany, Bruker), EYELA N-1000 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司), CA-1111 型冷阱 (上海爱朗仪器有限公司), BT25S 型电子分析天平 (北京赛多利斯公司)。

HG/T2354-92 型薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司), 柱薄层硅胶 (青岛海洋化工厂, 100 ~ 200, 200 ~ 300 目, 批号 0120171), HSGF₂₅₄ 硅胶预制板 (烟台江友硅胶开发有限公司), HSGF₂₅₄ 高效制备硅胶板 (烟台江友硅胶开发有限公司), Sephadex LH-20 型羟甲基葡聚糖凝胶 (瑞典通用电气医疗集团), ODS (美国赛分科技, 40 ~ 60 μm); MCI 小孔树脂凝胶 (日本三菱, 75 ~ 150 μm)。

牛耳枫药材由上海中医药大学俞桂新教授鉴定为虎皮楠科虎牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* 的干燥地上部分, 牛耳枫水提取物干浸膏由广西柳州中药厂提供 (批号 GXLZ20140813-02)。

2 提取与分离

取牛耳枫水提取物干浸膏 5 kg,加水约 55 L 制成混悬溶液,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取。合并各部分萃取液,浓缩得各部位浸膏。将乙酸乙酯部位用乙醇溶解,硅胶拌样,通过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯系统洗脱)得到 13 个洗脱部位,每个部位通过反复硅胶柱色谱,Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,ODS 柱色谱等,得到化合物 1,3。将正丁醇部位加氨水调 pH 9~10,依次用二氯甲烷、正丁醇萃取,合并各部分萃取液,浓缩得各部位浸膏。将二氯甲烷部位首先经 MCI 柱色谱粗分为 12 个部位,然后经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,制备薄层,ODS 柱色谱,得到化合物 4~7。

3 结构鉴定

化合物 1 近无色棱晶(甲醇),¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.93 (1H, s, H-3), 8.76 (1H, s, H-5), 7.93 (1H, s, H-6), 2.21 (3H, s, H-7); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 141.3 (C-2), 149.2 (C-3), 168.5 (C-4), 144.2 (C-5), 139.0 (C-6), 14.5 (C-7)。以上数据与文献报道[10-11]基本一致,故鉴定化合物 1 为 5-oxy maltol。

化合物 2 无色晶体,ESI-MS *m/z* 470.363 2 [M + H]⁺,¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 3.43 (1H, br s, H-1), 1.64 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-3), 2.05 (3H, m, H-3,4,15), 1.68 (3H, m, H-4,6,9), 2.66 (1H, m, H-7), 3.15 (1H, m, H-11), 3.64 (1H, m, H-11), 1.51 (1H, m, H-12), 1.54 (2H, m, H-12,14), 2.08 (2H, m, H-13), 1.98 (1H, m, H-14), 1.81 (1H, m, H-15), 1.71 (1H, m, H-16), 2.02 (1H, m, H-16), 2.97 (1H, m, H-17), 3.06 (1H, m, H-17), 1.09 (1H, m, H-18), 1.04 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-19), 1.10 (3H, d, *J* = 4.4 Hz, H-20), 1.37 (3H, s, H-21), 0.82 (3H, s, H-24), 3.61 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-25), 4.30 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-25), 4.63 (1H, d, *J* = 5.6 Hz, H-26), 1.88 (1H, m, H-27), 2.08 (1H, m, H-27), 1.92 (1H, m, H-28), 2.12 (1H, m, H-28), 1.92 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 65.4 (C-1), 31.5 (C-2), 22.0 (C-3), 40.9 (C-4), 38.2 (C-5), 38.7 (C-6), 51.8 (C-7), 48.5 (C-8), 40.2 (C-9), 78.6 (C-10), 47.1 (C-11), 24.0 (C-12), 25.4 (C-13), 30.0 (C-14), 28.8 (C-15), 26.7 (C-16), 36.8 (C-17), 25.2 (C-18), 21.1 (C-19), 21.6

(C-20), 23.9 (C-21), 213.3 (C-22), 51.0 (C-23), 17.7 (C-24), 66.2 (C-25), 82.2 (C-26), 26.2 (C-27), 34.7 (C-8), 106.6 (C-29), 24.2 (C-30)。以上数据与文献[12-13]报道一致,故鉴定化合物 2 为 secodaphniphylline。

化合物 3 无色块晶,¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.90 (1H, br s, H-5), 7.52 (1H, dd, *J* = 8.6, 6.6 Hz, H-7), 7.42 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-8), 2.44 (6H, s, H-11, 12); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 139.8 (C-2), 152.2 (C-3), 174.0 (C-4), 125.1 (C-5), 135.7 (C-6), 135.6 (C-7), 119.0 (C-8), 155.1 (C-9), 123.1 (C-10), 20.9 (C-11), 15.0 (C-12)。以上数据与文献[14]报道一致,故鉴定化合物 3 为 2,6-dimethyl-3-hydroxychromone。

化合物 4 无色方晶,ESI-MS *m/z* 342.243 3 [M + H]⁺,¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 3.18 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H-1), 2.70 (1H, m, H-2), 1.62 (1H, m, H-3), 1.88 (1H, m, H-3), 1.47 (1H, m, H-4), 1.73 (1H, m, H-4), 2.04 (1H, m, H-6), 3.55 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-7), 2.60 (1H, m, H-10), 1.39 (1H, m, H-11), 1.80 (1H, m, H-11), 1.11 (1H, m, H-12), 1.78 (1H, m, H-12), 1.67 (1H, m, H-13), 1.96 (1H, m, H-13), 1.50 (1H, m, H-14), 2.40 (1H, m, H-14), 5.64 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-15), 2.36 (2H, m, H-16), 1.39 (1H, m, H-17), 2.26 (1H, m, H-17), 2.41 (1H, m, H-18), 3.11 (1H, dd, *J* = 8.6, 13.1 Hz, H-19), 2.14 (1H, dd, *J* = 13.2, 17.7 Hz, H-19), 1.07 (3H, d, *J* = 10.2 Hz, H-20), 1.33 (3H, s, H-21); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 70.5 (C-1), 48.2 (C-2), 21.5 (C-3), 37.5 (C-4), 88.5 (C-5), 49.4 (C-6), 57.8 (C-7), 53.2 (C-8), 145.2 (C-9), 39.2 (C-10), 31.5 (C-11), 21.1 (C-12), 30.5 (C-13), 28.3 (C-14), 129.4 (C-15), 32.7 (C-16), 33.7 (C-17), 36.5 (C-18), 60.4 (C-19), 13.0 (C-20), 19.9 (C-21), 175.7 (C-22)。以上数据与文献[15]报道一致,故鉴定化合物 4 为 deoxycalyciphylline B。

化合物 5 淡黄色油状物,ESI-MS *m/z* 386.233 1 [M + H]⁺,¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 2.34 (1H, m, H-2), 0.88 (1H, m, H-3), 2.32 (1H, m, H-3), 3.69 (1H, br s, H-4), 2.76 (1H, m, H-6), 3.10 (1H, t, *J* = 10.9 Hz, H-7), 3.24

(1H, m, H-7), 1.95 (1H, m, H-11), 2.06 (1H, m, H-11), 1.49 (1H, m, H-12), 1.83 (2H, m, H-12,16), 2.55 (1H, m, H-13), 2.69 (1H, m, H-13), 2.70 (1H, m, H-14), 3.30 (1H, m, H-15), 1.24 (1H, m, H-16), 2.29 (1H, dd, $J = 10.8, 16.6$ Hz, H-17), 2.52 (1H, m, H-17), 2.40 (1H, m, H-18), 2.92 (1H, dd, $J = 8.8, 13.5$ Hz, H-19), 3.45 (1H, dd, $J = 6.7, 13.4$ Hz, H-19), 1.11 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-20), 1.48 (3H, s, H-21), 3.53 (3H, s, H-23); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 215.9 (C-1), 43.6 (C-2), 19.5 (C-3), 89.5 (C-4), 62.7 (C-5), 49.5 (C-6), 74.4 (C-7), 52.8 (C-8), 141.0 (C-9), 140.9 (C-10), 27.1 (C-11), 29.9 (C-12), 41.6 (C-13), 42.7 (C-14), 54.2 (C-15), 28.2 (C-16), 41.5 (C-17), 32.7 (C-18), 67.4 (C-19), 19.3 (C-20), 27.7 (C-21), 176.0 (C-22), 51.8 (C-23)。以上数据与文献[16]报道一致,故鉴定化合物 5 为 calyciphylline A。

化合物 6 白色粉末,ESI-MS m/z 346.274 6 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ : 3.43 (1H, s, H-1), 1.46 (1H, m, H-2), 1.38 (1H, m, H-3), 1.82 (4H, m, H-3, 4, 11, 12), 1.31 (1H, m, H-4), 2.13 (1H, t, $J = 5.3$ Hz, H-6), 3.07 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-7), 2.00 (1H, m, H-9), 1.74 (2H, m, H-11, H-17), 1.61 (1H, m, H-12), 1.72 (2H, m, H-13), 2.05 (2H, m, H-14, 15), 2.25 (1H, m, H-14), 1.52 (1H, m, H-15), 1.55 (1H, m, H-16), 1.78 (2H, m, H-16, 17), 1.44 (1H, m, H-18), 1.05 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-19), 1.00 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-20), 0.92 (3H, s, H-21); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 51.7 (C-1), 42.0 (C-2), 20.9 (C-3), 37.2 (C-4), 45.8 (C-5), 59.1 (C-6), 37.7 (C-7), 54.1 (C-8), 49.7 (C-9), 40.7 (C-10), 23.7 (C-11), 30.1 (C-12), 33.9 (C-13), 30.6 (C-14), 26.8 (C-15), 36.2 (C-16), 29.4 (C-17), 20.8 (C-18), 20.7 (C-19), 20.9 (C-20), 181.6 (C-21)。以上数据与文献[17-18]报道一致,故鉴定化合物 6 为 daphnezzomine M。

化合物 7 粉末,ESI-MS m/z 342.243 3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ : 3.15 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-1), 2.70 (1H, m, H-2), 1.68 (1H, m, H-3), 1.95 (1H, m, H-3), 1.71 (1H,

m, H-4), 2.03 (1H, m, H-4), 2.33 (1H, m, H-6), 3.87 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-7), 2.60 (1H, m, H-10), 1.06 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-11), 1.97 (1H, m, H-11), 1.74 (2H, m, H-12,13), 1.91 (1H, m, H-12), 2.02 (1H, m, H-13), 2.78 (2H, dd, $J = 6.3, 8.4$ Hz, H-14), 5.70 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-15), 1.51 (1H, m, H-16), 2.30 (2H, m, H-16,17), 2.17 (1H, m, H-17), 2.41 (1H, m, H-18), 2.99 (1H, dd, $J = 7.8, 10.6$ Hz, H-19), 2.58 (1H, m, H-19), 1.06 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-20), 1.51 (3H, s, H-21); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 75.6 (C-1), 49.7 (C-2), 23.4 (C-3), 33.9 (C-4), 87.2 (C-5), 44.2 (C-6), 60.8 (C-7), 50.1 (C-8), 147.5 (C-9), 42.8 (C-10), 33.2 (C-11), 25.3 (C-12), 30.2 (C-13), 26.9 (C-14), 130.1 (C-15), 31.6 (C-16), 31.4 (C-17), 36.8 (C-18), 61.4 (C-19), 14.5 (C-20), 22.5 (C-21), 174.8 (C-22)。以上数据与文献[15]报道一致,故鉴定化合物 7 为 deoxysocalyciphylline B。

4 抗胆碱酯酶活性

采用刘伟等^[19]建立的 UPLC-MS/MS 法对化合物 1~7 抗 AChE 和 BChE 活性进行测定。操作如下:样品组首先加入新配好的受试样品 10 μL ,然后加入酶溶液(AChE 为 0.003 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,BChE 为 0.008 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 40 μL 混合,放置 15 min,加入底物(ACh 为 5.505 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,BCh 为 7.152 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 50 μL ,25 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min,立即用含有 1.899 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IS 的冰乙腈(0 $^\circ\text{C}$) 300 μL 终止反应,15 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液采用 UPLC-MS/MS 法对生成的 Ch 含量进行检测。空白组仅在样品组基础上将最先加入的受试样品 10 μL 换成缓冲溶液 10 μL ,其余步骤均同样品组。抑制率计算公式为:抑制率 = $(C_{\text{空白组}} - C_{\text{样品组}}) / C_{\text{空白组}}$ (100%, $C_{\text{空白组}}$ 表示空白组生成 Ch 的含量, $C_{\text{样品组}}$ 表示待测样品组生成 Ch 的含量。半数抑制浓度(IC_{50})通过 Prism 5 软件进行计算。

最终完成各化合物抗 AChE 和 BChE 活性(IC_{50})测定,结果见表 1,化合物 4 和 7 具有抗 AChE 活性, IC_{50} 分别为 (128.83 ± 21.41) , $(56.15 \pm 11.02) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;化合物 2,4,5 和 7 具有抗 BChE 酶活性, IC_{50} 分别为 (0.31 ± 0.15) , (54.53 ± 3.33) , (811.17 ± 22.49) , $(8.13 \pm 0.78) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

5 结论与讨论

本文通过对牛耳枫乙酸乙酯及正丁醇部位的主

表 1 不同化合物对 AChE 和 BChE 的 IC₅₀ 抑制活性 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 AChE and BChE inhibitory activities of various compounds ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

化合物	AChE	BChE
加兰他敏	0.05 ± 0.00	0.25 ± 0.00
1	> 1 000	> 1 000
2	> 1 000	0.31 ± 0.15
3	> 1 000	> 1 000
4	128.83 ± 21.41	54.53 ± 3.33
5	> 1 000	811.17 ± 22.49
6	> 1 000	> 1 000
7	56.15 ± 11.02	8.13 ± 0.78

要化学成分的分析,分离、鉴定了 7 个化合物,发现化合物 1 和 3 为首次从该植物中分离获得。采用 UPLC-MS/MS 法对分离获得的化合物进行体外抗 AChE 和 BChE 活性研究,发现化合物 4 与化合物 7 均同时具有抗 AChE 和抗 BChE 活性,其中化合物 4 在两方面的活性均为中等强度,而化合物 7 具有中等强度的抗 AChE 活性及较强的抗 BChE 活性;而化合物 2 与 5 均仅具有抗 BChE 活性,并且化合物 2 活性非常强,与阳性药加兰他敏 [$\text{IC}_{50} (0.25 \pm 0.00) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 的活性相当,具有开发成为选择性 BChE 抑制剂的潜力。本研究结果同时可以为牛耳枫用于 AD 等重大疾病的防治提供科学依据。

[参考文献]

[1] 应侠,吴振,雷严,等.阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展[J].中国药房,2014,25(33):3152-3155.

[2] Daniela S, Mariana S, Melisa M, et al. Morphinans and isoquinolines: acetylcholinesterase inhibition, pharmacophore modeling, and interaction with opioid receptors [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18 (14): 5071-5080.

[3] Mohamed T, Zhao X, Habib L K, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship (SAR) studies of 2,4-disubstituted pyrimidine derivatives: dual activity as cholinesterase and Aβ-aggregation inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19 (7): 2269-2281.

[4] 饶桂维.中药牛耳枫生物碱类化学成分及活性研究[D].杭州:浙江工业大学,2009.

[5] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编.下册[M].北京:人民卫生出版社,1978:154.

[6] 符乃光,刘侠,刘明生,等.黎药材海南牛耳枫大鼠体内药动学研究[J].海南医学,2010,21(9):24-26.

[7] 郑勉,阚天禄.中国植物志[M].北京:科学出版社,1980,45(1):1-11.

[8] Wu H F, Zhang X P, Ding L S, et al. Daphniphyllum alkaloids: recent findings on chemistry and pharmacology [J]. Planta Med, 2013, 79 (17): 1589-1598.

[9] Gamez E J C, Luyengi L, Lee S K, et al. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum* [J]. J Nat Prod, 1998, 61 (5): 706-708.

[10] 张君增,方起程,梁晓天.中国特有植物白豆杉的化学成分研究[J].植物学报,1996,38(5):399-405.

[11] Terada O, Suzuki S, Kinoshita S. 5-Oxymaltol, another new γ-pyrone by formed gluconobacter [J]. Agr Biol Chem, 1961, 25 (12): 939-940.

[12] Toda M, Hirata Y, Yamamura S. Daphniphyllum alkaloids- II: secodaphniphylline and methyl homosecodaphniphyllate [J]. Tetrahedron, 1972, 28 (6): 1477-1484.

[13] Saito S, Kubota T, Fukushi E, et al. Calyciphylline D, a novel alkaloid with an unprecedented fused-pentacyclic skeleton from *Daphniphyllum calycinum* [J]. Org Lett, 2007, 38(32): 1207-1209.

[14] Gadre S Y, Marathe K, Pujari M J. An unusual acid-catalyzed carbon-carbon bond fragmentation of E-3-arylidene flavanone and chromanone epoxides [J]. Chem Ind-London, 1988,19 (20): 27-28.

[15] Yang S P, Yue J M. Two novel alkaloids with a unique fused hexacyclic skeleton from *Daphniphyllum subverticillatum* [J]. J Org Chem, 2003, 68 (9): 7961-7966.

[16] Morita H, Kobayashi J. Calyciphyllines A and B, two novel hexacyclic alkaloids from *Daphniphyllum calycinum* [J]. Org Lett, 2003, 5 (16): 2895-2898.

[17] Zhan Z J, Zhang C R, Yue J M, et al. Caldaphnidines A-F, six new *Daphniphyllum* alkaloids from *Daphniphyllum calycinum* [J]. Tetrahedron, 2005, 61 (4): 11038-11045.

[18] Morita H, Kobayashi J. Daphnezomines L, M, N, and O, new alkaloids from *Daphniphyllum humile* [J]. Tetrahedron, 2002, 58 (33): 6637-6641.

[19] Liu W, Yang Y D, Cheng X M, et al. Rapid and sensitive detection of the inhibitive activities of acetyl- and butyryl-cholinesterases inhibitors by UPLC-ESI-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 94 (2014): 215-220.

[责任编辑 顾雪竹]