

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0097-07

芳香植物假荜拔茎叶的化学成分及其胆碱酯酶抑制活性研究

陈琳^{1#},向彩朋^{1#},韩佳欣¹,杨少杰²,孙治涛³,李海舟¹,杨崇仁^{1,4},许敏^{1*}¹昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 650500; ²云南省科学技术院,昆明 650101;³青岛市疾病预防控制中心青岛市预防医学研究院理化检验科,青岛 266033;⁴中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室,昆明 650201

摘要:采用凝胶树脂(Toyopearl HW-40c)、正相硅胶、反相硅胶(ODS)、大孔树脂(MCI-gel CHP20P)等柱层析和半制备HPLC分离方法从胡椒科胡椒属植物假荜拔(*Piper retrofractum*)茎叶的70%丙酮提取物中分离得到10个化合物,包括1个生物碱衍生物(1)、6个酰胺类衍生物(2~7)、2个酚性成分(8和9)以及1个紫罗兰酮类衍生物(10)。运用波谱光谱学方法分别鉴定为:4-[2-甲酸基-5-(甲氧基甲基)-1H-吡咯-1-基]丁酸(1)、3-氯-4-羟基-2-哌啶酮(2)、反式-锯齿菊除虫素(3)、1-肉桂酰基哌啶(4)、(2E,4E)-胡椒碱(5)、胡椒新碱(6)、3-苯丙酰胺(7)、(2R/2S)-异奥卡宁7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(8a和8b)、香草酸(9)和布卢姆醇A(10),其中化合物1,7,8和10均首次从胡椒属中分离得到。采用Ellman比色法对部分化合物的胆碱酯酶抑制活性进行测试,活性测试结果表明化合物4对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶均显示抑制活性,半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $37.44 \pm 0.62 \mu\text{M}$ 和 $3.03 \pm 0.11 \mu\text{M}$;化合物5和6选择性抑制丁酰胆碱酯酶,半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $49.43 \pm 2.13 \mu\text{M}$ 和 $24.70 \pm 0.90 \mu\text{M}$ 。但是,其余化合物在 $100 \mu\text{M}$ 浓度下均没有显示胆碱酯酶抑制活性。

关键词:假荜拔;化合物;抑制胆碱酯酶活性。

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.013

Chemical Constituents from the Stem and Leaf of *Piper retrofractum* and Their Anti-cholinesterase Activity

CHEN Lin^{1#}, XIANG Cai-peng^{1#}, HAN Jia-xin¹, YANG Shao-jie², SUN Zhi-tao³,
LI Hai-zhou¹, YANG Chong-ren^{1,4}, XU Min^{1*}¹Centre for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University
of Science and Technology, Chenggong Campus, Kunming 650500, China;²Yunnan Provincial Academy of Science and Technology, Kunming 650101, China;³Physical and Chemical Test Department, Qingdao Municipal Centers for Disease
Control and Prevention, Qingdao Preventive Medicine Research Institute, Qingdao 266033, China;⁴China State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources of West China,
Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Ten compounds were isolated from the stem and leaf of *Piper retrofractum* by using the method of Toyopearl HW-40c, silica gel, ODS, MCI-gel CHP20P and pre-HPLC, including one alkaloid (1), six amides (2-7), two phenols (8 and 9), and one ionone derivative (10). The structure elucidation was based on spectroscopic analysis as 4-[2-formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]butanoic acid (1), 3-chloro-4-hydroxy-2-piperidone (2), trans-pellitorin (3), 1-cinnamoylpiperidine (4), (2E,4E)-piperine (5), piperamine (6), 3-phenylpropanamide (7), (2R/2S)-isookanin-7-O-β-D-glucopyranoside (8a and 8b), vanillic acid (9), and blumenol A (10). Among them, compound 1, 7, 8 and 10 are reported from *Piper* plants for the first time. Some isolates were tested for their effect on anti-cholinesterase activity by Ellman's method. Compound 4 showed anti-acetylcholinesterase and anti-butyrocholinesterase activities with IC_{50} values of $37.44 \pm 0.62 \mu\text{M}$ and $3.03 \pm 0.11 \mu\text{M}$, respectively. Compounds 5 and 6 showed selectively antibutyrocholinesterase

收稿日期:2018-06-01 接受日期:2018-09-13

基金项目:云南省科技厅重点新产品开发项目(2016BC013);昆明理工大学学术青蓝人才项目(1407840012);昆明理工大学高层次人才引进项目(10978190)

*通信作者 E-mail:xumin8121@hotmail.com

#共同第一作者

activity with IC_{50} values of 49.43 ± 2.13 and $24.70 \pm 0.90 \mu\text{M}$, respectively.

Key words: *Piper retrofractum*; chemical constituent; anti-cholinesterase activity

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)俗称老年痴呆,是一种起病隐匿、进行性发展、致死性,在老年人中发病率最高的神经退行性疾病,临床表现为局部记忆性障碍并逐步发展成为全面性的痴呆。目前发展中国家AD患者约占全世界AD患者的56%。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是一种重要的神经递质,在促进学习和记忆的方面发挥着至关重要的作用。因此,目前治疗AD的药物主要是胆碱酯酶抑制剂,这些药物通过抑制大脑中的胆碱酯酶的活性,减少胆碱酯酶对乙酰胆碱的降解,从而增加大脑中乙酰胆碱的含量,有利于改善痴呆患者的学习和记忆能力。从中药或天然药物中寻找乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂,用于发现有效治疗和改善AD的药物是重要的研究方向之一。

许多芳香植物不仅是重要的香料植物也是重要的药材,被全世界各地用于神经系统疾病的治疗^[1]。大多数胡椒属植物为芳香性植物,可用作香料和药用,具有丰富的化学成分和显著的生理活性^[2-4]。假荜拔(*Piper retrofractum*)为胡椒科胡椒属香料植物,原产于东南亚,广泛种植于印度尼西亚、泰国和中国。作为传统的民间常用香料,其不成熟或成熟的果实作为香料或调味剂用于咖喱,果酱和泡菜的调料^[5]。此外,叶子和果实用于祛寒、消肿止痛、跌打损伤、抗抑郁和促进睡眠。据《中华本草》记载,假荜拔具有温中健胃,祛寒止痛的作用。前期研究结果表明,酰胺类生物碱和二聚酰胺类生物碱为假荜拔果实中的主要化学成分^[6-11]。Wan等从根茎中分离到了木脂素类成分^[7],Luyen等从叶中分离鉴定了具有抑制(-葡萄糖苷酶活性的苯丙素和烷基葡萄糖苷类成分^[5]。假荜拔中分离到的酰胺类生物碱显示抗虫^[7]、神经保护^[8]、细胞毒^[6]和抗真菌^[10]的活性。此外,亦有文献报道假荜拔中哌啶类生物碱具有显著的减肥活性,主要与调节脂代谢和激活AMP活化蛋白激酶有关^[12]。作为我们系统开展芳香植物的化学成分及其抗老年痴呆症研究工作的一部分^[2,3,13-16],本研究主要报道从假荜拔茎叶中分离到的10个化合物及其抑制胆碱酯酶活性。

采用凝胶树脂(Toyopearl HW-40c)、正相硅胶、反相硅胶(ODS)、大孔树脂(MCI-gel CHP20P)等柱层析方法和半制备HPLC从假荜拔茎叶丙酮提取物

中分离得到10个化合物,包括1个生物碱(**1**),6个酰胺类化合物(**2~7**),2个酚性化合物(**8**和**9**)以及一个紫罗兰酮类衍生物(**10**)。运用波谱学和光谱学方法分别鉴定为:4-[2-甲酸基-5-(甲氧基甲基)-1H-吡咯-1-基]丁酸(4-[2-formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]butanoic acid,**1**)^[17]、3-氯-4-羟基-2-哌啶酮(3-chloro-4-hydroxy-2-piperidone,**2**)^[18]、反式-锯齿菊除虫素(*trans*-pellitorin,**3**)^[19]、1-肉桂酰基哌啶(1-cinnamoylpiperidine,**4**)^[20]、(2E,4E)-胡椒碱[(2E,4E)-piperine,**5**]^[21]、胡椒新碱(piperanine,**6**)^[21]、3-苯丙酰胺(3-phenylpropanamide,**7**)^[22]、(2R/2S)-异奥卡宁7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷((2R/2S)-isookanin-7-O-β-D-glucopyranoside,**8a**和**8b**)^[23,24]、香草酸(vanillic acid,**9**)^[25]和布卢姆醇A(blumenol A,**10**)^[26]。化合物**1~6**测试了胆碱酯酶抑制活性。

1 仪器与材料

柱色谱采用的材料包括:80~100、100~200和200~300目正相硅胶(青岛海洋化工厂);反相填充材料ODS(40~63 μm,Merk,Darmstadt,Germany);Toyopearl HW-40c(Amersham Biosciences AB,Uppsala,Sweden);MCI-gel-CHP-20P(75~150 μm,Mitsubishi Chemical Corporation,Tokyo,Japan)和Diaion HP20SS(Mitsubishi Chemical Co.,Ltd)。TLC采用GF₂₅₄型和G型薄层正相硅胶板(青岛海洋化工厂),显色剂为10% H₂SO₄-EtOH溶液,均匀喷洒后加热至显色。

分析级乙醇、石油醚、丙酮、Na₂HPO₄(12H₂O)和NaH₂PO₄(2H₂O)均采购自天津津东天正试剂有限公司,碳酸氢钠购自四川西陇化工股份有限公司;碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)和5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)购自阿达玛斯(Adamas Reagent)编号分别为P1189822和P1159103;丁酰胆碱酯酶(来源于马血清,Sigma C 4290;1000 U)和乙酰胆碱酯酶(来源于电鳗,Sigma C 2888;1000 U)均购自西格玛公司;石杉碱甲购自aladdin(CAS编号:102518-79-6);他克林购自瀚香生物科技有限公司(CAS编号:321-64-2),所用水为去离子水。

1D和2D-NMR在BrukerDRX-600和800 Hz

核磁共振仪上测定, TMS 作内标, δ 为 ppm, J 为 Hz (Bruker BioSpin group, Germany); ESI-MS 在 Agilent 液质联用仪(美国安捷伦公司, 1260HPLC 二元梯度泵、内置真空脱气机、100 位自动进样器、G6530B 高精度四级杆串联飞行时间质谱仪)上测定; EI-MS 在三扇型双聚焦磁质谱仪, 型号为 Waters AutoSpec Premier P776 上测定; 中压液相(NP-7000C 输送泵, 江苏汉邦科技有限公司)和制备型液相在汉邦高效液相上进行(NP-7000C 输送泵和 NU-3000 检测器, 江苏汉邦科技有限公司); 分析液相为 waters 2695/2996(美国 waters 公司); 分析柱为 Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 4.6 × 250 mm) 柱以及 Thermo Hypersil GOLD (5 μm , 4.6 × 250 mm) 和制备柱 Thermo Hypersil GOLD (5 μm , 10 × 250 mm)。

实验药材于 2015 年 8 月采集于海南省, 经中国热带农业科学研究员郝朝运博士鉴定为假荜拔(*P. retrofractum*), 凭证标本现存放于昆明理工大学生命科学与技术学院药物化学生物学实验室, 标号为 KMUST-20140701。

2 实验方法与结果

2.1 提取与分离

取假荜拔干燥茎叶(351 g)经粉碎后用 70% 丙酮(1.7 L)室温下浸渍 3 次, 每次浸渍 7 天, 合并滤液, 回收丙酮。得到丙酮提取物用乙酸乙酯进行等体积萃取三次, 得到水层萃取相 32.2 g, 乙酸乙酯萃取相 20.7 g。乙酸乙酯相再经过大孔树脂 Diaion HP20ss 柱层析, 分别以 90% 甲醇水和 50% 丙酮水为流动相洗脱, 得到甲醇洗脱部分 4.1 g, 丙酮洗脱部分 6.3 g。

50% 丙酮洗脱部分经过反相硅胶中压柱层析, 用甲醇-水(40% ~ 100%)梯度洗脱, 得到 4 个组分(Fr. A1 ~ Fr. A4)。Fr. A1(4.1 g) 经过 ODS 柱色谱(甲醇-水(60% ~ 100%)梯度洗脱)和 500-600 目硅胶柱层析(石油醚-丙酮(2:1)梯度洗脱)纯化, 得到化合物 6(14.7 mg) 和化合物 4(6.9 mg)。Fr. A2(700 mg) 经过 500 ~ 600 目硅胶柱层析, 使用石油醚-丙酮(2:1)为洗脱剂, 得到化合物 3(14.8 mg) 和 5(105 mg)。甲醇洗脱部分经过反相 ODS 柱色谱, 用甲醇-水(30% ~ 100%)梯度洗脱, 得到 Fr. M1-M5。Fr. M1(113.8 mg) 经反复硅胶和 ODS-A 柱层析, 纯化得到化合物 2(10.2 mg)。Fr. M2(1.2 g) 经凝胶树脂 Toyopearl HW-40c, 甲醇-水(0% ~ 100%)梯度

洗脱, 经大孔树脂 MCI-gel CHP-20P, 甲醇-水(0% ~ 100%)梯度洗脱, 正向硅胶(氯仿-甲醇梯度洗脱)反复纯化, 再通过过制备高压液相色谱 Thermo Hypersil GOLD(5 μm , 10 × 250 mm) 分离纯化得到化合物 1(6.6 mg)、8(2.7 mg) 和 9(1.5 mg)。Fr. M3(106 mg) 经正相硅胶柱柱层析以石油醚-丙酮(2:1)梯度洗脱, 再经过反相硅胶 ODS 柱柱层析以甲醇-水(70% ~ 100%)梯度洗脱得到化合物 10(1.2 mg) 和 7(2.8 mg)。

2.2 胆碱酯酶抑制活性研究

应用改良的 Ellman 法^[14] 测试胆碱酯酶抑制活性。37 °C 孵育, 胆碱酯酶与底物结合生成的产物可与显色剂发生显色反应, 利用酶标仪在 412 nm 处测定吸光度值, 根据吸光度值的变化来计算测试样品对胆碱酯酶的抑制率。乙酰胆碱酯酶活性抑制实验中的反应底物为碘代乙酰胆碱(Acetylthiocholine Iodide, ATCI), 丁酰胆碱酯酶活性抑制实验中的反应底物为硫代顶酰胆碱(S-Betylthiocholine Iodide, BT-CI), 显色剂均为二硫代双硝基苯甲酸(5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)。计算公式如下(公式 1):

$$\frac{\text{抑制率}}{(\text{空白组 - 空白对照组}) - (\text{实验组 - 实验控制组})} = \frac{\text{空白组 - 空白对照组}}{\times 100\%}$$

2.2.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性实验

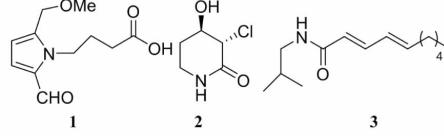
精确称取化合物 1(2.2 mg)、化合物 2(1.5 mg)、化合物 3(2.2 mg)、化合物 4(2.1 mg)、化合物 5(2.8 mg) 和化合物 6(2.9 mg) 于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 978、1 007、986、977、982、1 094 μL 甲醇溶解, 配成 10 mM 浓度的储备液, 4 °C 保存, 使用时从冰箱中取出, 每个样品取 50 μL 储备液稀释 10 倍, 得到浓度为 1 mM 的测试溶液。分别取 10 μL 测试样品溶液, 40 μL PBS(pH = 8.0), 10 μL 0.5 U/mL 的 AChE 溶液, 和 20 μL 0.6 mM/L DTNB 置于 96 孔板中, 此时每个测试孔中化合物的终浓度为 100 μM , 混匀, 在 37 °C 预孵 10 min, 然后加 20 μL 0.6 mM/L ATCI 于 37 °C 恒温反应 30 min 后, 加 50 μL 无水乙醇终止反应。实验对照组用 PBS(pH = 8.0)代替 AChE 溶液; 空白组用甲醇替代测试样品溶液; 空白对照组用甲醇替代测试样品溶液、PBS 替代 AChE 溶液。每组实验平行三次。石杉碱甲为阳性对照, $\text{IC}_{50} = 13.23 \pm 0.33 \text{nM}$ 。

2.2.2 丁酰胆碱酯酶抑制活性实验

分别取 2.2.1 项下配置的样品溶液 10 μL , 40 μL PBS (pH = 8.0), 10 μL 0.8 U/mL 的 BChE 溶液, 20 μL 0.6 mmol/L DTNB 置于 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 10 min, 然后再加 20 μL 0.8 mmol/L BTCl 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 30 min, 加 50 μL 无水乙醇终止反应。实验控制组用 PBS (pH = 8.0) 代替 BChE 溶液; 空白组用甲醇替代测试样品溶液; 空白对照组用甲醇替代测试样品溶液、PBS 替代 BChE 溶液。他克林为阳性对照, $\text{IC}_{50} = 87.58 \pm 9.47 \text{ nM}$ 。

2.2.3 胆碱酯酶抑制活性结果

对假草拔中分离到的化合物 1~6(结构如图 1 所示)测试了胆碱酯酶抑制活性。初筛结果显示化



合物 4 对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶均显示抑制活性, 化合物 5 和 6 选择性抑制丁酰胆碱酯酶。复筛时, 按 2 倍连续稀释 3 次, 测试浓度梯度下化合物的胆碱酯酶抑制活性, 每个浓度平行测三次。将不同浓度测得的 OD 值代入公式 1 算出各浓度抑制率, 并做曲线图得到拟合方程, 根据方程计算半数抑制浓度 (IC_{50})。化合物 4 抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) 的 IC_{50} 值分别为 $37.44 \pm 0.62 \mu\text{M}$ (图 2A) 和 $3.03 \pm 0.11 \mu\text{M}$ (图 2B); 化合物 5 和化合物 6 抑制丁酰胆碱酯酶 (BChE) 的 IC_{50} 值分别为 $49.43 \pm 2.13 \mu\text{M}$ (图 2C) 和 $24.70 \pm 0.90 \mu\text{M}$ (图 2D)。其余测试化合物在 100 μM 浓度下均没有显示胆碱酯酶抑制活性。

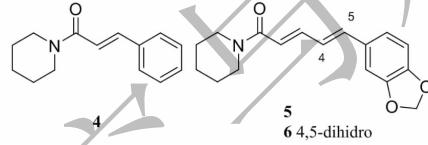


图 1 化合物 1~6 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-6

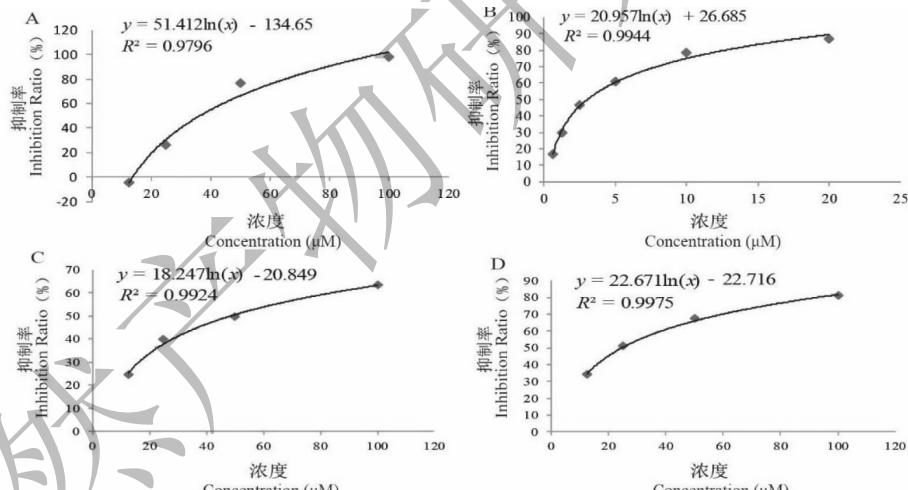


图 2 化合物 4~6 的胆碱酯酶抑制活性曲线图和拟合方程

Fig. 2 Anti-cholinesterase activity curve and fitting equation of compound 4-6

注:A 化合物 4 抑制 AChE 的 IC_{50} 值的计算结果; B 化合物 4 抑制 BChE 的 IC_{50} 值的计算结果; C 化合物 5 抑制 AChE 的 IC_{50} 值的计算结果;

D 化合物 6 抑制 AChE 的 IC_{50} 值的计算结果。

Note: A Acetylcholinesterase inhibition rate of compound 4; B Butyrylcholinesterase inhibition rate of compound 4; C Acetylcholinesterase inhibition rate of compound 5; D Acetylcholinesterase inhibition rate of compound 6.

3 结构鉴定

化合物 1 白色无定型粉末 (CH_3OH); ^1H NMR (800 MHz, CD_3OD) δ : 1.98 (2H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 2.29 (2H, t), 3.35 (3H, s), 4.35 (2H, t, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 4.49

(2H, s), 6.27 (1H, d, $J = 4.0 \text{ Hz}$), 6.98 (1H, d, $J = 4.0 \text{ Hz}$), 9.44 (1H, s); ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD) δ : 134.3 (C-2), 126.3 (C-3), 113.3 (C-4), 141.6 (C-5), 66.9 (C-6), 181.6 (-CHO), 58.8 (-OCH₃), 46.6 (C-1'), 28.7 (C-2'), 33.6 (C-3'), 181.6 (-CHO);

- Piper caninum* Blume [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 7720-7731.
- 5 Luyen B, Tai BH, Thao NP, et al. A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 4120-4124.
- 6 Muharini R, Liu Z, Lin WH, et al. New amides from the fruits of *Piper retrofractum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2015, 56: 2521-2525.
- 7 Bodiwala HS, Singh G, Singh R, et al. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum* [J]. *J Nat Med*, 2007, 61: 418-421.
- 8 Kubo M, Ishii R, Ishino Y, et al. Evaluation of constituents of *Piper retrofractum* fruits on neurotrophic activity [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76: 769-773.
- 9 Pande A, Shukla YN, Srivastava R, et al. 3-methyl-5-decanoylpyridine and amides from *Piper retrofractum* [J]. *Indian J Chem B*, 1997, 36: 377-379.
- 10 Muharini R, Liu Z, Wenhan L, et al. New cytotoxic and anti-fungal amides from the fruit of *Piper retrofractum* [J]. *Planta Med*, 2015, 81: 1450.
- 11 Banerji A, Sarkar M, Datta R, et al. Amides from *Piper brachystachyum* and *Piper retrofractum* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 897-901.
- 12 Kim KJ, Lee MS, Jo K, et al. Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411: 219-225.
- 13 Shi YN, Shi YM, Yang L, et al. Lignans and aromatic glycosides from *Piper wallichii* and their antithrombotic activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 87-96.
- 14 Shi YN, Yang L, Zhao JH, et al. Chemical constituents from *Piper wallichii* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29: 1372-1375.
- 15 Shi YN, Xin Y, Ling Y, et al. Chemical constituents from *Piper hainanense* and their cytotoxicities [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18: 730-736.
- 16 Shi YN, Liu FF, Jacob MR, et al. Antifungal amide alkaloids from the aerial parts of *Piper flavidorum* and *Piper sarmentosum* [J]. *Planta Med*, 2017, 83: 143-150.
- 17 Yang NN, Huang SZ, Ma QY, et al. A new pyrrole alkaloid from *Leccinum extremiorientale* [J]. *Chem Nat Compd*, 2015, 51: 730-732.
- 18 Narui T, Takeuchi M, Ishii R, et al. Studies on the constituents of *Piper hancei* of spice from Okinawa [J]. *Nat Med*, 1995, 49: 438-441.
- 19 Park IK, Lee SG, Shin SC, et al. Larvicidal activity of isobutyramides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 1866-1870.
- 20 Lei J, Burgess EJ, Richardson A, et al. Cytotoxic amides from fruits of Kawakawa, *Macropiper excelsum* [J]. *Planta Med*, 2015, 81: 1163-1168.
- 21 Wu SH, Sun CR, Pei SF, et al. Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040: 193-204.
- 22 Pedras MS, Alavi M, To QH, Expanding the nasturlexin family: Nasturlexins C and D and their sulfoxides are phytoalexins of the crucifers *Barbarea vulgaris* and *B. verna* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 118: 131-138.
- 23 Zhao J(赵军), Sun YH(孙玉华), Xu F(徐芳), et al. Study on Flavonoids of *Coreopsis tinctoria* Nutt [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25: 50-52.
- 24 Wang XY(王晓宇), Chen GR(陈冠儒), Deng ZY(邓子云), et al. Chemical constituents of *Bidens bipinnata* [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2014, 39: 1838-1844.
- 25 Zheng XK(郑晓珂), Yan H(颜慧), Li DD(李丹丹), et al. Chemical constituents of *Caryopteris terniflora* Maxim [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2013, 48: 1997-2001.
- 26 He JB(何江波), Niu YF(牛艳芬), Li JX(李金仙), et al. Studies on terpenoids from *Zygophyllum fabago* [J]. *Chin J Trop Crops*(中国中药杂志), 2015, 40: 4634-4638.
- 27 Fan R(范睿), Hao CY(郝朝运), Qin XW(秦晓威), et al. Analysis of Volatile Constituents of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Leaves by HS-SPME-GC/MS [J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2015, 36: 2276-2282.