

黑蛞蝓化学成分研究(II)

张祖湘¹,王亚凤¹,张 瑛²,何瑞杰¹,韦用琼²,阳丙媛¹,阮 俊²,黄永林^{1*}¹广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所 广西植物功能物质研究与利用重点实验室,桂林 541006;²广西久福生物科技有限公司,南宁 530012

摘要:为研究中药材黑蛞蝓(*Agriolimax agrestis*)的化学成分及其化合物的 α -糖苷酶抑制活性,本研究采用 Sephadex LH-20、硅胶、Chromatorex C₁₈等柱色谱对黑蛞蝓正己烷提取物进行化学分离纯化,通过 NMR 波谱数据与文献对比分析鉴定化合物结构。从黑蛞蝓正己烷提取物中共分离得到 15 个化合物,分别鉴定为苯乙醇(1)、十六烷酸(2)、(*Z*)-9-octadecenoic acid(3)、1-(2-hydroxyethoxy) ethyl (*E*)-octadec-9-enoate(4)、二十七烷(5)、dodecyl (*Z*)-9-hexadecenoate(6)、*cis,cis*-diunsaturated α -meromycolic acid(7)、1,2,3-propanetriyl (9*Z*,9'*Z*,9''*Z*) tris(-9-octadecenoate)(8)、胆固醇(9)、7-酮基胆固醇(10)、胆甾-5-烯-3 β ,7 α 二醇(11)、胆甾-5-烯-3 β ,7 β 二醇(12)、胆甾醇肉豆蔻酸酯(13)、胆甾醇基十七酸酯(14)、熊果酸(15)。除化合物 9 外的所有化合物均为首次从黑蛞蝓中分离得到, α -糖苷酶抑制活性筛选结果显示 7 个化合物对 α -糖苷酶的抑制活性均较弱。

关键词:黑蛞蝓;化学成分;结构鉴定; α -糖苷酶抑制活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)1-0063-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.1.009

Study on the chemical constituents of *Agriolimax agrestis*(II)ZHANG Zu-xiang¹,WANG Ya-feng¹,ZHANG Ying², HE Rui-jie¹,
WEI Yong-qiong²,YANG Bing-yuan¹,RUAN Jun²,HUANG Yong-lin^{1*}¹Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization,
Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences,
Guilin 541006, China; ²Guangxi Jiufu Biotechnology Co., Ltd., Nanning 530012, China

Abstract: To study the chemical constituents of *Agriolimax agrestis* and the α -glycosidase inhibitory activity of its compounds. The chemical constituents of hexane extract from *Agriolimax agrestis* were isolated and purified by column chromatography, such as Sephadex LH-20, silica gel, Chromatorex C₁₈, etc., and the structures of compounds identified by the NMR spectroscopic data analysis and comparison with literature. Fifteen compounds were obtained from the hexane extract of *Agriolimax agrestis* and their chemical structures identified as phenylethyl alcohol (1), palmitic acid (2), (*Z*)-9-octadecenoic acid (3), 1-(2-hydroxyethoxy) ethyl (*E*)-octadec-9-enoate (4), heptacosane (5), dodecyl (*Z*)-9-hexadecenoate (6), *cis,cis*-diunsaturated α -meromycolic acid (7), 1,2,3-propanetriyl (9*Z*,9'*Z*,9''*Z*) tris(-9-octadecenoate) (8), cholesterol (9), 7-ketochol-esterol (10), 5-ene-3 β ,7 α -diol (11), 5-ene-3 β ,7 β -diol (12), cholesteryl myristate (13), cholesteryl hepadecanoate (14), and ursolic acid (15). All compounds were isolated from *Agriolimax agrestis* for the first time except for compound 9. The screening results of α -glycosidase inhibitory activity show that 7 compounds have weak inhibitory activity on α -glycosidase.

Key words: *Agriolimax agrestis*; chemical constituents; structure identification; α -glycosidase inhibitory activity

蛞蝓属腹足类腹足纲蛞蝓科动物,为有肺的软体动物,因其体表布满黏液,俗称“黏虫、鼻涕虫、蜒

蚰、土蜗、附蜗”。蛞蝓作为一种传统中药,味咸寒,入肺、肝、大肠经,具有祛风定惊、清热解毒、破瘀通经等功用,主治中风喎僻、筋脉拘挛、惊痫、喘息、喉痹、咽肿、痈肿、痰核、痔疮肿痛等症^[1-3]。现代药理学研究表明蛞蝓提取物能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤生长,还可抑制肺癌细胞端粒酶基因

收稿日期:2021-07-16 接受日期:2021-12-06

基金项目:国家自然科学基金(82060764);广西自然科学基金(2018GXNSFAA281078);广东省重点领域研发计划资助项目(2020B1111110003);中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY20111010)

* 通信作者 Tel:86-013507830572; E-mail: hyl@gxib. cn

hTERT 和改变突变型 P53 的表达^[4,5]。同时蛞蝓冻干粉能明显延长咳嗽潜伏期,减少咳嗽次数,具止咳化痰平喘作用,并能明显的降低哮喘豚鼠肺组织嗜酸性粒细胞浸润,对支气管哮喘及慢性支气管炎有较好的治疗作用^[6-9]。本课题前期通过 DPPH 自由基清除、细胞抗炎、酶活筛选实验发现黑蛞蝓甲醇提取物脂溶性部位具有抗氧化、抗炎、降低血糖血脂等多种生物活性,以正己烷为溶剂,可使活性成分得到有效提取。文献报道蛞蝓中含有多糖、氨基酸、甾醇类及其他成分^[10-13]。植物甾醇类化合物与人体内胆固醇的吸收、降解代谢、生化合成等密切相关,影响血糖血脂的变化^[14],但是目前对动物甾醇类化合物生理活性报道较少,为了全面掌握黑蛞蝓 (*Agriolimax agrestis* Linnaeus) 正己烷提取物的物质基础,本实验对黑蛞蝓正己烷提取物进行了系统的分离纯化,并对化合物进行了初步的 α -糖苷酶抑制活性筛选。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Brucker Avance 500MHz 超导核磁共振波谱仪(瑞典 Bruker 公司);中低压 Semi-preparative HPLC(北京赛谱锐思公司);CA-1111 冷却水循环(东京理化公司);EYELA N-1300 旋转蒸发仪(东京理化公司);自动接收仪(日本 Advantec 公司);柱层析硅胶(200~300 目,青岛海洋化工有限公司);ODS-C₁₈ 反相色谱柱(Agilent 公司);Sephadex LH-20(美国 GE 公司)、Chromatorex C₁₈(日本 Fuji Silysia Chemical 公司);F254 硅胶薄层板(德国 Merck 公司),阿卡波糖(上海源叶);PNPG(上海源叶); α -糖苷酶(美国 sigma 公司);液相色谱所用试剂为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

样品 2019 年 7 月购于南宁市五塘镇,经李岳执业药师鉴定为黑蛞蝓 (*Agriolimax agrestis* Linnaeus),凭证样品(201907)存放于广西久福生物科技有限公司。

1.2 提取与分离

取黑蛞蝓 (*Agriolimax agrestis* Linnaeus) 粉末 3.0 kg,干燥后加入正己烷,超声提取 6 次,每次 30 min,过滤后合并滤液,滤液减压除去正己烷后,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇反复萃取至无色。回收溶剂后分别得到石油醚浸膏 290.0 g、乙酸乙酯浸膏 8.6 g、正丁醇浸膏 2.6 g。石油醚浸膏用二氯甲烷:甲醇(1:1)充分溶解后经 Sephadex LH-20 柱层析分

离,二氯甲烷-甲醇(1:1)体系等梯度洗脱,得到 9 个流份 Fr1 ~ Fr9。Fr4(122.0 g)采用硅胶柱层析分离,石油醚-二氯甲烷(9:1→1:9)体系梯度洗脱,分为 Fr4-1 ~ Fr4-9 共 9 个流分。其中 Fr4-4(5.0 g)经 Sephadex LH-20 柱层析纯化,二氯甲烷:甲醇(1:1)等梯度洗脱,得到化合物 **14**(753 mg)。Fr5(52.5 g)采用 Sephadex LH-20 柱层析纯化,二氯甲烷:甲醇(1:1)等梯度洗脱,分为 Fr5-1 ~ Fr5-6 共 6 个流分。Fr5-2(6.5 g)经硅胶柱层析分离、Semi-preparative HPLC 制备及重结晶,得到化合物 **13**(44 mg)、**8**(26 mg)。Fr5-4(10.9 g)采用 Chromatorex C₁₈ 柱层析分离,甲醇-水(1:9→10:0)体系洗脱,分为 Fr5-4-1 ~ Fr5-4-8 共 8 个流分。Fr5-4-5(2.7 g)经 Chromatorex C₁₈ 柱层析、Semi-preparative HPLC 制备纯化分离,得到化合物 **10**(4 mg)、**6**(8 mg)、**7**(10 mg)。Fr5-5(5.3 g)经硅胶分离纯化,石油醚-二氯甲烷(9:1→1:9)体系梯度洗脱,分为 Fr5-5-1 ~ Fr5-5-14 共 14 个流分,其中 Fr5-5-12 用 Sephadex LH-20 柱层析分离,得到化合物 **15**(4 mg);Fr5-5-14(1.3 g)通过 Sephadex LH-20、硅胶、Diaion HP20SS 柱层析以及 Semi-preparative HPLC 制备纯化分离,得到化合物 **11**(10 mg)、**12**(18 mg)、**4**(16 mg)。乙酸乙酯浸膏用甲醇充分溶解后经 Chromatorex C₁₈ 柱层析分离,甲醇-水(1:9→10:0)进行梯度洗脱,得到 Fr10-1 ~ Fr10-5 共 5 个流份。其中 Fr10-1(318 mg)经 Chromatorex C₁₈(甲醇-水)梯度洗脱并进行重结晶,得到化合物 **3**(20 mg)。正丁醇浸膏用甲醇充分溶解后经 Chromatorex C₁₈(甲醇-水)分离,得到 Fr11-1 ~ Fr11-12 共 12 个流分,其中 Fr11-1-1 经 Semi-preparative HPLC 制备纯化分离,得到纯化合物 **1**(2 mg)。Fr11-4(634 mg)、Fr11-6(876 mg)、Fr11-12(413 mg)重结晶后,分别得到化合物 **2**(78 mg)、化合物 **9**(512 mg)、化合物 **5**(20 mg)。

1.3 α -糖苷酶抑制活性筛选

将 50 μ L PBS 缓冲液(pH 为 6.8)加入 96 孔板中,然后分别加入不同浓度的待测样品溶液 20 μ L 和 10 μ L 酶溶液(0.1 U/mL),震荡均匀,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中预热 5 min,然后加入 10 μ L PNPG(1 mM),于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30 min,最后加入 50 μ L 无水碳酸钠(0.2 M)终止反应,在波长 405 nm 处测定吸光值为反应组 A,等量缓冲液代替酶液做反应对照组 A₀,等量缓冲液代替样品做空白组 C,等量缓冲液分别代替样品溶液和酶液做空白对照组

C_0 ,其他步骤及试剂同上^[15,16]。抑制率计算公式:抑制率 = $[1 - (A - A_0) / (C - C_0)] \times 100\%$ 。重复上述实验三次。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末;分子式为 $C_8H_{10}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 3.00 (2H, dd, $J = 8.9, 14.6$ Hz, H-7), 3.78 (2H, dd, $J = 4.3, 8.9$ Hz, H-8), 7.24 ~ 7.33 (5H, m, H-2 ~ H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 137.3 (C-1), 130.4 (C-2), 129.9 (C-3), 128.4 (C-4), 129.9 (C-5), 130.4 (C-6), 38.3 (C-7), 57.6 (C-8)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定化合物 **1** 为苯乙醇。

化合物 2 白色片状固体;分子式为 $C_{16}H_{32}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16), 1.25 ~ 1.36 (24H, m, $12 \times CH_2$), 1.64 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.0 (C-1), 34.0 (C-2), 32.1 (C-3), 29.9 (C-4), 29.8 (C-5), 29.8 (C-6), 29.8 (C-7), 29.8 (C-8), 29.7 (C-9), 29.6 (C-10), 29.5 (C-11), 29.4 (C-12), 29.2 (C-13), 24.9 (C-14), 22.9 (C-15), 14.3 (C-16)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定化合物 **2** 为十六烷酸。

化合物 3 淡黄色粉末;分子式为 $C_{18}H_{34}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.87 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18), 1.24 ~ 1.29 (22H, m, H-3 ~ H-7, H-12 ~ H-17), 1.62 (2H, m, H-11), 2.01 (2H, s, H-8), 2.33 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 5.34 ~ 5.37 (2H, m, H-9, H-10); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 179.5 (C-1), 34.1 (C-2), 22.8 (C-3), 29.6 (C-4), 29.4 (C-5), 29.5 (C-6), 29.8 (C-7), 29.8 (C-8), 129.9 (C-9), 130.2 (C-10), 29.2 (C-11), 29.8 (C-12), 24.8 (C-13), 29.8 (C-14), 29.7 (C-15), 29.8 (C-16), 32.1 (C-17), 14.2 (C-18)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物 **3** 为 (*Z*)-9-octadecenoic acid。

化合物 4 白色粉末;分子式为 $C_{21}H_{40}O_4$ 。 1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18'), 1.29 ~ 1.33 (20H, m, H-4' ~ H-7', H-12' ~ H-17'), 1.63 (2H, m, H-3'), 2.03 ~ 2.06 (2H, m, H-8', H-11'), 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 3.56 (2H, m, H-3), 3.83 (1H, m, H-2), 4.06 (1H, dd, $J = 6.3, 11.6$ Hz, H-1b), 4.15 (1H, dd, $J = 4.3, 11.6$ Hz, H-1a), 5.35 ~ 5.37 (2H, m, H-9', H-10'); ^{13}C NMR

(125 MHz, CD_3OD) δ : 66.5 (C-1), 71.1 (C-2), 64.1 (C-3), 175.5 (C-1'), 33.1 (C-2'), 30.2 (C-3'), 28.1 (C-4'), 28.1 (C-5'), 26.0 (C-6'), 30.5 (C-7'), 30.3 (C-8'), 130.9 (C-9'), 130.8 (C-10'), 34.9 (C-11'), 30.2 (C-12'), 30.8 (C-13'), 30.8 (C-14'), 30.4 (C-15'), 30.7 (C-16'), 23.7 (C-17'), 14.5 (C-18')。以上数据与文献^[20]报道基本一致,故鉴定化合物 **4** 为 1-(2-hydroxyethoxy) ethyl (*E*)-octadec-9-enoate。

化合物 5 淡黄色固体;分子式为 $C_{27}H_{56}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.85 (6H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1, H-27), 1.22 ~ 1.25 (4H, m, H-2, H-26); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 14.3 (C-1), 22.8 (C-2), 32.1 (C-3), 29.6 (C-4), 29.8-29.9 (19C, C-5 ~ 23), 29.6 (C-24), 32.1 (C-25), 22.8 (C-26), 14.3 (C-27)。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定化合物 **5** 为二十七烷。

化合物 6 白色粉末;分子式为 $C_{28}H_{54}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 0.88 (6H, t, $J = 6.5$ Hz, H-16, H-12'), 2.31 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2), 3.65 (2H, s, H-1'), 5.33 ~ 5.35 (2H, m, H-9, H-10); ^{13}C NMR(125 MHz, CD_3OD) δ : 175.9 (C-1), 34.9 (C-2), 26.0 (C-3), 28.2 (C-4), 34.1 (C-5), 33.0 (C-6), 33.1 (C-7), 34.9 (C-8), 130.7 (C-9), 130.9 (C-10), 34.9 (C-11), 33.1 (C-12), 30.8 (C-13), 34.8 (C-14), 23.7 (C-15), 15.4 (C-16), 51.9 (C-1'), 28.1 (C-2'), 26.1 (C-3'), 30.5 (C-4'), 30.9 (C-5'), 30.9 (C-6'), 30.9 (C-7'), 30.9 (C-8'), 30.5 (C-9'), 34.8 (C-10'), 23.7 (C-11'), 14.2 (C-12')。以上数据与文献^[22]报道基本一致,故鉴定化合物 **6** 为 dodecyl (*Z*)-9-hexadecenoate。

化合物 7 白色粉末;分子式为 $C_{50}H_{96}O_2$ 。 1H NMR(500 MHz, CD_3OD) δ : 0.90 (12H, t, $J = 6.7$ Hz, $4 \times CH_3$), 1.60 (2H, m, H-3), 2.02 ~ 2.06 (8H, m, H-18, H-21, H-30, H-33), 2.28 (2H, m, H-2), 5.35 (4H, t, $J = 4.6$ Hz, H-19, H-20, H-31, H-32); ^{13}C NMR(125 MHz, CD_3OD) δ : 178.2 (C-1), 34.9 (C-2), 26.1 (C-3), 28.1 (C-4), 30.1 (C-5), 30.2 (C-6), 30.2 (C-7), 30.2 (C-8), 30.2 (C-9), 30.2 (C-10), 30.2 (C-11), 30.2 (C-12), 30.2 (C-13), 30.2 (C-14), 30.3 (C-15), 30.3 (C-16), 30.7 (C-17), 28.1 (C-18), 130.8 (C-19), 130.9 (C-20), 28.1 (C-21), 30.7 (C-22), 30.4 (C-23), 30.4 (C-24), 30.2 (C-25), 30.2 (C-26), 30.6 (C-27), 30.6 (C-28), 30.8

(C-29), 28.1 (C-30), 130.8 (C-31), 130.9 (C-32), 28.1 (C-33), 30.8 (C-34), 30.6 (C-35), 30.6 (C-36), 30.3 (C-37), 30.3 (C-38), 30.3 (C-39), 30.3 (C-40), 30.3 (C-41), 30.3 (C-42), 30.3 (C-43), 30.3 (C-44), 30.3 (C-45), 30.3 (C-46), 30.1 (C-47), 33.0 (C-48), 23.7 (C-49), 14.4 (C-50)。以上数据与文献^[23,24]报道基本一致,故鉴定化合物 **7** 为 *cis,cis*-diunsaturated α -meromycolic acid。

化合物 8 白色粉末;分子式为 $C_{57}H_{104}O_6$ 。¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.86 (9H, t, $J = 7.0$ Hz, $3 \times (H-18')$), 1.25 (66H, s, $3 \times 11 (CH_2)$), 1.61 (6H, br s, $3 \times (H-11')$), 2.01 (6H, br s, $3 \times (H-8')$), 2.34 (6H, t, $J = 7.5$ Hz, $3 \times (H-2')$), 4.13 ~ 4.16 (4H, m, H-1, 3), 5.26 (1H, m, H-2), 5.33 ~ 5.36 (6H, m, $3 \times (H-9', 10')$); ¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 65.2 (C-1), 68.5 (C-2), 65.2 (C-3), 174.0 (C-1'), 34.2 (C-2'), 29.4 (C-3'), 29.2 (C-4'), 29.5 (C-5'), 29.2 (C-6'), 29.8 (C-7'), 27.4 (C-8'), 129.8 (C-9'), 130.2 (C-10'), 25.0 (C-11'), 29.8 (C-12'), 29.8 (C-13'), 29.8 (C-14'), 29.9 (C-15'), 22.8 (C-16'), 32.1 (C-17'), 14.2 (C-18')。以上数据与文献^[25]报道基本一致,故鉴定化合物 **8** 为 1,2,3-propanetriyl (9*Z*,9'*Z*,9''*Z*) tris(-9-octadecenoate)。

化合物 9 白色粉末;分子式为 $C_{27}H_{46}O$ 。¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.67 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-26), 0.86 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-27), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 3.57 (1H, m, H-3), 5.34 (1H, m, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.1 (C-1), 29.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.7 (C-5), 121.6 (C-6), 31.5 (C-7), 31.8 (C-8), 50.0 (C-9), 36.4 (C-10), 20.9 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.2 (C-15), 28.1 (C-16), 56.0 (C-17), 11.7 (C-18), 19.3 (C-19), 35.7 (C-20), 18.6 (C-21), 36.1 (C-22), 23.7 (C-23), 39.4 (C-24), 27.9 (C-25), 22.4 (C-26), 22.7 (C-27)。以上数据与文献^[26]报道基本一致,故鉴定化合物 **9** 为胆固醇。

化合物 10 白色粉末;分子式为 $C_{27}H_{44}O_2$ 。¹H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.73 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, H-26), 0.89 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, H-27), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.24 (3H, s, H-19), 3.55 (1H, m, H-3), 5.66 (1H, br s, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 39.6 (C-1), 31.9

(C-2), 71.2 (C-3), 44.3 (C-4), 169.1 (C-5), 126.3 (C-6), 204.7 (C-7), 42.7 (C-8), 51.4 (C-9), 37.5 (C-10), 22.3 (C-11), 40.1 (C-12), 46.6 (C-13), 51.5 (C-14), 24.9 (C-15), 29.6 (C-16), 56.2 (C-17), 12.4 (C-18), 17.7 (C-19), 37.0 (C-20), 19.4 (C-21), 37.4 (C-22), 27.4 (C-23), 40.6 (C-24), 29.1 (C-25), 23.2 (C-26), 22.9 (C-27)。以上数据与文献^[27]报道基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 7-酮基胆固醇。

化合物 11 白色粉末;分子式为 $C_{27}H_{46}O_2$ 。¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.69 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-26), 0.86 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-27), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 3.58 (1H, m, H-3), 3.85 (1H, br s, H-7), 5.60 (1H, dd, $J = 1.8, 5.3$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.1 (C-1), 31.7 (C-2), 71.6 (C-3), 41.9 (C-4), 143.6 (C-5), 125.6 (C-6), 73.5 (C-7), 41.1 (C-8), 48.4 (C-9), 36.6 (C-10), 21.2 (C-11), 39.7 (C-12), 43.1 (C-13), 55.6 (C-14), 23.9 (C-15), 28.7 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 18.9 (C-19), 35.9 (C-20), 19.3 (C-21), 36.4 (C-22), 26.5 (C-23), 39.7 (C-24), 28.1 (C-25), 22.9 (C-26), 22.7 (C-27)。以上数据与文献^[28,29]报道基本一致,故鉴定化合物 **11** 为胆甾-5-烯-3 β ,7 α 二醇。

化合物 12 白色粉末;分子式为 $C_{27}H_{46}O_2$ 。¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.69 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-26), 0.86 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-27), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.05 (3H, s, H-19), 3.57 (1H, m, H-3), 3.85 (1H, m, H-7), 5.29 (1H, br s, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.1 (C-1), 31.5 (C-2), 71.4 (C-3), 42.1 (C-4), 146.4 (C-5), 124.0 (C-6), 65.5 (C-7), 37.6 (C-8), 42.3 (C-9), 37.5 (C-10), 20.9 (C-11), 39.3 (C-12), 42.4 (C-13), 49.6 (C-14), 23.8 (C-15), 28.4 (C-16), 56.0 (C-17), 11.7 (C-18), 18.3 (C-19), 35.9 (C-20), 18.8 (C-21), 36.3 (C-22), 24.4 (C-23), 39.6 (C-24), 28.1 (C-25), 22.9 (C-26), 22.7 (C-27)。以上数据与文献^[28,29]报道基本一致,故鉴定化合物 **12** 为胆甾-5-烯-3 β ,7 β 二醇。

化合物 13 白色粉末;分子式为 $C_{41}H_{72}O_2$ 。¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.67 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, H-26), 0.88 (3H, d, $J = 2.0$ Hz,

H-27), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 4.10 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, m, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 37.2 (C-1), 27.9 (C-2), 73.8 (C-3), 38.3 (C-4), 139.8 (C-5), 122.7 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.2 (C-9), 36.3 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 28.4 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.4 (C-19), 34.8 (C-20), 18.8 (C-21), 35.9 (C-22), 23.9 (C-23), 39.6 (C-24), 28.1 (C-25), 22.6 (C-26), 22.8 (C-27), 173.4 (C-1'), 34.5 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.3 (C-4'), 29.4 (C-5'), 29.6 (C-6'), 29.7 (C-7'), 29.7 (C-8'), 29.8 (C-9'), 29.5 (C-10'), 32.0 (C-11'), 22.9 (C-12'), 14.2 (C-13')。以上数据与文献^[30]报道基本一致,故鉴定化合物**13**为胆甾醇肉豆蔻酸酯。

化合物 14 白色针状结晶;分子式为 $\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{O}_2$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.67 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-27), 0.87 (3H, d, $J = 2.2$ Hz, H-26), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 2.28 (2H, m, H-4), 4.62 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, m, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 37.2 (C-1), 27.9 (C-2), 73.8 (C-3), 38.3 (C-4), 139.9 (C-5), 122.7 (C-6), 32.0 (C-7), 32.1 (C-8), 50.2 (C-9), 36.4 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 28.2 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.5 (C-19), 35.9 (C-20), 18.9 (C-21), 36.8 (C-22), 22.7 (C-23), 39.7 (C-24), 28.4 (C-25), 22.8 (C-26), 23.9 (C-27), 173.4 (C-1'), 34.9 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.3 (C-4'), 29.4 (C-5'), 29.5 (C-6'), 29.6 (C-7'), 29.7 (C-8'), 29.8 (C-9'), 29.8 (C-10'), 29.8 (C-11'), 29.8 (C-12'), 29.8 (C-13'), 29.5 (C-14'), 32.1 (C-15'), 24.0 (C-16'), 14.3 (C-17')。以上数据与文献^[31]报道基本一致,故鉴定化合物**14**为胆甾醇基十七酸酯。

化合物 15 白色针状结晶;分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.67 (3H, s, H-24), 0.74 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-29), 0.86 (3H, d, $J = 4.5$ Hz, H-30), 0.91 (3H, s, H-26), 1.04 (3H, s, H-27), 2.99 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, t, $J = 3.2$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 36.5 (C-1), 26.9 (C-2), 76.9 (C-3), 38.3 (C-4), 54.8 (C-5), 18.0 (C-6), 32.7 (C-7), 40.0 (C-

8), 47.0 (C-9), 38.5 (C-10), 23.3 (C-11), 124.6 (C-12), 138.2 (C-13), 41.7 (C-14), 28.2 (C-15), 23.8 (C-16), 46.9 (C-17), 52.4 (C-18), 38.4 (C-19), 38.4 (C-20), 30.2 (C-21), 36.3 (C-22), 27.6 (C-23), 15.2 (C-24), 16.1 (C-25), 17.0 (C-26), 22.9 (C-27), 178.3 (C-8), 16.9 (C-29), 21.1 (C-30)。以上数据与文献^[32]报道基本一致,故鉴定化合物**15**为熊果酸。

2.2 α -糖苷酶抑制活性筛选结果

以上述标准方法平行测定三次取平均值,实验结果显示阳性药阿卡波糖的 IC_{50} 为 0.003 7 mg/mL, 化合物**6**的 IC_{50} 为 1.19 mg/mL, 化合物**10**的 IC_{50} 为 1.34 mg/mL, 对 α -糖苷酶的抑制活性较弱, 其他化合物无法计算其 IC_{50} 值, 对 α -糖苷酶基本无抑制作用。具体实验结果如表 1 所示。

表 1 不同化合物抑制 α -糖苷酶活性的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of different compounds inhibiting α -glycosidase activity

化合物 Compound	IC_{50} (mg/mL)
6	1.19
7	>20
8	>10
9	>10
10	1.34
11	>10
12	>10
阿卡波糖 Acarbose	0.003 7

3 结论

黑蛭螭正己烷提取物中共分离得到 15 个化合物, 主要为长链脂肪酸和甾醇类化合物, 其中有 6 个甾醇类化合物, 甾醇类化合物**9**和**14**为主要成分。除化合物**9**之外, 其余化合物均为首次从该动物药中首次分离得到。植物甾醇类化合物具有多种生物活性, 能够抑制人体对胆固醇的吸收、促进胆固醇的降解代谢、抑制胆固醇的生化合成等作用, 但是目前对动物甾醇类化合物生理活性报道较少。本实验初步筛选了纯度较高的 7 个化合物的 α -糖苷酶抑制活性, 结果显示化合物**6**和**10**对 α -糖苷酶的抑制活性均较弱, 其他化合物对 α -糖苷酶基本无抑制作用。前期实验结果显示该活性部位具有 α -糖苷酶的抑制活性, 活性成分可能为检测到的多种萜类化

合物。

参考文献

- Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine; Vol 2 (中药大辞典下册) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006:3318.
- Chen GL. Research progress on pharmacology of *Agriolimax agrestis* [J]. J North Pharm (北方药学), 2013, 10(10):55-56.
- Li SZ. Bencao Gangmu (本草纲目) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982:362.
- Wang J, Cao JU, Yao X, et al. Inhibitory effects of limax effective extraction on the growth of cervical cancer HeLa cells transplanted tumor in nude mice [J]. Med Sci J Cent South China (中南医学科学杂志), 2017, 45:562-566.
- Wei JY, Zeng ZD, Zeng CQ, et al. Effects of slug extract on lung cancer cell cycl [J]. Nei Mongolia J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2011, 30(24):38-39.
- Yan PK, Lin GQ, Luo QF, et al. Effect of limax lyophilized powder on bronchial asthma [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2011, 34:1086-1089.
- Su LY, Wei QY, Tang XN, et al. Effects of limax lyophilized powder on asthma latency and levels of serum and bronchoalveolar lavage fluid interferon γ and interleukin 4 in rats with bronchial asthma [J]. Guangxi Med J (广西医学), 2019, 41:1921-1924.
- Lin GQ, Yan PK, Luo QF, et al. Improvement effect of limax lyophilized powder on chronic bronchitis [J]. Chin Pharm (中国药房), 2011, 22:2511-2514.
- Su LY. Study on the antiasthmatic effect and mechanism of limax extract and its quality control [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine (广西中医药大学), 2019.
- Liu ZY, Yao WX, Liang X, et al. Study of polysaccharide characteristics and antioxidation activity of *Vaginulus alte* Ferussac extract [J]. Mod Hosp (现代医院), 2018, 18:1498-1502.
- He RJ. Isolation, purification, structural elucidation, chemical modification and *in vitro* activities of polysaccharides from the body of *Philomycus bilineatus* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2014.
- Xie JK, Wang Z. Analysis of amino acid composition of bifilar mucilage slugs [J]. Hunan J Tradit Chin Med (湖南中医杂志), 1999(3):78-79.
- Huang YL, Wei YQ, He RJ, et al. Chemical constituents from *Agriolimax agrestis* [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40:2471-2474.
- Xie XM, Hao HX, He JB. Physiological function and application of phytosterol [J]. Pratacult Sci (草业科学), 2013, 30:2105-2109.
- You F, Meng JW, Xiao D, et al. Study on the hypoglycemic effect of three kinds of medicinal materials from Xinjiang [J]. Anim Husb Vet Med (畜牧与兽医), 2021, 53(7):117-121.
- Jiang SR, Wang LY, Dong Q, et al. Study on the inhibitory activity of α -glucosidase and α -amylase of 31 traditional Chinese medicines and Tibetan medicine water extracts [J]. Qinghai Sci Technol (青海科技), 2021, 28(3):41-46.
- Wu YH, Xiao B, Fu HZ, et al. Phytochemical study of *Asparagus officinalis* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2016, 18:1571-1573.
- Ma Q, Wang ZG, Yang X, et al. Study on chemical composition and antibacterial activity of the leaves of *Mikania micrantha* H. B. K. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:2061-2065.
- Abdulmumeen AH, Olapeju OA, Arvind SN, et al. Bioguided isolation and antiproliferative activity of constituents from *Smilax korthalsii* A. D. C. leaves [J]. J Chin Chem Soc, 2016, 63:562-571.
- Wang M, Chen YC, Sun ZH, et al. Study on cytotoxic secondary metabolites of endophytic fungus *Diaporthe longicolla* A616 from *Pogostemon cablin* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41:2112-2117.
- Qu H, Yang ZX. Isolation and identification of alkanes from *Zantedeschia aethiopica* [J]. China Pharm (中国药师), 2009, 12:1361-1362.
- Louw S, Burger BV, Le RM, et al. Lizard epidermal gland secretions. II. Chemical characterization of the generation gland secretion of the sungazer, *Cordylus giganteus* [J]. J Nat Prod, 2011, 74:1364-1369.
- Giacomo B, Geoffrey DC. Synthesis of *cis, cis*-diunsaturated α -meromycolic acid by a palladium-catalysed alkyl-alkyl Negishi reaction [J]. Tetrahedron Lett, 2012, 53:214-216.
- Bi W. Anti-tumor constituents from Kujin Tea and a pharmacophylogenetic investigation in the genus *Acer* L. [D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2016.
- Abdulmumeen AH, Olapeju OA, Fatima K, et al. Correction to: isolation, characterization and antiproliferative evaluation of constituents from stem extracts of *Alafia barteri* Oliv. Hook. F [J]. Med Chem Res, 2018, 27:693-693.
- Tang B, Chen GY, Song XP, et al. Studies on chemical constituents from the leaves of *Actephila merrilliana* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24:179-181.
- Zhu YD, Soroka D, Sang S. Oxyphytosterols as active in gre-

- dients in wheat bran suppress human colon cancer cell growth; identification, chemical synthesis, and biological evaluation [J]. *J Agr Food Chem*, 2015, 63:2264-2276.
- 28 Yao HP, Liang ZG, Zhao LL, et al. Study on the chemical constituents of *Lapemis curtus* II [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2016, 27:599-602.
- 29 Liu HW, Li JK, Zhang DW, et al. Two new steroidal compounds from starfish *Asterias amurensis* Lutken [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10:521-629.
- 30 Tang H, Cheng P, Lin HW, et al. Studies on chemical constituents of marine bryozoan *Bugula neritina* L. [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2007, 30:655-657.
- 31 Zhang JW, Chen HD, Liao M, et al. Studies on chemical constituents of *Sarcopyramis nepdensis* [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(1):17-20.
- 32 Xiang CP, Wang Y, Wang Q, et al. Chemical constituents from *Leycesteria formosa* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:58-67.

基于配体捕捞结合 HR-ESI-Q-TOF-MS 快速鉴定 和分离蛇莓的神经氨酸酶抑制剂

流感是一种急性呼吸道疾病,由甲型、乙型和丙型等流感病毒引起。其中,甲型和乙型流感病毒可导致季节性流行甚至全球大流行。流感病毒神经氨酸酶(NA)是病毒复制、传播和发病机制中的关键酶,因而研发神经氨酸酶抑制剂(NAIs)是对抗流感感染的有效途径之一。在中国,许多用于清热解毒的中药单独使用或作为中药配方来治疗流感显示出良好的疗效,但如何从中药中快速分离出活性物质是一个难题。

来自暨南大学的田海妍及其团队开发了一种配体捕捞技术,通过使用神经氨酸酶固定化磁珠(NA-MB)来筛选NAIs。在用包括NA抑制剂和非抑制剂的人工混合物验证了NA-MB的可行性后,开发的配体捕捞技术被应用于从树莓的粗提取物中筛选NAIs。该团队通过高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)和FingerID从提取物中鉴定出多种NAI化合物,包括12个鞣花丹宁、4个短叶苏木酚衍生物、3个鞣花酸衍生物和4个黄酮类化合物。其中,有9个化合物被分离出来。通过对产气荚膜梭菌、奥司他韦敏感和耐药的甲型流感病毒株进行体外NA抑制活性测试,结果表明化合物**B23**对奥司他韦敏感和耐药的甲型流感病毒株NA都具有抑制活性,其半数最大抑制浓度(IC₅₀)值分别为197.9、125.4 μmol/L。此外,化合物**B23**在40、200 μmol/L的浓度下可以明显减少奥司他韦敏感和耐药病毒在MDCK细胞中的复制。该研究为快速筛选天然来源的神经氨酸酶抑制剂提供了参考,相关研究发表在《Acta Pharmaceutica Sinica B》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383520305438>

原文标题:Rapid identification and isolation of neuraminidase inhibitors from mock-strawberry (*Duchesnea indica* Andr.) based on ligand fishing combined with HR-ESI-Q-TOF-MS