

华南胡椒的化学成分及其抗胆碱酯酶活性研究

陈琳^{1#}, 向彩朋^{1#}, 韩佳欣¹, 焦玉菡¹, 郝朝运²,

杨少杰³, 杨蕾^{3,4}, 郭立群^{3,4}, 李海舟¹, 杨崇仁^{1,5}, 许敏^{1*}

¹昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500; ²中国热带农业科学院, 海南兴隆 100049;

³云南省科学技术院; ⁴云南现代民族药工程技术研究中心, 昆明 650101;

⁵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)等柱层析方法和制备液相, 从胡椒科胡椒属华南胡椒(*Piper austrosinense*)的茎叶的70%丙酮提取物中分离得到11个化合物, 包括1个苯甲醛类衍生物(1), 1个苯甲酸类衍生物(2), 2个苯丙素类成分(4和5)、2个黄酮苷(5和6)、2个生物碱(7和8)、2个倍半萜(9和10)、1个紫罗兰酮类(11)。运用波谱光谱学方法分别鉴定为: 原儿茶醛(1), 原儿茶酸(2), 4-丙烯基儿茶酚(3), 咖啡醛(4), 青兰苷(5), 野漆树苷(6), piperonaline(7), 吲哚-3-甲酸(8), 4 β , 10 β -二醇-香木兰烷(9), (-)-丁香三环烷-2,9-二醇(10), 和(3S,5R,6S,7E)-3,5,6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮(11)。其中, 化合物5~11均首次从该植物中分离得到, 化合物5,6,8~11均首次从胡椒属植物中分离得到。通过改良的Ellman法测试了所有化合物对乙酰和丁酰胆碱酯酶的抑制活性, 测试结果表明化合物7显示选择性抑制丁酰胆碱酯酶的活性, 半数抑制浓度(IC₅₀)为29.06 ± 0.32 μM。其余化合物在30 μM浓度下对乙酰和丁酰胆碱酯酶均不显示抑制活性。采用MTT法测试了所有化合物对肝癌细胞株(HepG2)的体外细胞毒活性, 测试表明所有化合物在30 μM浓度下对所测试的细胞株未显示细胞毒活性。

关键词: 华南胡椒; 化学成分; 胡椒属; 胆碱酯酶抑制活性。

中图分类号: R285.5; Q946.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.9.017

Chemical Constituents of *Piper austrosinense* and Their Anticholinesterase Inhibitory Activity

CHEN Lin^{1#}, XIANG Cai-peng^{1#}, HAN Jia-xin¹, JIAO Yu-han¹, HAO Chao-yu², YANG Shao-jie³,
YANG Lei^{3,4}, GUO Li-qun^{3,4}, LI Hai-zhou¹, YANG Chong-ren^{1,5}, XU Min^{1*}

¹Centre for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University

of Science and Technology, Chenggong Campus, Kunming 650500, China; ²Chinese Academy of Tropical

Agricultural Sciences, Hainan 100049; ³Yunnan Provincial Academy of Science and Technology;

⁴Yunnan Engineering Research Centre of Ethnopharmacy, Kunming 650101, China; ⁵China State Key Laboratory

of Phytochemistry and Plant Resources of West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Eleven compounds were isolated from the stem and leaf of *Piper austrosinense* by using the method of Toyopearl HW-40c, silica gel, ODS, MCI and pre-HPLC, including one benzaldehyde derivative, one benzoic acid derivative, three phenylpropanoids, two flavonoids, two alkaloids, two sesquiterpenes, and one ionone. The compounds were identified as protocatechualdehyde (1), protocatechuate (2), 4-allyl catechol (3), caffeic aldehyde (4), cynaroside (luteolin-7-O- β -D-glucoside, 5), rhoifolin (apigenin-7-O-neohesperidoside, 6), piperonaline (7), indole-3-formic acid (8), aromadendrane-4 β , 10 β -diol (9), (-)-cloveane-2,9-diol (10), and (3S,5R,6S,7E)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (11). Compounds 5-11 were firstly isolated from the title plant. Among them, it is the first time to report compounds

收稿日期: 2017-11-06

接受日期: 2018-03-29

基金项目: 云南省科技厅重点新产品开发项目“云南民族民间重要芳香疗法植物资源的开发与应用”(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

5, 6, 8-11 isolated in the genus *Piper*. In addition, compound **7** showed selective butyrylcholinesterase inhibitory activity with IC_{50} value of $29.06 \pm 0.32 \mu\text{M}$, while other compounds showed no acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities at the concentration of $30 \mu\text{M}$. The cytotoxic activities of all compounds against HepG2 cell line were tested by MTT assay. However, no compounds showed cytotoxicity at the concentration of $30 \mu\text{M}$.

Key words: *Piper austrosinense*; chemical constituents; *Piper*; cholinesterase inhibitory activity

胡椒属 (*Piper*) 为胡椒科 (Piperaceae) 的一个大属, 全世界约有 1000 余种。其中 68 种为我国所特有, 主要分布于东南至西南各省区。该属中的一些品种是重要的香料植物, 还有一些植物被作为当地草药使用^[1]。在我国 20 多种胡椒属植物入药, 主要用于跌打损伤、风湿疼痛或抗真菌等^[1]。国内外自上世纪 40 年代开始对该属植物进行研究, 报道的化学成分主要包括生物碱、木脂素、黄酮、环戊二烯酮、丁烯羟酸内酯以及苯丙素等^[1]。药理活性研究主要涉及抗真菌、抗病毒、抗细菌、抗肿瘤、神经系统疾病等多方面的作用^[1]。华南胡椒 (*Piper austrosinense*) 隶属于胡椒科胡椒属, 据《中华本草》记载, 华南胡椒具有消肿, 止痛之功效, 主治牙痛、跌打损伤^[2]。前期, 除肖培根院士团队报道从产于云南省西双版纳华南胡椒的地上部分分离鉴定了 2 个新的酰胺类生物碱外, 其药理作用及化学成分尚未见文献报道^[3]。本研究论文对产于广州的华南胡椒的茎叶部分进行了研究, 共分离得到 11 个化合物, 运用波谱光谱学方法分别鉴定为: 原儿茶醛 (**1**)^[4]、原儿茶酸 (**2**)^[4]、4-丙烯基儿茶酚 (**3**)^[4]、咖啡醛 (**4**)^[5]、青兰苷 (木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷, **5**)^[6]、野漆树苷 (芹菜素-7-*O*-新橘皮糖苷, **6**)^[7]、piperonaline (**7**)^[8,9]、吡啶-3-甲酸 (**8**)^[10]、 4β , 10β -二醇-香木兰烷 (**9**)^[11]、(-)-丁香三环烷-2, 9-二醇 (**10**)^[12] 和 (3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*E*)-3, 5, 6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮 (**11**)^[13]。其中, 化合物 **5 ~ 11** 均首次从该植物中分离得到, 化合物 **5, 6, 8 ~ 11** 均首次从胡椒属植物中分离得到。

芳香植物长期被用于改善或治疗神经系统疾病。胡椒属植物作为重要的芳香性植物长期应用于神经系统疾病的治疗。为了探讨胡椒属植物在治疗和改善老年痴呆症疾病方面的应用, 本论文通过改良的 Ellman 法测试了胡椒属植物华南胡椒中分离到的化合物对乙酰和丁酰胆碱酯酶的抑制活性, 测试结果表明化合物 **7** 显示选择性抑制丁酰胆碱酯酶的活性, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $29.06 \pm 0.32 \mu\text{M}$, 其余化合物在 $30 \mu\text{M}$ 浓度下对乙酰和丁酰胆碱酯酶均不显示抑制活性。此外, 我们采用 MTT 法测试

了所有化合物对肝癌细胞株 (HepG2) 的体外细胞毒活性, 测试表明所有化合物在 $30 \mu\text{M}$ 浓度下对所测试的细胞株未显示细胞毒活性。

1 仪器与材料

柱色谱采用的材料包括: 200 ~ 300 和 500 ~ 600 目正相硅胶 (青岛海洋化工厂); 反相填充材料 ODS (40 ~ 63 μm , Darmstadt, Germany); 凝胶树脂填充材料 Toyopearl HW-40c (Amersham Biosciences AB, Sweden); 大孔树脂 MCI-gel-CHP-20P (75 ~ 150 μm , Mitsubishi Chemical Corporation, Japan)。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、A 试剂 (茴香醛/乙醇/浓硫酸/乙酸 = 5:90:5:1, v/v), 改良版碘化铋钾试剂和 10% FeCl₃ 溶液-EtOH 溶液, 均匀喷洒后加热至显色。

HR 级甲醇购自安徽时联特种溶剂股份有限公司; 分析级乙醇、石油醚、丙酮、Na₂HPO₄ · 12H₂O 和 NaH₂PO₄ · 2H₂O 均购自天津津东天正试剂有限公司, 编号分别为 20140303、20130306、20131103、20121126 和 20141127; 碳酸氢钠购自四川西陇化工股份有限公司, 编号 201209005; 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)、乙酰胆碱酯酶 (来源于电鳗, Sigma C 2888; 1000 U) 均购自西格玛公司, 编号分别 SLBN1774V 和 SLBN0954V; 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 Bruker DRX-600 和 800 MHz 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; 制备型液相在汉邦高效液相上进行(江苏汉邦科技有限公司, NP-7000C 输送泵, NU-3000 检测器); 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)。

实验药材采自中国广东省广州市, 经中国科学院华南植物园方晓明博士鉴定为华南胡椒(*Piper austrosinense*), 凭证标本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-20140702。

2 实验方法与结果

2.1 提取与分离

将华南胡椒茎叶(1.455 kg)打粉, 用 70% 丙酮浸泡 3 次, 第一次加 70% 丙酮 4.33 L, 第二次加 70% 丙酮 6 L, 第三次加 70% 丙酮 5 L, 每次两天。过滤后合并滤液, 滤液减压浓缩至没有丙酮后, 放置, 过滤沉淀, 滤液加入乙酸乙酯 1:1 等体积进行萃取 3 次, 所得到的乙酸乙酯层浓缩蒸干得到 8.3 g 提取物, 水层浓缩蒸干得到 83.3 g 提取物。

乙酸乙酯层(8.3 g)经过大孔树脂柱层析, 分别用 90% 甲醇水和 50% 丙酮水进行洗脱, 90% 甲醇水洗脱液浓缩蒸干为 7.3 g, 50% 丙酮水洗脱液浓缩蒸干为 700.0 mg。甲醇洗脱部分(7.3 g)经过 200 ~ 300 目硅胶柱层析, 用 CHCl₃/Me₂CO(1:0 ~ 6:4, v/v) 梯度洗脱, 得到 Fr. 1(836.1 mg)、Fr. 2(110.9 mg)、Fr. 3(223.0 mg)、Fr. 4(119.5 mg) 和 Fr. 5(3.85 g)。

Fr. 3(223.0 mg) 经过 500 ~ 600 目硅胶柱层析, 使用 PE/Me₂CO(6:1-0:1, v/v) 梯度洗脱, 得到 Fr. 3-6(4.3 mg) 和 Fr. 3-7(3.0 mg) 经过 HPLC 和制备型液相(PHPLC)纯化得到化合物 1(1.0 mg)。Fr. 3-4(80.0 mg) 经过 500 ~ 600 目硅胶柱层析反复纯化得到化合物 3(4.0 mg)。

Fr. 5(3.85 g) 经过 MCI 树脂柱层析, 流动相为 MeOH/H₂O(30% -100%) 梯度洗脱, 得到 36 个部分。其中, Fr. 5-7 结晶析出化合物 4(20.0 mg), Fr. 5-14 结晶析出化合物 6(3.7 mg), Fr. 10 结晶析出化合物 5(2.8 mg)。Fr. 5-(12-13)(66.6 mg) 经过反复硅胶(500 ~ 600 目)柱层析, 使用 PE/EtOAc(1:0 ~ 5:1 ~ 4:1 ~ 3:1 ~ 1:1 ~ 0:1) 为流动相进行梯度洗

脱, 经凝胶 sephadex LH20 柱层析, 以 CHCl₃/MeOH(1:1) 为流动相纯化得到化合物 7(1.8 mg)、化合物 8(3.0 mg), 经 PTLC 得到化合物 9(3.0 mg)。

Fr. 2(110.9 mg) 经过 200 ~ 300 目硅胶柱层析, 分别以 PE/Me₂CO(4:1) 和 PE/Me₂CO(7:3) 为流动相, 梯度洗脱, 得到两个 fractions, sub-fr. 1(60.0 mg) 和 sub-fr. 2(38.1 mg)。sub-fr. 1(60.0 mg) 经过 500 ~ 600 目硅胶柱层析, 使用 CHCl₃/MeOH 为流动相, 以 80:1 ~ 75:1 ~ 65:1 ~ 60:1 ~ 40:1 ~ 20:1 ~ 0:1 为梯度进行洗脱, 洗脱液经 HPLC 和 PHPL 得到化合物, 化合物 10(10.2 mg) 和化合物 2(6.1 mg)。

Fr. 1(836.1 mg) 经过 500 ~ 600 目硅胶柱层析, 以 CHCl₃/MeOH(1:0 ~ 70:1) 进行梯度洗脱, 通过 PTLC 和 PHPLC 得到化合物 11(4.0 mg)。

2.2 胆碱酯酶抑制活性研究

通过改良的 Ellman 法^[14] 测试胆碱酯酶抑制活性。在 37 °C 恒温条件时, 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-Bcetylthiocholine Iodide, BTCI), 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:

抑制率(%) =

$$\frac{(\text{空白组} - \text{空白对照组}) - (\text{实验组} - \text{实验对照组})}{(\text{空白组} - \text{空白对照组})}$$

× 100%

2.2.1 乙酰胆碱酯酶抑制活性实验

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 mmol/L DTNB 置于 96 孔板中, 混匀, 在 37 °C 预孵 10 min, 然后加 20 μL 0.6 mmol/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。石杉碱甲为阳性对照, IC₅₀ = 13.23 ± 0.33 nM。

2.2.2 丁酰胆碱酯酶抑制活性实验

分别取 10 μL 测试样品溶液, 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 °C 预孵 10 min, 然后再加 20 μ L 0.8 mmol/L BTCl 于 37 °C 恒温反应 30 min, 加 50 μ L 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, $IC_{50} = 87.58 \pm 9.47$ nM。

3 结构鉴定

化合物 1 浅黄色固体 (CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD, 800 MHz) δ : 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.01 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, H-6), 7.20 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 9.60 (1H, s, CHO); ¹³C NMR (CD₃OD, 200 MHz) δ : 115.3 (C-5), 116.2 (C-2), 126.4 (C-6), 130.8 (C-1), 147.2 (C-3), 153.8 (C-4), 193.1 (CHO); ESI-MS: m/z 139 [M + H]⁺。以上波谱数据与文献^[4]对照基本一致, 故鉴定为原儿茶醛。

化合物 2 无色透明固体 (CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.55 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.4 (1H, dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, H-5); ¹³C NMR (CD₃OD, 200 MHz) δ : 168.4 (-COOH), 128.2 (C-5), 131.6 (C-2), 133.6 (C-6), 131.6 (C-1), 138.8 (C-4); ESI-MS: m/z 155 [M + H]⁺。以上波谱数据与文献^[4]对照基本一致, 故鉴定化合物 2 为原儿茶酸。

化合物 3 淡黄色油状物 (CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD, 800 MHz) δ : 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.46 (1H, dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz), 5.90 (1H, m, 2(-H)), 4.58 (2H, s, 3-OH, 4-OH); ¹³C NMR (CD₃OD, 200 MHz) δ : 144.8 (C-3), 143.1 (C-4), 138.2 (C-2'), 131.5 (C-1), 119.4 (C-6), 115.3 (C-5), 114.9 (C-2), 113.8 (C-3'), 39.2 (C-1'); ESI-MS: m/z 189 [M + K]⁺, 323 [2M + Na]⁺。以上波谱数据与化合物 1 的 ¹³C NMR 波谱数据对比并结合文献^[4], 推断化合物 3 为 4-丙烯基儿茶酚。

化合物 4 黄色固体 (CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 9.53 (1H, d, $J = 7.86$ Hz, CHO), 7.51 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, 1(-H)), 7.10 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, 5-H), 7.02 (1H, dd, $J = 1.8, 8.16$ Hz, 6-H), 6.81 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, 2-H), 6.54 (1H, dd, $J = 7.86, 15.72$ Hz); ¹³C NMR (CD₃OD, 200

MHz) δ : 127.6 (C-1), 116.3 (C-2), 147.0 (C-3), 150.7 (C-4), 116.6 (C-5), 123.4 (C-6), 156.5 (C-7), 126.3 (C-8), 196.2 (C-9); ESI-MS: m/z 165 [M + H]⁺。以上波谱数据与文献^[5]对照基本一致, 故鉴定化合物 4 为咖啡醛。

化合物 5 黄色晶体 (CH₃COCH₃); ¹H NMR (CD₃COCD₃, 800 MHz) δ : 12.05 (1H, s, 5-OH), 9.94 (1H, s, 3(-OH)), 9.46 (1H, s, 4(-OH)), 7.48 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, 2(-H)), 6.96 (1H, dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 5(-H)), 5.13 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 6(-H)), 6.65 (1H, br s, 5-OH); ¹³C NMR (CD₃COCD₃, 200 MHz) δ : 95.8 (C-8), 100.8 (C-6), 103.7 (C-3), 106.3 (C-10), 113.8 (C-2'), 120.0 (C-6'), 122.7 (C-1'), 146.3 (C-3'), 150.4 (C-4'), 158.1 (C-9), 161.8 (C-5), 165.7 (C-7), 183.1 (-CO-), 100.5 (Glu-1''), 73.8 (C-2''), 76.8 (C-3''), 70.4 (C-4''), 77.5 (C-5''), 61.7 (C-6''); ESI-MS: m/z 447 [M-H]⁻。以上波谱数据与文献^[6]对照基本一致, 故鉴定化合物 5 为木犀草素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 俗称青兰苷。

化合物 6 棕褐色固体 (CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD, 800 MHz) δ : 7.87 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 2(-H, 6(-H))), 6.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 3(-H, 5(-H))), 6.77 (1H, s, 3-H), 6.65 (1H, s, 8-H), 6.44 (1H, s, 6-H), 5.28 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Glu-H-1''), 5.19 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, Rha-H-6'''), 1.32 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, Rha-H-6'''); ¹³C NMR (CD₃OD, 200 MHz) δ : 102.5 (C-6), 95.9 (C-8), 104.1 (C-3), 107.1 (C-10), 117.1 (C-3(C-5')), 123.1 (C-1'), 129.6 (C-2(C-6')), 158.9 (C-9), 162.9 (C-5), 162.9 (C-4'), 164.4 (C-2), 166.8 (C-7), 184.1 (-CO-), 99.8 (Glu-1''), 79.1 (C-2''), 79.0 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.4 (Glu-6''), 101.0 (Rha-1'''), 72.2 (C-2'''), 72.2 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 70.0 (C-5'''), 18.2 (C-6'''); ESI-MS: m/z 577 [M-H]⁻。以上波谱数据与文献^[7]的对照基本一致, 鉴定化合物 6 为芹菜素-7-O-新橘皮糖苷, 俗称野漆树苷。

化合物 7 黄色固体 (CH₃OH); ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 1.50 (4H, m), 1.55 (2H, m), 1.69 (2H, m), 2.19 (2H, m), 2.29 (2H, m), 3.55 (2H, m), 3.60 (2H, m), 6.06 (1H, dt, $J = 16.0, 4.8$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.70 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.74 (1H, d,

$J = 7.6$ Hz), 6.78 (1H, dt, $J = 15.2, 5.6$ Hz), 6.89 (1H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.7 (C-1), 121.6 (C-2), 147.6 (C-3), 33.7 (C-4), 29.1 (C-5), 30.0 (C-6), 33.2 (C-7), 129.6 (C-8), 131.0 (C-9), 133.8 (C-1'), 106.2 (C-2'), 148.1 (C-3'), 149.4 (C-4'), 109.7 (C-5'), 121.7 (C-6'), 44.4 (C-1''), 27.8 (C-2''), 25.5 (C-3''), 26.8 (C-4''), 48.1 (C-5''); ESI-MS: m/z 288 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。以上波谱数据与文献^[8,9]对照基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 piperonaline。

化合物 8 白色针型晶体 (CH_3OH); ^1H NMR (800 MHz, CD_3OD) δ : 8.05 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4), 7.93 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 7.17 (2H, m, H-5, H-6); ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD) δ : 169.4 (-COOH), 133.3 (C-2), 108.0 (C-3), 122.0 (C-4), 122.4 (C-5), 123.6 (C-6), 112.9 (C-7), 138.2 (C-8), 127.6 (C-9); ESI-MS: m/z 160 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。以上波谱数据与文献^[10]对照基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 吡啶-3-甲酸。

化合物 9 白色无定型粉末 (CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 800 MHz) δ : 0.40 (1H, ddd, 10.7, 9.6 Hz, H-7), 0.62 (1H, ddd, 10.7, 9.6, 6.0 Hz, H-6), 1.01 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-13), 1.17 (3H, s, H-14), 1.19, (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 56.3 (C-1), 23.8 (C-2), 41.1 (C-3), 80.4 (C-4), 48.4 (C-5), 28.2 (C-6), 26.6 (C-7), 20.3 (C-8), 44.4 (C-9), 75.0 (C-10), 29.6 (C-11), 28.7 (C-12), 16.8 (C-13), 24.5 (C-14), 20.3 (C-15); ESI-MS: m/z 239 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 261 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ 。以上波谱数据与文献^[11]对照基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 4', 10'-二羟基-香木兰烷。

化合物 10 白色胶状物 (CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 1.04 (3H, s, H-14), 0.86 (3H, s, H-13), 0.96 (3H, s, H-15), 3.80 (1H, dd, $J = 5.8, 10.1$ Hz, H-2), 3.33 (1H, s, H-9); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 44.1 (C-1), 80.9 (C-2), 75.1 (C-9), 47.6 (C-3), 37.1 (C-4), 50.4 (C-5), 20.7 (C-6), 33.1 (C-7), 34.7 (C-8), 26.0 (C-10), 26.3 (C-11), 35.5 (C-12), 25.4 (C-13), 31.4 (C-14), 28.3 (C-15); EI-MS: m/z 238 $[\text{M}]^+$ 。以上波谱数据与文献^[12]对照基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 (-)-丁香三环烷-2, 9-二醇。

化合物 11 白色无定型粉末 (CH_3OH); ^1H

NMR (CD_3OD , 800 MHz) δ : 7.15 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-7), 4.59 (1H, s, OH-3), 3.75 (1H, m, H-3), 2.28 (3H, s, H-10), 2.30 (1H, dd, $J = 5.0, 1.7$ Hz, H-4a), 1.26 (1H, m, H-2b), 1.65 (1H, dd, $J = 14.4, 9.1$ Hz, H-4b), 1.51 (1H, dd, $J = 12.9, 3.3$ Hz, H-2a); ^{13}C NMR (CD_3OD , 200 MHz) δ : 200.3 (C-9), 145.4 (C-7), 133.8 (C-8), 70.9 (C-6), 68.8 (C-5), 64.4 (C-3), 47.6 (C-2), 41.3 (C-4), 36.1 (C-1), 29.8 (C-10), 27.4 (C-13), 25.1 (C-11), 20.0 (C-12); ESI-MS: m/z 266 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。以上波谱数据与文献^[13]对照基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 (3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*E*)-3, 5, 6-三羟基-7-巨豆烯-9-酮。

4 讨论

阿尔茨海默病(AD)是致命的破坏性神经退行性疾病, 全世界大约有 4.4 亿人患有 AD 或者与痴呆性相关的疾病^[15]。该病的特征是大脑内出现(-)淀粉样蛋白(A β)沉积和细胞内神经原纤维缠结, 并伴有突触功能障碍和神经退行性病变^[16,17]。这种疾病不仅影响人们的健康和生活质量, 而且因为高的治疗成本给社会和家庭带来严重的负担^[18]。胆碱酯酶是目前 AD 药物研发最重要的靶点之一。本研究对华南胡椒进行了系统的化学研究, 并采用改良的 Ellman 法对所有化学成分进行了胆碱酯酶抑制活性测试, 测试结果表明所有化合物在浓度为 30 μM 时, 对乙酰胆碱酯酶不显示抑制活性, 而化合物 **7** 对丁酰胆碱酯酶显示选择性的抑制活性, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 29.06 \pm 0.32 μM 。此外, 我们采用 MTT 法测试了所有化合物对肝癌细胞株(HepG2)的体外细胞毒活性, 测试结果显示所有化合物未显示细胞毒活性。

参考文献

- Xiang CP, Shi YN, Liu FF, *et al.* A Survey of the chemical compounds of *Piper* spp. (Piperaceae) and their biological activities[J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11: 1403-1408.
- Editorial Board of Chinese Herbal Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine of P. R. China(国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Herbal Medicine (Vol. III)(中华本草: 第三卷) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999, 425.
- Liu HY(刘宏宇), Xiao PG(肖培根). Studies on chemical constituents of *Piper austrosinense* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天

- 然产物研究与开发), 1995, 2: 20-23.
- 4 Gao XZ(高晓忠), Zhou CX(周长新), Yao W(姚巍), *et al.* Studies on the chemical constituents in herb of *Ranunculus sceleratus* [J]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*(中国中药杂志), 2005, 30: 124-126.
 - 5 Zhao PJ(赵沛基), Zhu N(珠娜), Shen YM(沈月毛). I-identification of chemical constituent of seed crusts from *Trewia nudiflora* L. [J]. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*(中国药物化学杂志), 2004, 14: 287-290.
 - 6 Youssef D, Frahm AW. Constituents of the *Egyptian centaurea scoparia*; III. phenolic constituents of the aerial parts. *Planta Med*, 1995, 61: 570-573.
 - 7 Itokawa H, Suto K, Takeya K. Studies on a novel *p*-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from *patchouli*(*Labiatae*) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29: 254-256.
 - 8 Lee SE, Park BS, Kim MK, *et al.* Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi [J]. *Crop Protection*. 2001, 20: 523-528.
 - 9 Wu SH, Sun CR, Pei SF, *et al.* Preparative isolation and purification of amides from the fruits of *Piper longum* L. by up-right counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1040: 193-204.
 - 10 Hagemeyer J, Schneider B, Oldham NJ, *et al.* Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 753-758.
 - 11 Wu TS, Chan YY, Leu YL. The constituents of the root and stem of *Aristolochia heterophylla* Hems [J]. *Chem. Pharm. Bull*, 2000, 48: 357(361).
 - 12 Tsui WY, Brown GD. Sesquiterpenes from *Baeckea frutescens* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 1084-1086.
 - 13 Park JH, Lee DG, Yeon S-W, *et al.* Isolation of megastigmane sesquiterpenes from the silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings and their promotion activity on HO-1 and SIRT1 [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2011, 34: 533-542.
 - 14 Loizzo MR, Ben JM, Senatore F, *et al.* Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils [J]. *Food Chem*, 2013, 59: 586-594.
 - 15 Shrestha P, Klann E. Alzheimer's disease: Lost memories found [J]. *Nature*, 2016, 531(7595).
 - 16 Sevigny J, Ping C, Bussière T, *et al.* The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 50.
 - 17 Gou X(勾洵), Huang SY(黄思莹), Yao XM(姚雪梅), *et al.* Effects of total flavone in *Portulacaoleracea* L. on learning and memory of alzheimer's disease mice caused by A β_{25-35} [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 11: 1846-1850.
 - 18 Cauwenbergh CV, Broeckhoven CV, Slegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives [J]. *Genet Med*, 2016, 18: 421-430.
- (上接第 1525 页)
- 17 Chen CP(陈翠平), Pei J(裴瑾), Wu YY(吴沂芸), *et al.* Cloning, bioinformatic analysis of chalcone-flavonone isomerase Gene (*CHI*) and relationship between expression of CHI and accumulation of HSYA in *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Med Mat*(中药材), 2016, 39: 499-503.
 - 18 Li LL(李琳玲), Cheng H(程华), Xu F(许锋), *et al.* Progress of chalcone isomerase in plants [J]. *Lett Biotechnol*(生物技术通讯), 2008, 19: 935-937.
 - 19 Liu F(刘飞). Cloning and functional identification of the genes encoding the key enzymes in the biosynthetic pathway of flavonoids in safflower [D]. Shanghai: The Second Military Medical University(第二军医大学), 2014.
 - 20 Guo DD, Liu FT, He YH, *et al.* Expression patterns of three UGT genes in different chemotype safflower lines and under MeJA stimulus revealed their Potential role in flavonoid biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2016, 11, e0158159.