

# 蒟子的化学成分研究

张潘华<sup>1</sup>, 杨 珺<sup>1</sup>, 罗吉凤<sup>1</sup>, 夏梦媛<sup>1</sup>, 龙春林<sup>2</sup>, 王 俐<sup>3\*</sup>, 王跃虎<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院昆明植物研究所 资源植物与生物技术重点实验室及云南省野生资源植物研发重点实验室, 昆明 650201;

<sup>2</sup>中央民族大学 民族医药教育部重点实验室, 北京 100081; <sup>3</sup> 云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201

**摘要:**采用色谱柱层析及半制备高效液相色谱的分离方法, 以及质谱和核磁共振波谱的鉴定方法, 从蒟子全株中分离、鉴定出了 10 个化合物, 其中 4 个为新的酰胺类成分, 即蒟子酰胺 A~D(**1**~**4**)。已知化合物包括 3 个二肽, 即短蒟酰胺 C~E(**5**~**7**), 以及 3 个酰胺, 即(*E*)-*N*-(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基) 四氢吡咯(**8**)、(*E*)-*N*-(5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基肉桂酰基) 四氢吡咯(**9**)和(*Z*)-*N*-(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基) 四氢吡咯(**10**)。采用 MTS 法测试了 4 个新化合物对 5 种肿瘤细胞株的体外细胞毒活性, 蒟子酰胺 A(**1**) 对人白血病 HL-60 细胞( $IC_{50} = 10.99 \mu M$ )、人肝癌 SMMC-7721 细胞( $IC_{50} = 17.10 \mu M$ )、人肺癌 A-549 细胞株( $IC_{50} = 7.93 \mu M$ )、人乳腺癌 MCF-7 细胞( $IC_{50} = 16.63 \mu M$ ) 和人结肠癌 SW480 细胞( $IC_{50} = 9.16 \mu M$ ) 的生长有抑制活性。

**关键词:**胡椒科; 蒟子; 酰胺; 细胞毒

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)2-0232-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.2.007

## Chemical constituents of *Piper yunnanense*

ZHANG Pan-hua<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, LUO Ji-feng<sup>1</sup>, XIA Meng-yuan<sup>1</sup>, LONG Chun-lin<sup>2</sup>, WANG Li<sup>3\*</sup>, WANG Yue-hu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, and Yunnan Key Laboratory for Wild Plant Resource, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Ethnomedicine (Minzu University of China), Ministry of Education, Beijing 100081, China;

<sup>3</sup>College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract:** Through column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC), 10 compounds were isolated from the whole plants of *Piper yunnanense*. These compounds including four new amides, namely piperunnamides A-D (**1-4**), along with three known dipeptides, piperunnamides C-E (**5-7**), and three known amides, (*E*)-*N*-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl) pyrrolidine (**8**), (*E*)-*N*-(5-methoxy-3,4-methylenedioxcinnamoyl) pyrrolidine (**9**), and (*Z*)-*N*-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl) pyrrolidine (**10**). Their structures were elucidated by MS and NMR spectra. The cytotoxic activity against five tumor cell lines of these new compounds was evaluated by an MTS assay. The result showed that piperunnamide A (**1**) exhibited growth inhibitory activity against human leukemia HL-60 ( $IC_{50} = 10.99 \mu M$ ) cell line, human liver cancer SMMC-7721 ( $IC_{50} = 17.10 \mu M$ ) cell line, human lung cancer A-549 cell line ( $IC_{50} = 7.93 \mu M$ ), human breast cancer MCF-7 cell line ( $IC_{50} = 16.63 \mu M$ ), and human colon cancer SW480 cell line ( $IC_{50} = 9.16 \mu M$ ).

**Key words:** Piperaceae; *Piper yunnanense*; amides; cytotoxicity

胡椒科 (Piperaceae) 胡椒属 (*Piper* Linn.) 植物全球约 2000 种; 中国分布 60 余种, 其中约 30 种为药用植物<sup>[1,2]</sup>。部分胡椒属植物在民间用于治疗癌症, 目前已从胡椒属植物中发现具有细胞毒活性的

酰胺、木脂素、链烯基苯酚 (alkenylphenols)、查尔酮、胡椒内酯 (piperolides) 等类型成分<sup>[1]</sup>。

蒟子 (*Piper yunnanense* Tseng), 别名大麻疙瘩, 产于云南南部、西南部和西北部。生于林中或湿润地, 海拔 1 100 ~ 2 000 m<sup>[2]</sup>。蒟子全株入药, 有舒筋活络、温经行湿、行气止痛的功能, 用于风湿、跌打损伤、胃痛和月经不调等<sup>[3]</sup>。2012 年 6 月, 我们在云南省西双版纳州基诺乡进行了调查时发现, 当地基

收稿日期: 2019-11-01 接受日期: 2019-12-31

基金项目: 民族医药教育部重点实验室 (中央民族大学) 开放课题 (KLEM-KF2018Z01)

\* 通信作者 Tel: 86-871-65223318; E-mail: wangli7159@sina.com, wangyuehu@mail.kib.ac.cn

诺族人将蒟子的根捣碎包敷,用于治疗跌打损伤;傣族人将蒟子的根泡水,当作饮料饮用。但是,至今为止,尚无人报道该药用植物的化学成分。我们对采集于当地的蒟子全株进行化学成分研究,发现4个新的酰胺成分及6个已知化合物(图1),本文报道这4个新化合物的结构解析及其细胞毒活性测试结果。

## 1 仪器与材料

旋光由 JASCO P-1020 旋光仪 (Jasco Corp., Tokyo, Japan) 测定;紫外光谱 (UV) 由 Shimadzu UV-2401 PC 紫外分光光度仪 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测定;ECD 谱由 Chirascan 圆二色谱仪 (Applied Photophysics Ltd., Leatherhead, UK) 测定;红外光谱 (IR) 由 Bruker Tensor 27 FTIR 红外光谱仪 (Bruker Corp., Ettlingen, Germany) 测定 (KBr 压片); $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱由 Bruker DRX-500 核磁共振仪 (Bruker Bio-Spin GmbH, Rheinstetten, Germany) 测定 (TMS 为内标);电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 由 API Qstar Pulsar1 质谱仪 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA) 测定;高分辨电子轰击质谱 (HR-ESI-MS) 由 Waters AutoSpec Premier p776 三扇型双聚焦磁质谱仪 (Waters, Millford, MA, USA) 测定;柱层析用材料包括正相硅胶 G (100 ~ 200 目、300 ~ 400 目)、H 型硅胶 (10 ~ 40  $\mu\text{m}$ ) 和硅胶  $\text{G}_{245}$  (青岛海洋化工厂),反相硅胶 RP- $\text{C}_{18}$  (40 ~ 75  $\mu\text{m}$ , 日本 Fuji Silysia 化学公司), D101 大孔吸附树脂 (青岛海洋化工厂),以及凝胶 Sephadax LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB)。化合物半制备采用 Agilent 1200 型高效液相色谱 (HPLC) 仪,配备色谱柱为 Agilent Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  (9.4  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 和 Waters XBridge prep  $\text{C}_{18}$  (10  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。化合物显色剂为 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -乙醇溶液。

蒟子全株于 2012 年 6 月,采自云南省西双版纳州景洪市基诺乡,由本文作者龙春林教授和杨珺实验师鉴定为 *Piper yunnanense* Tseng, 标本 (2012083) 保存于中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术重点实验室。

## 2 实验方法

### 2.1 提取与分离

将蒟子的全株 (5.7 kg) 干燥后粉碎,用甲醇常温浸渍法提取 4 次,每次 7 天。滤液回收溶剂后,得粗提物 (410 g)。加入水制备成混悬液,依次用石油醚和氯仿萃取后得到石油醚部分 (0.7 g) 和氯仿部

分 (18.0 g)。通过薄层色谱检测后发现,水相还有大量的改良碘化铋钾显色的成分,因此,将水相部分用 D101 大孔吸附树脂进行柱色谱分离,水洗脱部分弃去,90% 乙醇洗脱部分浓缩后得醇洗脱部位 (24.1 g)。将醇洗脱部位用正相硅胶柱层析划段 (氯仿-甲醇, 5:1  $\rightarrow$  1:1, V/V), 最终得到 5 个部分 (A ~ E)。

A 部分 (9.1 g) 经 RP-18 反相硅胶柱层析 (甲醇-水, 5:95  $\rightarrow$  90:10) 洗脱,取 50% 甲醇洗脱部分经 Sephadex LX-20 凝胶 (甲醇) 柱层析,得到 4 个组分样品 (A1 ~ A4)。A1 经正相硅胶柱层析 (石油醚-乙酸乙酯, 3:1) 后,用半制备 HPLC (Agilent Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  柱,流速  $v = 2$  mL/min;乙腈-水, 39:61) 纯化,得到化合物 **1** ( $t_{\text{R}} = 29.427$  min, 3.2 mg) 和 **2** ( $t_{\text{R}} = 43.065$  min, 3.4 mg)。A2 经正相硅胶柱层析 (氯仿-丙酮, 3:1 和 1:1) 后,用半制备 HPLC (Agilent Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  柱,流速  $v = 2$  mL/min;乙腈-水, 43:57;  $t_{\text{R}} = 22.570$  min) 纯化,得化合物 **3** (8.3 mg)。A3 经正相硅胶层析 (氯仿-乙酸乙酯, 5:1 和 3:1) 和 Sephadex LX-20 凝胶柱层析 (甲醇) 后,用半制备 HPLC (Agilent Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  柱,流速  $v = 2$  mL/min;乙腈-水, 43:57;  $t_{\text{R}} = 16.570$  min) 纯化,得到化合物 **4** (3.7 mg)。A4 经正相硅胶 (氯仿-乙酸乙酯, 5:1 和 3:1) 后,用半制备 HPLC (Agilent Zorbax SB- $\text{C}_{18}$  柱,流速  $v = 2$  mL/min;甲醇-水, 55:45) 分离,得到化合物 **10** ( $t_{\text{R}} = 14.341$  min, 3.7 mg)、**8** ( $t_{\text{R}} = 20.896$  min, 3.4 mg) 和 **9** ( $t_{\text{R}} = 28.876$  min, 4.2 mg)。

D 部分 (2.4 g) 经 RP-18 反相硅胶柱层析 (甲醇-水, 5:95  $\rightarrow$  90:10) 后,取 50% 甲醇洗脱部分,进行 Sephadex LX-20 凝胶柱 (甲醇) 和正相硅胶柱 (氯仿-甲醇, 5:1) 层析,最后经过半制备 HPLC [Waters XBridge prep  $\text{C}_{18}$  柱,流速  $v = 2$  mL/min;甲醇-水 (含 0.05% 三氟醋酸), 65:35] 分离,得化合物 **5** ( $t_{\text{R}} = 15.535$  min, 10.0 mg)、**7** ( $t_{\text{R}} = 19.828$  min, 12.2 mg) 和 **6** ( $t_{\text{R}} = 25.963$  min, 6.1 mg)。

### 2.2 细胞毒活性测试

细胞毒活性评价采用 MTS 法,根据文献中提供的方法进行癌细胞生长活性测试<sup>[4,5]</sup>。MTS 为 MTT 类似物,全称为 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfopheny)-2H-tetrazolium。活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能够代谢还原 MTS,生成可溶性的甲臞 (formazan) 化合物,该化合物的光密度 OD (490 nm) 值与活细胞数目成正比。

应用两点法 (Reed and Muench 法) 计算化合物的  $IC_{50}$  值。顺铂和紫杉醇为阳性对照。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 结构鉴定

表 1 化合物 1 的核磁共振氢谱和碳谱数据 (500 MHz 和 125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz, 下同)

Table 1  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data of 1 in  $CDCl_3$  (500 MHz and 125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz, The same below)

Position	$\delta_H$	$\delta_C$	Position	$\delta_H$	$\delta_C$
1		136.3	1''		135.2
2	6.66, 1H, s	105.2	2''	6.65, 1H, d(1.3)	102.4
3		153.1	3''		148.8
4		137.0	4''		134.2
5		153.1	5''		143.4
6	6.66, 1H, s	105.2	6''	6.62, 1H, d(1.3)	107.5
7	4.63, 1H, dd(10.7, 7.5)	41.8	7''	4.59, 1H, dd(10.7, 6.6)	41.6
8	3.66, 1H, dd(10.7, 7.5)	49.2	8''	3.58, 1H, dd(10.7, 6.6)	49.4
9		169.3	9''		169.4
1'	3.14, 1H, m 2.95, 1H, m	45.9	1'''	3.22, 1H, m 3.06, 1H, m	45.8
2'	1.68, 1H, m 1.33, 1H, m	25.9	2'''	1.73, 1H, m 1.45, 1H, m	25.83'
3	1.61, 1H, m 1.47, 1H, m	24.2	3'''	1.63, 1H, m 1.47, 1H, m	24.1
4'	3.33, 1H, m 3.09, 1H, m	45.7	4'''	3.33, 1H, m 3.07, 1H, m	45.7
3,5-OMe	3.87, 6H, s	56.4	5''-OMe	3.91, 3H, s	56.8
4-OMe	3.80, 3H, s	61.0	-OCH <sub>2</sub> O-	5.94, 1H, d(1.3) 5.93, 1H, d(1.3)	101.5

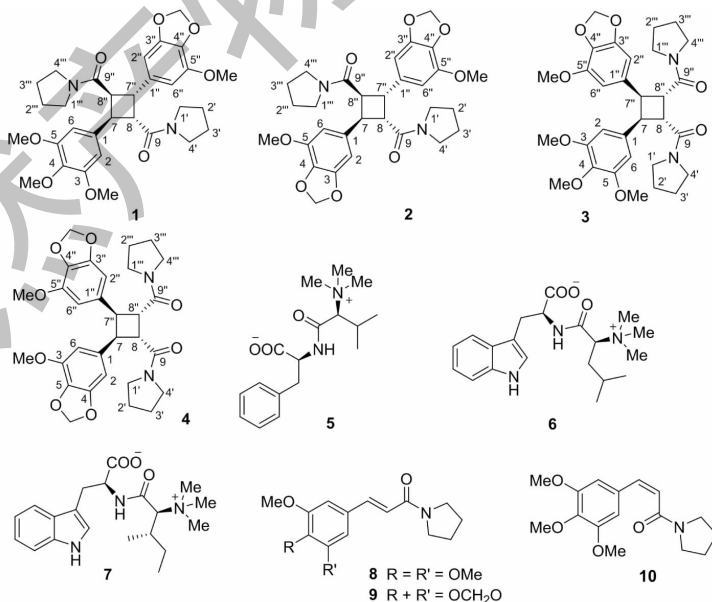


图 1 药子中化合物 1~10 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-10 from *P. yunnanense*

化合物 **1** 的高分辨质谱 (HR-EI-MS) 显示出  $[M]^+$  峰  $m/z$  566. 262 6 (calcd for  $C_{31}H_{38}N_2O_8$ , 566. 262 8), 推断其分子式为  $C_{31}H_{38}N_2O_8$ , 不饱和度 14。 $^1H$  NMR 谱 (表 1) 中显示有 4 个甲氧基 [ $\delta_H$  3. 91 (3H, s), 3. 87 (6H, s) 和 3. 80 (3H, s)], 1 个亚甲二氧基 [ $\delta_H$  5. 94 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz) 和 5. 93 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz)], 以及两个四取代苯环 [ $\delta_H$  6. 66 (2H, s), 6. 65 (d,  $J = 1.3$  Hz) 和 6. 62 (d,  $J = 1.3$  Hz)] 的信号。 $^{13}C$  NMR 谱 (表 1) 显示该化合物存在 2 个酰胺羰基 ( $\delta_C$  169. 4 和 169. 3), 4 个甲氧基, 1 个亚甲二氧基, 两个苯环, 两个四氢吡咯片段, 以及 4 个次甲基 ( $\delta_C$  49. 4, 49. 2, 41. 8 和 41. 6)。

通过分析以上波谱特征, 并把化合物 **1** 的 NMR 数据跟已知化合物 (*E*)-*N*-(3, 4, 5-三甲氧基肉桂酰

基) 四氢吡咯 [*(E)*-*N*-(3, 4, 5-trimethoxycinnamoyl) pyrrolidine, **8**]<sup>[6]</sup> 和 (*E*)-*N*-(5-甲氧基-3, 4-亚甲二氧基肉桂酰基) 四氢吡咯 [*(E)*-*N*-(5-methoxy-3, 4-methylenedioxcinnamoyl) pyrrolidine, **9**]<sup>[7]</sup> 的 NMR 数据进行对比, 推测化合物 **1** 很可能是化合物 **8** 与 **9** 通过 [2 + 2] 光环合加成的产物。从化合物 **1** 的 EI-MS 谱碎片离子峰 (图 2) 推测, 该化合物是头对尾的 [2 + 2] 加成产物。其平面结构通过 COSY 和 HMBC 相关 (图 3) 得到确认。在 HMBC 谱中, H-2 和 H-6 跟 C-7, 以及 H-7 跟 C-2 和 C-6 有相关, 说明 3, 4, 5-三甲氧基苯基连接在 C-7 上; H-2'' 和 H-6'' 跟 C-7'', 以及 H-7'' 跟 C-2'' 和 C-6'' 有相关, 说明 5-甲氧基-3, 4-亚甲二氧基连接在 C-7'' 上, 进一步确证了化合物 **1** 是头对尾的 [2 + 2] 加成产物。

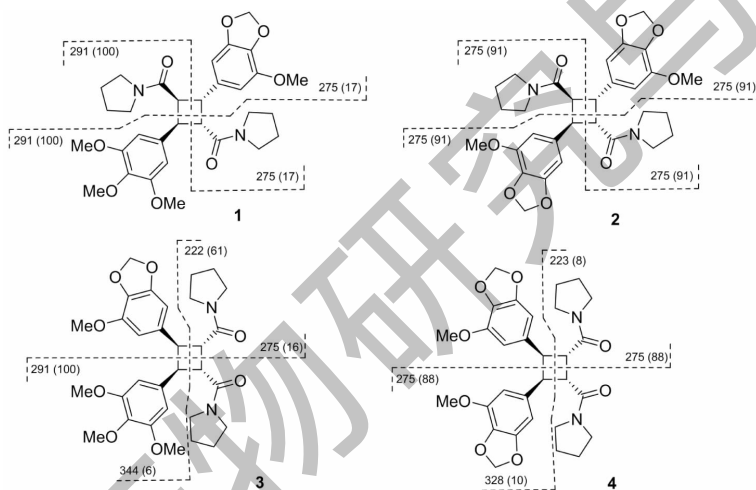


图 2 化合物 **1**~**4** 的 EI-MS 裂解碎片

Fig. 2 EI-MS fragments of compounds **1-4**

注: 括号中为相对丰度。Note: Relative intensities in brackets.

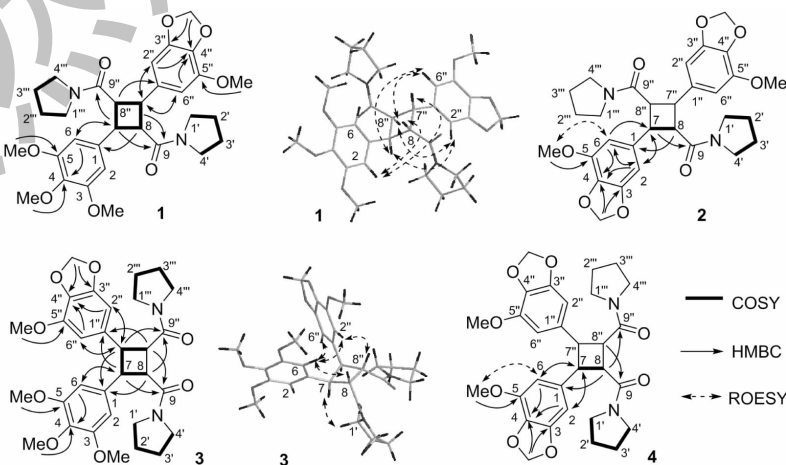


图 3 化合物 **1**~**4** 关键的 2D NMR 相关

Fig. 3 2D NMR correlations of compounds **1-4**

根据 ROESY 相关(图 3)来判断化合物 **1** 的相对构型, H-7 与 H-8'' 跟 H-2'' 和 H-6'' 有相关, 表明这些氢原子均位于平面的一侧; 而 H-8 与 H-7'' 跟 H-2 和 H-6 有相关, 表明这些氢原子位于平面的另

一侧。这样, 化合物 **1** 的相对构型得以确定, 命名为蒟子酰胺 A (piperinamide A)。由于该化合物的圆二色谱(CD)无信号, 推测为消旋体。我们尝试进行手性拆分, 但没有成功。

表 2 化合物 **2** 和 **4** 的核磁共振氢谱和碳谱数据

Table 2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **2** and **4**

Position	<b>2</b>		<b>4</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1,1''		135.1		134.6
2,2''	6.63, 2H, d(1.4)	102.4	6.22, 2H, d(1.0)	102.0
3,3''		148.8		148.8
4,4''		134.2		133.7
5,5''		143.4		143.3
6,6''	6.60, 2H, d(1.4)	107.5	6.10, 2H, d(1.0)	108.1
7,7''	4.57, 2H, dd(10.4, 7.0)	41.6	4.29, 2H, m	45.5
8,8''	3.61, 2H, dd(10.4, 7.0)	49.3	3.69, 2H, m	43.9
9,9''		169.3		170.4
1',1'''	3.19, 2H, m 3.03, 2H, m	45.9	3.27, 4H, m	46.6
2',2'''	1.73, 2H, m 1.43, 2H, m	25.9	1.88, 4H, m	26.4
3',3'''	1.62, 2H, m 1.53, 2H, m	24.2	1.83, 4H, m	24.3
4',4'''	3.33, 2H, m 3.10, 2H, m	45.7	3.50, 4H, t(7.0)	46.3
5,5''-OMe	3.90, 6H, s	56.8	3.73, 6H, s	56.7
-OCH <sub>2</sub> O-	5.93, 2H, d(1.4) 5.92, 2H, d(1.4)	101.5	5.87, 4H, br s	101.4

化合物 **2** 的高分辨 EI 质谱显示出  $[\text{M}]^+$  峰  $m/z$  550.231 0 (calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$ , 550.231 5), 推断其分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$ , 不饱和度 15。从分子式来看, 该化合物应该有 30 个碳, 但其  $^{13}\text{C}$  NMR 谱(表 2)中只能看到 15 个信号(1 个苯环, 1 个甲氧基, 1 个亚甲二氧基, 1 个羰基, 1 个四氢吡咯基, 以及 2 个高场次甲基), 推测其具有分子内对称结构。将该化合物的 NMR 数据(表 2)跟化合物 **1** 及已知化合物 (*E*)-*N*-(5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基肉桂酰基)四氢吡咯(**9**)的 NMR 数据进行对比, 并结合 EI-MS 裂解碎片分析(图 2), 推测化合物 **2** 是由两分子 (*E*)-*N*-(5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基肉桂酰基)四氢吡咯的头对尾[2+2]光环合加成的产物。化合物 **2** 的 H-7 和 H-7'' ( $\delta_{\text{H}}$  4.57, 2H, dd,  $J = 10.4, 7.0$  Hz), 以及 H-8 和 H-8'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.61, 2H, dd,  $J = 10.4, 7.0$  Hz) 的化学位移及偶合常数跟 **1** 这几个氢的数据

(表 1) 基本一致, 因此, 推测其相对构型跟 **1** 的一致。把化合物 **2** 命名为蒟子酰胺 B (piperunnamide B)。

化合物 **3** 的高分辨 EI 质谱显示出  $[\text{M}]^+$  峰  $m/z$  566.262 8 (calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$ , 566.262 8), 推断其分子式为  $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$ , 不饱和度 14, 其分子式跟蒟子酰胺 A (**1**) 完全一样, 是后者的同分异构体。跟蒟子酰胺 A 一样, 化合物 **3** 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱(表 3)也显示该化合物存在 2 个酰胺羰基 ( $\delta_{\text{C}}$  170.5 和 170.4), 4 个甲氧基, 1 个亚甲二氧基, 两个四氢吡咯, 以及 4 个高场次甲基 ( $\delta_{\text{C}}$  45.7、45.7、43.9 和 43.8)。结合化合物 **3** 的 EI-MS 谱碎片离子峰(图 2)推测, 该化合物是化合物 **8** 和 **9** 头对头的[2+2]加成产物。HMBC 相关中(图 3), 可以看到 H-2 和 H-6 跟 C-7, 以及 H-7 跟 C-2 和 C-6 的相关, 说明 3, 4, 5-三甲氧基苯基连接在 C-7 位; H-2'' 和 H-6'' 跟

表 3 化合物 3 的核磁共振氢谱和碳谱数据

Table 3  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **3**

Position	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		135.4	1''		134.5
2	6.16, 1H, s	105.6	2''	6.25, 1H, d(1.1)	102.0
3		152.8	3''		148.8
4		136.7	4''		133.7
5		152.8	5''		143.3
6	6.16, 1H, s	105.6	6''	6.06, 1H, d(1.1)	108.4
7	4.34, 1H, m	45.7	7''	4.25, 1H, m	45.7
8	3.72, 1H, m	43.8	8''	3.72, 1H, m	43.9
9		170.4	9''		170.5
1'	3.31, 2H, m	46.6	1'''	3.28, 2H, m	46.6
2'	1.87, 2H, m	26.9	2'''	1.87, 2H, m	26.9
3'	1.83, 2H, m	24.3	3'''	1.83, 2H, m	24.2
4'	3.50, 2H, m	46.3	4'''	3.50, 2H, m	46.3
3,5-OMe	3.68, 6H, s	56.3	5''-OMe	3.69, 3H, s	56.8
4-OMe	3.74, 3H, s	61.0	-OCH <sub>2</sub> O-	5.86, 1H, d(1.4) 5.85, 1H, d(1.4)	101.4

C-7'', 以及 H-7'' 跟 C-2'' 和 C-6'' 的相关, 说明 5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基连接在 C-7'' 上, 进一步证实了化合物 **3** 是头对头的 [2 + 2] 加成产物。

根据 ROESY 相关(图 3) 可判断化合物 **3** 的相对构型, H-2、H-6、H-8 和 H-8'' 跟 H-2'' 和 H-6'' 有相关, 表明这些氢原子均位于平面的一侧; 而 H-7 与 H-7'' 跟 H<sub>2</sub>-1' 和 H<sub>2</sub>-1''' 有相关, 表明这些氢原子位于平面的另一侧。这样, 化合物 **3** 的相对构型得以确定, 给俗名莨菪子酰胺 C (piperunnamide C)。

化合物 **4** 的高分辨 EI 质谱显示出 [M]<sup>+</sup> 峰  $m/z$  550.229 8 (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 550.231 5), 推断其分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 不饱和度 15, 是化合物 **2** 的同分异构体。从分子式来看, 该化合物应该有 30 个碳, 但其 <sup>13</sup>C NMR 谱(表 2) 中只能看到 15 个信号 (1 个苯环, 1 个甲氧基, 1 个亚甲二氧基, 1 个羰基, 1 个四氢吡咯基, 以及 2 个高场次甲基), 推测其具有分子内对称结构。将该化合物的 NMR 数据(表 2) 跟化合物 **3** 及化合物 **9** 的 NMR 数据进行对比, 结合 EI-MS 裂解碎片分析(图 2), 推测化合物 **4** 是两分子 (*E*)-*N*-(5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基肉桂酰基) 四氢吡咯的头对头 [2 + 2] 光环合加成的产物。化合物 **4** 的 H-7 和 H-7'' ( $\delta_{\text{H}}$  4.29, 2H, m), C-7 和 C-7'' ( $\delta_{\text{C}}$  45.5), H-8 和 H-8'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.69, 2H, m), 以及

C-8 和 C-8'' ( $\delta_{\text{C}}$  43.9) 的化学位移跟 **3** 这几个位置氢和碳的数据(表 3) 基本一致, 因此, 推测其相对构型跟 **3** 的一致。把化合物 **4** 命名为莨菪子酰胺 D (piperunnamide D)。

通过跟文献中的化合物对比波谱数据, 已知化合物分别鉴定为短莨菪酰胺 C (piperunnamide C, **5**)<sup>[8]</sup>, 短莨菪酰胺 D (piperunnamide D, **6**)<sup>[8]</sup>, 短莨菪酰胺 E (piperunnamide E, **7**)<sup>[8]</sup>, (*E*)-*N*-(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基) 四氢吡咯 [ (*E*)-*N*-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl) pyrrolidine, **8**]<sup>[6]</sup>, (*E*)-*N*-(5-甲氧基-3,4-亚甲二氧基肉桂酰基) 四氢吡咯 [ (*E*)-*N*-(5-methoxy-3,4-methylenedioxycinnamoyl) pyrrolidine, **9**]<sup>[7]</sup>, 以及 (*Z*)-*N*-(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基) 四氢吡咯 [ (*Z*)-*N*-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl) pyrrolidine, **10**]<sup>[9]</sup>。

### 3.2 化合物的物理常数

莨菪子酰胺 A (piperunnamide A, **1**) 白色粉末 (CHCl<sub>3</sub>); UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log $\epsilon$ ) 275 (2.81), 240 (3.39), 207 (4.08) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  1 631, 1 452, 1 383, 1 049 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据见表 1; EI-M:  $m/z$  (rel. int.) 566 [M]<sup>+</sup> (38), 468 (19), 291 (100), 275 (17), 221 (67), 205 (47); ESI-MS:  $m/z$  589 [M + Na]<sup>+</sup>; HR-EI-MS  $m/z$ : 566.262 6 [M]<sup>+</sup>

(calcd for  $C_{31}H_{38}N_2O_8$ , 566.262 8)。

蒟子酰胺 B (piperunnamide B, **2**) 白色粉末 ( $CHCl_3$ ); UV ( $CH_3OH$ )  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 276 (3.68), 245 (4.17), 210 (4.87) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  1 632, 1 511, 1 448, 1 439, 1 383, 1 197, 1 133, 1 093, 1 045  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据见表 2; EI-MS:  $m/z$  (rel. int.) 550  $[M]^+$  (68), 305 (100), 275 (91), 206 (80); ESI-MS:  $m/z$  573  $[M + Na]^+$ , HR-EI-MS:  $m/z$  550.231 9  $[M]^+$  (calcd for  $C_{30}H_{34}N_2O_8$ , 550.231 5)。

蒟子酰胺 C (piperunnamide C, **3**) 白色粉末 ( $CHCl_3$ ); UV ( $CH_3OH$ )  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 274 (3.37), 240 (4.08), 206 (4.88) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  1 632, 1 511, 1 451, 1 126, 1 094, 1 045  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据见表 3; EI-MS:  $m/z$  (rel. int.) 566  $[M]^+$  (15), 344 (6), 291 (100), 275 (16), 222 (62); ESI-MS:  $m/z$  589  $[M + Na]^+$ , HR-EI-MS:  $m/z$  566.262 8  $[M]^+$  (calcd for  $C_{31}H_{38}N_2O_8$ , 566.262 8)。

蒟子酰胺 D (piperunnamide D, **4**) 白色粉末 ( $CHCl_3$ ); UV ( $CH_3OH$ )  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) 280 (3.49), 244 (4.03), 208 (4.84) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$  1 631, 1 512, 1 451, 1 384, 1 199, 1 131, 1 092, 1 046  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR 和  $^{13}C$  NMR 数据见表 2; EI-MS:  $m/z$  (rel. int.) 550  $[M]^+$  (10), 328 (10), 275 (88), 223 (8), 206 (100);

表 4 蒟子中化合物 **1**~**4** 对 5 株肿瘤细胞生长抑制作用

Table 4 The growth-inhibitory activity of compounds **1**~**4** from *P. yunnanense* against five tumor cell lines

化合物 Compound	半数抑制浓度 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )				
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
<b>1</b>	10.99	17.10	7.93	16.63	9.16
<b>2</b>	>40	>40	>40	>40	>40
<b>3</b>	>40	>40	>40	>40	>40
<b>4</b>	>40	>40	>40	>40	>40
顺铂 Cisplatin	1.93	11.83	12.40	18.34	18.10
紫杉醇 Paclitaxel	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008	<0.008

注:每个试验重复 3 次;  $IC_{50}$  值是根据 3 次试验所得抑制率的平均值计算出来的;顺铂和紫杉醇为阳性对照。

Note: All experiments were repeated three times;  $IC_{50}$  values were calculated from the mean inhibition value at each concentration; Cisplatin and paclitaxel are positive control.

#### 4 结论

从蒟子全株中分离、鉴定出了 10 个化合物,其中 4 个为新的酰胺类成分,所有化合物均是首次从该植物中发现。蒟子酰胺 A (**1**) 对人白血病 HL-60 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人肺癌 A-549 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人结肠癌 SW480 细胞的生长有抑制活性。为了更好地开发利用这个药用植物,有必要对其开展更深入的化学成分研究和药理活性评价。

ESI-MS:  $m/z$  573  $[M + Na]^+$ , HR-EI-MS:  $m/z$  550.229 8  $[M]^+$  (calcd for  $C_{30}H_{34}N_2O_8$ , 550.231 5)。化合物 **1**~**4** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 ([www.trew.ac.cn](http://www.trew.ac.cn))。

#### 3.3 细胞毒活性测试结果

测试了 4 个新化合物对 5 种肿瘤细胞株的体外细胞毒活性,结果见表 4。蒟子酰胺 A (**1**) 对人白血病 HL-60 细胞 ( $IC_{50} = 10.99 \mu M$ )、人肝癌 SMMC-7721 细胞 ( $IC_{50} = 17.10 \mu M$ )、人肺癌 A-549 细胞株 ( $IC_{50} = 7.93 \mu M$ )、乳腺癌 MCF-7 细胞 ( $IC_{50} = 16.63 \mu M$ ) 和结肠癌 SW480 细胞 ( $IC_{50} = 9.16 \mu M$ ) 的生长有抑制活性。其余 3 个化合物没有活性 ( $IC_{50} > 40 \mu M$ )。

在此前的研究中,我们注意到,胡椒属植物中的酰胺类成分,如果其分子结构中具有 3,4,5-三甲氧基苯基片段,该化合物可能会显示出较好的细胞毒活性,比如葶拔明碱 (piperlongumine)<sup>[1]</sup>。我们也因此合成了一些含有这种结构片段的酰胺类成分<sup>[10]</sup>。化合物 **1** 和 **3** 含有 3,4,5-三甲氧基苯基片段,化合物 **2** 和 **4** 没有这种结构片段。化合物 **1** 具有细胞毒活性,符合上述构效关系 (structure-activity relationship) 的预测;化合物 **3** 没有活性,可能是由于其立体构型的差异造成的。

致谢:在云南省西双版纳州景洪市基诺乡调查

时,得到基诺族村民阿妹和周布鲁的帮助;同时,刘洪新和谭英也参与了此次调查,在此一并致谢。

#### 参考文献

- 1 Wang YH, Morris-Natschke SL, Yang J, et al. Anticancer principles from medicinal *Piper* plants [J]. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4 (1): 8-16.

(下转第 256 页)