

海风藤中酰胺生物碱类成分研究

朱莹¹,孔江波¹,孙潘婷¹,孙彦君^{1,2},冯卫生^{1,2},李玉贤^{1,2*},陈辉^{1,2*}¹河南中医药大学药学院;²呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,郑州 450046

摘要:为研究海风藤的化学成分及生物活性,本研究利用正、反相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 及制备液相等色谱分离技术对海风藤茎中的化学成分进行分离纯化,并结合多种波谱技术鉴定出 13 个酰胺生物碱类化合物,分别为 (2*E*,4*E*)-*N*-isobutyl-6-oxodeca-2,4-dienamide (**1**)、(4,5)-*trans*-*N*-isobutyl-4,5-epoxy-2*E*-decadienamide (**2**)、*N*-isobutyl-4-hexanoyl-4-hydroxypyrrolidin-1-one (**3**)、sylvamide (**4**)、*N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadienamide (**5**)、pellitorine (**6**)、*N*-isobutyl-2*E*,4*E*-dodecadienamide (**7**)、*N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadecadienamide (**8**)、*N*-2'-methylbutyl-2*E*,4*E*-decadienamide (**9**)、*N*-isobutyl-2*E*,4*E*,12*Z*-octadecatrienamide (**10**)、*N*-isobutyl-2*E*-decenamide (**11**)、二氢萘发明宁碱 (**12**)、风藤酰胺 (**13**)。化合物 **1** 为新化合物,化合物 **2** 为新天然产物,化合物 **3**~**7**、**9**、**10** 为首次从该植物中分离得到。采用 MPP⁺ 致损伤的 PC12 细胞模型对分离得到的化合物 **1**~**10** 进行体外神经保活性测试,化合物 **6** 在 20 μM 时,对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤具有显著的保护作用 ($P < 0.01$)。

关键词:海风藤;化学成分;酰胺类生物碱;神经保护活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)9-1506-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.008

Amide alkaloids from the stems of *Piper kadsura*ZHU Ying¹, KONG Jiang-bo¹, SUN Pan-ting¹, SUN Yan-jun^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}, LI Yu-xian^{1,2*}, CHEN Hui^{1,2*}¹School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine; ²Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease by Henan & Education Ministry of China, Zhengzhou 450046, China

Abstract: To study the chemical constituents and biological activities of *Piper kadsura*. The chemical constituents of the stems of *Piper kadsura* were purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 and preparative liquid chromatography. Based on various spectroscopic methods, 13 amide alkaloids were identified as (2*E*,4*E*)-*N*-isobutyl-6-oxodeca-2,4-dienamide (**1**), (4,5)-*trans*-*N*-isobutyl-4,5-epoxy-2*E*-decadienamide (**2**), *N*-isobutyl-4-hexanoyl-4-hydroxypyrrolidin-1-one (**3**), sylvamide (**4**), *N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadienamide (**5**), pellitorine (**6**), *N*-isobutyl-2*E*,4*E*-dodecadienamide (**7**), *N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadecadienamide (**8**), *N*-2'-methylbutyl-2*E*,4*E*-decadienamide (**9**), *N*-isobutyl-2*E*,4*E*,12*Z*-octadecatrienamide (**10**), *N*-isobutyl-2*E*-decenamide (**11**), dihydropiperlonguminimine (**12**) and futoamine (**13**). Compound **1** was a new compound, compound **2** was a new natural product, and compounds **3**-**7**, **9** and **10** were isolated from this plant for the first time. The neuroprotective activity of compounds **1**-**10** were tested *in vitro* by using MPP⁺ injured PC12 cell, compound **6** displayed a significant protective effect on MPP⁺ induced PC12 cell injury at 20 μM ($P < 0.01$).

Key words: *Piper kadsura*; chemical constituents; amide alkaloids; neuroprotective activity

海风藤为胡椒科 Piperaceae 胡椒属植物风藤 *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi 的干燥藤茎,主产于我国台湾、云南、广东等地。海风藤味辛、苦,性微温,

归肝经,具有“祛风湿,通经络,止痹痛”等功效,临床上用于治疗风寒湿痹,肢节疼痛等症^[1,2]。药理研究表明海风藤在治疗阿尔兹海默症,抗炎,镇痛和器官缺血再灌注等方面具有显著的药用价值^[3-7]。化学成分研究发现海风藤中主要含有新木脂素类、生物碱类、黄酮类、挥发油等成分^[8,9],其中酰胺生物碱类成分是该属植物中的特征成分,且含量较大,在海风藤中亦有报道。目前国内外学者对海风藤的

收稿日期:2021-03-03 接受日期:2021-05-21

基金项目:国家自然科学基金(21602047);河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2017GGJS-081);河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(202102310509)

* 通信作者 E-mail: lyx@hactcm.edu.cn, chenhuixy@hactcm.edu.cn

研究主要集中于其中的新木脂素类及其在治疗和预防阿尔兹海默症、缺血性脑血管病等方面^[3-7],但对于该植物中的酰胺生物碱类化合物报道较少。帕金森病(PD)是仅次于阿尔兹海默症第二常见的神经退行性疾病,近年来研究发现含有海风藤的一些中药复方或制剂对于PD具有较好的改善作用^[10-12],但缺少相应的化学成分研究基础。基于以上问题,我们开展了海风藤中酰胺生物碱类成分的研究,并采用MPP⁺致损伤PC12细胞构建PD细胞模型,对分离得到的化合物进行体外神经保活性筛选,为后续该植物活性成分的开发和利用提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Bruker AVANCE III 500 MHz 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);Bruker maxis HD 型飞行时间质谱(德国 Bruker 公司);N-1000 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHB-B 95A 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DFZ-3 型真空干燥箱(上海医用恒温设备厂);赛谱锐思 LC 52 型高压制备液相色谱仪(赛谱锐思北京科技有限公司,SP 5030 型半制备型高压输液泵,UV 200 型紫外检测器,Easychrom 型色谱工作站;色谱柱为 YMC-Pack ODS-A,250 mm × 20 mm,5 μm);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司);薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶(200 ~ 300 目,青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司);ODS(40 ~ 60 μm YMC);甲醇,色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司);其他试剂均为分析级;薄层层析硅胶选用 10 ~ 40 μm 的粒径,以 0.5% CMC-Na 制板,阴干,105 °C 活化 0.5 h;MPP⁺(Sigma),MTS(Promega)。

海风藤于 2018 年 6 月采购于安徽亳州药材市场,经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为胡椒科胡椒属植物风藤 *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi 的干燥藤茎,标本存放于河南中医药大学中药化学研究室(标本号 ID-201806091)。

1.2 提取与分离

海风藤药材粗粉(40 kg),采用二氯甲烷冷浸提取,每次 24 h,共提取 3 次,继续用甲醇冷浸提取;提取液经减压浓缩,得到二氯甲烷部位浸膏 600 g,甲醇部位浸膏 450 g。将二氯甲烷部位总浸膏进行硅胶柱色谱分离,以石油醚-丙酮系统(100:0→0:100)梯度洗脱,共分离得到 13 个流分(Fr. 1 ~ 13)。流分

Fr. 7 经中压柱色谱分离,依次用甲醇-水(30% → 100% 甲醇)梯度洗脱,得 6 个亚流分(Fr. 7-1 ~ Fr. 7-6)。将 Fr. 7-3 经半制备型 HPLC 制备(甲醇-水 70%)制备得化合物 **9**(20 mg, $t_R = 28$ min),将 Fr. 7-5 经硅胶柱色谱分离(石油醚:丙酮),再经半制备型 HPLC 制备得化合物 **8**(2.6 mg, $t_R = 22$ min)。流分 Fr. 8 经中压柱色谱分离,依次用甲醇-水(30% → 100% 甲醇)梯度洗脱,得 7 个亚流分(Fr. 8-1 ~ Fr. 8-7)。将 Fr. 8-3 经硅胶柱色谱分离,依次用石油醚:丙酮(100:0→0:100)梯度洗脱,再结合制备型 HPLC 制备(甲醇-水 60%)得化合物 **1**(5 mg, $t_R = 40$ min)、**2**(6 mg, $t_R = 66$ min)、**3**(14 mg, $t_R = 60$ min)、**4**(10 mg, $t_R = 80$ min)、**6**(8 mg, $t_R = 120$ min)。将 Fr. 8-4 经硅胶柱色谱分离,依次用石油醚:丙酮(100:0→0:100)梯度洗脱,再结合制备型 HPLC 制备(甲醇-水 70%)得化合物 **7**(2.5 mg, $t_R = 68$ min)、**11**(1.5 mg, $t_R = 57$ min)。将 Fr. 8-6 经硅胶柱色谱分离,依次用石油醚:丙酮(100:0→0:100)梯度洗脱,再结合半制备型 HPLC 制备(甲醇-水 90%)得化合物 **5**(2.6 mg, $t_R = 26$ min)、**10**(3 mg, $t_R = 25$ min)。将甲醇部位总浸膏进行硅藻土柱色谱分离,得石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯及甲醇 4 部位样品。将乙酸乙酯部位总浸膏进行硅胶柱色谱分离,以石油醚-丙酮系统(50:1→0:100)梯度洗脱,共分离得到 8 个流分(Fr. E1 ~ E8)。将组分 Fr. E3 经凝胶柱色谱分离,再结合制备型 HPLC 制备(甲醇-水 75%)得化合物 **12**(5.5 mg, $t_R = 68$ min)、**13**(3.5 mg, $t_R = 57$ min)。

1.3 体外神经保护活性测试

PC12 低分化细胞置于 10% FBS 及 100 U/mL 的 DMEM 高糖双抗的培养基中,并在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养至合适数量,用胰酶消化制成细胞悬液吸至 15 mL 离心管中,800 rpm,离心 5 min 后弃上清,加入新的完全培养基 5 mL,用移液器吹打 10 次,尽量吹散细胞,取 0.02 mL 细胞悬液加入到细胞计数板中,计数。将细胞浓度调整至 1 × 10⁵ 个/mL 接种到 96 孔板继续培养。23 h 后,吸出培养基,根据加入成分不同分成 3 组,每组平行重复 3 次^[13]。空白对照组:只加入新培养基;模型组:加入培养基及终浓度 750 μM MPP⁺,24 h 后,加入 MTS,2 h 后,读值检测;药物组:加入培养基及终浓度 20 μM 化合物,再加终浓度 750 μM MPP⁺,24 h 后,加

入 MTS, 2 h 后, 读值检测。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶 (CHCl_3); mp. 133.2 $^{\circ}\text{C}$; UV 光谱中显示该化合物在甲醇溶液中的最大吸收为 276 nm; IR 光谱显示有胺基 ($3\ 315\ \text{cm}^{-1}$) 和共轭羰基 ($1\ 648\ \text{cm}^{-1}$) 等特征吸收峰; HR-ESI-MS: $m/z\ 238.180\ 9\ [\text{M} + \text{H}]^+$ (计算值为 238.180 2), 确定化合物 1 的分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_2$, 计算不饱和度为 4。 ^1H NMR 谱中 (表 1), 低场区显示有 2 组烯烃质子信号 $\delta_{\text{H}}\ 6.26\ (1\text{H}, \text{d}, J = 14.6\ \text{Hz}, \text{H-2})$, $7.29\ (1\text{H}, \text{dd}, J = 14.6, 11.6\ \text{Hz}, \text{H-3})$ 和 $7.20\ (1\text{H}, \text{dd}, J = 15.1, 11.6\ \text{Hz}, \text{H-4})$, $6.46\ (1\text{H}, \text{d}, J = 15.1\ \text{Hz}, \text{H-5})$, 根据其偶合常数推测分子中存在 2 个反

式双键。此外, $\delta_{\text{H}}\ 5.84$ 处的质子信号, 结合 HSQC 谱, 推测为胺基活泼质子信号。高场区 $\delta_{\text{H}}\ 3.21 \sim 1.36$ 之间出现 4 个亚甲基质子信号 $\delta_{\text{H}}\ 3.21\ (2\text{H}, \text{t}, J = 6.3\ \text{Hz}, \text{H-1}')$, $2.59\ (2\text{H}, \text{t}, J = 7.3\ \text{Hz}, \text{H-7})$, $1.63\ (2\text{H}, \text{m}, \text{H-8})$, $1.36\ (2\text{H}, \text{m}, \text{H-9})$ 和 1 个次甲基质子信号 $\delta_{\text{H}}\ 1.84\ (1\text{H}, \text{m}, \text{H-2}')$ 。此外, 高场区还显示 3 个甲基质子信号 $\delta_{\text{H}}\ 0.94\ (6\text{H}, \text{d}, J = 6.2\ \text{Hz}, \text{H-3}', 4')$, $0.92\ (3\text{H}, \text{t}, J = 7.3\ \text{Hz}, \text{H-10})$ 。 ^{13}C NMR 谱中共显示 14 个碳信号, 进一步结合 DEPT 和 HSQC 谱确定化合物 1 显示有 2 个羰基碳信号 $\delta_{\text{C}}\ 200.3\ (\text{C-6})$, $165.1\ (\text{C-1})$, 4 个双键碳信号, 4 个亚甲基碳信号, 1 个次甲基碳信号以及 3 个甲基碳信号。综合以上光谱数据信息, 推测化合物 1 为酰胺类生物碱 (见图 1)。

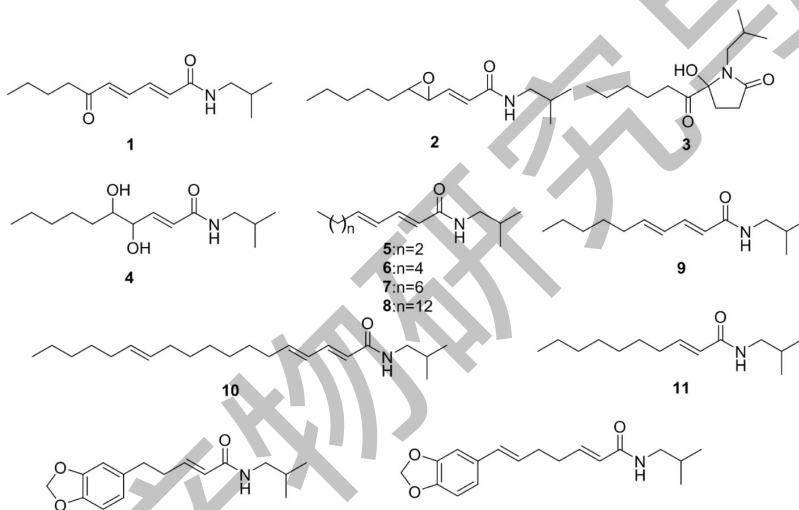


图 1 化合物 1~13 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-13

$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱中 (图 2) H-3 与 H-4 有相关, 说明分子中的 2 个反式双键以 1,3 共轭的形式存在; H-7 与 H-8, H-8 与 H-9, H-9 与 H-10 存在相关, 证明该化合物存在 1 个正丁基片段; H-1' 与 H-2', -NH-, H-2' 与 H-3', 4' 存在相关, 证明该化合物有异丁基片段, 且与氨基相连形成 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ 结构片段。HMBC 谱 (见图 2) 中, H-3 与 $\delta_{\text{C}}\ 165.1$ 处的羰基碳 (C-1) 及 C-5 有明显远程相关, H-4 与 $\delta_{\text{C}}\ 200.3$ 处羰基碳 (C-6) 及 C-2 有远程相关, 说明这 2 个羰基碳分别与 1,3 共轭双键上的 C-2 和 C-5 相连; H-7 与 C-9 有相关, H-8 与羰基碳 C-6 及 C-10 有相关, 证明 6 位羰基碳与正丁基片段通过 C-7 相连; 此外, H-1' 与 3', C-4' 及 C-1 有相关, H-2' 与 C-4' 有相关, 证

明 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ 结构片段与 1 位羰基碳相连。综上所述, 确定该化合物为 $(2E,4E)-N$ -isobutyl-6-oxodeca-2,4-dienamide。其 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1。化合物 1 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trcw.ac.cn)。

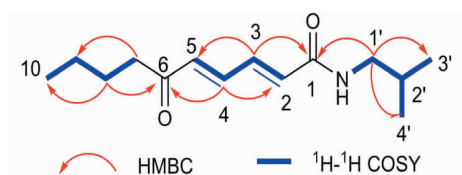


图 2 化合物 1 的结构和关键 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY、HMBC 相关
Fig. 2 Key $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations of compound 1

表1 化合物1的¹H NMR和¹³C NMR
波谱数据(500和125 MHz, CDCl₃)

Table 1 ¹H NMR and ¹³C NMR data of
compound 1 (500 and 125 MHz, CDCl₃)

No	δ _H (J in Hz)	δ _C
1		165.1
2	6.26, 1H, d(14.6)	131.7
3	7.29, 1H, dd(14.6, 11.6)	138.5
4	7.20, 1H, dd(15.1, 11.6)	138.0
5	6.46, 1H, d(15.1)	134.3
6		200.3
7	2.59, H, t(7.3)	41.4
8	1.63, 2H, m	26.2
9	1.36, 2H, m	22.4
10	0.92, 3H, t(7.3)	13.8
1'	3.21, 2H, t(6.3)	47.1
2'	1.84, 1H, m	28.6
3', 4'	0.94, 6H, d(6.2)	20.1
-NH-	5.84, 1H, br s	

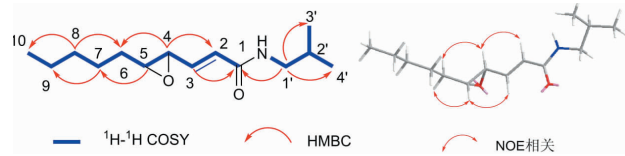


图3 化合物2的结构和关键¹H-¹H COSY、HMBC、NOE相关
Fig. 3 Key ¹H-¹H COSY, HMBC and NOE
correlations of compound 2

化合物3 无色油状物; ESI-MS: m/z 256 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₄H₂₅NO₃。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 3.23 (1H, dd, $J = 12.1, 9.1$ Hz, H-1'a), 2.74 (1H, m, H-2a), 2.49 (2H, m, H-1'a, 2b), 2.48 (2H, m, H-6), 2.30 (1H, ddd, $J = 14.3, 10.3, 4.9$ Hz, H-3a), 2.11 (1H, ddd, $J = 14.3, 10.3, 7.0$ Hz, H-3b), 1.87 (1H, m, H-2'), 1.67 (1H, m, H-7a), 1.65 (1H, m, H-7b), 1.36 (1H, m, H-9a), 1.30 (1H, m, H-8a), 1.29 (1H, m, H-9b), 1.28 (1H, m, H-8b), 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-10), 0.88 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3', 4'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 209.3 (C-5), 175.0 (C-1), 92.7 (C-4), 47.8 (C-1'), 34.8 (C-6), 31.2 (C-8), 30.2 (C-3), 29.2 (C-2), 27.9 (C-2'), 23.4 (C-7), 22.4 (C-9), 20.3 (C-3'), 20.4 (C-4'), 13.8 (C-10)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物为 *N*-isobutyl-4-hexanoyl-4-hydroxypyrrolidin-1-one。

化合物4 针晶 (CHCl₃); [α]_D²⁵ + 5.89 (c 0.008, MeOH); ESI-MS: m/z 258 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₄H₂₇NO₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.86 (1H, dd, $J = 15.5, 5.3$ Hz, H-3), 6.17 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-2), 4.07 (1H, d, $J = 5.3, 1.6$ Hz, H-4), 3.50 (1H, m, H-5), 3.06 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 1.79 (1H, m, H-2'), 1.57 (1H, m, H-6a), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.30 (6H, m, H-7, 8, 9), 0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 168.5 (C-1), 144.4 (C-3), 125.1 (C-2), 75.6 (C-4), 75.4 (C-5), 48.0 (C-1'), 33.7 (C-6), 33.1 (C-8), 29.7 (C-2'), 26.6 (C-7), 23.7 (C-9), 20.5 (C-3'), 20.5 (C-4'), 14.4 (C-10)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定化合物为 sylvamide。

化合物5 白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 196 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₂H₂₁NO。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.19 (1H, dd, $J = 15.0, 10.4$ Hz, H-

化合物2 无色油状物; [α]_D²⁵ + 8.47 (c 0.017, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 240.1965 [M + H]⁺ (计算值为 240.1958), 分子式为 C₁₄H₂₅NO₂, 计算不饱和度为 3。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.67 (1H, dd, $J = 15.2, 6.5$ Hz, H-3), 6.09 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-2), 3.22 (1H, m, H-4), 3.18 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.87 (1H, td, $J = 5.6, 2.0$ Hz, H-5), 1.82 (1H, m, H-2'), 1.62 (2H, m, H-6), 1.49 (2H, m, H-8), 1.33 (4H, m, H-7, 9), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.92 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 164.9 (C-1), 140.5 (C-3), 125.5 (C-2), 61.8 (C-5), 56.5 (C-4), 47.0 (C-1'), 32.0 (C-6), 31.5 (C-7), 28.6 (C-2'), 25.5 (C-8), 22.5 (C-9), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 14.0 (C-10)。化合物2的¹H NMR谱数据与 *N*-isobutyl-4,5-epoxy-2*E*-decenamide^[14]一致, 但其¹³C NMR谱数据尚未见文献报道。为进一步确定其结构和核磁数据归属, 我们对其进行¹H-¹H COSY和HMBC谱测试, 验证了其平面结构的正确性(见图3)。化合物2的NOESY谱, H-4与H-2、H-6存在明显的NOE相关; H-5与H-3、H-7存在明显的NOE相关, 表明H-4与H-5位于异侧, 为反式构型。故鉴定化合物2为(4,5)-*trans*-*N*-isobutyl-4,5-epoxy-2*E*-decenamide。

3), 6.10 (1H, m, H-4), 6.10 (1H, m, H-5), 5.75 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 3.17 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 2.13 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-6), 1.79 (1H, m, H-2'), 1.45 (2H, m, H-7), 0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.3 (C-1), 143.0 (C-3), 141.3 (C-5), 128.4 (C-4), 121.7 (C-2), 46.9 (C-1'), 35.0 (C-6), 28.6 (C-2'), 22.0 (C-7), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 13.7 (C-8)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadienamamide。

化合物 6 无色结晶(CHCl_3);ESI-MS: m/z 224 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :7.20(1H,dd, $J = 15.0, 10.3$ Hz, H-3), 6.11 (1H, m, H-4), 6.11 (1H, m, H-5), 5.78 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 3.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 2.15 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-6), 1.81 (1H, m, H-2'), 1.43 (2H, m, H-7), 1.30 (4H, m, H-8, 9), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C-1), 143.2 (C-5), 141.3 (C-3), 128.2 (C-4), 121.8 (C-2), 46.9 (C-1'), 32.9 (C-6), 31.4 (C-8), 28.5 (C-7), 28.6 (C-2'), 22.5 (C-9), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 14.0 (C-10)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定化合物为 pellitorine。

化合物 7 无色结晶(CHCl_3);ESI-MS: m/z 252 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :7.21(1H,dd, $J = 15.0, 10.2$ Hz, H-3), 6.12 (1H, m, H-4), 6.12 (1H, m, H-5), 5.77 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 3.19 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 2.17 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-6), 1.81 (1H, m, H-2'), 1.43 (2H, m, H-7), 1.31 (8H, m, H-8 ~ 11), 0.95 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-12); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C-1), 143.3 (C-5), 141.4 (C-3), 128.2 (C-4), 121.7 (C-2), 46.9 (C-1'), 33.0 (C-6), 31.8 (C-8), 29.1 (C-7), 29.1 (C-9), 28.8 (C-10), 28.6 (C-2'), 22.6 (C-11), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 14.1 (C-12)。以上数据与文献^[18]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-isobuty-2*E*,4*E*-dodecadienamamide。

化合物 8 白色无定形粉末;ESI-MS: m/z 336 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :7.21(1H,dd, $J = 15.0, 10.1$ Hz, H-

3), 6.12 (1H, m, H-4), 6.12 (1H, m, H-5), 5.77 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 3.19 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.15 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-6), 1.81 (1H, m, H-2'), 1.43 (2H, m, H-7), 1.28 (20H, m, H-8 ~ 17), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C-1), 143.3 (C-3), 141.4 (C-5), 128.2 (C-4), 121.7 (C-2), 46.9 (C-1'), 33.0 (C-6), 31.9 (C-16), 29.5 (C-7), 29.2 ~ 29.7 (C-9 ~ 15), 28.8 (C-8), 28.6 (C-2'), 22.7 (C-17), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 14.1 (C-18)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-isobutyl-2*E*,4*E*-octadecadienamamide。

化合物 9 无色结晶(CHCl_3);ESI-MS: m/z 238 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :7.21(1H,dd, $J = 14.9, 10.7$ Hz, H-3), 6.11 (1H, m, H-4), 6.11 (1H, m, H-5), 5.77 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, H-2), 3.18 (2H, m, H-1'), 2.16 (2H, m, H-6), 1.60 (1H, m, H-2'), 1.42 (2H, m, H-7), 1.27 (6H, m, H-8, 9, 3'), 0.94 (6H, m, H-4', 5'), 0.90 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.5 (C-1), 143.3 (C-5), 141.4 (C-3), 128.2 (C-4), 121.7 (C-2), 45.2 (C-1'), 32.9 (C-6), 31.4 (C-8), 35.1 (C-2'), 28.5 (C-7), 27.0 (C-3'), 22.5 (C-9), 17.2 (C-5'), 14.0 (C-10), 11.3 (C-4')。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-(2'-methylbutyl)-2*E*,4*E*-decadienamamide。

化合物 10 黄色结晶(CHCl_3);ESI-MS: m/z 334 $[\text{M} + \text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{NO}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :7.19(1H,dd, $J = 15.0, 10.2$ Hz, H-3), 6.09 (1H, m, H-4), 6.09 (1H, m, H-5), 5.74 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-2), 5.38 (2H, m, H-12, 13), 3.16 (2H, t, $J = 13.0, 6.7$ Hz, H-1'), 2.14 (2H, m, H-6), 1.96 (4H, m, H-11, 14), 1.80 (1H, m, $J = 13.4, 6.7$ Hz, H-2'), 1.41 (2H, m, H-7), 1.30 (6H, m, H-15 ~ 17), 1.29 (6H, m, H-8 ~ 10), 0.93 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', 4'), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C-1), 143.3 (C-3), 141.4 (C-5), 130.5 (C-12), 130.2 (C-13), 128.2 (C-4), 121.7 (C-2), 46.9 (C-1'), 32.6 (C-6), 32.6 (C-11), 32.5 (C-14), 32.5 (C-16), 29.6 (C-10), 29.3 (C-15), 29.1 (C-9), 29.0 (C-8), 28.9

(C-7), 28.6 (C-2'), 22.6 (C-17), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 14.1 (C-18)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-isobutyl-2*E*,4*E*,12*Z*-octadecatrienamido。

化合物 11 无色结晶 (CHCl₃); ESI-MS: *m/z* 226 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₄H₂₇NO。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.85 (1H, m, H-3), 5.77 (1H, d, *J* = 15.2 Hz, H-2), 3.18 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 2.19 (2H, q, *J* = 6.9 Hz, H-4), 1.81 (1H, m, H-2'), 1.59 (6H, m, H-5 ~ 7), 1.30 (4H, m, H-8, 9), 0.95 (6H, d, *J* = 6.5 Hz, H-3', 4'), 0.90 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-10); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 166.3 (C-1), 144.8 (C-3), 123.5 (C-2), 46.8 (C-1'), 32.0 (C-4), 31.8 (C-8), 29.1 (C-5), 29.1 (C-6), 28.6 (C-2'), 28.3 (C-7), 22.6 (C-9), 20.1 (C-3'), 20.1 (C-4'), 13.8 (C-10)。以上数据与文献^[20]报道基本一致,故鉴定化合物为 *N*-isobutyl-2*E*-decenamido。

化合物 12 黄色结晶 (MeOH); ESI-MS: *m/z* 276 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₆H₂₁NO₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.76 (1H, m, H-3), 6.69 (2H, overlap, H-2'', 6''), 6.64 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4''), 5.90 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-2), 5.87 (2H, s, -OCH₂O-), 3.03 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 2.68 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-5), 2.45 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, H-4), 1.76 (1H, m, H-2'), 0.80 (6H, d, *J* = 6.7 Hz, H-3', 4'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 167.3 (C-1), 147.7 (C-3''), 145.9 (C-4''), 143.1 (C-3), 134.9 (C-1''), 123.9 (C-2), 120.9 (C-6''), 108.7 (C-2''), 107.6 (C-5''), 100.7 (-OCH₂O-), 46.5 (C-1'), 34.0 (C-5), 33.8 (C-4), 28.3 (C-2'), 19.1 (C-3', 4')。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定化合物为二氢茛菪明宁碱。

化合物 13 无色结晶 (MeOH); ESI-MS: *m/z* 302 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₈H₂₃NO₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.90 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2''), 6.79 (2H, m, H-3, 6''), 6.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5''), 6.34 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-7), 6.08 (1H, m, H-6), 5.97 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-2), 5.90 (2H, s, -OCH₂O-), 3.04 (2H, d, *J* = 6.9 Hz, H-1'), 2.35 (4H, m, H-4, 5), 1.78 (1H, m, H-2'), 0.90 (6H, d, *J* = 6.8 Hz, H-3', 4'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 167.7 (C-1), 147.5 (C-3''), 147.5 (C-4''), 143.3 (C-3), 132.1 (C-1''), 130.3 (C-7), 126.9 (C-6),

123.8 (C-2), 120.1 (C-6''), 107.6 (C-5''), 104.9 (C-2''), 100.9 (-OCH₂O-), 46.5 (C-1'), 31.6 (C-5), 31.4 (C-4), 28.3 (C-2'), 19.1 (C-3', 4')。以上数据与文献^[21]报道基本一致,故鉴定化合物为风藤酰胺。

2.2 体外神经保护活性测试结果

采用 MPP⁺ 损伤 PC12 细胞模型对化合物 1~10 进行活性测试,检测结果显示:与空白对照组比较 (100%),模型组的细胞存活率显著降低 (68.60%);与模型组比较,化合物 6 在 20 μM 时,细胞的存活率为 73.78%,对 MPP⁺ 诱导的神经细胞损伤有非常显著的保护作用 (*P* < 0.01),其余化合物对 MPP⁺ 诱导的神经细胞损伤无明显保护作用。

3 讨论

本实验从海风藤二氯甲烷部位共分离得到酰胺类生物碱 13 个,其中化合物 1 为新化合物,化合物 2 为新天然产物,化合物 3~7、9、10 为首次从该植物中分离得到。药理实验研究表明化合物 6 在 20 μM 时,对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤具有显著的保护作用 (*P* < 0.01),提示其对于帕金森病具有潜在的治疗作用。本研究不仅进一步丰富了海风藤中酰胺生物碱类成分的结构多样性,对海风藤中酰胺类生物碱在治疗和预防神经退行性疾病方面的研究亦具有一定的参考价值,同时对该属植物后续化学成分及生物活性的研究具有一定的借鉴作用。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 306.
- 2 Ren FZ, Zhang L, Niu GY, et al. Studies on the chemical constituents of *Piper kadsura* (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 184-185.
- 3 Song JL, Yuan L, Liu YJ, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of *Piper kadsura* [J]. J Hubei Coll Tradit Chin Med (湖北中医学院学报), 2007, 9: 70-72.
- 4 Zhang SX, Liu XK, Zhang L, et al. Studies on chemical constituents of *Piper kadsura* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 1992, 4: 1-4.
- 5 Yuan L. Study on anti-inflammatory active constituents of *Piper kadsura* [D]. Wuhan: Hubei College of Traditional Chinese Medicine (湖北中医学院), 2008.

- 6 Ma Y, Han GQ, Liu ZJ. Study on PAF antagonistic constituents of neolignans from *Piper kadsura* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1993, 28: 207-211.
- 7 Ma Y, Han GQ, Wang YY. PAF antagonistic benzofuran neolignans from *Piper kadsura* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1993, 28: 370-373.
- 8 Chen GX, Ran JL, Ding WP. Studies on the chemical constituents of *Piper kadsura* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 1991, 16: 552-554.
- 9 Li XM, Wang DY, Liu HQ. Studies on the chemical constituents of polysaccharide from *Piper kwangtungensis* [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2005, 27: 1198-1200.
- 10 Yang N. The reasearch on the distribution of "elements of syndrome and pathogenesis" of Parkinson's disease and the clinical observation of Yishen Chuchan Decoction on treating 40 cases [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2017.
- 11 Chen HY. Study on relationship between syndrome differentiation with TCM of vascular parkinsonism and T lymphocyte immune function [D]. Fuzhou: Fujian College of Traditional Chinese Medicine (福建中医学院), 2004.
- 12 Wei J. A Chinese medicine preparation and preparation method for Parkinson's disease (一种用于治疗帕金森的中药制剂及制备方法): CN104127727 [P]. 2014-11-05.
- 13 Zhang L, Wang YY, Liu J, et al. Protective effect of Siegesbeckia Herba extract on MPP⁺ induced PC12 cell injury [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2015, 35: 7042-7044.
- 14 Banerji A, Pal SC. Total synthesis of sylvamide, a *Piper* alkaloid [J]. Phytochemistry, 1983, 22: 1028-1030.
- 15 Gómez-Calvario V, Ríos MY. ¹H and ¹³C NMR data, occurrence, biosynthesis and biological activity of *Piper* amides [J]. Magn Reson Chem, 2019, 57: 994-1070.
- 16 Ee GC, Lim CM, Lim CK, et al. Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum* [J]. Nat Prod Res, 2009, 23: 994-1070.
- 17 Xin Y, Shi YN, Zhu HT, et al. NMR characteristics of *Piper* amides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1181-1191.
- 18 Huang XZ, Yin Y, Huang WQ, et al. Alkaloids and lignans from the stems of *Piper betle* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2010, 35: 2285-2288.
- 19 Stöhr J, Xiao PG, Bauer R. Isobutylamides and a new methylbutylamide from *Piper sarmentosum* [J]. Planta Med, 1999, 65: 175-177.
- 20 Molina-Torres J, Salazar-Cabrera CJ, Armenta-Salinas C, et al. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affin and reduced amides [J]. J Agr Food Chem, 2004, 52: 4700-4704.
- 21 Zhao GW, Xia W, Chen P, et al. Study on the bioactive constituents of *Piper wallichii* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2012, 35: 53-56.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊	欧阳杰
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun	OUYANG Jie
易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚
YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang
高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武
GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu
蓝蔚青	廖晨钟	薛永波			
LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo			