

• 化学成分 •

何首乌中 1 个新的木脂素酰胺类化合物

杨建波¹, 高慧宇¹, 王雪婷¹, 宋云飞¹, 段宝忠², 程显隆¹, 魏 锋^{1*}, 王 莹¹, 汪 祺¹, 胡笑文¹, 马双成^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100050

2. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

摘要: 目的 对何首乌 *Polygonum multiflorum* 70%乙醇提取物进行化学成分研究, 并考察部分化合物对正常人 L02 肝细胞生长的影响。方法 采用大孔吸附树脂 (DM-8 型)、ODS 反相硅胶、MCI 和制备液相等多种色谱技术进行分离纯化, 运用质谱和现代波谱学技术对化合物进行结构鉴定; 采用 CCK-8 法, 以细胞抑制率为评价指标, 考察部分化合物对 L02 肝细胞生长的影响。结果 从何首乌 70%乙醇提取物中分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 (*E*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-5-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-7-methoxybenzofuran (**1**)、cannabisin D (**2**)、grossamide (**3**)、eleutherinol (**4**)、isolariciresinol (**5**)、*N,N*-二甲基-色氨酸甲酯 (**6**)、*N*-反式-阿魏酰酪胺 (**7**) 和 *N*-反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺 (**8**)。化合物 **1**、**7** 和 **8** 对 L02 肝细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 3.02、190.35、300.61 μmol/L。结论 化合物 **1** 为新的木脂素酰胺类化合物, 命名为何首乌庚素。化合物 **2**~**6** 均为首次从该植物中分离得到, 并通过二维核磁谱补充了化合物 **4** 和 **6** 的核磁数据。化合物 **1** 对正常人 L02 肝细胞具有较强的抑制作用。

关键词: 何首乌; 何首乌庚素; CCK-8 法; L02 肝细胞; *N,N*-二甲基-色氨酸甲酯; eleutherinol

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5475-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.001

A new lignanamide isolated from roots of *Polygonum multiflorum*

YANG Jian-bo¹, GAO Hui-yu¹, WANG Xue-ting¹, SONG Yun-fei¹, DUAN Bao-zhong², CHENG Xian-long¹, WEI Feng¹, WANG Ying¹, WANG Qi¹, HU Xiao-wen¹, MA Shuang-cheng¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the 70% EtOH of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) and further evaluate their hepatotoxicities against L-02 human liver cells. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by macroporous resin (DM-8), ODS, MCI and MPLC. Their structures were elucidated based on mass spectrometry and NMR analyses. CCK-8 method was used to observe the inhibiting rate in L02 cell and some of the compounds isolated from *P. multiflorum* against L-02 human liver cells were evaluated. **Results** Eight compounds were isolated and identified as (*E*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-5-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-7-methoxybenzofuran (**1**), cannabisin D (**2**), grossamide (**3**), eleutherinol (**4**), isolariciresinol (**5**), *N,N*-dimethyl-tryptophan methyl ester (**6**), *N*-trans-feruloyltyramine (**7**) and *N*-trans-feruloyl-3-methyl dopamine (**8**). Compounds **1**, **7** and **8** showed the inhibitory activity against L02 human liver cells with the half inhibitory concentration (IC₅₀) values of 3.02, 190.35 and 300.61 μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound **1** is a new compound named as polygonimitin G and compounds **2**—**6** were isolated from this plant for the first time. Meanwhile, the NMR data of

收稿日期: 2021-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773874); 国家自然科学基金资助项目 (81973476); 国家自然科学基金资助项目 (81703665); 中药组分资源库及产业公共技术服务平台建设 (2018ZX09735006)

作者简介: 杨建波, 副研究员, 研究方向为中药物质基础、质量标准及安全性评价。Tel: (010)53852102 E-mail: yangjianbo@nifdc.org.cn

*通信作者: 魏 锋, 研究员, 研究方向为中药质量标准及安全性评价研究。Tel: (010)53852020 E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

马双成, 研究员, 研究方向为中药民族药质量标准及安全性评价研究。Tel: (010)53852072 E-mail: masc@nifdc.org.cn

compounds **4** and **6** were further improved. Compound **1** showed strong inhibitory activity against L-02 human liver cells.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; polygonimitin G; CCK-8 method; L02 liver cells; *N,N*-dimethyl-tryptophan methyl ester; eleutherinol

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 生何首乌味苦、甘、涩, 微温, 归肝、心、肾经, 具有解毒、消痈、截疟、润肠通便等功效, 可用于疮痈、风疹瘙痒和润肠通便等^[1], 主要分布于我国贵州、四川、云南、安徽和广东等地, 其中广东肇庆市德庆县为传统道地产区^[2-3]。何首乌被广泛应用于处方药、非处方药和保健食品中, 含有何首乌的药品约有 500 余种、保健食品约有 200 余种^[4]。然而, 近年来, 国内外关于服用何首乌及其相关制剂引发的不良反应, 尤其肝损伤的不良反应报道较多, 其安全性问题已经引起国内外高度关注^[5-6]。

目前, 从何首乌中提取分离得到约 200 个单体化合物, 主要为蒽醌(单核蒽醌和双核蒽醌)类、二苯乙烯类、萜类、黄酮类和其他类成分^[7-13], 其中双核蒽醌为本课题组首次从何首乌中分离得到, 主要有 polygonumnolide A1~A4、polygonumnolide B1~B3^[9]、polygonumnolide C1~C4^[10]、polygonumnolide E^[11]、顺式-大黄素二蒽酮和反式-大黄素二蒽酮^[13]。何首乌中潜在的肝毒性成分, 可能为蒽醌类(包括大黄素等单核蒽醌和大黄素二蒽酮等双核蒽醌)、二苯乙烯苷类和没食子酸类成分^[5,14-16]。其中关于何首乌中二蒽酮成分为其潜在肝毒性成分, 为本项目组首次报道。所以, 一方面为了进一步丰富何首乌中的化学成分种类; 另一方面, 也为了继续寻找何首乌中潜在的肝毒性成分。本课题组继续对何首乌 70%乙醇提取部分进行化学成分研究, 分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为(*E*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-5-[*N*-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-7-methoxybenzofuran (**1**)、cannabisin D (**2**)、grossamide (**3**)、eleutherinol (**4**)、isolariciresinol (**5**) 和 *N,N*-二甲基-色氨酸甲酯(*N,N*-dimethyl-tryptophan methyl ester, **6**)、*N*-反式-阿魏酰酪胺(*N-trans-feruloyl*tyramine, **7**) 和 *N*-反式-阿魏酰-3-甲氧基酪胺(*N-trans-feruloyl*-3-methyl dopamine, **8**)。其中, 化合物 **1** 为新的木脂素酰胺类化合物, 命名为何首乌庚素。化合物 **2~6** 均为首次从该药材中分离得到, 并通过二维核磁谱补充

了化合物 **4** 和 **6** 的核磁数据。化合物 **1** 对正常人 L02 肝细胞具有较强的抑制作用。

1 仪器与材料

岛津 UV-2700 型紫外可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司); IM-PACT400 型傅里叶变换红外光谱仪(美国尼高力公司); 布鲁克 Avance-500 和 600 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司); 安捷伦 HP1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 岛津 LC-6AD 型制备高效液相色谱仪(日本岛津公司); C18 反相填料(日本 YMC 公司); MCI GEL CHP20P 填料(日本三菱化学公司); EYELASB-1000 旋转蒸发仪(日本 EYELA 公司); DM-8 型大孔吸收树脂(津达正源化工); 酶标仪(Bio-Tek); 二氧化碳培养箱(Bio-Tek); QUINTIX313-1CN 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); 正常人 L02 肝细胞, 上海陶术生物科技有限公司; 高糖 DMEM 培养基(货号 06-1055-57-1ACS, BI 公司)、RPMI1640(货号 01-100-1ACS, BI 公司)、FBS(货号 FB-1058/500, Biosera 公司)、CCK-8 试剂盒(货号 C0005, 上海陶素生化科技有限公司); 0.25%胰酶-EDTA(货号 325-043-CL, 维森特生物技术公司); 常规试剂为分析纯, 高效液相用试剂为色谱纯。

实验用何首乌样品于 2013 年 10 月采集于广东省肇庆市德庆县, 经中国食品药品检定研究院张继副研究员鉴定为何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 样品标本(No.060104)保存于中国食品药品检定研究院。

2 提取与分离

取何首乌干燥块根 28 kg, 粉碎, 用 70%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液减压回收溶剂得浸膏 4.0 kg。将浸膏于 1.5 L 水中混悬, 用二氯甲烷萃取, 剩余水部分, 再加水稀释至 10 L, 过 DM-8 型大孔吸附树脂, 依次用不同体积分数的乙醇洗脱, 得到 5 个不同组分, 分别为水洗脱部分(组分 A, 2.0 kg)、25%乙醇(组分 B, 62.0 g)、40%乙醇(组分 C, 200.0 g)、55%乙醇(组分 D, 38.0 g)和 95%乙醇洗脱部分(组分 E, 55.0 g)。组分 B(62.0 g)经 ODS 中压柱色谱, 依此用 10%~100%甲醇洗脱, 再经过反相硅胶薄层色谱检测、合并, 共获得 20

个亚组分,分别为 B1~B20。其中亚组分 B2(3.5 g),经过半制备液相分离纯化,流动相 [乙腈-水 (35:65)],检测波长为 230 nm,体积流量为 5.0 mL/min,得到化合物 7($t_R=28$ min, 29.0 mg)、8($t_R=34$ min, 7.5 mg)。其中亚组分 B5 (5.0 g),经过半制备液相分离纯化,流动相[甲醇-水 (32:68)],检测波长为 230 nm,体积流量为 5.0 mL/min,得到化合物 5($t_R=33.0$ min, 3.0 mg)、6($t_R=41.0$ min, 3.5 mg)。组分 B10 (6.5 g),用水溶解,过 MCI 树脂,依此用不同浓度甲醇洗脱,得到 5 个不同组分,依此为水洗脱部分(组分 B10A)、30%甲醇(组分 B10B)、50%甲醇(组分 B10C)、70%甲醇(组分 B10D)和 100%甲醇洗脱(组分 B10E)。组分 B10B,经过半制备液相分离纯化,流动相 [乙腈-水 (30:70)],检测波长为 230 nm,体积流量为 5.0 mL/min,得到化合物 2($t_R=32.0$ min, 2.5 mg)和 3($t_R=39.0$ min, 3.0 mg)。组分 B10C,经过半制备液相分离纯化,流动相 [乙腈-水 (40:60)],检测波长为 230 nm,体积流量为 5.0 mL/min,得到化合物 1($t_R=35.0$ min, 4.0 mg)和 4($t_R=43.0$ min, 3.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色无定形粉末。HR-ESI-MS 显

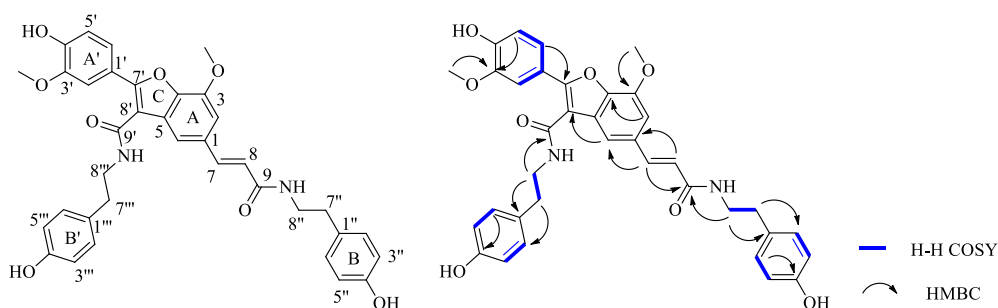
示准分子离子峰 m/z : 623.237 9 $[M+H]^+$ (计算值 623.238 8), 提示该化合物分子式为 $C_{36}H_{34}N_2O_8$, 不饱和度为 21。UV 光谱显示其在 224、252、310 nm 处有最大吸收; IR 光谱在 3459、1657、1609、1538 cm^{-1} 有吸收峰, 提示其含有羟基和酰胺基^[12]。

1H -NMR (表 1) 和 1H - 1H COSY 谱 (图 1) 中显示该化合物含有 2 个酰胺基 [δ_H 8.10 (t, $J=4.8$ Hz, α -NH), 3.37 (2H, m, H-8''), 2.67 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-7''); 8.50 (t, $J=4.8$ Hz, β -NH), 3.49 (2H, m, H-8'''), 2.77 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-7''')]; 2 组 AA'BB' 耦合系统的芳香氢信号 [δ_H 7.03 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2''/6''), 6.69 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3''/5''); 7.06 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2'''/6'''), 6.89 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'''/5''')]; 1 组 ABX 耦合系统的芳香氢信号 [δ_H 7.46 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.31 (1H, dd, $J=8.4$, 1.8 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5')]; 1 组 AX 耦合系统的芳香氢信号 [δ_H 7.17 (1H, s, H-2), 7.24 (1H, s, H-6)]; 1 组反式双键 [δ_H 7.49 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7), 6.64 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8)] 和 2 个甲氧基 [δ_H 4.01 (3H, s, Me-3), 3.81 (3H, s, Me-3')]. 化合物 1 的 ^{13}C -NMR、HSQC 以及 DEPT 数据分析, 发现有 36 个碳信号, 其中 15 个季碳, 包括 2 个

表 1 化合物 1 的氢谱和碳谱数据 (600/150 MHz, DMSO- d_6)

Table 1 1H and ^{13}C NMR spectral data of compound 1 (600/150 MHz, DMSO- d_6)

碳位	δ_H	δ_C (DEPT)	碳位	δ_H	δ_C (DEPT)
1		131.6 (s)	1'		129.3 (s)
2	7.17 (s)	106.2 (d)	2'	7.46 (d, $J=1.8$ Hz)	110.7 (d)
3		144.7 (s)	3'		148.4 (s)
4		142.2 (s)	4'		153.8 (s)
5		112.3 (s)	5'	6.89 (d, $J=8.4$ Hz)	115.8 (d)
6	7.24 (s)	112.1 (d)	6'	7.31 (dd, $J=1.8, 8.4$ Hz)	120.5 (d)
7	7.49 (d, $J=15.6$ Hz)	138.9 (d)	7'		147.6 (s)
8	6.64 (d, $J=15.6$ Hz)	121.6 (d)	8'		120.0 (s)
9		165.0 (s)	9'		163.1 (s)
3-OMe	4.01(s)	55.9 (q)	3'-OMe	3.81 (s)	55.6 (q)
1''		129.7 (s)	1'''		129.7 (s)
2''	7.03 (d, $J=8.4$ Hz)	129.5 (d)	2'''	7.06 (d, $J=7.8$ Hz)	129.5 (d)
3''	6.69 (d, $J=8.4$ Hz)	115.1 (d)	3'''	6.89 (d, $J=7.8$ Hz)	115.2 (d)
4''		155.6 (s)	4'''		155.6 (s)
5''	6.69 (d, $J=8.4$ Hz)	115.1 (d)	5'''	6.89 (d, $J=7.8$ Hz)	115.2 (d)
6''	7.03 (d, $J=8.4$ Hz)	129.5 (d)	6'''	7.06 (d, $J=7.8$ Hz)	129.5 (d)
7''	2.67 (t, $J=7.2$ Hz)	34.4 (t)	7'''	2.77 (t, $J=7.2$ Hz)	34.1 (t)
8''	3.37 (m)	40.7 (t)	8'''	3.49 (m)	40.9 (t)
NH (α)	8.10 (t, $J=4.8$ Hz)		NH (β)	8.50 (t, $J=4.8$ Hz)	

图1 化合物1的结构和 ^1H - ^1H COSY、HMBC图谱Fig. 1 Structure and ^1H - ^1H COSY, HMBC correlations of compound 1

羰基信号 [δ_{C} 165.0(C-9), 163.1(C-9')]; 4个亚甲基信号, 包括2组AX耦合系统的脂肪族亚甲基的碳信号 [δ_{C} 34.4(C-7'')和40.7(C-8''); 34.1(C-7''')和40.9(C-8''')]; 15个次甲基信号, 包括2组AA'BB'耦合系统的芳香环上的碳信号 [δ_{C} 115.1(C-3''/5'')和129.5(C-2''/6'')]; 115.2(C-3'''/5''')和129.5(C-2'''/6''')]; 1组ABX耦合系统的芳香环上的碳信号 δ_{C} 110.7(C-2'), 115.8(C-5'), 120.5(C-6'); 1组AX耦合系统的芳香环上的碳信号 δ_{C} 106.2(C-2), 112.1(C-6)和1组反式双键的碳信号 δ_{C} 138.9(C-7), 121.6(C-8)以及2个甲氧基碳信号 δ_{C} 55.9(C-3), 55.6(C-3')。

在HMBC图谱中(图1), δ_{H} 7.31(H-6')与 δ_{C} 147.6(C-7')相关, δ_{H} 6.89(H-5')与 δ_{C} 148.4(C-3')相关, 说明化合物1的A'苯环中C-1'位连接在C环的C-7'位。 δ_{H} 3.49(H-8'')与 δ_{C} 163.1(C-9'), 129.7(C-1'')相关, δ_{H} 2.77(H-7'')与 δ_{C} 115.2(C-3'')相关, 说明化合物1的B'苯环中C-1''位连接在C-7''位, C-9'连接在C环的C-8'位。 δ_{H} 7.17(H-2)与 δ_{C} 142.2(C-4)相关, δ_{H} 7.24(H-6)与 δ_{C} 120.0(C-8')相关, δ_{H} 7.49(H-7)与 δ_{C} 112.1(C-6), 165.0(C-9)相关, δ_{H} 6.64(H-8)与 δ_{C} 131.6(C-1)相关, 说明C-7为连接在A环的C-1位, C-9连接在C环的C-8位。 δ_{H} 3.37(H-8'')与 δ_{C} 165.0(C-9), 129.7(C-1'')相关, δ_{H} 2.67(H-7'')与 δ_{C} 115.1(C-3'')相关, 说明化合物1的B苯环中C-1''位连接在C-7''位。 δ_{H} 4.01(Me-3)与 δ_{C} 144.7(C-3)相关, δ_{H} 3.81(Me-3')与 δ_{C} 148.4(C-3')相关, 说明化合物1的B苯环中C-1''位连接在C-7''位。

综合上述信息, 确定化合物1为N-反式-阿魏酰酰胺的二聚体, 结构为(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-[N-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-5-[N-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl-ethenyl-

7-methoxybenzofuran, 为1个新化合物, 命名为何首乌庚素。

化合物2: 淡黄色固体粉末。ESI-MS m/z : 625.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.23 (1H, s, H-4), 6.96 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'', 6''), 6.84 (1H, s, H-5), 6.86 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 6.70 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.65 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''', 5'''), 6.62 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'', 5''), 6.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 4.23 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 3.78 (3H, s, 3-OMe), 3.68 (3H, s, 3'-OMe), 3.60 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 3.24 (2H, m, H-8''), 3.10 (2H, m, H-8'''), 2.61 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-7''), 2.43 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'''); ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 170.9 (C-2a), 167.6 (C-3a), 155.6 (C-4''), 155.6 (C-4'''), 147.7 (C-6), 147.2 (C-3'), 146.2 (C-7), 145.0 (C-4'), 135.0 (C-1'), 131.7 (C-4), 131.3 (C-8a), 129.6 (C-1''), 129.5 (C-1'''), 129.5 (C-2''), 129.5 (C-2'''), 129.5 (C-6''), 129.5 (C-6'''), 126.5 (C-3), 122.9 (C-4a), 119.6 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.1 (C-3''), 115.1 (C-3'''), 115.0 (C-5''), 115.0 (C-5'''), 112.1 (C-8), 111.8 (C-5), 55.7 (3-OMe), 55.6 (3'-OMe), 47.8 (C-2), 41.2 (C-1), 40.9 (C-a'), 40.4 (C-a), 34.3 (C- β), 34.3 (C- β')。以上数据与文献对照^[17], 鉴定化合物2为cannabisin D。

化合物3: 淡黄色固体粉末。ESI-MS m/z : 623.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.35 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-1'''), 7.05 (1H, s, H-6), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 6.89 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''', 5'''), 6.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 6.69 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''', 5'''), 6.46 (2H, d, $J = 15.6$ Hz,

H-2'''), 6.39 (1H, s, H-4), 5.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 4.18 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 3.91 (3H, s, 7-OMe), 3.83 (3H, s, 3'-OMe), 3.66 (2H, m, H-1''), 3.62 (2H, m, H-1'''), 2.64 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2''), 2.58 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.9 (3-CONR), 165.7 (2''''-CONR), 156.1 (C-4'''''), 156.1 (C-4'''), 149.2 (C-8), 148.1 (C-3'), 147.3 (C-4'), 144.5 (C-7), 141.1 (C-1'''), 131.1 (C-1'), 130.3 (C-1'''''), 130.0 (C-2''', 6'''), 129.9 (C-1'''), 129.8 (C-2''''', 6'''''), 129.7 (C-5), 129.0 (C-9), 119.3 (C-6'), 119.0 (C-4), 118.8 (C-2'''), 116.4 (C-3''', 5'''), 115.6 (C-3''''', 5'''''), 115.5 (C-5'), 110.8 (C-6), 110.4 (C-2'), 88.2 (C-2), 56.3 (C-3), 56.2 (3'-OMe), 56.2 (7-OMe), 41.3 (C-1'''''), 41.1 (C-1''), 34.9 (C-2'''''), 34.7 (C-2''). 以上数据与文献对照基本一致^[18-19], 故确定化合物 **3** 为 grossamide。

化合物 **4**: 淡黄色固体粉末。ESI-MS m/z : 257.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.20 (1H, s, H-4), 6.58 (1H, s, H-5), 6.57 (1H, s, H-7), 6.18 (1H, s, H-12), 2.72 (3H, s, 3-Me), 2.38 (3H, s, 13-Me); 以上数据与文献报道的数据基本一致^[20], 但是未见该化合物的碳谱文献报道, 通过二维谱对化合物碳谱数据进行了归属, 具体如下: $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.9 (C-11), 163.8 (C-1), 163.8 (C-13), 159.7 (C-6), 157.1 (C-8), 139.0 (C-10), 134.7 (C-3), 125.1 (C-4), 116.6 (C-2), 112.4 (C-12), 107.5 (C-9), 103.3 (C-7), 101.5 (C-5), 23.4 (Me-3), 19.9 (Me-13)。故鉴定化合物 **4** 为 eleutherinol。

化合物 **5**: 淡黄色固体粉末。ESI-MS m/z : 361.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.69 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.63 (1H, dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz, H-6), 3.82 (1H, m, H-7), 1.78 (1H, m, H-8), 3.41 (1H, dd, $J = 3.6, 10.8$ Hz, H-9 α), 3.68 (1H, dd, $J = 5.4, 10.8$ Hz, H-9 β), 6.67 (1H, s, H-2'), 6.19 (1H, s, H-5'), 2.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 2.02 (1H, m, H-8'), 3.66 (1H, dd, $J = 4.8, 7.8$ Hz, H-9' α), 3.72 (1H, dd, $J = 4.8, 10.8$ Hz, H-9' β), 3.78 (3H, s, 3-OMe), 3.82 (3H, s, 3'-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 149.0 (C-3), 147.2 (C-3'), 146.0 (C-4), 145.3 (C-4'), 138.6 (C-1), 134.2 (C-6'), 129.0 (C-1'), 123.2 (C-6), 117.4 (C-5'), 116.0 (C-5), 113.8 (C-2), 112.4 (C-2'), 65.9 (C-9'), 62.2 (C-9), 56.4 (3'-OMe), 56.3 (3-OMe), 48.1 (C-7), 48.0 (C-8), 40.0

(C-8'), 33.6 (C-7')。以上数据与文献对照^[21-22], 确定化合物 **5** 为 isolariciresinol。

化合物 **6**: 白色固体粉末。HR-ESI-MS m/z : 247.143 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 247.144 1), 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.63 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.34 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.18 (1H, s, H-7), 7.11 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.05 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-3), 3.88 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10), 3.41 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-9), 3.25 (9H, s, Me-12, 13, 14)。以上数据与文献报道的核磁数据基本一致^[23-24], 但是未见该化合物的碳谱文献报道, 通过二维谱对化合物碳谱数据进行了归属, 具体如下: $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.7 (C-11), 138.1 (C-6), 128.3 (C-1), 122.6 (C-4), 125.1 (C-7), 120.0 (C-3), 119.1 (C-2), 112.4 (C-5), 109.0 (C-8), 80.6 (C-10), 52.7 (C-12), 52.7 (C-13), 52.6 (C-14), 24.6 (C-9)。故鉴定化合物 **6** 为 *N,N*-二甲基-色氨酸甲酯。

化合物 **7**: 白色固体粉末。ESI-MS m/z : 314.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.26 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7), 7.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.00 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6), 6.74 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.64 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-8), 3.76 (3H, s, 3-OMe), 3.28 (2H, m, H-8'), 2.60 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.8 (C-9), 156.2 (C-3), 148.3 (C-4'), 148.8 (C-4), 139.4 (C-7), 130.1 (C-1'), 130.0 (C-2', C-6'), 127.0 (C-1), 122.0 (C-6), 119.6 (C-8), 116.2 (C-5), 115.6 (C-3', 5'), 111.3 (C-2), 56.0 (3-OMe), 41.2 (C-8'), 35.0 (C-7')。以上数据与文献对照^[25-26], 故鉴定化合物 **7** 为 *N*-反式-阿魏酰酪胺。

化合物 **8**: 白色固体粉末。ESI-MS m/z : 344.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 7.10 (1H, s, H-2'), 7.00 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, s, H-2), 6.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8'), 3.86 (3H, s, 3'-OMe), 3.82 (3H, s, 3-OMe), 3.48 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.76 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7')。以上数据与文献对照^[25], 故鉴定化合物 **8** 为 *N*-反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺。

4 生物合成途径

本项目组从何首乌中, 首次分离得到 *N*-反式-

阿魏酰酪胺的 3 个二聚体和 1 个三聚体^[13], 发现其均为何首乌中微量成分, 初步推测这些聚合物在何首乌中可能的生物合成途径, 见图 2。

5 对正常人 L02 肝细胞活性的影响

5.1 细胞培养

参考文献方法^[27-28]: 取正常人 L02 肝细胞, 在 37 °C 和 5% 二氧化碳条件下, 培养于含 10% 的胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 待细胞长满培养皿 80%~90%, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 然后用新的培养基将细胞重悬, 将细胞按适当比例传代, 取对数生长细胞进行实验。

5.2 样品溶液的配制

取化合物 **1**、**7** 和 **8** 适量, 精密称定, 加 DMSO 溶解, 初始质量浓度为 500.0 μg/mL, 5 倍梯度稀释, 共计 7 个质量浓度梯度, 分别为 500.0、100.0、20.0、4.0、0.8、0.16 和 0.032 μg/mL, 重复 3 次。

5.3 细胞生长抑制率测定

采用 CCK8 法, 将肝细胞密度 (800 细胞/孔) 接种于 384 孔细胞板中, 每孔接种 40 μL 细胞悬液, 细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 孵育 24 h。每孔加入 10 μL 化合物 **1**、**7**、**8** 的样品溶液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 避光孵育 72 h。孵育后, 向细胞板中加入

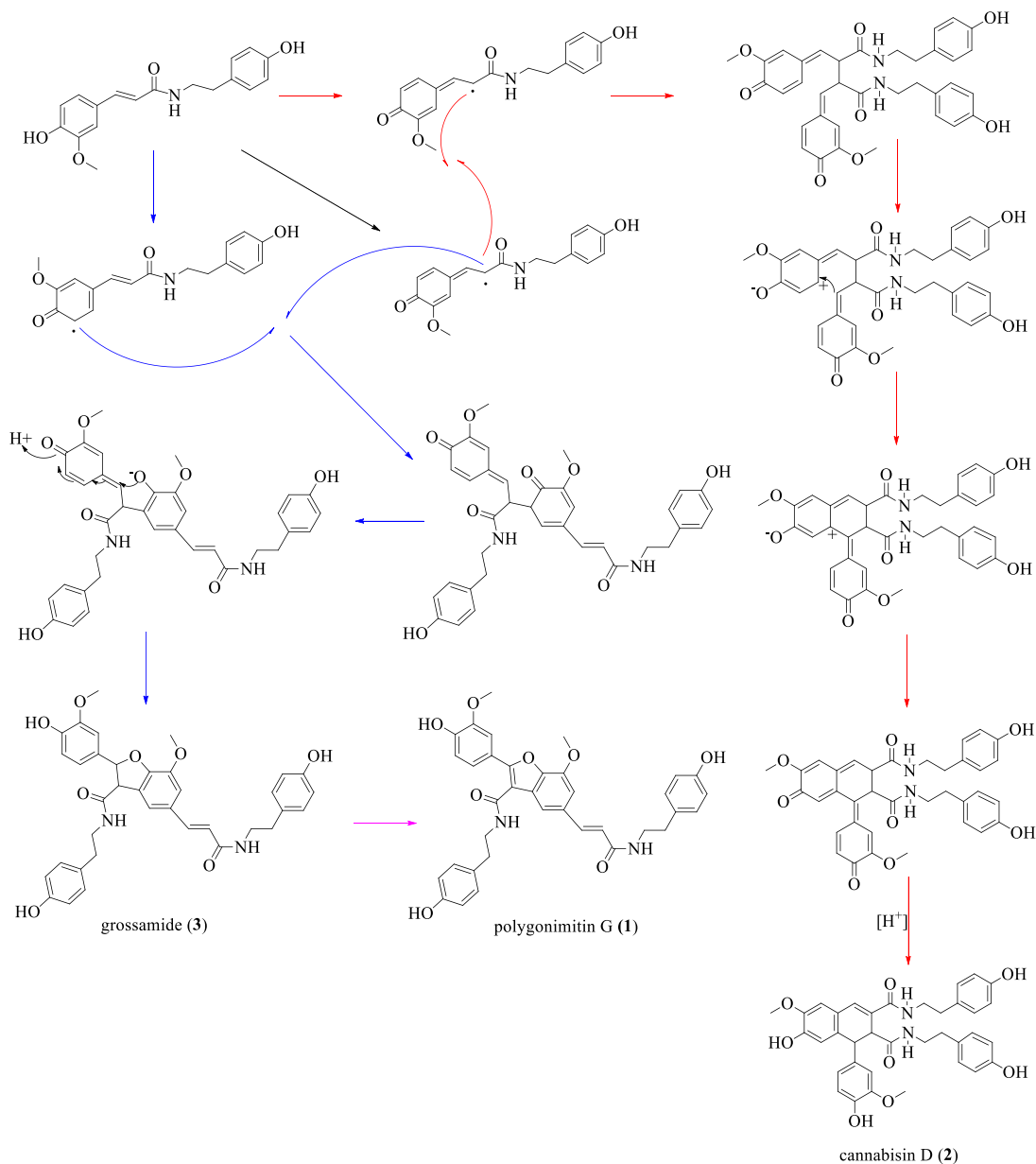


图 2 化合物 **1**~**3** 的可能生物合成途径

Fig. 2 Plausible biogenetic route for compounds **1**–**3**

CCK8, 5 μL /孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 4 h (注意避光), 然后在酶标仪中检测吸光度 (A) 值, 吸收波长设为 450 nm, 按照公式计算细胞的抑制率。结果发现, 化合物 **1**、**7** 和 **8** 对 L-02 细胞的 IC_{50} 值, 分别为 (3.02 ± 1.20) 、 (190.35 ± 5.39) 和 (300.61 ± 16.27) $\mu\text{mol/L}$ 。

抑制率 = $(A_s - A_{NC}) / (A_{STSP} - A_{NC})$

A_s 为样品孔的 A 值 (待测化合物); A_{NC} 为阴性孔 A 值 (细胞 + 培养基 + DMSO); A_{STSP} 为星孢菌素 (STSP) 孔 A 值 (细胞 + 培养基 + 10 $\mu\text{mol/L}$ STSP)

6 讨论

目前, 从何首乌中仅分离得到 N -反式-阿魏酰酪胺、 N -反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺、 N -反式咖啡酰酪胺、cannabisin D、grossamide、polygonimitin G 和 polygonimitin F 等 7 个木脂素酰胺类成分, 但化合物量较少, 提示其可能为何首乌中一类新的微量成分。polygonimitin G (**1**) 与 N -反式-阿魏酰酪胺 (**7**) 和 N -反式阿魏酰-3-甲氧基酪胺 (**8**) 相比, 具有更强的 L-02 细胞抑制作用, 提示该类化合物可能具有一定的潜在肝毒性。另据文献报道^[13,29-31], 该类成分还具有保肝、调血脂、抗肿瘤、抗氧化和抗炎等活性, 所以, 有必要对其进行全合成研究, 从而进一步系统评价该成分的肝毒性和生物活性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 183-184.
- [2] 赵玉姣, 彭华胜. 历代本草何首乌图考及其“辨状论质”观 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1960-1967.
- [3] 陈仁山. 药物出产辨 [M]. 广州: 新医药出版社, 1930: 78.
- [4] 李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价 [J]. 药学报, 2015, 50(1): 28-33.
- [5] 于瑞丽, 门伟婕, 周昆, 等. 何首乌毒性物质基础及肝毒性机制研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2019, 16(8): 496-503.
- [6] 马红红, 魏桂林, 潘秋莎, 等. 中药人源性毒性评判的科学基础、策略与技术关键点 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3568-3573.
- [7] 王浩, 杨健, 周良云, 等. 何首乌化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 192-205.
- [8] Teka T, Wang L M, Gao J, et al. *Polygonum multiflorum*: Recent updates on newly isolated compounds, potential hepatotoxic compounds and their mechanisms [J]. *J*

Ethnopharmacol, 2021, 271: 113864.

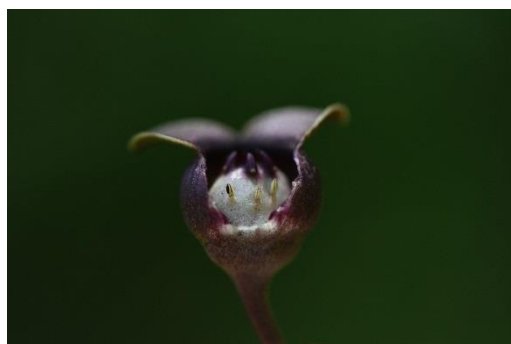
- [9] Yang J B, Yan Z, Ren J, et al. Polygonumolides A1-B3, minor dianthrone derivatives from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(6): 617-624.
- [10] Yang J B, Li L, Dai Z, et al. Polygonumolides C1-C4; minor dianthrone glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(9): 813-822.
- [11] Yang J B, Tian J Y, Dai Z, et al. A-Glucosidase inhibitors extracted from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Fitoterapia*, 2017, 117: 65-70.
- [12] Yang J B, Ye F, Tian J Y, et al. Multiflorumisides HK, stilbene glucosides isolated from *Polygonum multiflorum* and their *in vitro* PTP1B inhibitory activities [J]. *Fitoterapia*, 2020, 146: 104703.
- [13] Yang J B, Sun H, Ma J, et al. New phenolic constituents obtained from *Polygonum multiflorum* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(3): 342-346.
- [14] Li H Y, Yang J B, Li W F, et al. *In vivo* hepatotoxicity screening of different extracts, components, and constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. in zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110524.
- [15] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型评价何首乌中 18 种成分的肝脏毒性 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 744-752.
- [16] 吴宇. 药物性肝损伤体外筛选模型和何首乌致肝损伤的初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [17] Sakakibara I, Ikeya Y, Hayashi K, et al. Three phenyldihydronaphthalene lignanamides from fruits of *Cannabis sativa* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(9): 3219-3223.
- [18] 陈芳, 郑新恒, 王瑞, 等. 枸杞根化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1007-1012.
- [19] Seca A M, Silva A M, Silvestre A J, et al. Lignanamide and other phenolic constituents from the bark of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(8): 1219-1223.
- [20] Helvetica A, Meijer T M, Schmid H. Eleutherinol, a natural naphthopyrone. VI. constituents of *Eleutherine bulbosa* [J]. *Helv Chim Acta*, 1952, 35: 910-928.
- [21] Jutiviboonsuk A, Zhang H J, Tan G T, et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(23): 2745-2751.
- [22] 张立新, 岳丹丹, 刘学贵, 等. 透骨草化学成分的分离鉴定及生物活性研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2020, 30(10): 606-612.

- [23] Mandava N, Anderson J D, Dutky S R. Indole plant-growth inhibitor from *Abrus precatorius* seeds [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13(12): 2853-2856.
- [24] Chawla H M, Sharma S K. Erythritol, a new isoquinoline alkaloid from *Erythrina variegata* flowers [J]. *Fitoterapia*, 1993, 64: 15-17.
- [25] 欧阳文, 罗懿钊, 李震, 等. 土牛膝抗炎成分分离、鉴定与含量测定研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7): 1171-1181.
- [26] 陈惠琴, 张荣荣, 梅文莉, 等. 海南栽培肾茶中 1 个新的桉烷型倍半萜 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 95-99.
- [27] Yu J, Xie J, Mao X J, *et al.* Hepatotoxicity of major constituents and extractions of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Polygoni Multiflori Praeparata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1291-1299.
- [28] 邵丹, 李晓菲, 尹萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2044-2050.
- [29] Chen H, Li Y J, Sun Y J, *et al.* Lignanamides with potent antihyperlipidemic activities from the root bark of *Lycium chinense* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 122: 119-125.
- [30] Zhuang X C, Chen G L, Liu Y, *et al.* New lignanamides with antioxidant and anti-inflammatory activities screened out and identified from *Warburgia ugandensis* combining affinity ultrafiltration LC-MS with SOD and XOD enzymes [J]. *Antioxidants* (Basel), 2021, 10(3): 370.
- [31] Leonard W, Zhang P Z, Ying D Y, *et al.* Lignanamides: sources, biosynthesis and potential health benefits-a minireview [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(8): 1404-1414.

[责任编辑 王文倩]

• 封面图片介绍 •

北细辛花



北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 为马兜铃科细辛属植物。常卷曲成团。根茎横生呈不规则圆柱状，具短分枝，长 1~10 cm，直径 0.2~0.4 cm；表面灰棕色，粗糙，有环形的节，节间长 0.2~0.3 cm。分枝顶端有碗状的茎痕。根细长，密生节上，长 10~20 cm，直径 0.1 cm；表面灰黄色，平滑或具纵皱纹；有须根和须根痕；质脆，易折断，断面平坦，黄白色或白色。气辛香，味辛辣、麻舌。

北细辛主产于吉林、辽宁、黑龙江省，为细辛药材基原植物；具有祛风散寒、通窍止痛、温肺化饮的功效。用于风寒感冒、头痛、牙痛、鼻塞鼻不渊、风湿痹痛、痰饮喘咳。