

土千年健化学成分及生物活性研究*

杨增明^{1,2}, 赵云丽³, 盛丽琴², 尚建华³

(1. 昆明贝叶傣医药研究所, 云南 昆明 650217; 2. 云南良方傣药研发技术中心, 云南 昆明 650217;

3. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要: 研究云南民间习用药材土千年健主要化学成分及其生物活性. 采用各种色谱技术进行分离纯化, 通过 NMR、MS 等波谱学方法鉴定化合物; 采用醋酸致小鼠扭体性疼痛试验考察化合物的镇痛活性. 从土千年健 60% 乙醇提取物中分离得到 2 个化合物, 分别鉴定为 cinnamtannin B1 (1) 和 2-ethylene-3,5,6-trimethyl-4-phenol-1-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (2); 与溶媒对照组相比, 化合物 1 能明显抑制醋酸所致小鼠扭体性疼痛, 差异具有统计学意义. 化合物 2 为首次从越桔属中分离得到, 化合物 1 为首次从该植物中分离得到; 首次研究报道了化合物 1 和 2 的镇痛活性.

关键词: 土千年健; 乌鸦果; cinnamtannin B1; 镇痛活性

中图分类号: R 284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0258-7971(2015)06-0884-04

土千年健为杜鹃花科植物乌鸦果^[1] (*Vaccinium fragile* Franch.) 的干燥根. 在中药大辞典^[2]、滇南本草^[3]、云南中草药^[4]、昆明民间常用中草药^[5] 等中草药著作中均有收载. 具有祛风除湿, 舒经通络, 活血, 消肿止痛等功效, 临床主要用于风寒湿痹, 筋挛骨痛, 手足顽麻, 半身不遂, 跌打损伤等症^[2-5]. 目前, 国内外对该属植物的果实与叶研究较多^[6-8], 还未见土千年健化学成分有关的研究报道, 为阐明民间传统药用知识的物质基础和理论依据, 充分挖掘其药用价值, 发展民族医药, 本文对土千年健化学成分进行研究, 从中分离得到 2 个化合物, 分别鉴定为 cinnamtannin B1 (1) 和 2-ethylene-3,5,6-trimethyl-4-phenol-1-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (2), 均为首次从该植物中分离得到, 化合物 2 为首次从越桔属中分离得到. 本文还首次研究报道了化合物 1 和 2 的镇痛活性.

1 仪器与材料

1.1 仪器、试剂与材料 BRUKER AV-III 600、DRX-500 MHz 型核磁共振仪, BRUKER HCT Esquire 3000 型或 Agilent G6230 TOF LC-MS 型液相色谱/质谱联用仪; Agilent 1100 高效液相色谱仪; D101 大孔树脂 (沧州宝恩化工有限公司) ϕ .077~0.087 mm 柱色谱硅胶和薄层硅胶 G 板 (青岛海洋化工厂), ODS-A (50 μ m, YMC 产品), LH-20 (0.077~0.172 mm, 台州市路桥四甲生化塑料厂); HPLC 用试剂为色谱纯, 其他为分析纯或食品级.

土千年健样品于 2010 年 10 月采自云南省禄丰县, 经笔者鉴定, 为杜鹃花科植物乌鸦果 (*Vaccinium fragile* Franch.), 凭证标本 (标本号 091006) 存放于昆明贝叶傣医药研究所.

1.2 实验动物与对照样品 SPF 级昆明种小鼠, 3~4 周龄, 全雄, 购自昆明医学院实验动物中心, 生产许可证: SCXK(滇) 2005-0008. 拜阿斯匹灵 (阿斯匹林, ASP), 100 mg/片, 进口药品注册证号 H20050059, 批号 BTA6ZB7, Bayer Health Care AG 生产, 用 1% CMC-Na 研磨后配制成 10 mg/mL 混悬液供阳性对照用;

* 收稿日期: 2015-08-07

基金项目: 昆明市科技计划项目 (09H130202).

作者简介: 杨增明 (1965-), 男, 硕士, 正高级工程师, 主要从事中药民族药研究与开发. E-mail: bydy@188.com.

通信作者: 尚建华 (1957-), 女, 正高级工程师, 主要从事药理毒理学研究. E-mail: sjhyaowu@163.com.

羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na), 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20070826, 用纯水加热、煮沸、冷却后配成 1% 质量分数供受试样品配制及溶媒对照用。

2 提取与分离

土千年健 1 kg 粉碎成粗粉, 60% 乙醇回流提取 2 次, 提取液减压浓缩至无醇味, 加水稀释至 2 000 mL, 离心, 上清液通过预处理好的 D101 大孔吸附树脂柱, 依次用水、20% 乙醇洗脱, 收集 20% 乙醇洗脱液, 减压浓缩至无醇味, 加水稀释至 1 000 mL, 通过预处理好的聚酰胺树脂柱, 依次用水、90% 乙醇洗脱, 得水洗脱部位和醇洗脱部位。醇洗脱部位拌膏过硅胶柱, 乙酸乙酯洗脱, 再反复通过 ODS-A、LH-20 柱分离, 最后经 ZORBAX SB-C18(9.4 mm × 250 mm, ϕ 5 μ m) 半制备 HPLC 纯化, 冷冻干燥, 得化合物 1(22 mg)。水洗脱部位经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(体积比 80:20)洗脱, 洗脱物经甲醇重结晶, 得化合物 2(85 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 灰白色粉末, ESI-MS(neg.) m/z : 863 $[M-H]^-$, ESI-MS(pos.) m/z : 887 $[M+Na]^+$ 。 1H NMR(CD_3OD , 500 MHz) δ : Upper unit 3.29(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3), 4.12(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-4), 6.0(1H, dd, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.05(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 7.07(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.85(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.01(1H, dd, $J=8.5$, 2.0 Hz, H-6'); Middle unit 5.78(1H, s, H-2), 4.07(1H, d, H-3), 4.54(1H, s, H-4), 5.97(1H, d, H-6), 7.30(1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2'), 6.90(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.18(1H, dd, $J=8.5$, 1.5 Hz, H-6'); Lower unit 4.37(1H, s, H-2), 3.91(1H, s, H-3), 2.91(1H, s, H-4), 6.09(1H, s, H-6), 6.82(1H, m, $J=1.5$ Hz, H-2'), 6.75(1H, m, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.72(1H, m, $J=8.5$, 1.5 Hz, H-6')。 ^{13}C NMR(CD_3OD , 125 MHz) δ : Upper unit 99.9(C-2), 67.5(C-3), 28.8(C-4), 156.7(C-5), 98.3(C-6), 157.8(C-7), 96.5(C-8), 154.1(C-9), 106.3(C-10), 132.4(C-1'), 115.7(C-2'), 145.5(C-3'), 146.3(C-4'), 116.1(C-5'), 119.8(C-6'); Middle unit 78.9(C-2), 72.6(C-3), 38.3(C-4), 155.8(C-5), 96.0(C-6), 151.1(C-7), 106.7(C-8), 151.8(C-9), 106.8(C-10), 131.8(C-1'), 116.7(C-2'), 145.9(C-3'), 146.3(C-4'), 115.9(C-5'), 121.4(C-6'); Lower unit 80.3(C-2), 67.2(C-3), 29.9(C-4), 155.8(C-5), 96.3(C-6), 155.6(C-7), 108.8(C-8), 156.0(C-9), 99.9(C-10), 132.4(C-1'), 115.4(C-2'), 145.3(C-3'), 145.8(C-4'), 115.7(C-5'), 119.4(C-6')。以上数据与文献^[9-11]对照基本一致, 化合物 1 鉴定为 cinnamtannin B1。

化合物 2 白色无定形粉末; -TOF MS m/z : 471 $[M-H]^-$, 507 $[M+Cl]^-$, 943 $[2M-H]^-$, 979 $[2M+Cl]^-$, EI-MS(pos.) m/z : 472 $[M]^+$ (10), 340 $[M-xyl]^+$ (15), 178 $[M-glc-xyl]^+$ (100); 1H NMR(C_5D_5N , 500 MHz) δ : 7.71(1H, dd, $J=12.2$, 18.3 Hz, H-7), 5.62(1H, dd, $J=2.4$, 11.8 Hz, H-8a), 5.54(1H, dd, $J=2.6$, 18.5 Hz, H-8b), 2.55(3H, s, H-9), 2.42(3H, s, H-10), 2.65(3H, s, H-11); glc-5.32(1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 4.19~4.29(1H, overlapped, H-2'), 4.19~4.29(1H, overlapped, H-3'), 4.17~4.19(1H, overlapped, H-4'), 3.89~3.93(1H, overlapped, H-5'), 4.66(1H, dd, $J=5.2$, 11.6 Hz, H-6'a), 4.17~4.19(1H, overlapped, H-6'b); xyl-4.80(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.89~3.93(1H, overlapped, H-2''), 4.07(1H, t, H-3''), 4.12~4.15(1H, m, H-4''), 4.19~4.29(1H, t, H-5''a), 3.60(1H, overlapped, H-5''b)。 ^{13}C NMR(C_5D_5N , 400 MHz) δ : 147.1(C-1), 130.4(C-2), 121.6(C-3), 151.2(C-4), 129.2(C-5), 124.7(C-6), 134.9(C-7), 119.4(C-8), 14.6(C-9), 13.8(C-10), 15.2(C-11); glc-106.0(C-1'), 75.7(C-2'), 78.3(C-3'), 71.7(C-4'), 76.9(C-5'), 70.1(C-6'); xyl-105.7(C-1''), 74.7(C-2''), 77.9(C-3''), 71.2(C-4''), 66.9(C-5'')。以上数据与文献^[12]对照基本一致, 化合物 2 鉴定为 2-ethylene-3,5,6-trimethyl-4-phenol-1-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside(2)。

4 镇痛作用研究

选 18 ~ 21 g 雄性昆明种小鼠,按体重随机分组:溶媒对照组;阳性对照阿斯匹林 200 mg/kg 组;化合物 2(批号 110223, HPLC 外标法测定质量分数为 95.7%) 8.33、25 mg/kg 组(第 1 次试验);或化合物 1(批号 110727, HPLC 外标法测定质量分数为 83.3%) 33、66 mg/kg 组(第 2 次试验);每组 11 只。除阿斯匹林组仅于试验当日给药 1 次外,其余各组每日分别按剂量灌胃给药 1 次,对照组灌服等容量 1% CMC-Na 20 mL/kg,连续 3 d。末次给药后 30 min,每鼠按 0.1 mL/10 g,剂量腹腔注射 0.6% 冰醋酸溶液,观察并记录 15 min 内各鼠因疼痛引起的扭体反应次数,计算抑制率。结果见表 1。结果表明,化合物 1 能明显抑制醋酸所致小鼠的扭体性疼痛,与溶媒对照组相比,差异具有统计学意义。

表 1 化合物 1 和化合物 2 对醋酸致小鼠疼痛的影响
Tab. 1 Effects of compound 1 and 2 on pain induced by acetic acid in mice

组别	溶媒对照	阿斯匹林	化合物 1		化合物 2	
剂量(mg/kg)	20 mL	200	33	66	8.33	25
动物数(只)	11	11	11	11	11	11
给药途径	ig	ig	ig	ig	ig	ig
扭体数	50.9 ± 11.0	14.4 ± 10.9**	36.8 ± 15.6*	35.5 ± 13.2**	—	—
($\bar{x} \pm SD$, 次)	41.1 ± 18.2	11.1 ± 12.2**	—	—	29.3 ± 16.2	29.9 ± 14.7
抑制率 / %	—	71.79	27.68	30.18	—	—
	—	73.01	—	—	28.78	27.23

* / ** 为与溶媒对照组相比 $P < 0.05 / 0.01$

5 讨 论

之前,化合物 1 已从落地梅(*Lysimachia pardiformis*)^[9]、长节珠(*Parameria laevigata*)^[10]、菲律宾樟树(*Machilus philippinensis*)^[11]以及越桔(*Vaccinium vitis-idaea*)^[13]等多种植物中分离得到,化合物 2 仅见从荨麻目的桑科榕属植物地果 *Ficus tikoua* 中分离得到。在哈钦松被子植物系统图中,荨麻目与杜鹃花目均由五桠果目进化而来,有一定的亲缘关系。

本课题组的另一项研究成果表明,土千年健药材用甲醇回流提取,直接或经 D101 大孔树脂纯化后,照 HPLC 法测定,以乙腈-0.1% 磷酸溶液(体积比 15: 85)为流动相,280 nm 或 247 nm 波长处检测,结果显示土千年健药材中化合物 1 和 2 的质量分数分别为 0.44% 和 0.24%,为土千年健药材的主要成分。生物活性研究结果表明 2 者均具有一定的镇痛活性。据文献[14]报道,以化合物 1 为主要成分的乌药 LEF 组分能有效地抑制继发性肿胀、风寒湿痹肿胀及炎性组织中 PGE₂ 的生成,具有很好的抗炎活性。文献[15]还报道了化合物 1 诱导脂肪细胞形成的药理活性。文献[12]报道了化合物 2 对体外培养的 HeLa 细胞和 HepG2 细胞具有一定的细胞毒活性。

综上,化合物 1 和 2 为土千年健药材消肿止痛功效的主要活性成分之一。1 和 2 的其它药理活性值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志(57 卷,第三分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 117-120.
Institute of Botany of the Chinese Academy of Sciences. Flora of China, vol. 57(3) [M]. Beijing: Science Press, 1991: 117-120.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1977: 98-99.

- Jiangsu New Medical College. Chin Herb Dict [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1977: 98-99.
- [3] 《滇南本草》整理组. 滇南本草(第一卷) [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1975: 328-331.
Yunnan Materia Medica Organize Group. Yunnan Materia Medica (vol. 1) [M]. Kunming: Yunnan People's Press, 1975: 328-331.
- [4] 云南省卫生局革委会. 云南中草药 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1971: 44-45.
The Revolutionary Committee of Health Bureau, Yunnan Province. Yunnan Herbal Medicine [M]. Kunming: Yunnan People's Press, 1971: 44-45.
- [5] 昆明市卫生局. 昆明民间常用中草药 [M]. 昆明. 1971: 298-299.
Kunming Health Bureau. Kunming common folk herbs [M]. Kunming. 1971: 298-299.
- [6] PAPPAS E, SCHAICH K M. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability [J]. Food Science and Nutrition, 2009, 49: 741-781.
- [7] JUNGFER E, ZIMMERMANN B F, RUTTKAT A, et al. Comparing procyanidins in selected *Vaccinium* species by UHPLC-MS(2) with regard to authenticity and health effects [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(38): 9688-9696.
- [8] LEE S, JUNG E S, DO S G, et al. Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium* spp.) [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(9): 2126-2133.
- [9] 任凤霞, 张爱军, 赵毅民. 四块瓦的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 334-336.
REN F X, ZHANG A J, ZHAO Y M. Studies on constituents of *Lysimachia pardiformis* Franch [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2009, 44(5): 334-336.
- [10] KAMIYA K, WATANABE C, ENDANG H, et al. Studies on the constituents of bark of *Parameria laevigata* MOLDENKE [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(5): 551-557.
- [11] LIN H C, LEE S S. Proanthocyanidins from the Leaves of *Machilus philippinensis* [J]. J Nat Prod, 2010, 73: 1375-1380.
- [12] JIANG Z Y, LI S Y, LI W J, et al. Phenolic glycosides from *Ficus tikoua* and their cytotoxic activities [J]. Carbohydrate Research, 2013, 382: 19-24.
- [13] HO K Y, HUANG J S, TSAI C C. Antioxidant activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. [J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(9): 1075-1078.
- [14] 俞桂新, 李庆林, 王峥涛, 等. 乌药活性组分 LEF 的化学成分及抗风湿作用 [J]. 植物资源与环境, 1999, 8(4): 1-6.
CHOU G X, LI Q L, WANG Z T, et al. Compositions and anti-rheumatism effect of LEF fraction from the root of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 1999, 8(4): 1-6.
- [15] TAHER M, BDUL MAJID F A, SARMIDI M R. Cinnamtannin B1 activity on adipocytes formation [J]. Med J Malaysia, 2004, 59(SB): 97-98.

Chemical constituents from the roots of *Vaccinium fragile* and their bioactivity

YANG Zeng-ming^{1,2}, ZHAO Yun-li³, SHENG Li-qing², SHANG Jian-hua³

(1. Kunming Institute of Pattra Medicine, Kunming 650217, China;

2. Liangfang Research and Development Center of Pattra Medicine of Yunnan, Kunming 650217, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: To study the chemical constituents from the roots of *Vaccinium fragile* and their bioactivity. The chemical constituents were isolated and purified by chromatographic techniques and identified by NMR, MS spectroscopic analyses. In the 60% ethanol extract, two compounds were isolated and identified as cinnamtannin B1 (1) 2-ethylene-3,5,6-trimethyl-4-phenol-1-O- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (2), respectively. Compared with the vehicle control, compound 1 can significantly inhibit the acetic acid-induced writhing pain in mice. Compound 2 is isolated from the genus *Vaccinium* for the first time, compound 1 is first obtained from this plant. It is the first report of the analgesic activity of compounds 1 and 2.

Key words: *Vaccinium fragile*; cinnamtannin B1; analgesic activity