

落地生根的化学成分研究

叶艳影¹, 杨友剑², 夏明钰³, 刘东春¹, 代英辉¹, 郑玲⁴, 王东^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 大连华立金港药业有限公司, 辽宁 大连 116100

3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

4. 云南省药物依赖防治研究所, 云南 昆明 650228

摘要: 目的 研究落地生根 *Bryophyllum pinnatum* 的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和制备薄层色谱等多种方法进行分离, 并通过 NMR 等多种方法鉴定化合物的结构。采用 RBL-2H3 细胞脱颗粒法测定了化合物的抗过敏活性。

结果 从落地生根的 60%乙醇提取部位分离得到 1 个木脂素类化合物: 落地生根苷(1); 4 个黄酮类化合物: 山柰酚(2)、芦丁(3)、槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃鼠李糖苷(4)、槲皮苷(5)以及 β -谷甾醇(6)。**结论** 化合物 1 为新化合物, 且木脂素类化合物为首次从该植物中分离得到。山柰酚为落地生根抗过敏主要活性成分之一。

关键词: 景天科; 落地生根; 落地生根苷; 山柰酚; 木脂素类; 抗过敏

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2642-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.002

Chemical constituents in herbs of *Bryophyllum pinnatum*

YE Yan-ying¹, YANG You-jian², XIA Ming-yu³, LIU Dong-chun¹, DAI Ying-hui¹, ZHENG Ling⁴, WANG Dong¹

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Dalian Holley KingKong Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116100, China

3. School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

4. Yunnan Institute for Drug Abuse, Kunming 650228, China

Abstract: Objective To isolate and identify the chemical constituents from the herbs of *Bryophyllum pinnatum*. **Methods** The compounds were isolated by chromatography on silica gel and Sephadex LH-20 columns and preparative TLC. The structures of the isolated compounds were elucidated based on spectroscopic data and chemical properties. The anti-allergic activities of the compounds were evaluated by RBL-2H3 cells. **Results** Six compounds were isolated from the herbs of *B. pinnatum*. Their structures were identified as bryophylluside (1), kaempferol (2), rutin (3), quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside (4), quercitrin (5), and β -sitosterol (6). **Conclusion** Compound 1 is a new lignan, and lignans are first isolated from *B. pinnatum*. Kaempferol is one of the main anti-allergic active compounds in *B. pinnatum*.

Key words: Crassulaceae; *Bryophyllum pinnatum* (L. f.) Oken; bryophylluside; kaempferol; lignans; anti-allergy

落地生根是景天科(Crassulaceae)落地生根 *Bryophyllum pinnatum* (L. f.) Oken 的全草, 分布于我国福建、台湾、广东、广西、云南等地, 具有凉血、止血、消肿、解毒的功效^[1]。落地生根还广泛分布于非洲、美洲热带以及印度和澳大利亚, 作为传统药物用于腹泻、呕吐、镇痛、抗炎、抗病原微生物、利什曼病及抗变态反应等, 主要含有黄酮类、三萜类、

生物碱类及蟾蜍二烯羟酸内酯类等成分^[2]。现代药理研究表明, 落地生根具有很强的抗过敏和抗组胺作用^[3-4], 也曾作为皮肤过敏的治疗药物而在民间使用, 但目前尚未有落地生根抗过敏活性成分系统研究的报道。为了阐明落地生根抗过敏活性成分, 本实验对落地生根的 60%乙醇提取部位进行了研究, 从中分离并鉴定了 6 个化合物: 1 个木脂素类化合

收稿日期: 2013-06-16

作者简介: 叶艳影(1984—), 女, 广东佛山人, 硕士研究生。E-mail: yeyanying0708@126.com

*通信作者 王东(1976—), 男, 辽宁阜新, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事活性天然产物及其生物合成途径调控研究。

Tel: (024)23986466 E-mail: wangdxmy@gmail.com

物落地生根苷 (bryophylluside, **1**); 4个黄酮类化合物山柰酚 (kaempferol, **2**)、芦丁 (rutin, **3**)、槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃鼠李糖苷 [quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranoside, **4**]、槲皮苷 (quercitrin, **5**) 以及 β -谷甾醇 (β -sitosterol, **6**)。其中化合物**1**为一新化合物, 且木脂素类化合物为首次从该植物中分离得到。山柰酚为落地生根抗过敏主要活性成分之一。

1 仪器与材料

Bruker Arx 300、Bruker Arx 600 核磁共振光谱仪 (瑞士 Bruker 公司), Finnigan LCQ LC-MS (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Perkin Elmer Model 341LC 旋光仪 (美国 Perkin Elmer 公司), X4 显微熔点测定仪 (上海精密科学仪器有限公司), 二氧化碳培养箱 (上海福玛实验设备有限公司), 680 型酶联免疫分析仪 (美国 Bio-Rad 公司), 倒置显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司)。

薄层色谱用硅胶 G、柱色谱用硅胶 (50~75 μ m, 青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 (美国 Sigma 公司), D101 大孔吸附树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司), 其余试剂为市售分析纯。

RBL-2H3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库, 甲基噻唑蓝 (MTT)、*p*-硝苯基-*N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷 (*p*-NAG)、抗 DNP-IgE 单克隆抗体、色甘酸钠、PIPES (美国 Sigma-Aldrich 公司), 胰蛋白酶、MEM 培养基 (美国 Gibco 公司)、胎牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所以)、抗原 DNP-BSA (美国 Biosearch Technologies 公司)。

落地生根药材于 2009 年 7 月采于中国云南省, 经沈阳药科大学中药学院生药教研室王东副教授鉴定为景天科植物落地生根 *Bryophyllum pinnatum* (L. f.) Oken 的全草。

2 提取与分离

干燥的落地生根药材 4 kg, 粉碎后用 85%乙醇 20 L 室温浸泡提取 4 次, 每次 3 d, 合并浸出液, 滤过, 滤液减压浓缩, 得到总浸膏 414 g, 所得浸膏用 2 L 蒸馏水充分溶解, 滤过。滤液通过 D101 大孔吸附树脂柱色谱, 依次用水和 20%、40%、60%、80%、95%乙醇进行洗脱。60%乙醇洗脱部分 (17 g), 干法上样进行硅胶柱色谱, 用二氯甲烷-甲醇 (100:0 $\rightarrow$ 1:5) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 共得到 19 个流分 (Fr. 1~19)。Fr. 3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 (1:1) 为流动相洗

脱得到化合物**1** (9 mg)。Fr. 4 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以甲醇为流动相洗脱得到化合物**2** (8 mg)。Fr. 9 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以甲醇-水 (1:1) 为流动相洗脱得到化合物**3** (3 mg)。Fr. 10 经 ODS 柱色谱 (40%甲醇为流动相), 制备 TLC (正丁醇-醋酸-水 4:1:5) 及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇-水 90:10) 得到化合物**4** (5 mg)。Fr. 11 经制备 TLC (三氯甲烷-甲醇-冰醋酸-水 70:35:10:5) 及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇-水 90:10) 得到化合物**5** (10 mg)、**6** (12 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**: 无色针状结晶 (甲醇), mp 210~212 $^{\circ}$ C, HR-ESI-MS 显示化合物的准分子离子峰 m/z : $[M+Na]^+$ 529.204 4 (分子式 $C_{26}H_{34}O_{10}Na$, 计算值 529.204 9), 确定分子式为 $C_{26}H_{34}O_{10}$ 。 $[\alpha]_D^{25} +13.2^{\circ}$ (c 3.15, MeOH); UV λ_{max} (CH₃CN) nm: 201 (4.29), 220 (4.53), 237 (4.58), 256 (4.70)。IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 553.6, 1 513.7, 1 254.5, 1 042.9。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 在低场区给出一组 ABX 耦合质子信号 δ 6.48 (1H, dd, $J=1.8, 7.8$ Hz)、6.68 (1H, d, $J=7.8$ Hz) 和 6.80 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 以及 2 个芳香质子信号 δ 6.16 (1H, s) 和 6.67 (1H, s)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) 共给出 26 个碳信号, 其中低场区给出 12 个芳香碳信号 δ 137.7、114.9、148.2、145.5、116.5、122.2、114.4、147.6、147.9、112.9、130.2、133.3 及 1 组木糖碳信号 δ 105.5 (C-1''), 74.4 (C-2''), 77.7 (C-3''), 70.7 (C-4'') 和 66.8 (C-5'')^[5]。DEPT-135 谱显示高场区有 3 个次甲基碳信号 δ 38.6 (C-2)、45.2 (C-3) 和 46.9 (C-4) 和 1 个亚甲基碳信号 δ 33.6 (C-1), 同时显示有 2 个连氧亚甲基碳信号 δ 68.5 (C-3a) 和 63.7 (C-2a)。推测化合物**1**可能为苯代四氢萘类木脂素苷类化合物。

HSQC 谱显示 δ 3.94 (1H, d, $J=7.2$ Hz) 的质子与木糖的端基碳信号 δ 105.5 相关; HMBC 谱中, δ 3.94 的质子与碳信号 δ 68.5 有远程相关, 因此确定木糖与木脂素苷元的 3a 位相连。¹H-NMR 显示有 3 个甲氧基质子信号 δ 3.72 (3H, s)、3.71 (3H, s) 和 3.43 (3H, s), HMBC 谱中分别与 δ 148.2 (C-3'), 147.9 (C-7) 和 147.6 (C-6) 的碳信号有远程相关, 因此确定甲氧基分别与 C-6, 7 及 3'位相连。将化合物**1**的碳谱数据与 schizandriside 的碳谱数据^[6]对照, 除化合物**1**多出 1 个甲氧基碳信号 (δ 56.5, 6-OCH₃) 外, 二者碳谱数据基本一致 (表 1)。故鉴定化合物

表1 化合物1的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR及HMBC谱数据Table 1 ^{13}C -NMR and ^1H -NMR spectroscopic data for compound 1 and HMBC correlations

碳位	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	schizandriside ^[6] (δ_{C})
1	33.6	2.74 (2H, d, $J = 7.8$ Hz)	C-2a, 3, 8	33.9
2	38.6	1.88 (1H, m)	C-4, 9	39.6
3	45.2	1.72 (1H, tt, $J = 2.4, 10.8$ Hz)	C-1, 2a, 10, 1'	45.9
4	46.9	4.09 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	C-5, 9, 2', 6'	47.9
5	114.4	6.16 (1H, s)	C-7, 9	117.4
6	147.6			145.1
7	147.9			147.1
8	112.9	6.67 (1H, s)	C-1, 6, 10	112.3
9	130.2			129.1
10	133.2			134.3
2a	63.7	3.47 (1H, m) 3.58 (1H, m)		65.1
3a	68.5	3.85 (1H, m) 2.98 (1H, m)		69.3
1'	137.7			138.6
2'	114.9	6.80 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	C-4, 4', 6'	114.2
3'	148.2			148.9
4'	146.5			145.8
5'	116.5	6.68 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	C-1', 3'	116.1
6'	122.2	6.48 (1H, dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz)	C-2', 4'	123.1
1''	105.5	3.94 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	C-3a	105.8
2''	74.4	2.95 (1H, m)		75.0
3''	77.7	3.09 (1H, m)		77.9
4''	70.7	3.27 (1H, m)		71.3
5''	66.8	3.66 (1H, m) 2.96 (1H, m)		66.9
6-OCH ₃	56.5	3.43 (3H, s)	C-6	
7-OCH ₃	56.3	3.71 (3H, s)	C-7	56.3
3'-OCH ₃	56.4	3.72 (3H, s)	C-3'	56.4

1 平面结构为 6-methoxy schizandriside。NOESY 谱中可见 H-2' (δ 6.80)、H-6' (δ 6.48) 与 H-3 (δ 1.72) 的相关信号, 同时可见 H-4 (δ 4.09) 与 H-2 (δ 1.88) 及 H-4 与 H-3a (δ 2.98) 的相关信号, 未见 H-2a 与 H-3a 以及 H-2' 与 H-3a 的相关信号, 因此推测 H-2 与 H-4 均位于 H-3 的反式位置上。旋光活性显示, 化合物 1 的比旋光度为 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +13.2^\circ$, 与 schizandriside 旋光活性 ($[\alpha]_{\text{D}}^{23} +18^\circ$) 基本一致^[6], 推测确定化合物 1 的相对构型为 2*R*, 3*R*, 4*S*。确定化合物 1 为 6-methoxyschizandriside, 为新化合物, 命名为落地生根苷, 结构式见图 1。且木脂素类化合物也为首次从该植物中分离得到。

化合物 2: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应呈阳性。

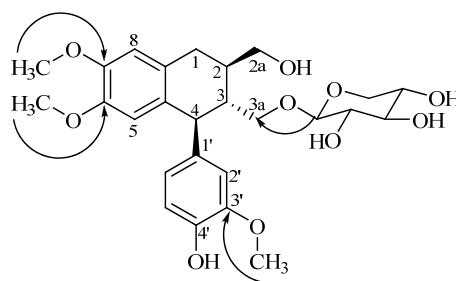


图1 化合物1的结构式及关键HMBC相关

Fig. 1 Structure and key HMBC correlations of compound 1 ^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.04 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-5), 6.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-7)。经与山柰酚氢谱数据对照基本一致^[7], 且与

山柰酚对照品共薄层, 3种不同展开系统下Rf值均一致, 故鉴定化合物**2**为山柰酚。

化合物**3**: 淡黄色粉末, 盐酸-镁粉反应呈阳性。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.56 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.83 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.36 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-6), 5.33 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-1''), 4.38 (1H, brs, H-1'''), 0.99 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-6''). 经与芦丁氢谱数据对照基本一致^[8], 且与芦丁对照品共薄层, 3种不同展开系统下Rf值均一致, 故鉴定化合物**3**为芦丁。

化合物**4**: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应呈阳性。正模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : $[M+H]^+$ 581.5, 负模式 ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z $[M-H]^-$ 579.5, 推测相对分子质量为 580。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.28 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.19 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.10 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 5.93 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 5.32 (1H, brs, H-1''), 4.12 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-1'''), 0.88 (3H, d, J = 5.8 Hz, H-6''); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.2 (C-4), 167.6 (C-7), 161.9 (C-5), 157.3 (C-9), 157.2 (C-2), 149.7 (C-4'), 146.2 (C-3'), 134.8 (C-3), 121.5 (C-1'), 121.1 (C-6'), 116.4 (C-2'), 116.0 (C-5'), 107.1 (C-1'''), 103.7 (C-10), 101.6 (C-1''), 100.1 (C-6), 94.8 (C-8), 81.4 (C-2''), 73.2 (C-4''), 72.6 (C-3'''), 71.8 (C-2'''), 71.0 (C-3''), 71.0 (C-5''), 68.5 (C-4'''), 66.5 (C-5'''), 18.2 (C-6''). 与槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃鼠李糖苷的波谱数据对照基本一致^[9]。但文献报道^[9]中 C-5 的化学位移位于较高场 (δ 157.5), C-9 的化学位移位于较低场 (δ 161.8), 经 HSQC 和 HMBC 谱确认, 且与槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷碳谱数据比较^[10], 证实文献报道^[9]中碳谱数据有误。故鉴定化合物**4**为槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物**5**: 黄色粉末, 盐酸-镁粉反应呈阳性。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.30 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 7.25 (1H, dd, J = 1.8, 8.0 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6), 5.26 (1H, brs, H-1''), 0.82 (3H, d, J = 5.7 Hz, H-6''); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 178.4 (C-4), 165.4 (C-7), 162.0

(C-5), 158.0 (C-9), 155.7 (C-2), 149.2 (C-4'), 146.0 (C-3'), 134.9 (C-3), 121.8 (C-1'), 121.5 (C-6'), 116.4 (C-5'), 116.2 (C-2'), 104.7 (C-10), 102.5 (C-1''), 99.6 (C-6), 94.4 (C-8), 71.9 (C-4''), 71.3 (C-3''), 71.1 (C-2''), 70.8 (C-5''), 18.2 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物**5**为槲皮苷。

化合物**6**: 白色针状结晶 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应阳性, 出现红 $\rightarrow$ 紫 $\rightarrow$ 蓝 $\rightarrow$ 绿 $\rightarrow$ 污绿等颜色变化。将其与 β -谷甾醇对照品共薄层, 在 3 种不同展开系统下展开, 其薄层行为一致, 故鉴定化合物**6**为 β -谷甾醇。

4 讨论

本课题组对所分离得到的化合物进行了抗过敏活性研究。采用 RBL-2H3 细胞脱颗粒法^[12], 对化合物**1**、**2**、**4**、**5**的抗过敏活性进行了考察, 同时采用 MTT 法^[13]考察了上述化合物在同等剂量下对 RBL-2H3 细胞的细胞毒作用。结果显示, 在 10 mg/L 剂量下, 上述化合物未见对 RBL-2H3 细胞有细胞毒活性, 对 RBL-2H3 细胞增殖抑制率分别为 18.2%、9.2%、22.7%和-15.3%。但该剂量下化合物**2**能够显著抑制 RBL-2H3 细胞释放 β -己糖胺酶, 抑制率为 50.3%, 远高于阳性对照色氨酸钠 (抑制率为 3.6%), 而其他化合物未见抑制作用, 抑制率分别为 3.0% (化合物**1**)、-11.6% (化合物**4**)和-27.6% (化合物**5**)。推测山柰酚为落地生根发挥抗过敏作用的主要活性成分之一。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] Kamboj A, Saluja A K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile: A review [J]. *Pharmacog Rev*, 2009, 3(6): 364-374.
- [3] Pal S, Sen T, Chaudhuri Nag A K. Neuropsychopharmacological profile of the methanolic fraction of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(3): 313-318.
- [4] Cruz E A, Da-silva S A, Muzitano M F, et al. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(12): 1616-1621.
- [5] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [6] Sadhu S K, Khatun A, Phattanawasin P, et al. Lignan

- glycosides and flavonoids from *Saraca asoca* with antioxidant activity [J]. *J Nat Med*, 2007, 61(4): 480-482.
- [7] 陈 剑, Mangelinckx S, 吕 寒, 等. 白子菜醋酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 524-527.
- [8] 任徐生. 天然产物化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [9] Muzitano M F, Tinoco L W, Guette C, *et al.* The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(18): 2071-2077.
- [10] Halabalaki M, Urbain A, Paschali A, *et al.* Quercetin and kaempferol 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabino-pyranoside]-7-*O*- α -L-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae*: Structure determination and conformational studies [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(9): 1939-1945.
- [11] 王洪平, 曹 芳, 杨秀伟. 头花蓼地上部分的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 24-30.
- [12] Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Kummee S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(1): 191-193.
- [13] Wang D, Xia M Y, Cui Z, *et al.* Cytotoxic effects of mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1025-1030.