

瑶药材搜山虎的化学成分研究

王 刚^{1,2,3}, 邹 准¹, 周艳林¹, 刘曲山¹, 覃柳馨³, 周泽阳³, 王晓艳³, 陈晓双³, 邹节明^{1*}, 奉建芳^{2,3*}

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 研究搜山虎(岭南花椒 *Zanthoxylum strosinense* 的根和茎)的化学成分, 为双虎肿痛宁酊剂的药效物质基础研究和质量标准提升提供依据。方法 利用 AB-8 大孔树脂、硅胶、制备色谱进行成分分离, 并结合核磁共振氢谱、碳谱和质谱鉴定化合物结构; 采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞对化合物进行抗炎活性的研究; 采用小鼠醋酸扭体法、热板法对分离得到的成分进行镇痛活性的研究。结果 从搜山虎根中共分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为胡芦巴碱(1)、甲芬那酸(2)、4-羟基肉桂酸(3)、小檗碱(4)、橙皮苷(5)、新绿原酸(6)、白藜芦醇(7)、芥子酸(8)、脯氨酸(9)和甘草次酸(10)。抗炎活性研究表明, 化合物 2、4~7、10 能够显著抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的释放。镇痛实验结果表明, 化合物 2、4、7 能够显著降低小鼠扭体次数, 显著提高痛阈值。结论 所有化合物均为首次从该植物及花椒属植物中分离得到, 化合物 2、4、7 具有很好的抗炎和镇痛作用。

关键词: 岭南花椒; 抗炎; 镇痛; 甲芬那酸; 小檗碱; 白藜芦醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6466-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.003

Study on chemical constituents from *Zanthoxyli Austrosinensis Radix et Caulis*

WANG Gang^{1,2,3}, ZOU Zhun¹, ZHOU Yan-lin¹, LIU Qu-shan¹, QIN Liu-xin³, ZHOU Ze-yang³, WANG Xiao-yan³, CHEN Xiao-shuang³, ZOU Jie-ming¹, FENG Jian-fang^{2,3}

1. Guilin San jin Pharmaceutical Company Limited, Guilin 541004, China

2. Jiang xi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Guang xi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective Identification the chemical constituents of *Zanthoxyli Austrosinensis Radix et Caulis* is an important work for evaluating the potential pharmacodynamics substances and controlling the quality of Shuanghu zhongtong ning tincture. **Methods** The compounds were isolated by AB-8 macroporous resin, silica gel column chromatography and preparative chromatography. And the structural analysis was performed with NMR and UPLC-Q-TOF and their anti-inflammatory activity and analgesic effects were investigated *in vitro*. **Results** Ten compounds were isolated from *Zanthoxylum austrosinense* Huang and identified as trigonelline (1), mefenamic acid (2), 4-hydroxycinnamic acid (3), berberine (4), hesperidin (5), neochlorogenic acid (6), resveratrol (7), erucic acid (8), proline (9) and glycyrrhetinic acid (10). The anti-inflammatory experiment indicated that compound 2, 4—7, 10 exhibited significant biological activities, which suppressed the release of TNF- α and IL-6. In addition, compound 2, 4, 7 had significant analgesic effects on rats by a reduced writhing and increased the pain threshold. **Conclusion** All the compounds were isolated from *Zanthoxylum austrosinense* for the first time. Compounds 2, 4 and 7 exhibited significantly anti-inflammatory activity and analgesic effects.

Key words: *Zanthoxylum austrosinense* Huang; anti-inflammatory; analgesic; mefenamic acid; berberine; resveratrol

收稿日期: 2021-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82060641); 中国博士后面上基金资助项目(2019M653814XB); 广西科技基地和人才专项(2018AD19035); 广西自然科学基金课题(2018JJB140377、2018JJB140325); 广西中青年骨干教师提升项目(2019KY0338); 广西一流学科建设开放性课题(2019XK127); 广西中医药大学校级课题(2018MS003)。

作者简介: 王 刚, 男, 硕士生导师, 副研究员, 从事药物新制剂、新剂型研究与开发。E-mail: 99329388@qq.com

***通信作者:** 邹节明, 男, 博士生导师, 教授级高级工程师, 从事中药新药研究。E-mail: zjm@sanjin.com.cn

奉建芳, 男, 博士生导师, 研究员, 从事中药新型给药系统研究。E-mail: fengjianfang@vip.163.com

搜山虎是芸香科植物岭南花椒 *Zanthoxylum austrosinense* Huang 的根和茎, 主要产于广西、广东和江西等地^[1]。《广西本草选编》《广西药用植物名录》等本草论著均有记载, 又名地蜈蚣、爬山虎、过山龙, 性微寒, 归脾胃经, 具有化瘀行气、消肿止痛、舒筋活络、驱风除湿、舒筋活络、消积滞、通大便、降火的作用, 用于治疗全身筋骨疼痛、坐骨神经痛、跌打损伤、外伤出血等症状^[2-3]。有研究表明搜山虎中含有生物碱、氨基酸、酚类化合物、香豆素、萜类内酯化合物等^[4]。但具体成分均未明确, 因此不利于搜山虎的质量控制。

双虎肿痛宁酊剂是桂林三金药业股份有限公司研制开发的一种非处方药, 临床用于跌打损伤、扭伤、摔伤、风湿关节痛等疾病的治疗, 并可作骨折及脱臼复位等手术局部麻醉止痛用。搜山虎作为双虎肿痛宁酊剂的君药, 是发挥镇痛作用的主要药味之一。搜山虎在广西壮、瑶族民间医中有广泛的临床应用, 也是靖西、恭城端午药市上常见交易药材, 但相关基础研究十分薄弱, 开展其化学成分及药效物质基础研究, 将为该民族药资源的可持续开发利用, 指导临床合理用药, 促进新药开发和民族药现代化提供依据。并有助于双虎肿痛宁酊剂、古威活络酊等临床常用中成药的质量标准提升。本研究以 60% 的乙醇为溶剂, 利用渗漉法提取, 结合硅胶柱色谱进行分离纯化, 通过波谱技术鉴定化合物的结构。从搜山虎中共分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为胡芦巴碱 (trigonelline, **1**)、甲芬那酸 (mefenamic acid, **2**)、4-羟基肉桂酸 (4-hydroxycinnamic acid, **3**)、小檗碱 (berberine, **4**)、橙皮苷 (hesperidin, **5**)、新绿原酸 (neochlorogenic acid, **6**)、白藜芦醇 (resveratrol, **7**)、芥子酸 (erucic acid, **8**)、脯氨酸 (proline, **9**) 和甘草次酸 (glycyrrhetic acid, **10**)。以上所有成分均为首次从搜山虎中分离得到, 也是首次从花椒属植物中分离得到。体内外活性研究表明, 化合物 **2**、**4**~**7**、**10** 具有显著的抗炎活性, 化合物 **2**、**4**、**7** 具有显著的镇痛作用。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

Bruker AM-600 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Waters Q-TOF Premier 质谱仪 (美国 Waters 公司); 安捷伦 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); AB-8 大孔树脂 (天津市海光化工有限公司); C₁₈ 制备色谱柱 (250 mm×20 mm, 5 μm,

日本 YMC 公司); CP214 分析天平 (奥豪斯仪器上海有限公司); 硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂); GF₂₅₄ 高效薄层板 (青岛海洋化工厂); 其他试剂皆为分析纯 (天津大茂试剂有限公司); 高效液相流动相为色谱纯 (Thermo Fisher 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 96 孔板 (美国 Thermo Fisher 公司); Synergy H1 酶标仪 (美国博腾公司); RB-200 智能热板仪 (成都泰盟科技有限公司); YP5002 电子天平 (上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.2 药品

研究所用的搜山虎药材 (标本号 20180201) 采自广西桂林, 经桂林三金药业股份有限公司邹节明教授鉴定为芸香科植物岭南花椒 *Zanthoxylum austrosinense* Huang 的根和根茎, 样本存放于广西中医药大学科学实验中心天然药物研发实验室。

双虎肿痛宁酊 (批号 180501, 桂林三金药业股份有限公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 质量分数>99%, 美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (批号 19460202, 浙江天杭生物科技股份有限公司); DMEM 高糖培养基 [批号 SH40007.03, 海克隆生物化学制品 (北京) 有限公司]; 肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 及白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 201906)、BCA 试剂盒 (批号 A81911151), 杭州联科生物有限公司。

1.3 动物及细胞

SPF 级昆明种小鼠, 体质量 18~20 g, 雌雄兼用, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004, 实验动物伦理批准单位为广西中医药大学, 实验动物伦理审批号为 DW20210311-021, 动物饲养在温湿度可控的动物中心, 自由摄食及饮水。

RAW264.7 单核细胞购买于上海元和生物有限公司。

2 方法

2.1 提取与分离

取搜山虎根粉 10 kg, 用 60% 乙醇渗漉提取, 收集提取液, 减压浓缩回收溶剂, 得棕黑色浸膏 190 g。取上述浸膏, 用 AB-8 大孔树脂柱色谱进行梯度洗脱, 洗脱溶剂分别为水及 20%、45%、65%、85% 乙醇溶液。65% 乙醇洗脱部分 (50 g) 经正己烷-醋酸乙酯系统分离, 反相 C₁₈ 柱色谱 (流动相为 1% 甲

酸水-甲醇) 分离得到化合物 **1** (17.2 mg, t_R = 24.1 min)、**3** (122.6 mg, t_R = 36.3 min)、**7** (23.1 mg, t_R = 42.1 min)、**8** (10.1 mg, t_R = 27.6 min); 85%乙醇洗脱部分 (80 g) 经正己烷-醋酸乙酯系统分离, 反相 C_{18} 柱色谱 (流动相为水-甲醇) 分离得到化合物 **2** (142.2 mg, t_R = 68.4 min)、**4** (12.1 mg, t_R = 49.8 min)、**5** (7.7 mg, t_R = 52.1 min)、**6** (17.2 mg, t_R = 37.5 min)、**9** (8.3 mg, t_R = 18.5 min) 和 **10** (6.6 mg, t_R = 53.6 min)。

2.2 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 和 IL-6 水平

用 0.5%胰酶消化对数生长期的 RAW264.7 细胞, 制成细胞悬液, 接种于 24 孔板, 接种密度为 6×10^5 个/孔, 于 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。用搜山虎 60%乙醇提取物、化合物 **1**~**9** (给药剂量为 80 μ g/mL) 处理细胞 1 h 后, 加入 LPS (1 μ g/mL) 共培养 20 h, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行炎症因子 TNF- α 和 IL-6 检测。另外, 设置对照组 (不用 LPS 和药物孵育) 和 LPS 组 (1 μ g/mL LPS 孵育)。

2.3 小鼠醋酸扭体致痛实验

昆明种小鼠 110 只, 雌雄各半, 随机分成 11 组, 每组 10 只, 分别为对照组 (水)、阳性对照组 (双虎肿痛宁酊剂)、搜山虎药材 60%乙醇提取物组、化合物 **1**~**9** (100 mg/kg), 对照、阳性对照及搜山虎药材 60%乙醇提取物组按 1.6 mL/只涂于小鼠 4 足, 化合物 **1**~**9** 组小鼠按照 0.4 mL/只分别涂于小鼠 4 足。给药后 30 min, ip 0.6%冰醋酸, 0.2 mL/只, 同时用秒表计时, 记录小鼠 15 min 内出现的扭体次数扭体 (反应指标为腹部内凹、后肢伸展、抬高臀部), 记录 ip 冰醋酸后 15 min 内扭体总次数, 并计算扭体反应抑制率。

2.4 小鼠热板镇痛实验

筛选出合格昆明种小鼠 110 只 [痛阈值在 5~30 s (以小鼠舔后足反应为疼痛反应指标) 且无跳跃反应的合格小鼠], 随机分成 11 组, 每组 10 只, 分别为对照组 (水)、阳性对照组 (双虎肿痛宁酊剂)、搜山虎药材 60%乙醇提取物组、化合物 **1**~**9** (100 mg/kg), 对照、阳性对照及搜山虎提取物组按 1.6 mL/只涂于小鼠 4 足。给药完成 0.5、1.0、1.5 h 后, 分别测定各组小鼠痛阈值, 计算痛阈抑制率。

痛阈抑制率 = (给药组小鼠平均痛阈值 - 对照组小鼠平均痛阈值) / 对照组小鼠平均痛阈值

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。分子式 $C_7H_7NO_2$, ESI-MS m/z : 136.238 2 $[M-H]^-$ 。碘化汞钾沉淀试验、碘-碘化钾沉淀试验、苦味酸沉淀试验均呈阳性反应^[5]。

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.20 (1H, s, H-2), 8.89 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-4), 8.74 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-6), 8.05~7.98 (1H, m, H-5), 4.36 (3H, s, -CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.4 (C-7), 146.4 (C-6), 145.1 (C-2), 144.4 (C-4), 140.7 (C-3), 127.1 (C-5), 48.1 (-CH₃)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为胡芦巴碱。

化合物 **2**: 白色粉末。分子式 $C_{15}H_{15}NO_2$, ESI-MS m/z : 240.122 9 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.98 (1H, s, -COOH), 9.45 (1H, s, -NH), 7.89 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, H-3), 7.33~7.28 (1H, m, H-5), 7.14~7.09 (2H, m, H-5', 6'), 7.05~7.00 (1H, m, H-4'), 6.69 (2H, dd, J = 11.9, 4.3 Hz, H-4, 6), 2.29 (3H, s, 7'-CH₃), 2.10 (3H, s, 8'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.7 (C-1), 149.2 (C-2), 138.8 (C-3), 138.4 (C-4), 134.7 (C-5), 132.2 (C-6), 131.7 (C-7), 126.9 (C-8), 126.5 (C-9), 122.7 (C-10), 116.7 (C-11), 113.6 (C-12), 111.7 (C-13), 20.7 (C-14), 14.1 (C-15)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[7-9], 故鉴定化合物 **2** 为甲芬那酸。

化合物 **3**: 白色粉末。分子式 $C_9H_8O_3$, ESI-MS m/z : 163.263 4 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.47 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-2, 6), 6.79 (2H, d, J = 7.9 Hz, H-3, 5), 6.29 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.4 (C-9), 160.1 (C-4), 144.6 (C-7), 130.7 (C-6), 130.6 (C-6), 125.7 (C-1), 116.4 (C-3), 116.2 (C-5), 115.8 (C-8)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[10-12], 故鉴定化合物 **3** 为 4-羟基肉桂酸。

化合物 **4**: 白色粉末。分子式 $C_{17}H_{17}N$, ESI-MS m/z : 236.312 2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.91 (1H, s, H-8), 8.97 (1H, s, H-13), 8.20 (1H, d, J = 9.2 Hz, H-11), 8.01 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-12), 7.80 (1H, s, H-1), 7.09 (1H, s, H-4), 6.17 (2H, s, -O-CH₂-O-), 4.95 (2H, t, J = 6.3 Hz, H-6), 4.10 (3H, s, -OCH₃), 4.07 (3H, s, -OCH₃), 3.23~3.19 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 150.9 (C-3), 150.3 (C-10), 148.2 (C-2), 145.9 (C-8),

144.1 (C-9), 137.9 (C-13a), 133.5 (C-12a), 127.2 (C-4a), 124.0 (C-11), 121.9 (C-8a), 120.9 (C-13b), 120.7 (C-13), 108.9 (C-1), 62.4 (9-OCH₃), 57.5 (10-OCH₃), 55.6 (C-6), 26.8 (C-5)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[13-14], 故鉴定化合物 **4** 为小檗碱。

化合物 **5**: 白色粉末。分子式 C₂₈H₃₄O₁₅, ESI-MS m/z : 611.125 6 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.02 (1H, s, 5-OH), 9.09 (1H, s, 3'-OH), 6.97~6.92 (2H, m, H-2', 5'), 6.90 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 6.16~6.11 (2H, m, H-6, 8), 5.50 (1H, ddd, J = 10.9, 7.7, 3.0 Hz, H-2), 5.39 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-1'), 5.17 (2H, dd, J = 10.7, 5.2 Hz, H-1'', 2''), 4.98 (1H, t, J = 8.2 Hz, H-1''), 4.52 (1H, s, H-3'''), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.57~3.52 (1H, m, H-6''), 3.32~3.25 (2H, m, H-5''', 3''), 3.24~3.20 (1H, m, H-3), 3.19~3.10 (2H, m, H-4'', 4''), 1.09 (3H, dd, J = 6.1, 3.5 Hz, 6''-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 197.5 (C-4), 165.6 (C-7), 163.5 (C-5), 163.0 (C-9), 148.4, (C-4'), 146.9 (C-3'), 131.4 (C-1'), 118.4 (C-6'), 114.6 (C-2'), 112.5 (C-5'), 103.8 (C-10), 101.1 (C-1'''), 99.9 (C-1'), 96.8 (C-6), 96.0 (C-8), 78.8 (C-2), 76.7 (C-5''), 76.0 (C-2''), 73.4 (C-4'''), 72.5 (C-3''), 71.2 (C-4''), 70.7 (C-3'''), 70.1 (C-2'''), 68.8 (C-5'''), 66.5 (C-6''), 56.1 (-OCH₃), 42.5 (C-3), 18.3 (-CH₃)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[15-16], 故鉴定化合物 **5** 为橙皮苷。

化合物 **6**: 白色粉末。分子式 C₁₆H₁₈O₉, ESI-MS m/z : 353.341 1 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.28 (1H, s, -COOH), 7.46 (1H, d, J = 15.8 Hz, H- β), 7.07~6.95 (2H, m, H-6', 2'), 6.77 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.20 (1H, d, J = 15.9 Hz, H- α), 5.34~4.82 (2H, m, H-3, 5), 3.87 (1H, dd, J = 12.1, 5.7 Hz, H-8'), 3.55 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-4), 2.51 (1H, dt, J = 3.6, 1.8 Hz, H-6), 2.06~1.84 (4H, m, 2 $\times$ -CH₂); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 176.5 (-COOH), 166.6 (-C=O), 148.6 (C-4'), 146.0 (C- β), 144.9 (C-3'), 126.2 (C-1'), 121.6 (C-6'), 116.3 (C-5'), 115.5 (C- α), 115.1 (C-2'), 73.4 (C-1), 71.4 (C-4), 67.7 (C-3), 56.5 (C-5), 35.6 (C-2), 19.0 (C-6)。以上波谱数据与文献报道基本一致^[17-18], 故鉴定化合物 **6** 为新绿原酸。

化合物 **7**: 白色粉末。分子式 C₁₄H₁₂O₃, ESI-MS m/z : 229.244 1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz,

DMSO-*d*₆) δ : 7.42~7.37 (2H, m, H-2', 6'), 6.93 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-1), 6.82 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-1'), 6.78~6.74 (2H, m, H-3', 5'), 6.39 (2H, d, J = 2.1 Hz, H-2, 6), 6.13 (1H, t, J = 2.1 Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.0 (C-3'), 157.7 (C-6), 139.7 (C-1'), 128.5 (C-3), 128.3 (C-2), 128.3 (C-4), 126.1 (C-1), 116.0 (C-5), 104.7 (C-2'), 102.2 (C-4')。以上波谱数据与文献报道基本一致^[19-20], 故鉴定化合物 **7** 为白藜芦醇。

化合物 **8**: 白色粉末。分子式 C₁₁H₁₂O₅, ESI-MS m/z : 223.122 1 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.13 (1H, s, -COOH), 7.50 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.99 (2H, s, H-1, 6), 6.42 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 3.80 (6H, s, 2 $\times$ -CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.4 (-COOH), 148.5 (C-3, 5), 145.3 (C- β), 138.5 (C-4), 125.1 (C-1), 116.5 (C- α), 106.5 (C-2, 6), 56.6 (-OCH₃)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[21-22], 故鉴定化合物 **8** 为芥子酸。

化合物 **9**: 白色粉末。分子式 C₃H₉NO₂, ESI-MS m/z : 115.146 1 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.66 (1H, s, -COOH), 3.64 (1H, dd, J = 8.3, 5.4 Hz, H-2), 3.29~3.13 (2H, m, 5-CH₂), 2.07~1.86 (2H, m, 3-CH₂), 1.84~1.60 (2H, m, 4-CH₂); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.8 (-COOH), 61.2 (C-2), 45.6 (C-5), 29.4 (C-3), 24.4 (C-4)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[23-24], 故鉴定化合物 **9** 为脯氨酸。

化合物 **10**: 白色粉末。分子式 C₃₄H₅₀O₇, ESI-MS m/z : 569.076 1 [M - H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.18 (1H, s, -COOH), 5.40 (1H, s, H-12), 3.02 (1H, d, J = 10.9 Hz, H-3), 2.58 (2H, dt, J = 12.9, 3.1 Hz, H-1), 2.33 (1H, s, H-9), 1.31 (3H, m, H-27), 1.25 (3H, td, J = 14.1, 3.7 Hz, H-29), 1.15 (3H, d, J = 12.0 Hz, H-25), 1.11 (3H, d, J = 8.9 Hz, H-23), 1.03 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-26), 0.96 (2H, dd, J = 13.7, 2.6 Hz), 0.91 (3H, s, H-26), 0.76 (3H, s, H-24), 0.70 (3H, d, J = 8.6 Hz, H-28); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 199.5 (C-11), 178.1 (C-29), 170.1 (C-13), 127.7 (C-12), 77.1 (C-3), 61.6 (C-9), 54.6 (C-5), 48.5 (C-18), 45.3 (C-8), 43.5 (C-20), 43.4 (C-14), 41.1 (C-19), 39.2 (C-4), 39.0 (C-1), 38.0 (C-22), 37.1 (C-10), 32.6 (C-7), 32.0 (C-17), 30.8 (C-21), 28.9 (C-28), 28.6 (C-30), 28.3 (C-23), 27.4

(C-2), 26.5 (C-16), 26.3 (C-15), 23.5 (C-27), 18.8 (C-26), 17.6 (C-6), 16.7 (C-25), 16.5 (C-24)。以上波谱数据与文献报道对照基本一致^[25-26], 故鉴定化合物 **10** 为甘草次酸。

3.2 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 和 IL-6 水平

搜山虎 60%乙醇提取物和分离得到化合物的抗炎活性研究如表 1 所示。结果表明, 在 LPS 的作用

下, RAW264.7 细胞释放的 TNF- α 和 IL-6 明显升高, 搜山虎 60%乙醇提取物能够显著降低上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量。另外从药材中分离得到的化合物 **2**、**4**~**7**、**10** 能够显著抑制细胞分泌 TNF- α 和 IL-6。而化合物 **1**、**3**、**8**、**9** 与 RAW264.7 细胞孵育后, 细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量与 LPS 诱导组接近 ($P>0.05$), 说明这些化合物对 TNF- α 和 IL-6 的分泌没有抑制作用。

表 1 搜山虎药材提取物及不同成分对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of the ethanol extracts and components of *Zanthoxylum austrosinense* release of TNF- α and IL-6 by RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	100.34 $\pm$ 14.34	160.34 $\pm$ 10.88
LPS	1 224.05 $\pm$ 115.87	565.76 $\pm$ 20.18
搜山虎 60%乙醇提取物	615.74 $\pm$ 89.328**	342.24 $\pm$ 31.45**
2	979.25 $\pm$ 133.28*	412.45 $\pm$ 91.38*
4	734.68 $\pm$ 112.04**	372.98 $\pm$ 99.14**
5	807.84 $\pm$ 86.32*	312.45 $\pm$ 65.89*
6	621.23 $\pm$ 132.45**	338.54 $\pm$ 84.32**
7	856.75 $\pm$ 92.48*	367.35 $\pm$ 28.14*
10	954.72 $\pm$ 88.36*	452.61 $\pm$ 50.34*

与 LPS 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs LPS group

3.3 小鼠醋酸扭体致痛实验

小鼠醋酸扭体致痛实验结果 (表 2) 表明, 与对照组相比, 双虎肿痛宁酊剂能够显著降低小鼠扭体次数, 抑制率为 74.2%。60%乙醇提取的搜山虎亦能减少小鼠的扭体次数, 抑制率为 36.1%, 但小于双虎肿痛宁酊剂。另外从搜山虎药材中分离得到的化合物 **2**、**4**、**7** 能够显著降低小鼠扭体次数。抑制率由高到低排序依次为双虎肿痛宁酊剂>甲芬

那酸 (**2**)>白藜芦醇 (**7**)>小檗碱 (**4**)>搜山虎 60%乙醇提取物。化合物 **1**、**3**、**5**、**6**、**8**、**9** 对小鼠醋酸扭体无影响。

3.4 小鼠热板法镇痛实验

小鼠热板法镇痛反应的研究结果 (表 3) 表明, 与对照组相比, 给药后 30、60、90 min 双虎肿痛宁酊剂组、甲芬那酸组和白藜芦醇组的痛阈值显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。给药后 60、90 min 搜山虎乙

表 2 双虎肿痛宁酊剂、搜山虎药材提取物及不同成分对醋酸所致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of shuanghu tincture, extracts and components of *Zanthoxylum austrosinense* writhing reaction in mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	15 min 内扭体次数	抑制率/%
对照	1.6 mL	36.10 $\pm$ 5.17	
搜山虎 60%乙醇提取物	1.6 mL	23.00 $\pm$ 5.72*	36.1
双虎肿痛宁酊剂	1.6 mL	9.30 $\pm$ 3.76**	74.2
2	100 mg/kg	10.60 $\pm$ 5.66**	70.6
4	100 mg/kg	20.30 $\pm$ 3.49*	43.8
7	100 mg/kg	12.42 $\pm$ 2.78*	65.6

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group, same as Table below

表 3 双虎肿痛宁酊剂、搜山虎药材提取物及不同成分对小鼠热板法镇痛的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of shuanghu tincture, extracts and components of *Zanthoxylum austrosinense* on pain threshold in mice by hot plate method ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	基础痛阈值/s	给药后不同时间痛阈值/s			痛阈值抑制率/%
			30 min	60 min	90 min	
对照	1.6 mL	16.41 ± 5.21	16.15 ± 6.49	17.43 ± 6.93	17.25 ± 5.09	
搜山虎提取物	1.6 mL	17.61 ± 2.11	23.12 ± 4.69	24.15 ± 3.21*	25.63 ± 3.61*	38.0
双虎肿痛宁酊剂	1.6mL	18.68 ± 3.21	26.70 ± 2.08*	31.72 ± 5.18**	32.66 ± 4.98**	62.5
2	100 mg/kg	18.41 ± 2.20	27.21 ± 4.42*	28.12 ± 5.22*	29.91 ± 4.24**	54.3
4	100 mg/kg	17.07 ± 3.67	19.24 ± 3.42	23.77 ± 2.59	25.21 ± 2.36*	33.2
7	100 mg/kg	19.88 ± 2.70	25.72 ± 4.42*	28.69 ± 3.25*	28.21 ± 3.14*	38.5

醇提取物组的痛阈值显著升高 ($P < 0.05$)。给药后 90 min 小檗碱组的痛阈值显著升高 ($P < 0.05$)。痛阈值抑制率由高到低分别为双虎肿痛宁酊剂 > 甲芬那酸 (2) > 白藜芦醇 (7) > 搜山虎 60%乙醇提取物 > 小檗碱 (4)。化合物 1、3、5、6、8、9 对小鼠热板镇痛无作用。

4 讨论

采用现代色谱技术手段对瑶药材搜山虎进行了系统的化学成分研究,共得到了 10 个化合物,包括 2 个生物碱类化合物、3 个苯丙素类化合物、1 个黄酮类化合物、1 个皂苷类化合物、1 个氨基酸、1 个多酚类化合物、1 个芳基烷酸类化合物,均为首次从搜山虎中分离得到,也是首次从花椒属植物中分离得到。

组织损伤诱发疼痛和炎症反应,二者相互因果,形成炎症性疼痛^[27-28]。炎症反应发生时,细胞分泌大量的 TNF- α 、IL-6 等细胞因袭,这些因子可以延长炎症的时间,增加炎症的强度,促进疼痛级别的升高^[29]。本研究发现搜山虎醇提物能够有效的降低 TNF- α 和 IL-6 的分泌,说明该搜山虎能够通过抑制炎症因子的分泌来产生抗炎作用。另外从药材中分离得到的化合物 2、4~7、10 能够显著抑制细胞分泌 TNF- α 和 IL-6,说明这些化合物可能为搜山虎抗炎的药效成分。另外在镇痛的体内研究中,发现搜山虎药材醇提物和双虎肿痛宁酊的镇痛作用非常明显,而分离得到的化合物 2、4、7 具有一定的镇痛作用,表明搜山虎入药镇痛作用存在多组分整体协同效果。本研究结果为阐明白搜山虎药效物质基础和质量标准提升提供了依据,在保证药品质量的稳定性、有效性和安全性方面具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘雪婷, 韦秋菊, 周小苏, 等. 搜山虎水提液对小鼠抗疲劳、耐缺氧作用的实验研究 [J]. 右江医学, 2019, 47(10): 743-747.
- [2] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编 (下) [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974: 1684-1685.
- [3] 黄晓芳, 倪洪岗, 徐寒松, 等. 苗族民间药“搜山虎”的考证 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(18): 44-45.
- [4] 李干孙. “搜山虎”成份初探 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1984(15): 76.
- [5] 于洋. 胡芦巴生物碱的提取、纯化及分离的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [6] Li C Y, Lin C H, Wu T S. Quantitative analysis of camptothecin derivatives in nothapodytes foetida using ¹H-NMR method [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(3): 347-349.
- [7] Munro S, Craik D J. NMR conformational studies of fenamate non-steroidal anti-inflammatory drugs [J]. Mag Res Chem, 2011, 32(6):335-342.
- [8] Tadić A N, Poljarević J, Krstić M, et al. Ruthenium - Arene complexes with NSAIDs: Synthesis, characterization and bioactivity [J]. New J Chem, 2018, 42(4): 3001-3019.
- [9] Nykaza T V, Cooper J C, Li G, et al. Intermolecular reductive C-N cross coupling of nitroarenes and boronic acids by PIII/PV=O catalysis [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(45): 15200-15205.
- [10] Yong D M, Min C Y, Lee K H, et al. Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino [J]. Arch Pharmacol Res, 2006, 29(9): 757-761.
- [11] Moussouni S, Karakousi C V, Tsatalas P, et al. Biological studies with phytochemical analysis of *Cornus mas* unripe fruits [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56(1): 141-144.

- [12] Liao C R, Kuo Y H, Ho Y L, *et al.* Studies on cytotoxic constituents from the leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9515-9534.
- [13] Gatland A E, Pilgrim B S, Procopiou P A, *et al.* Short and efficient syntheses of protoberberine alkaloids using palladium-catalyzed enolate arylation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(52): 14555-14558.
- [14] Lin H J, Ho J H, Tsai L C, *et al.* Synthesis and *in vitro* photocytotoxicity of 9-/13-lipophilic substituted berberine derivatives as potential anticancer agents [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): E677.
- [15] Reinhardt J K, Zimmermann-Klemd A M, Danton O, *et al.* Compounds from *Toddalia asiatica*: Immunosuppressant activity and absolute configurations [J]. *J Nat Prods*, 83(10): 3012-3020.
- [16] Correia-Da-Silva M, Sousa E, Duarte B, *et al.* Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: A new class of anticoagulant agents [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(1): 95-106.
- [17] Ornano L, Venditti A, Ballero M, *et al.* Chemopreventive and antioxidant activity of the chamazulene-rich essential oil obtained from *Artemisia arborescens* L. growing on the isle of La Maddalena, Sardinia, Italy [J]. *Chem Biodivers*, 2013, 10(8): 1464-1474.
- [18] Kalinowska M, Bajko E, Matejczyk M, *et al.* The study of anti-/pro-oxidant, lipophilic, microbial and spectroscopic properties of new alkali metal salts of 5-*O*-caffeoylquinic acid [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): E463.
- [19] Thiel N O, Kaewmee B, Tran Ngoc T, *et al.* A simple nickel catalyst enabling an *E*-selective alkyne semihydrogenation [J]. *Chemistry*, 2020, 26(7): 1597-1603.
- [20] Yang S Y, Tian W J, Pan Z R, *et al.* Polyphenols from *Polygonum cuspidatum* reactivate latent HIV [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(2): 318-322.
- [21] 孙凯, 李锐, 康兴东, 等. 南葶苈子的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(3): 181-182.
- [22] Dong H B, Hou M, Ma W B, *et al.* First total synthesis of a new phenylpropanoid glycoside: Natural cytotoxic compound from *Cirsium japonicum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(12): 1154-1161.
- [23] Lokesh, Suryaprakash N. Weakly ordered chiral alignment medium derived from 5'-GMP: Guanosine [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(20): 2049-2051.
- [24] Thiele C M, Pomerantz W C, Abbott N L, *et al.* Lyotropic liquid crystalline phases from helical β -peptides as alignment media [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(1): 502-504.
- [25] Beseda I, Czollner L, Shah P S, *et al.* Synthesis of glycyrrhetic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(1): 433-454.
- [26] Wang X, Gu X, Wang H, *et al.* Synthesis, characterization and liver targeting evaluation of self-assembled hyaluronic acid nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 96: 255-262.
- [27] Grösch S, Niederberger E, Geisslinger G. Investigational drugs targeting the prostaglandin E2 signaling pathway for the treatment of inflammatory pain [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(1): 51-61.
- [28] 费雪瑜, 邵昭霞, 王涵芝, 等. P2X 受体介导慢性疼痛的研究进展 [J]. 世界中医药, 2019, 14(6): 1363-1367.
- [29] 王国峰, 赵霞, 李宁, 等. 川芎嗪对脂多糖诱导内皮细胞花生四烯酸通路炎症反应的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(4): 563-567.

[责任编辑 王文倩]