

A preliminary chemical study on *Piper hancei* Maxim.

By

Lei Hai-peng

Master of Science

2014



Institute of Chinese Medical Sciences

University of Maca

A preliminary chemical study on *Piper hancei* Maxim.

By

Lei Hai-peng

A thesis submitted in partial fulfillment of the

requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau



Approved by \_\_\_\_\_

Supervisor

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Date \_\_\_\_\_

In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for master's degree at the University of Macau, I agree that the library and the institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address: \_\_\_\_\_

Telephone: \_\_\_\_\_

Fax: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_



碩士學位論文

山萸化學成分的初步研究

研究生姓名：雷海鵬

導師：趙靜助理教授

專業：中藥學

日期：2014年1月



澳門大學中華醫藥研究院

## 致謝

本文是在我的導師趙靜博士和李紹平教授悉心指導下完成的。衷心感謝他們在過去兩年多的時間裏對我學習和科研所傾注的大量時間和心血！趙靜博士和李紹平教授治學嚴謹、學識淵博、思想深邃，他們勤勉務實、精益求精，他們的言傳身教讓我銘記在心。

感謝陳顯強博士跟我分享他實驗的技能，使實驗順利推進；感謝喬春峰博士、彭亮博士、吳定濤博士生、李德強博士對我實驗及文章撰寫的指導；感謝黃衛華博士對我無私的幫助；感謝李靜博士生在我煩惱憂傷時的開導；感謝質量控制組所有的師兄師姐、師弟師妹的幫助。

感謝王一濤教授、李銘源教授、張慶文副教授、鄭穎副教授、許貝文博士、何承偉博士、燕茹博士、陳修平博士、萬建波博士、李鵬博士、林理根博士對我研究生生活無私的幫助和關心。感謝實驗技術員 Leon、Sandy、Kio、Dorian、Joanna、Hada,對我實驗無私的支援。

感謝我的室友張杰良博士生和丁仁博，給我生活上諸多關心。感謝我的好朋友鮑嬌琳、Tina、Christina、James、Easter、Ellice、陳建鴻和王英等，一起分享生活的快樂。

感謝我的家人給我全方位的支持和幫助，你們的支持是我前行的動力。

## 摘要

山蒟 *Piper hancei* Maxim. 是胡椒科胡椒屬植物，廣泛分布于我國浙江、福建、廣東等南部省區，其莖葉和根在廣東、廣西等地用作民間草藥，有祛風除濕、活血消腫、行氣止痛、化痰止咳等功效，用于治療風濕痹痛、胃痛、痛經、跌打損傷、風寒咳喘、疝氣痛等。山蒟藤莖也常作為中藥海風藤、石楠藤的代用品在市場上流通使用。此外，山蒟作為一種美觀的常綠藤本植物，攀緣力強，長勢快，還具有較高的園林綠化價值。研究表明山蒟主要含有醯胺類生物鹼、木脂素等化學成分。

為了合理開發利用山蒟植物資源，我們對海南產的山蒟藤莖進行了化學成分分離與結構鑒定研究。以其主要成分為指標，建立了山蒟的 HPLC 指紋圖譜和含量測定分析方法，并與海風藤、石楠藤等近緣品種進行了比較分析。此外，我們對山蒟提取物及主要成分進行了  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑的篩選，發現了活性較好的化合物。這些結果為山蒟的資源利用、質量評價等提供了依據。

本論文分為四章，第一章為文獻綜述，對山蒟的化學成分、藥理活性、質量評價方法進行了較詳細的總結。第二章為山蒟化學成分研究，為探索山蒟的活性物質基礎，本課題對山蒟進行化學成分的分離、純化和結構鑒定。采用矽膠、Sephadex LH-20 及製備型 HPLC 對山蒟藤莖的化學成分進行分離純化，從中得到 7 個化合物，并通過氫譜、碳譜和質譜等光譜信息進行結構鑒定，其結果分別為 4-烯丙基兒茶酚 (I)、鞣荛明寧碱 (II)、*d*-芝麻素 (III)、 $\beta$ -穀甾醇 (IV)、墻草碱 (V)、胡椒內醯胺 A (VI) 和胡椒內醯胺 D (VII)。化合物 I、III、VI、VII 為首次從該

植物中分離得到。

第三章對山萮主要成分建立 HPLC 分析方法，對山萮、海風藤和石楠藤藥材進行含量測定和化學成分的分析。第四章對山萮提取物及主要成分以 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)為底物的酶抑制劑篩選模型進行  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑的篩選，發現 4-烯丙基兒茶酚具有很好的抑制作用，其  $IC_{50}$  為  $10.22\mu\text{g/ml}$ 。本課題組對山萮進行化學分離、質量控制，指紋圖譜比較和活性篩選進行的研究，為山萮之後的研究提供科學依據。

**關鍵詞：**山萮、化學成分、生物鹼、木脂素、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑、質量控制



## Abstract

*Piper hancei* Maxim is a Chinese herb of Piperaceae, which grows in forests or climbs on trees or rocks. It is distributed throughout Zhejiang, Fujian, Hubei, Guangdong, Guangxi, South Guizhou and Yunnan. *P. hancei* is used for wind-cold-wetness types of arthralgia, gastralgia, algomenorrhea, injuries from falls, coughing due to wind-cold evil, and hernia pain in "Chinese Materia Medica.

In recent years, *P. hancei* extracts have been used in pharmacology areas such as anti-platelet aggregation, anti-inflammatory and analgesia, but not  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. However, the study showed those alkaloids, flavonoids, lignans and other chemical components, which were isolated and purified from piper, can inhibit  $\alpha$ -glucosidase. In addition, piper *hancei* is often a substitute for *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi or *Piper puberulum* (Benth.) in clinical. Accordingly, our group chose *P. hancei* for chemical study by Modern separation and purification technology. Then we developed a method to analyse the main chemical components for *P. hancei*, *Piper kadsura* and *Piper puberulum*. Furthermore, we screen for  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from the main compounds in order to explore potential bioactive from *P. hancei*.

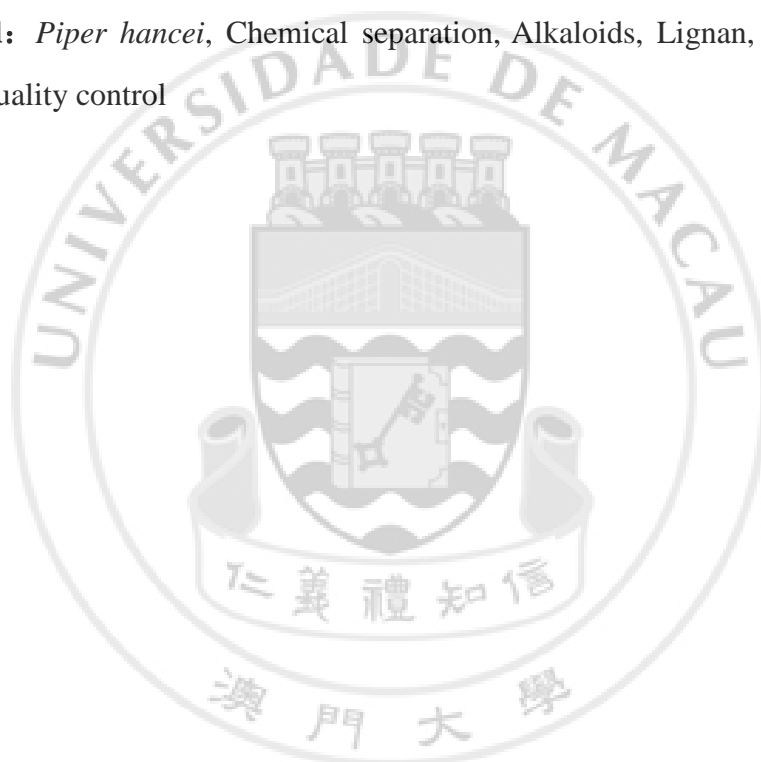
This thesis consists of four chapters. In **chapter (I)**, the research background, chemical constituents, and pharmacological studies have been reviewed. In **Chapter (II)** showed chemical research in *P. hancei*, In order to investigate the bioactive compounds in *P. hancei*; the chemical constituents were isolated and purified by means of chromatographic techniques using silica gel, Sephadex LH-20 and preparative RP-HPLC. Their structures were elucidated on the basis of physicochemical properties and spectral analysis. As a result, seven compounds were isolated and identified as 4-allylpyrocatechol (I), piperlonguminine (II), *d*-sesamin (III),  $\beta$ -sitosterol (IV), pellitorine (V), piperolactam A (VI) and piperolactamD (VII), respectively. It was concluded that compound I, III, VI and VII are isolated from this plant for the first time. In **Chapter III**, The HPLC analysis method was established



on the main components of *P. hancei* in order to provide more evidence for piper hancei, which is instead of *P. kadsura* and *P. puberulum* in clinical medication. In **ChapterIV**, compounds were screen for  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. Fortunately, 4-allylpyrocatechol had the strongest an  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, showing  $IC_{50}$  at  $10.22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

In this study, chemical constituents, quality control, fingerprint comparison and activity screening have been researched, and may provide scientific evidence for *P. hancei*.

**Key word:** *Piper hancei*, Chemical separation, Alkaloids, Lignan,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, quality control



# 目錄

致謝	1
符號說明	1
第一章 山萸的化學和藥理研究進展	2
1.1 山萸的化學成分研究進展	2
1.2 山萸的藥理作用研究進展	7
1.2.1 抗血小板活性作用	7
1.2.2 抗炎作用	7
1.2.3 抗菌作用	8
1.2.4 抗氧化作用	8
1.2.5 抗腫瘤作用	9
1.2.6 細胞毒作用	9
1.2.7 殺蟲活性	9
1.2.8 其他藥理活性	10
1.3 山萸的質量控制研究進展	10
第二章 山萸化學成分的分離與鑒定	11
2.1 儀器與材料	11
2.2 提取與分離	11
2.3 結構鑒定	13
2.3.1 化合物 I :	13
2.3.2 化合物 II :	14
2.3.3 化合物 III :	14
2.3.4 化合物 IV :	15
2.3.5 化合物 V :	15
2.3.6 化合物 VI :	16
2.3.7 化合物 VII :	17
2.4 小結	17
第三章 山萸與近緣藥材的 HPLC 比較分析	19
3.1 儀器與試藥	19
3.2 方法與結果	20
3.2.1 對照品溶液的製備	20
3.2.2 供試品溶液的製備	20
3.2.3 色譜條件	20
3.2.4 綫性關係考察	21
3.2.5 精密度考察	23
3.2.6 重現性考察	23
3.2.7 加樣回收率試驗	23
3.2.8 樣品測定	24
3.3 分析與討論	26
3.3.1 提取條件的優化	26
3.3.2 色譜條件的優化	27

3.3.3	測定結果分析	28
第四章	山茺中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性成分的篩選	29
4.1	儀器與試藥	29
4.2	方法與結果	30
4.2.1	溶液的配製	30
4.2.2	供試樣品溶液的製備	30
4.2.3	酶抑制活性檢測	30
4.2.4	實驗數據處理及評價標準	31
4.3	分析與討論	33
附：	胡椒屬醯胺類化合物綜述	35
參考文獻		64
附录：		84

