蛇附子化学成分及抗氧化活性研究

傅志勤¹, 黄泽豪¹, 林婧³, 贺文达¹, 纪明妹¹, 许文^{1,2*}, 范世明^{1*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建中医药大学 生物医药研发中心, 福建 福州 350122

3. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122

摘要: 目的 研究蛇附子(三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* 的块根)的化学成分及抗氧化活性。方法 采用多种色谱技术对其进行分离纯化,应用¹H-NMR、¹³C-NMR、MS、HR-MS等波谱学方法进行结构鉴定;利用DPPH法进行抗氧化活性测定。结果 从蛇附子80%甲醇提取物中分离得到14个化合物,分别鉴定为山柰酚(1)、槲皮素(2)、水杨酸(3)、苯甲酸(4)、氧化白藜芦醇(5)、儿茶素(6)、表儿茶素(7)、表没食子儿茶素(8)、原花青素B₂(9)、原花青素B₁(10)、绿原酸(11)、原儿茶醛(12)、对羟基苯甲酸(13)、原儿茶酸(14);其中化合物2、8、9、10、12抗氧化活性IC₅₀值分别为14.15、14.19、15.99、12.4、15.98 μmol/L,优于阳性药维生素C(IC₅₀值为23.0 μmol/L)。结论 化合物4~12均系首次从该植物中分离,得到蛇附子中除了黄酮类成分外,也富含较多的有机酸类成分;并且化合物2、8、9、10、12抗氧化活性良好。

关键词: 蛇附子; 槲皮素; 表没食子儿茶素; 原花青素B₂; 原儿茶醛; 抗氧化

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1583-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.003

Chemical constituents in root tuber of *Tetrastigma hemsleyanum* and their anti-oxidative activities

FU Zhi-qin¹, HUANG Ze-hao¹, LIN Jing³, HE Wen-da¹, JI Ming-mei¹, XU Wen^{1,2}, FAN Shi-ming¹

1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Centre of Biomedical Research & Development, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

3. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To study the chemical compositions from the root tuber of *Tetrastigma hemsleyanum* and their anti-oxidative activities. **Methods** The compounds were isolated by various column chromatography. Their structures were identified by spectroscopic methods including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, HR-MS, etc. The anti-oxidative activities were evaluated by DPPH radical scavenging assay. **Results** Fourteen compounds were isolated from the root tuber of *T. hemsleyanum*, they were identified as kaempferol (1), quercetin (2), salicylic acid (3), benzoic acid (4), oxyresveratrol (5), catechin (6), L-epicatechin (7), epigallocatechin (8), procyanidin B₂ (9), procyanidin B₁ (10), 3-O-caffeoylquinic acid (11), procatechualdehyde (12), p-hydroxybenzoic acid (13), and procatechuic acid (14). The anti-oxidative IC₅₀ values of compounds 2, 8, 9, 10, and 12 were 14.15, 14.19, 15.99, 12.4, and 15.98 μmol/L, respectively, better than the positive control Vit C (IC₅₀ value was 23.0 μmol/L). **Conclusion** Compounds 4—12 are isolated from *T. hemsleyanum* for the first time. It has been demonstrated that the root tuber contain flavonoids and also is rich in organic acids. Moreover, compounds 2, 8, 9, 10, and 12 have the certain prospects in the development of natural anti-oxidative agents.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; quercetin; epigallocatechin; procyanidin B₂; procatechualdehyde; anti-oxidative activity

蛇附子 *Tetrastigmatis Hemsleyani Radix* 为葡萄 叶崖爬藤(又名三叶青) *Tetrastigma hemsleyanum*
科(Vitaceae)崖爬藤属 *Tetrastigma* Planch. 植物三 Diels et Gilg^[1]的块根,是福建、浙江地区传统习用

收稿日期: 2015-02-28

基金项目: 福建省教育厅资助课题(JA13154); 国家公益性行业科研专项(201407002-3); 福建中医药大学校管课题(X2014134-学科); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510393014)

作者简介: 傅志勤(1991—),男,硕士研究生,研究方向为药物制剂及质量控制研究。E-mail: fuzhiqin123@sina.com

*通信作者 许文(1986—),男,研究实习员,研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: yaouxuwen@qq.com

范世明(1964—),男,高级实验师,研究方向为中药鉴定与资源评价研究。E-mail: r3570379@163.com

草药,习称“一粒珠”。蛇附子具有活血散瘀、解毒、化痰的作用,临床上用于治疗病毒性脑膜炎、乙型脑炎、病毒性肺炎、黄胆性肝炎等,特别是对小儿高热有特效^[2]。蛇附子中的化学成分研究已有报道^[3-7],从中分离鉴定的成分多为黄酮类、三萜甾醇和脂肪酸类,而极性部位的化学成分研究相对较少,并且前期课题组采用质谱引导纯化系统,已从蛇附子中分离制备4种黄酮类成分:芦丁(**15**)、异槲皮苷(**16**)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(**17**)、紫云英苷(**18**),并用于不同产地蛇附子质量评价^[8]。本实验继上述研究后,对蛇附子化学成分进一步研究,从蛇附子80%甲醇提取物中分离得到14个化合物,分别鉴定为山柰酚(kaempferol, **1**)、槲皮素(quercetin, **2**)、水杨酸(salicylic acid, **3**)、苯甲酸(benzoic acid, **4**)、氧化白藜芦醇(oxyresveratrol, **5**)、儿茶素(catechin, **6**)、表儿茶素(*L*-epicatechin, **7**)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, **8**)、原花青素 B₂(procyanidin B₂, **9**)、原花青素 B₁(procyanidin B₁, **10**)、绿原酸(3-*O*-caffeoylquinic acid, **11**)、原儿茶醛(protocatechualdehyde, **12**)、对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid, **13**)、原儿茶酸(protocatechuic acid, **14**)。其中化合物**4**~**12**均系首次从该植物中分离得到,蛇附子中除了黄酮类成分外,也富含较多的有机酸类成分。另外,采用改进的DPPH法对蛇附子中分离所得单体(包含前期分离所得的4种黄酮类成分^[9])进行抗氧化活性研究表明,除水杨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷以外,其他化合物呈现出较好的抗氧化活性,其中化合物**2**、**8**、**9**、**10**、**12**的抗氧化活性优于阳性对照维生素C。

1 仪器与试药

柱色谱硅胶(100~200、200~300目,青岛海洋化工厂);D101大孔树脂(天津海光化工有限公司);Sephadex LH-20(北京绿百草科技发展有限公司);ODS(50 μm,美国Welch公司);Waters AutoPurification自动纯化系统;Waters 2545二元梯度泵,Waters 2767自动进样器和收集器,Waters 515补偿泵和在线稀释泵,Waters 2489紫外检测器,Waters SQD2质谱(美国Waters公司);Bruker Avance 500型超导核磁共振波谱仪(德国Bruker公司);micrOTOF高分辨率飞行时间质谱仪(德国Bruker公司);CPA225D型十万分之一分析天平(德国Sartorius公司);KQ-500E台式超声波清洗器(昆

山市超声仪器有限公司);FY135型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);DPPH(美国Sigma公司);维生素C对照品(中国食品药品检定研究院,批号100425-201103);乙腈为色谱纯(德国MERCK公司);Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司),其余试剂均为分析纯。

蛇附子采自福建福安,经福建中医药大学药用植物实验室范世明高级实验师及生药教研室黄泽豪副教授鉴定为三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg的干燥块根,样本(SYQ20131201)存放于福建中医药大学药学院药用植物标本室。

2 提取与分离

干燥蛇附子(2 kg),用10倍量80%甲醇回流提取3次,每次1 h,回收甲醇得流浸膏175.2 g,用热水超声混悬,采用D101大孔吸附树脂柱(60 cm×5.5 cm)粗分,用不同体积分数(10%、30%、70%、95%)的乙醇梯度洗脱,各5 000 mL,收集30%和95%乙醇洗脱部位浓缩得浸膏分别为36.8、10.4 g,95%洗脱部位经硅胶柱色谱,石油醚-醋酸乙酯(10:1→0:1)梯度洗脱,每200 mL收集1份。第20~31组分合并经过Sephadex LH-20凝胶色谱(氯仿-甲醇1:1)分离得到化合物**1**(28 mg)和化合物**2**(12 mg),30%洗脱部位经硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇梯度(50:1→1:1)洗脱,TLC检视,合并得到4个流分(Fr.1~4)。Fr.1经硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(50:1→20:1),再经制ODS柱及自动纯化系统制备(乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱)得化合物**3**(15 mg)、**4**(12 mg)和**5**(8 mg)。Fr.2经反复Sephadex LH-20凝胶色谱(氯仿-甲醇1:1)和自动纯化系统制备(乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱)得化合物**6**(55 mg)、**7**(12 mg)和**8**(8 mg)。Fr.3经反复ODS柱色谱(甲醇-水梯度洗脱),再经自动纯化系统制备(乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱)得化合物**9**(4 mg)和**10**(22 mg)。Fr.4经硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(15:1→1:1)梯度洗脱,再经反复ODS柱色谱(甲醇-水梯度洗脱)和自动纯化系统制备得化合物**11**(10 mg)、**12**(5 mg)、**13**(12 mg)、**14**(10 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:黄色粉末,HR-ESI-MS m/z : 285.039 5 [M-H]⁻(calcd. for C₁₅H₁₀O₆)。¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) δ: 12.28(1H, brs, H-5), 8.09(2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2', 6'), 6.91(2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3', 5'), 6.40

(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 177.4 (C-4), 165.6 (C-7), 162.5 (C-5), 160.6 (C-4'), 158.3 (C-9), 148.1 (C-2), 137.2 (C-3), 130.7 (C-2'), 130.7 (C-6'), 123.7 (C-1'), 116.3 (C-3'), 116.3 (C-5'), 104.6 (C-10), 99.3 (C-6), 94.5 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **1** 为山柰酚。

化合物 **2**: 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 301.034 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 12.49 (1H, s, H-5), 7.68 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J = 7.9, 2.2$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 175.9 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-9), 156.2 (C-5), 147.7 (C-4'), 146.8 (C-2), 145.1 (C-3'), 135.8 (C-3), 122.0 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.6 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.0 (C-10), 98.2 (C-6), 93.4 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **2** 为槲皮素。

化合物 **3**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 137.023 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.85 (1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, H-6), 7.45 (1H, ddd, $J = 8.4, 7.2, 1.8$ Hz, H-4), 6.90 (1H, ddd, $J = 9.2, 8.4, 0.7$ Hz, H-5), 6.87 (1H, dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 173.5 (C-7), 163.2 (C-2), 136.6 (C-4), 131.5 (C-6), 120.0 (C-5), 118.1 (C-3), 113.9 (C-1)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **3** 为水杨酸。

化合物 **4**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 121.028 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.02 (2H, m, H-2, 6), 7.57 (1H, m, H-4), 7.45 (2H, m, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 169.8 (C-7), 134.0 (C-4), 131.9 (C-1), 130.7 (C-2, 6), 129.4 (C-3, 5)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **4** 为苯甲酸。

化合物 **5**: 淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z : 243.065 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.32 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-6), 7.26 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H- α), 6.81 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H- β), 6.44 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2', 6'), 6.32~6.29 (2H, m, H-3, 5), 6.13 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 159.6 (C-3', 5'), 159.2 (C-2), 157.3 (C-4), 142.2 (C-1'), 128.4 (C- α),

126.5 (C- β), 124.8 (C-6), 117.9 (C-1), 108.4 (C-5), 105.7 (C-2', 6'), 103.6 (C-3), 102.3 (C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **5** 为氧化白藜芦醇。

化合物 **6**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 289.071 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3COCD_3) δ : 6.81 (1H, brs, H-2'), 6.70 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, dd, $J = 1.6, 8.1$ Hz, H-6'), 5.93 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 5.79 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 4.47 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-2), 3.81 (1H, m, H-3), 2.80 (1H, m, H-4 α), 2.44 (1H, dd, $J = 8.4, 16.0$ Hz, H-4 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3COCD_3) δ : 157.8 (C-7), 157.2 (C-5), 156.9 (C-9), 145.7 (C-3'), 145.7 (C-4'), 132.2 (C-1'), 120.1 (C-5'), 115.7 (C-6'), 115.3 (C-2'), 100.7 (C-10), 96.2 (C-6), 95.5 (C-8), 82.7 (C-2), 68.4 (C-3), 28.7 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **6** 为儿茶素。

化合物 **7**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 289.071 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3COCD_3) δ : 7.03 (1H, brs, H-2'), 6.81 (1H, dd, $J = 1.7, 8.2$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 5.99 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 5.89 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 4.85 (1H, s, H-2), 4.18 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3), 2.80 (1H, m, H-4 α), 2.71 (1H, dd, $J = 2.6, 16.4$ Hz, H-4 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3COCD_3) δ : 157.6 (C-7), 157.6 (C-5), 157.2 (C-9), 145.4 (C-4'), 145.3 (C-3'), 132.3 (C-1'), 119.4 (C-5'), 115.5 (C-6'), 115.3 (C-2'), 99.8 (C-10), 96.2 (C-6), 95.7 (C-8), 79.5 (C-2), 67.0 (C-3), 29.0 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **7** 为表儿茶素。

化合物 **8**: 灰白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 305.065 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.51 (2H, d, $J = 0.4$ Hz, H-2', 6'), 5.93 (1H, s, H-8), 5.91 (1H, s, H-6), 4.75 (1H, s, H-2), 4.17 (1H, ddd, $J = 4.6, 3.2, 1.4$ Hz, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.6, 4.6$ Hz, H-4 α), 2.73 (1H, dd, $J = 16.9, 2.9$ Hz, H-4 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 158.0 (C-7), 157.6 (C-5), 157.3 (C-9), 146.7 (C-3', 5'), 133.6 (C-4'), 131.5 (C-1'), 107.0 (C-2', 6'), 100.1 (C-10), 96.3 (C-6), 95.8 (C-8), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.2 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **8** 为表没食子儿茶素。

化合物 **9**: 棕红色粉末, HR-ESI-MS m/z :

577.134 8 [M-H]⁻ (calcd. for C₃₀H₂₆O₁₂)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.09 (1H, brs, H-10'), 6.87 (1H, brs, H-10), 6.82 (2H, m, H-13, 14'), 6.71 (2H, dd, *J* = 8.2 Hz, H-14, 13'), 6.01 (1H, brs, H-8), 5.98 (1H, brs, H-6), 5.96 (1H, s, H-6'), 5.09 (1H, brs, H-2), 4.96 (1H, s, H-2'), 4.72 (1H, brs, H-4), 4.29 (1H, brs, H-3'), 3.99 (1H, brs, H-3), 2.93 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-4α'), 2.88 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-4'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 158.5 (C-7), 159.3 (C-8α), 157.8 (C-5), 155.8 (C-5'), 155.8 (C-7'), 153.9 (C-8α'), 145.4 (C-11'), 145.4 (C-11), 145.3 (C-12), 145.3 (C-12'), 131.9 (C-9), 131.9 (C-9'), 119.4 (C-14), 119.2 (C-14'), 115.5 (C-13), 115.5 (C-13'), 115.3 (C-10), 115.0 (C-10'), 107.0 (C-8'), 100.7 (C-4α), 100.5 (C-4α'), 96.5 (C-6'), 96.4 (C-6), 96.0 (C-8), 79.4 (C-2'), 77.0 (C-2), 72.9 (C-3), 66.5 (C-3'), 37.0 (C-4), 29.0 (C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **9** 为原花青素 B₂。

化合物 **10**: 棕红色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 577.134 4 [M-H]⁻ (calcd. for C₃₀H₂₆O₁₂)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.96 (2H, brs, H-10, 10'), 6.73 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-13, 14'), 6.70 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-14, 13'), 6.00 (1H, brs, H-8), 5.93 (2H, brs, H-6, 6'), 5.06 (1H, brs, H-2), 4.74 (1H, s, H-2'), 4.66 (1H, brs, H-4), 4.04 (1H, s, H-3'), 3.95 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-3), 2.59 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-4'), 2.57 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-4α'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 157.8 (C-8α), 157.7 (C-7), 156.0 (C-5'), 155.4 (C-7'), 155.4 (C-5), 153.0 (C-8α'), 145.5 (C-11'), 145.4 (C-11), 145.4 (C-12'), 145.2 (C-12), 132.6 (C-9), 132.4 (C-9'), 119.5 (C-14), 119.4 (C-14'), 115.7 (C-13'), 115.5 (C-13), 115.4 (C-10), 114.7 (C-10'), 107.3 (C-8'), 101.4 (C-4α), 101.1 (C-4α'), 97.0 (C-6'), 96.3 (C-6), 95.9 (C-8), 82.2 (C-2'), 77.0 (C-2), 72.7 (C-3), 68.0 (C-3'), 36.9 (C-4), 29.2 (C-4')。以上数据与文献报道的基本一致^[16], 故鉴定化合物 **10** 为原花青素 B₁。

化合物 **11**: 白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 353.086 9 [M-H]⁻ (calcd. for C₁₆H₁₈O₉)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.56 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8'), 5.33 (1H, m, H-3), 4.17 (1H, m, H-5),

3.73 (1H, dd, *J* = 8.4, 3.2 Hz, H-4), 1.99~2.25 (4H, m, H-2a, 2b, 6a, 6b); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 177.0 (C-7), 168.6 (C-9'), 149.6 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.8 (C-3'), 127.7 (C-6'), 123.0 (C-1'), 116.5 (C-5'), 115.2 (C-8'), 115.2 (C-2'), 76.1 (C-1), 73.4 (C-4), 72.0 (C-3), 71.3 (C-5), 38.8 (C-6), 38.2 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **11** 为绿原酸。

化合物 **12**: 灰白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 137.023 7 [M-H]⁻ (calcd. for C₇H₆O₃)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.31 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 7.30 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2), 9.69 (1H, s, H-7), 6.91 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 191.7 (C-7), 152.3 (C-3), 145.8 (C-4), 129.4 (C-1), 125.0 (C-6), 114.8 (C-5), 113.9 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **12** 为原儿茶醛。

化合物 **13**: 白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 137.023 5 [M-H]⁻ (calcd. for C₇H₆O₃)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.88 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 170.1 (C-7), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.6 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **13** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **14**: 白色粉末, HR-ESI-MS *m/z*: 153.018 0 [M-H]⁻ (calcd. for C₇H₆O₄)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.44 (1H, brs, H-2), 7.42 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, H-6), 6.8 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 170.2 (C-7), 151.5 (C-4), 146.0 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-2), 115.7 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **14** 为原儿茶酸。

4 抗氧化活性研究

参照文献报道的实验方法^[20]进行适当改进, 精密称取适量 DPPH, 用甲醇配成 50 μg/mL, 避光备用。将单体样品用甲醇制成系列浓度, 各取 10 μL 加入 790 μL DPPH 溶液于 EP 管中混匀, 避光反应 30 min。反应结束后, 立即精密吸取 200 μL 反应液置于 96 孔板中 (*n* = 3), 于 517 nm 波长处检测吸光度 (*A*_s) 值。同时测定空白对照体系, 即 10 μL 甲醇溶剂与 790 μL DPPH 溶液混合后的 *A*_c 值, 以及背景信号纯甲醇 200 μL 的 *A*_b 值, 每个浓度重复测定 3 次, 根据公式计算清除率, 以清除率为纵坐标 (*Y*), 化合物的浓度为横坐标 (*X*) 进行线性回归,

以清除率为 50% 时待测样品浓度 (IC₅₀) 为评价指标, 以维生素 C 为阳性对照。蛇附子中 18 种单

化合物的抗氧化活性结果见表 1。

$$\text{清除率} = 1 - (A_s - A_b) / (A_c - A_b)$$

表 1 蛇附子中 18 种化合物体外清除自由基活性检测结果

Table 1 Determination of 18 compounds from root tubers of *T. hemsleyanum* on *in vitro* scavenging free radical of DPPH

化合物	线性范围/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程	<i>r</i>	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	5.31~31.86	$Y = -0.0505X + 0.7705$	0.9993	26.84
2	3.82~19.08	$Y = -0.0871X + 0.7590$	0.9965	14.15
3	—	—	—	$>1.16 \times 10^3$
4	—	—	—	$>2.58 \times 10^3$
5	6.58~65.78	$Y = -0.0346X + 0.7385$	0.9957	43.81
6	6.58~32.89	$Y = -0.0383X + 0.7007$	0.9960	31.18
7	6.58~32.89	$Y = -0.0500X + 0.7235$	0.9956	24.22
8	5.17~25.83	$Y = -0.0804X + 0.7176$	0.9961	14.19
9	3.29~16.45	$Y = -0.0366X + 0.6835$	0.9980	15.99
10	2.72~13.62	$Y = -0.0510X + 0.7464$	0.9961	12.40
11	4.73~47.30	$Y = -0.0357X + 0.7717$	0.9973	29.63
12	7.24~24.25	$Y = -0.1696X + 0.7619$	0.9937	15.98
13	—	—	—	$>2.42 \times 10^3$
14	11.69~58.43	$Y = -0.0655X + 0.7483$	0.9917	36.06
芦丁	3.29~32.90	$Y = -0.0248X + 0.7447$	0.9985	24.31
异槲皮苷	3.29~26.31	$Y = -0.0439X + 0.7339$	0.9933	18.50
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	—	—	—	$>1.05 \times 10^3$
紫云英苷	—	—	—	$>1.05 \times 10^3$
维生素 C	5.85~29.24	$Y = -0.0956X + 0.7702$	0.9993	23.00

5 讨论

课题组先后从蛇附子中共分离鉴定 18 个成分, 结果表明蛇附子中除了文献报道的黄酮类主要成分外, 也含有较多的有机酸类成分。并且, 比较蛇附子中各成分清除 DPPH 自由基的活性, 结果表明槲皮素、表没食子儿茶素、原花青素 B₁、原花青素 B₂、原儿茶醛和异槲皮苷 IC₅₀ 值较小, 其抗氧化活性均优于阳性对照维生素 C; 而水杨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和紫云英苷的抗氧化活性则较弱 (IC₅₀ 大于 1 mmol/L)。

蛇附子中 18 种化合物, 抗氧化活性不同: (1) 黄酮苷元与其苷类成分相比, 苷元槲皮素和其 3 位糖基取代的异槲皮苷和芦丁相比, 抗氧化活性随着糖基取代而下降; 苷元山柰酚和其 3 位糖基取代的紫云英苷和山柰酚-3-*O*-芸香糖苷相比, 抗氧化活性随着糖基取代而大大下降。(2) 黄酮间的比较, 文献报道^[21]表明, 黄酮类化合物的抗氧化能力与其结构性质密切相关, B 环上的邻二酚羟基对黄酮类抗氧化活性起主要作用; 因此 B 环具有邻二酚羟基的槲皮素及其苷类成分抗氧化活性明显优于山柰酚和

其苷类成分。(3) 黄烷醇类二聚体的花青素 (原花青素 B₁ 和原花青素 B₂) 抗氧化活性优于单一体 (儿茶素和表儿茶素), 并且其 3 位取代没食子酰基的表没食子儿茶素活性优于表儿茶素。(4) 有机酸类苯甲酸、水杨酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸对比, 有机酚酸母核结构一致情况下, 酚羟基越多, 其抗氧化活性越强, 因而, 具有邻二酚羟基的原儿茶酸表现较好的抗氧化活性, 苯甲酸、水杨酸和对羟基苯甲酸则活性较弱; 原儿茶醛相比于原儿茶酸来说, 其含醛基, 抗氧化活性显著优于含羧基的原儿茶酸; 绿原酸由于其邻二酚羟基, 也表现较好的抗氧化活性。氧化白藜芦醇虽然没有邻二酚羟基结构, 但由于其具有 4 个间位酚羟基, 也表现一定的抗氧化活性。

本实验对蛇附子的化学成分进行分离, 共鉴定 14 个成分, 其中 9 个成分系首次分离, 蛇附子中除了黄酮类成分外, 也富含较多的有机酸。DPPH 抗氧化活性测试结果显示, 所测多数成分都具有良好的抗氧化能力, 本研究对于明确蛇附子抗氧化的药效物质基础以及蛇附子的开发利用具有指导意义。

志谢: 中国科学院福建物质结构研究所张旭东研究员在核磁结构解析的帮助。本研究依托于福建中医药大学福建省中药产业技术开发基地, 福建省中药研究开发工程实验室和福建省中药学重点实验室。

参考文献

- [1] 国家中药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 黄真, 毛庆秋, 魏佳平. 三叶青提取物抗炎、镇痛及解热作用的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 861-864.
- [3] 李瑛琦, 陆文超, 于治国. 三叶青的化学成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 982-983.
- [4] 刘东, 鞠建华, 林耕, 等. 中国特有植物三叶崖爬藤化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(增刊): 31-33.
- [5] 刘东, 鞠建华, 林耕, 等. 三叶崖爬藤中的新黄酮碳甙 [J]. 植物学报, 2002, 44(2): 227-229.
- [6] 刘东, 鞠建华, 杨峻山. 狭叶崖爬藤化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 4-6.
- [7] 霍昕, 杨迺嘉, 刘文炜, 等. 三叶青块根乙醚提取物成分研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1651-1653.
- [8] 迟祥, 郭美丽, 宋慧, 等. 鸡冠花种子的化学成分研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(6): 657-660.
- [9] 范世明, 黄泽豪, 林婧, 等. 蛇附子中4种黄酮类成分的分离及含量测定 [J]. 中药材, 2014, 37(12): 2226-2230.
- [10] 李干鹏, 罗阳, 李尚秀, 等. 小叶杜鹃花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1668-1672.
- [11] 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.
- [12] 焦威, 鲁璐, 邓美彩, 等. 千金子化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 181-187.
- [13] 何细新, 巢晓娟, 杨璐, 等. 广东桑根心材的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 193-196.
- [14] 杨大松, 杨永平, 杨永红, 等. 秋枫化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(8): 1056-1059.
- [15] 杨鑫, 梁锐君, 洪爱华, 等. 野生余甘子树皮的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 170-174.
- [16] 牟肖男, 杨文强, 王文婧, 等. 槟榔的化学成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2014, 35(1): 56-60.
- [17] 周媛媛, 刘兆熙, 孟颖, 等. 青龙衣有效部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2303-2306.
- [18] 阮鸣, 孔令义, 罗建光. 冠心宁注射液的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1838-1844.
- [19] 卢汝梅, 曹敏, 廖彭莹, 等. 壮药龙骨风化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2195-2199.
- [20] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [21] 谭福新, 叶涛, 刘湘新, 等. 植物提取物抗氧化成分及机理研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(15): 288-292.