

三叉刺中黄酮类化学成分研究

周光雄¹, 程 燕¹, 叶文才¹, 陈若芸²

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的 研究海南特有植物三叉刺 *Trifidacanthus unifoliolatus* 茎提取物中的化学成分。方法 通过硅胶柱色谱, 对该植物茎的醋酸乙酯部位中成分进行分离和纯化; 利用质谱及核磁等谱学方法确定所分离化合物的结构; 并利用 ORAC 法测定化合物的抗氧化活性。结果 分离得到 7 个黄酮类化合物, 分别为 dalbergioidin (I)、isoferreirin (II)、染料木素 (III)、2'-methoxyl-genistein (IV)、芹菜素 (V)、山柰酚 (VI) 和香橙素 (VII); 且所有化合物都具有一定的抗氧化活性。结论 所有化合物都为首次从该植物中分离得到, 其抗氧化活性因结构不同而有差异。

关键词: 三叉刺; 豆科; 黄酮; 抗氧化活性**中图分类号:** R284.1**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2008)03-0510-03

豆科植物三叉刺 *Trifidacanthus unifoliolatus* Merr. 为我国海南岛分布的特有植物, 笔者对该植物进行了研究, 从中分离得到 7 个黄酮类化合物, 由波谱数据分别鉴定为 dalbergioidin (I)、isoferreirin (II)、染料木素 (III)、2'-methoxyl-genistein (IV)、芹菜素 (V)、山柰酚 (VI) 和香橙素 (VII)。本实验报道这些化合物的分离和结构鉴定及其消除氧自由基活性结果。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂: 旋光用 Perkin-Elmer 241 型旋光仪测定, 红外光谱用 Inlet FT 红外仪测定, NMR 谱用 Varian-300 型核磁共振仪记录, EI-MS 谱在 VG ZAB-2F 型质谱仪上完成。柱色谱硅胶 (160~200 目) 及薄层用硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂产品, 所用溶剂为分析纯, 由北京化学试剂厂和天津化学试剂厂生产。

1.2 实验材料: 三叉刺茎于 1999 年从海南省乐东县尖峰岭采集, 原植物由海南大学生命科学中心黄世满老师鉴定, 原植物标本存于中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所标本室。

1.3 提取与分离: 将三叉刺干燥茎 1.0 kg 切成碎片, 粉碎成颗粒, 用 5 倍量 80% 乙醇浸提 3 次, 滤过并合并滤液, 减压回收乙醇。所得乙醇浸膏挥干溶剂, 得黑褐色干浸膏 220.0 g。将此浸膏 (140.0 g) 悬浮分散在 4 倍量蒸馏水中, 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次, 挥去溶剂及水, 得石油醚萃取物 (53.1 g)、醋酸乙酯萃取物 (27.0 g)、正丁醇萃取物 (19.2 g) 以及水层部分浓缩物 (37.0 g)。取醋酸乙酯萃取物 (22.0 g) 拌入 3 倍量硅胶中, 加到硅

胶干柱 (10 cm×60 cm) 上, 用氯仿-甲醇 (20:1~2:1) 进行梯度洗脱, 每 250 mL 收集一份洗脱液。其中第 125~131 份滤得化合物 I, 第 144~154 份滤得结晶 I, 母液合并, 再拌样上硅胶色谱柱, 以氯仿-甲醇 (10:1~2:1) 洗脱, 得化合物 III~VII。

2 结构鉴定

化合物 I: 白色晶体 (丙酮), 旋光 $[\alpha]_D^{25} + 16.0$ (c 0.075, MeOH); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 415, 3 372, 3 263, 2 987, 2 937, 1 705, 1 637, 1 612, 1 603, 1 623, 1 452, 1 373, 1 279, 1 227, 1 163, 1 105, 1 028, 833 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 6.49 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.33 (1H, dd, $J=8.3, 2.2$ Hz, H-5'), 5.96 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 5.95 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 4.59 (1H, t, $J=10.7$ Hz, H-2a), 4.44 (1H, dd, $J=10.7, 5.4$ Hz, H-2b), 4.23 (1H, dd, $J=10.7, 5.4$ Hz, H-3), 3.73 (4H, brs, OH); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 71.1 (t, C-2), 47.2 (d, C-3), 198.4 (s, C-4), 165.3 (s, C-5), 96.8 (d, C-6), 167.3 (s, C-7), 95.6 (d, C-8), 164.5 (s, C-9), 103.5 (s, C-10), 113.6 (s, C-1'), 158.9 (s, C-2'), 103.7 (d, C-3'), 157.5 (s, C-4'), 107.6 (d, C-5'), 130.6 (d, C-6'); EI-MS m/z (rel. int.): 288 (M⁺, 30), 270 (10), 153 (100), 136 (30), 121 (13), 107 (20), 95 (17), 79 (19), 69 (32), 55 (20)。上述数据与文献报道 dalbergioidin 的一致, 故确定该化合物为 dalbergioidin^[1]。

化合物 II: 白色晶体 (丙酮), 旋光 $[\alpha]_D^{25} - 60$ (c 0.175, MeOH); ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 6.49 (1H, d, $J=2.3$ Hz,

H-3'), 6.38 (1H, dd, $J=8.3, 2.3$ Hz, H-5'), 5.94 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 5.91 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 4.47 (1H, t, $J=10.9$ Hz, H-2a), 4.37 (1H, dd, $J=10.9, 5.5$ Hz, H-2b), 4.21 (1H, dd, $J=10.9, 5.5$ Hz, H-3), 3.73 (3H, s, OH); EI-MS m/z (rel. Int.) 302 (M^+ , 40), 294 (3), 281 (3), 267 (4), 239 (5), 225 (5), 211 (5), 153 (20), 97 (15), 85 (44), 71 (62), 57 (100), 43 (78). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 100 MHz) δ : 71.2 (t, C-2), 47.4 (d, C-3), 198.4 (s, C-4), 165.7 (s, C-5), 96.9 (d, C-6), 167.0 (s, C-7), 95.6 (d, C-8), 164.6 (s, C-9), 103.7 (s, C-10), 115.3 (s, C-1'), 159.3 (s, C-2'), 103.7 (d, C-3'), 159.6 (s, C-4'), 108.1 (d, C-5'), 131.7 (d, C-6'), 79.9 (OMe)。该化合物数据表明其具有与化合物 I 相同的二氢异黄酮骨架, 但 2' 位为甲氧基取代。甲氧基位置的确定是基于 C-2' 与甲氧基上氢具有远程相关。根据以上推定, 该化合物为 dalbergioidin-2-methyl ether, 即为 isoferreirin^[2]。

化合物 III: 白色晶体 (丙酮); 根据 ^1H -NMR 和 EI-MS 数据, 确定该化合物为染料木素^[1]。

化合物 IV: 白色晶体 (丙酮-石油醚), ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.17 (1H, s, H-2), 7.20 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3'), 6.86 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6'), 7.02 (1H, dd, $J=8.1, 2.1$ Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.39 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, OMe); EI-MS m/z (rel. int.): 300 (M^+ , 100), 285 ($M^+-\text{Me}$, 5), 271 (3), 257 (3), 229 (6), 153 (25), 148 (13), 134 (10), 120 (12), 105 (8), 77 (2), 69 (10), 58 (3), 51 (10)。根据上述数据, 确定该化合物为 2'-methoxyl-genistein^[1]。

化合物 V: 淡黄色粉末 (丙酮-石油醚); 根据 ^1H -NMR 和 EI-MS 数据, 确定该化合物为芹菜素^[3]。

化合物 VI: 淡黄色粉末 (丙酮-石油醚); 根据 ^1H -NMR 和 EI-MS 数据, 确定该化合物为山柰酚^[4]。

化合物 VII: 白色晶体 (丙酮-石油醚); 根据 ^1H -NMR 和 EI-MS 数据, 确定该化合物为香橙素^[4]。

3 体外抗氧化能力评价

以 ORAC 方法测定抗氧化能力指数, 其原理是以荧光素二钠 (disodium fluorescein) 为荧光物质, 在 485 nm 光激发下, 可发射 527 nm 荧光。2,2'-azobis (2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) 在水溶液中可释放过氧自由基, 并能将荧光素 (fluorescein) 氧化, 使其荧光特性消失。当抗氧化剂存在时, 可与 fluorescein 竞争氧化剂, 减缓其荧光消退的速

度。根据这一反应特性, 可测定样品对氧自由基清除活性。实验结果表达为荧光衰减曲线下面积, 扣除无抗氧化剂的空白曲线下面积, 得出抗氧化剂的保护面积, 并与 1 $\mu\text{mol/L}$ trolox 的保护面积进行定量比较。

3.1 ORAC 测定方法: 测定方法参照文献报道^[5]。在 96 孔板中加入 20 μL 75 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 后, 添加样品 (以 DMSO 溶解) 20 μL (312.5 ng/mL), 并依次加入 AAPH 140 μL 和缓冲液 20 μL , 最后添加 fluorescein 20 μL 后迅速将 96 孔板置于设置温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 的荧光酶标仪中, 开始测定。每 2 分钟测定一个点, 共测定 2 h。样品的 ORAC 值是以 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 trolox 在荧光衰减曲线上对应的保护积分面积作为标准对照计算。

3.2 化合物 I ~ VII 体外抗氧化活性: 如图 1 和 2 所示, 荧光素氧化的工作曲线用作抗氧化反应的抵抗时间的指数。荧光素二钠的曲线描述了化合物 I ~ VII 相比于 trolox 吸收过氧化自由基的能力。从该曲线清楚可知, 化合物 I ~ VII 均抑制该氧化进程, 具有明显抗氧化活性。

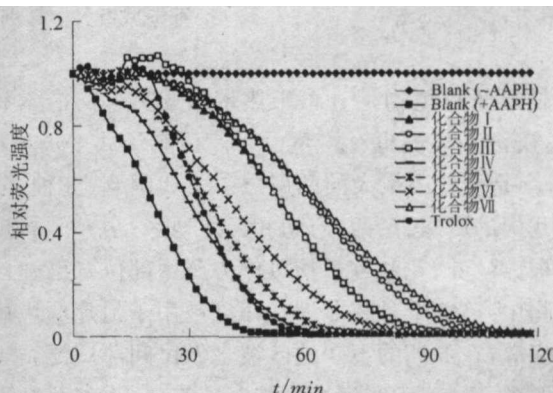


图 1 化合物对 AAPH 诱导荧光衰减的抑制效应曲线 ($n=3$)

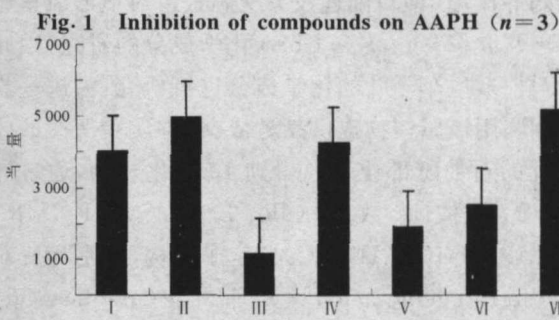


图 2 化合物对 AAPH 诱导荧光衰减的抑制效应

Fig. 2 Inhibition of compounds on AAPH

抗氧化剂存在时的荧光衰减曲线下面积与无抗氧化剂存在时自由基作用的荧光衰减曲线下面积之差, 即抗氧化剂的保护面积。抗氧化剂的氧自由基清

除能力 ORAC 值,是通过荧光衰减曲线的保护面积与标准抗氧化物质的保护面积相比得出。ORAC 值以 trolox 当量($\mu\text{mol trolox 当量}/\mu\text{mol}$, $\mu\text{mol trolox 当量}/\text{mL}$ 及 $\mu\text{mol trolox 当量}/\text{mg}$)表达。结果由 3 次实验数据的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

4 结果与讨论

从三叉刺醋酸乙酯部位分析情况来看,所分离成分虽都为黄酮类,但黄酮结构上的多样性突出,包括黄酮醇、黄酮、二氢黄酮醇、异黄酮及二氢异黄酮等结构类型。这些黄酮体外都表现出抗氧化活性,其中 dalbergioidin、染料木素、芹菜素、山柰酚和香橙素等多个成分都具有其他多种生物活性^[6,7]。

参考文献:

[1] Purango D, Quinones W, Torres F, et al. Phytoalexin ac-

cumulation in colombian bean varieties and aminosugar as elicitors [J]. *Molecules*, 2002, 7: 817-832.

[2] Keen N T, Ingham J L. Phytoalexins from *Dolichos biflorus* [J]. *J Biosci*, 1980, 35C(11-12): 923-926.

[3] 陈靖宇, 陈建民, 肖培根. 荫风轮的化学成分成分研究(1) [J]. *天然产物研究与开发*, 1997, 9(30): 5-8.

[4] 徐志红, 刘星楷. 蛇葡萄根化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(8): 484-486.

[5] Prior R L, Hoang H, Gu L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL))) of plasma and other biological and food samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(11): 3273-3279.

[6] Sasaki N, Toda T, Kaneko T, et al. Flavonoids suppress the cytotoxicity toward PC12 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(8): 1093-1096.

[7] Rajnarayana K, Reddy M S, Chaluvadi M R, et al. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential [J]. *Indian J Pharmacol*, 2001, 33: 2-16.

榄形风车子叶中萜类化合物的研究

吴晓鹏^{1,2}, 陈光英^{2*}, 蒋才武^{1*}, 朱国元³, 方宏勤³

(1. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 2. 海南师范大学 化学系, 海南海口 571158;

3. 香港城市大学深圳研究院, 广东深圳 518057)

使君子科植物是分布于热带和亚热带的灌木和乔木, 美洲和澳洲也有少量分布。风车子属 *Combretum* L. 是全科中最大的两属之一。我国有 13 种, 分布在我国的广东、广西、海南和云南地区。风车子属植物的根、茎、叶、花和种子均可作为药用部位。已知该属植物中有 25 个种在非洲和印度被用于治疗麻风病和癌症等, 在亚洲的不同地区被当做民间药广泛用于治疗肝炎、痢疾、呼吸道感染甚至癌症^[1]。据有关文献报道, 风车子属植物具有保肝、抗炎、杀菌、抗癌和抗艾滋病等作用。但目前还没有文献报道对榄形风车子 *Combretum olivaeforme* Chao 化学成分的研究, 因此笔者对榄形风车子叶的化学成分进行研究, 为进一步开发和利用该属植物提供参考依据。本实验从榄形风车子叶的石油醚部位分离得到 10 个化合物, 通过理化性质和波谱数据 (IR、ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR、HMQC、HMBC) 鉴定了结构, 分别为三对节酸 (serratenic acid, I)、熊果酸 (ursolic acid, II)、齐墩果酸 (oleanolic acid, III)、23-hydroxy-imberbic acid-23-O- α -L-4-acetylramnopiranoside

(IV)、3,23-diacetoxyimberbic acid Me ester (V)、1,3-diacetoxy-23-hydroxy-imberbic acid-23-O- α -L-ramnopiranoside (VI)、25(27)-脱氢多孔甾醇 (25(27)-dehydroporiferasterol, VII)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, VIII)、 β -胡萝卜苷 (β -daucosterol, IX)、羽扇豆醇 (lupeol, X)。

1 仪器与试剂

浦光数字熔点仪 WRS-1B 型熔点仪, 上海浦东物理光学仪器厂, 温度未校正; Bruker AV-400 型核磁共振仪; Finnigan LC-MS 质谱仪; 红外光谱仪: Nicolet Nexus 670 FT-IR 型红外分光光度计; 旋转蒸发仪及中压液相: 瑞士 BÜCHI 公司; HITACHI U-2800 紫外仪; 高效液相: Waters 2695 Alliance Empower 色谱工作站; Sephadex LH-20 (Pharmacia); 薄层板 GF₂₅₄; Merck 公司; 柱色谱硅胶: 青岛海洋化工厂。

风车子采自广西南宁郊区, 经刘寿养教授鉴定为风车子属榄形风车子 *Combretum olivaeforme* Chao, 标本存于广西中医学院中药研究所。

收稿日期: 2007-10-22

基金项目: 海南省教育厅高校科研项目 (Hjkj200517); 海南省重点学科有机化学开放基金资助项目

作者简介: 吴晓鹏 (1981-), 男, 硕士研究生, 从事药用植物的活性成分研究。E-mail: wxptl@126.com

* 通讯作者 陈光英 蒋才武