

小花八角果实抗氧化活性部位化学成分研究

刘婷婷¹, 武海波¹, 陈艳艳¹, 隋先进¹, 任晓倩¹, 王文蜀^{1*}, 董旭俊²

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

2. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710091

摘要: 目的 研究民间药用植物小花八角 *Illicium micranthum* 果实中具有抗氧化活性的有效成分。方法 使用 DPPH 活性测试方法进行抗氧化活性筛选; 利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等多种色谱技术进行化合物的分离、纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。结果 小花八角果实甲醇提取物的醋酸乙酯萃取层抗氧化活性最好, 从中共分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为 gynurenol (1)、 β -榄醇 (2)、*epi*-carrisonone (3)、6-羟基-桉烷-4(14)-烯 (4)、 β -桉醇 (5)、柳杉醇 (6)、1*R*, 2*R*, 4*R*-三羟基薄荷烷 (7)、2-isopropenyl-5-methyl-cyclohexanol (8)、(-)-isopulegol (9)、4-isopropenyl-1-methyl-cyclohexanol (10)、棕榈酸 (11)、三十烷酸 (12)、对甲氧基苯甲酸 (13)、 β -胡萝卜苷 (14)。结论 除化合物 14 外, 其他化合物均首次从该植物果实中分离得到, 其中化合物 1~4、7、8 为首次从八角科植物中分离得到。

关键词: 小花八角果实; 抗氧化活性; β -榄醇; 6-羟基-桉烷-4(14)-烯; 棕榈酸; β -胡萝卜苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)05-0611-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.003

Chemical constituents with anti-oxidative activity from fruits of *Illicium micranthum*

LIU Ting-ting¹, WU Hai-bo¹, CHEN Yan-yan¹, SUI Xian-jin¹, REN Xiao-qian¹, WANG Wen-shu¹, DONG Xu-jun²

1. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710091, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents with anti-oxidative activity from the fruits of *Illicium micranthum*. **Methods** DPPH Radical scavenging assay was used for screening the active fractions. The chemical constituents were isolated and purified by various column chromatographic methods such as silica gel and Sephadex LH-20. The structures were identified by physicochemical properties and spectral analyses. **Results** The ethyl acetate layer of methanol extract from the fruits of *I. micranthum* showed anti-oxidative activity, from which 14 compounds were separated. Their structures were identified as gynurenol (1), β -elemol (2), *epi*-carrisonone (3), 6-hydroxy-eudesm-4(14)-ene (4), β -eudesmol (5), *trans*-eudesmane-4, 11-diol (6), 1*R*, 2*R*, 4*R*-trihydroxy-*p*-menthane (7), 2-isopropenyl-5-methyl-cyclohexanol (8), (-)-isopulegol (9), 4-isopropenyl-1-methyl-cyclohexanol (10), palmitic acid (11), triacontanoic acid (12), *p*-hydroxy-benzoic acid (13), and β -daucosterol (14). **Conclusion** Except for compound 14, all the other compounds are isolated from the fruits of *I. micranthum* for the first time, while compounds 1—4, 7, and 8 are isolated from the plants in Illiciaceae family for the first time.

Key words: fruits of *Illicium micranthum*; anti-oxidative activity; β -elemol; 6-hydroxy-eudesm-4(14)-ene; palmitic acid; β -daucosterol

自由基与活性氧被认为是引发机体衰老的重要原因, 也是诱发肿瘤等恶性疾病的重要原因^[1]。人工合成的抗氧化剂, 如 2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT)、叔丁基对苯二酚 (TBHQ)、丁羟基茴香醚 (BHA), 由于其潜在的毒副作用而受到应用限制^[2]。因此从植

物中寻找天然抗氧化剂成为植物研究的重要问题。

我国共有八角科植物 25 种, 其中八角 *Illicium verum* Hook. f. 果实, 又名八角茴香, 已作为天然抗氧化剂广泛应用于食品行业^[3]。小花八角 *I. micranthum* Dunn 是八角科八角属植物, 多年生灌

收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31200260, 31100256); 中央民族大学“985”工程项目 (MUC98504-14, MUC 98507-08); 中央民族大学“111 引智工程”项目 (B08044); 中央民族大学大学生创新创业训练计划资助项目 (URTP2012110014, GCCX 2013110010)

作者简介: 刘婷婷 (1988—), 女, 黑龙江密山人, 中央民族大学生命与环境科学学院博士研究生, 研究方向为药物化学。

Tel: (010)68932242 Fax: (010)68932633 E-mail: liutingting1204@163.com

*通信作者 王文蜀 Tel: (010)68932242 E-mail: wangws@muc.edu.cn

木或小乔木,广泛分布于我国西南民族地区^[4]。其树皮外用,可散瘀止痛、祛风除湿、治疗跌打损伤;果实入药,可治风湿骨痛、风寒感冒、呕吐腹泻^[5]。为了科学开发利用民族地区药用植物资源,本实验拟寻找小花八角果实中天然抗氧化活性部位。通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法筛选,发现小花八角果实甲醇提取物醋酸乙酯萃取层具有抗氧化活性。运用硅胶、凝胶等色谱分离技术,分离得到14个化合物,通过波谱数据并结合文献分别鉴定结构。其中,6个倍半萜类化合物:gynurenol(1)、 β -榄醇(β -elemol, 2)、*epi*-carrisone(3)、6-羟基-桉烷-4(14)-烯[6-hydroxy-eudesm-4(14)-ene, 4]、 β -桉醇(β -eudesmol, 5)、柳杉醇(*trans*-eudesmane-4, 11-diol, 6);4个单萜类化合物:1*R*, 2*R*, 4*R*-三羟基薄荷烷(1*R*, 2*R*, 4*R*-trihydroxy-*p*-menthane, 7)、2-isopropenyl-5-methyl-cyclohexanol(8)、(-)-isopulegol(9)、4-isopropenyl-1-methyl-cyclohexanol(10);2个脂肪酸类化合物:棕榈酸(palmitic acid, 11)、三十烷酸(triacontanoic acid, 12);2个其他类型化合物:对甲氧基苯甲酸(*p*-hydroxy-benzoic acid, 13)、 β -胡萝卜苷(β -daucosterol, 14)。除化合物14外,其他化合物均为首次从该植物果实中分离得到,其中化合物1~4、7、8为首次从八角科植物中分离得到。

1 仪器与材料

DRX 500、AVANCE 600 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); BT224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); X-6 显微熔点仪(北京泰克仪器有限公司,北京); UV-2000 紫外-可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司); Agilent 6890N-5975 质谱仪(美国安捷伦科技有限公司); 薄层色谱硅胶(GF₂₅₄)硅胶和柱色谱硅胶(200~300目)均购自青岛海洋化工有限公司; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司生产; DPPH 为美国 Sigma 公司生产; 维生素 C 对照品为中国医药上海化学试剂公司生产; 水为蒸馏水; 其他试剂均为分析纯,北京化工厂生产。

药材于2010年10月采于云南省澜沧县,由中国科学院昆明植物研究所刘恩德研究员鉴定为小花八角 *Illicium micranthum* Dunn 的果实,标本(201010103)保存于中央民族大学生命与环境科学学院。

2 抗氧化活性追踪及化合物的分离

2.1 DPPH 法抗氧化活性追踪

干燥的小花八角果实 1.3 kg, 粉碎, 甲醇室温

提取3次,每次7d,提取液减压浓缩后得210.0g浸膏。将浸膏经硅胶柱色谱,依次用石油醚、醋酸乙酯、氯仿、甲醇萃取,得到石油醚萃取物13.0g,醋酸乙酯萃取物19.0g,氯仿萃取物5.7g,甲醇萃取物126.0g。因石油醚萃取物中含有大量植物色素,517nm波长处有吸收,干扰DPPH抗氧化实验检测,所以实验样品选用醋酸乙酯萃取物、氯仿萃取物、甲醇萃取物,阳性对照为维生素C。以上3种萃取物配置不同浓度的无水乙醇溶液,将3.0mL不同浓度的待测样品分别加入1.0mL 0.1mmol/L DPPH溶液,室温、避光反应30min,517nm波长处检测最大吸收^[6]。结果显示(图1),与其他萃取部位相比,醋酸乙酯部位显示较强抗氧化活性(DPPH自由基平均清除率为96.85%,接近阳性对照物维生素C的DPPH自由基平均清除率97.52%),故对醋酸乙酯萃取物进行化学成分提取分离研究。

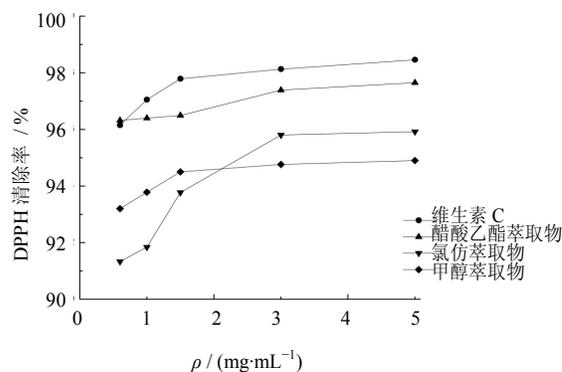


图1 小花八角果实甲醇提取物各萃取物清除DPPH自由基能力

Fig. 1 Radical scavenging activity of methanol extracts from fruits of *I. micranthum*

2.2 提取与分离

将醋酸乙酯萃取物分别采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱、薄层制备色谱等方法,分离得到化合物1(4.5mg)、2(5.2mg)、3(3.7mg)、4(7.1mg)、5(5.3mg)、6(4.9mg)、7(3.8mg)、8(4.7mg)、9(4.2mg)、10(3.9mg)、11(5.7mg)、12(6.1mg)、13(4.1mg)、14(4.5mg)。

3 结构鉴定

化合物1: 无色油状物(氯仿),薄层展开后三氯化铋显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 223 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.30 (1H, d, J = 0.6 Hz, H-6), 2.14 (1H, m, H-11), 1.69 (1H, m, H-4), 0.95

(6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12, 13), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-15), 0.88 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 142.1 (C-7), 125.3 (C-6), 75.2 (C-5), 38.9 (C-4), 36.7 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-11), 31.6 (C-3), 31.4 (C-9), 23.0 (C-2, 8), 21.8 (C-14), 20.5 (C-12, 13), 15.1 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **1** 为 gynurenol。

化合物 **2**: 无色针晶(氯仿), mp 49.0~50.5 °C。薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.88 (1H, dd, $J = 17.5, 10.5$ Hz, H-1), 4.88 (1H, s, H-3a), 4.72 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2a), 4.69 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2b), 4.60 (1H, s, H-3b), 1.94 (1H, dd, $J = 12.5, 2.4$ Hz, H-5), 1.83 (3H, s, H-15), 1.26 (3H, s, H-13), 1.22 (3H, s, H-12), 0.90 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 149.9 (C-4), 148.9 (C-1), 111.7 (C-2), 108.5 (C-3), 73.5 (C-11), 51.7 (C-7), 51.5 (C-5), 37.9 (C-9), 37.5 (C-10), 27.9 (C-12, 13), 26.2 (C-6), 25.9 (C-15), 23.0 (C-8), 18.1 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为 β -榄醇。

化合物 **3**: 白色油状物(氯仿), 薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 237 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.76 (3H, s, H-15), 1.26 (3H, s, H-13), 1.25 (3H, s, H-12), 1.16 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 198.5 (C-3), 155.6 (C-5), 130.0 (C-4), 72.9 (C-11), 52.5 (C-7), 38.0 (C-9), 36.0 (C-2), 33.9 (C-10), 29.8 (C-12, 13), 29.0 (C-1), 25.0 (C-8), 20.2 (C-6), 19.4 (C-14), 11.0 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为 *epi*-carrisone。

化合物 **4**: 无色油状物(氯仿), 薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 4.95 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-15b), 4.68 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-15a), 4.08 (1H, dd, $J = 10.8, 5.2$ Hz, H-6), 1.07 (3H, d, $J = 6.7$ Hz,

H-12), 0.93 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-13), 0.84 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 148.6 (C-4), 105.6 (C-15), 70.2 (C-6), 52.5 (C-5), 44.0 (C-7), 42.4 (C-1), 37.9 (C-3), 36.8 (C-10), 35.4 (C-9), 26.0 (C-11), 25.2 (C-12), 24.9 (C-2), 22.5 (C-8), 21.3 (C-13), 17.2 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为 6-羟基-桉烷-4(14)-烯。

化合物 **5**: 无色针晶(氯仿), mp 78.0~79.5 °C。薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 4.70 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-15a), 4.39 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-15b), 1.89 (1H, dd, $J = 12.3, 2.6$ Hz, H-5), 1.22 (6H, s, H-12, 13), 0.88 (3H, s, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 149.9 (C-4), 104.7 (C-15), 72.9 (C-11), 50.1 (C-7), 48.9 (C-5), 42.4 (C-1), 41.2 (C-9), 37.1 (C-3), 36.4 (C-10), 27.5 (C-12, 13), 24.9 (C-6), 24.6 (C-2), 23.5 (C-8), 16.2 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为 β -桉醇。

化合物 **6**: 无色针晶(氯仿), mp 135.5~136.0 °C。薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。ESI-MS m/z : 241 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.18 (1H, dd, $J = 12.3, 2.6$ Hz, H-5), 1.15 (3H, s, H-13), 1.14 (3H, s, H-12), 1.06 (3H, s, H-14), 0.88 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 71.8 (C-11), 71.4 (C-4), 54.9 (C-5), 49.9 (C-7), 44.8 (C-9), 43.1 (C-3), 41.8 (C-1), 34.5 (C-10), 27.2 (C-12), 27.1 (C-13), 23.0 (C-8), 22.7 (C-15), 22.0 (C-6), 21.2 (C-2), 18.9 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为柳杉醇。

化合物 **7~10**, 均为无色油状物。通过与参考文献报道^[12-14]对比碳谱数据(表 1), 分别鉴定为 1*R*, 2*R*, 4*R*-三羟基薄荷烷 (**7**)、2-isopropenyl-5-methyl-cyclohexanol (**8**)、(-)-isopulegol (**9**)、4-isopropenyl-1-methyl-cyclohexanol (**10**)。

化合物 **11**: 白色针晶(氯仿), mp 56 °C, 薄

表 1 化合物 7~10 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (125 MHz, CDCl_3)
Table 1 $^{13}\text{C-NMR}$ data of compounds 7—10 (125 MHz, CDCl_3)

碳位	7	8	9	10	碳位	7	8	9	10
1	71.6	31.6	31.6	69.2	6	29.9	41.6	42.6	39.2
2	76.1	34.3	34.3	39.3	7	27.7	21.9	21.9	32.6
3	34.1	29.5	29.5	27.5	8	38.9	145.9	145.9	150.0
4	74.8	52.9	54.2	45.7	9	16.8	111.4	111.4	107.1
5	30.5	67.7	70.9	27.5	10	16.8	19.8	19.8	21.6

层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 三氯化铋显色剂显淡黄色。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.30 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂COOH), 1.63 (2H, m, -CH₂CH₂COOH), 1.00~1.40 (24H, m, 12 \times -CH₂), 0.89 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, -CH₃)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **11** 为棕榈酸。

化合物 **12**: 白色粉末 (氯仿), mp 88~90 °C, 薄层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 三氯化铋显色剂显淡黄色。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.37 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, -CH₂COOH), 1.63 (2H, m, -CH₂CH₂COOH), 1.28~1.31 (52H, m, 26 \times -CH₂), 0.89 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, -CH₃)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **12** 为三十烷酸。

化合物 **13**: 无色针晶 (氯仿), mp 204~208 °C。薄层展开后三氯化铋显色剂不显色。ESI-MS m/z : 153 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.97 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.87 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 3.88 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 170.1 (C-7), 166.2 (C-4), 130.0 (C-2, 6), 122.7 (C-1), 116.0 (C-3, 5), 55.8 (-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **13** 为对甲氧基苯甲酸。

化合物 **14**: 白色粉末 (氯仿), mp 291~292 °C。薄层展开后三氯化铋显色剂显淡黄色。在多种溶剂系统中与 β -胡萝卜素对照品共薄层, 其 R_f 值和显色行为一致, 且混合熔点不变, 故鉴定化合物 **14** 为 β -胡萝卜素。

4 讨论

苯酚类及含有烯键、醇羟基等官能团的化合物化学性质活泼, 具有较强还原性, 已有文献表明其具有抗氧化活性^[18-19]。在以维生素 C 为阳性对照进行 DPPH 抗氧化实验中, 小花八角果实甲醇提取物的醋酸乙酯萃取层显示较好的抗氧化活性。进一步从中分离并鉴定的倍半萜类、单萜类、脂肪酸类、苯酚类化合物确实含有烯键、醇羟基、酚羟基等官能团。本研究提示民间药用植物小花八角果实在天然抗氧化剂方面有一定的开发前景, 为该植物果实在民族地区的深入开发利用打下了基础。

参考文献

[1] Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases [J]. *Free Radic Res*, 2000, 33:

85-97.

- [2] Williams G M, Iatropoulos M J, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37: 1027-1038.
- [3] 阳小勇, 黄初升, 刘红星. 八角茴香油的化学成分及其抗氧化性研究 [J]. 中国调味品, 2010, 35(7): 38-41.
- [4] 中国科学院昆明植物所. 云南植物志 (第 11 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [5] 林 祁. 八角属药用植物资源 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 654-657.
- [6] 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.
- [7] Shimizu Y, Imayoshi Y, Kato M, et al. New eudesmane-type sesquiterpenoids and other volatile constituents from the roots of *Gynura bicolor* DC. [J]. *Flavour Fragr J*, 2011, 26(1): 55-64.
- [8] 赵 庆, 郝小江, 陈耀祖, 等. 滇姜花的倍半萜成分 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 201-203.
- [9] Amano Y, Heathcock C H. (+)-Occidentalol: Absolute stereostructure and total synthesis [J]. *Canad J Chem*, 1972, 50(3): 340-345.
- [10] 钟文武, 刘劲松, 张聪, 等. 马兰化学成分研究 (II) [J]. 广西植物, 2012, 32(2): 261-263.
- [11] 王 哲. 干姜化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] 姜宏梁, 杨学东, 张 达, 等. 中药北刘寄奴的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(2): 97-99.
- [13] Jacob R G, Perin G, Loi L N, et al. Green synthesis of (-)-isopulegol from (+)-citronellal: Application to essential oil of citronella [J]. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44(18): 3605-3608.
- [14] Bohlmann F, Zeisberg R, Klein E. ¹³C-NMR-Spektren von monoterpenen [J]. *Magn Reson Chem*, 1975, 7(9): 426-432.
- [15] 许蒙蒙, 段营辉, 戴 毅, 等. 接骨木中 1 个新的降三萜成分 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2639-2641.
- [16] 连 珠, 张承忠, 李 冲, 等. 蒙药广枣化学成分的研究 [J]. 中药材, 2003, 26(1): 23-24.
- [17] 赵钟祥, 阮金兰, 金 晶, 等. 披针新月蕨根茎化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1936-1939.
- [18] 谭樛新, 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.
- [19] 李 越. 天然药物抗氧化成分构效关系研究进展 [J]. 天津药学, 2006, 18(2): 57-60.