

牛蒡根中黄酮苷类化学成分及其抗氧化活性构效关系的研究

蒋晓文^{1,2}, 白俊鹏², 田 星², 赵庆春^{1*}

1. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110840

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 研究牛蒡 *Arctium lappa* 根中的黄酮苷类化学成分及其抗氧化活性, 分析构效关系。方法 采用重结晶、硅胶柱色谱、RP₁₈ 柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和 PHPLC 等多种分离手段, 对黄酮苷类化合物进行分离纯化, 通过现代波谱学方法 (NMR、ESI-MS) 鉴定其结构, 并采用 DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法对分离得到的化合物进行抗氧化活性测试。结果 从牛蒡根 55%乙醇提取物中分离得到 8 个黄酮苷类化合物, 分别鉴定为柚皮素-7-芸香糖苷 (1)、橙皮苷 (2)、淫羊藿苷 (3)、芒柄花苷 (4)、异芒柄花苷 (5)、新甘草苷 (6)、新异甘草苷 (7)、甘草苷 (8); 经 3 种不同方法测试, 分析了这一类化合物的抗氧化活性构效关系。结论 化合物 3 为首次从该植物中分离得到, 其他化合物均为首次从该属植物中分离得到; 化合物 1 和 8 显示出较强抗氧化活性; 黄酮的 B 环上的 3'-OH 和 4'-OCH₃ 结构具有较高电子离域并且能形成氢键, 很大程度提高了其结构的稳定性, 增强了其抗氧化活性。

关键词: 牛蒡根; 黄酮苷类; 抗氧化; 构效关系; 柚皮素-7-芸香糖苷; 甘草苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)05-0726-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.006

Flavonoid glycoside compounds from roots of *Arctium lappa* and structure-activity relationship of anti-oxidation

JIANG Xiao-wen^{1,2}, BAI Jun-peng², TIAN Xing², ZHAO Qing-chun¹

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110840, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To investigate the flavonoid glycoside compounds from the roots of *Arctium lappa* and their structure-activity relationship (SAR) of anti-oxidation. **Methods** The compounds were isolated by column chromatography over silica gel, RP-C₁₈, Sephadex LH-20, and PHPLC. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis and their anti-oxidant activities were evaluated by DPPH, ABTS, and FRAP assays. **Results** Eight flavonoid glycoside compounds were isolated from 55% ethanol extract in the roots of *A. lappa*, which were identified as nairutin (1), hesperidin (2), icariin (3), ononin (4), isoononin (5), neoliquiritin (6), neoisoliquiritin (7), and liquiritin (8). The anti-oxidant activities of these compounds were tested by three different methods (DPPH, ABTS, and FPAR), and their SAR were further analyzed. **Conclusion** Compound 3 is isolated from the roots of *A. lappa* for the first time, all others were from the plants of *Arctium* L. for the first time; Compounds 1 and 8 have shown the strongest anti-oxidant activity; The -OH on C-3' and -OCH₃ on C-4' in the B ring in regard to the anti-oxidant activity of these compounds by participating in electron delocalization and hydrogen bonding.

Key words: roots of *Arctium lappa*; flavonoid glycoside; anti-oxidant activity; structure-activity relationship; nairutin; liquiritin

牛蒡 *Arctium lappa* L. 系菊科牛蒡属两年生草本植物, 是日本很受欢迎的保健食材, 后被引入国内, 目前在山东、江苏、安徽、黑龙江均有种植,

其果实、根和叶均可作为药用。牛蒡子为《中国药典》收载常用中药, 用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛等症^[1]。牛蒡根在《药性论》

收稿日期: 2015-11-05

基金项目: 国家科技重大专项 (2014ZX09J14101-05C)

作者简介: 蒋晓文, 男, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究。E-mail: 13840267257@163.com

*通信作者 赵庆春, 男, 博士生导师, 研究方向为基于靶点的天然活性产物的发现及作用机制研究。

Tel: (024)28856205 E-mail: Zhaoqingchun1967@163.com

《本草拾遗》等典籍中均有记载,但没有形成中草药类的商品,《中国药典》也未见收入。自 1929 年日本人田•川越等从牛蒡子中分离牛蒡苷以来,关于牛蒡的化学成分研究取得的重要进展。牛蒡的化学成分复杂,种类多样,根、茎、叶和种子中含有的主要成分也不尽相同。迄今为止,尚未见牛蒡化学成分系统的研究报道,多数为牛蒡子的研究。本课题组在前期工作中,曾对牛蒡根中的神经保护活性成分及作用机制进行了研究^[2-4],通过进一步的研究,又从中分离得到了 8 个黄酮苷类化合物,分别鉴定为柚皮素-7-芸香糖苷(nairutin, 1)、橙皮苷(hesperidin, 2)、淫羊藿苷(icariin, 3)、芒柄花苷(ononin, 4)、异芒柄花苷(isoononin, 5)、新甘草苷(neoliquiritin, 6)、新异甘草苷(neoisoliquiritin, 7)、甘草苷(liquiritin, 8)。其中化合物 3 为首次从该植物中分离得到,其他化合物均为首次从该属植物中分离得到,结构式见图 1。体外抗氧化活性测试发现,化合物 1 在 DPPH、ABTS 和 FRAP 3 个不同的抗氧化实验中均显示出比阳性药 Trolox (抗氧化能力与维生素 E 相当) 更强的活性。通过对其构效关系的研究,验证了文献报道的黄酮 B 环上 3' 和 4' 位的邻二酚羟基能显著提高其抗氧化活性^[5],另外还发现黄酮的 B 环上的 3'-OH 和 4'-OCH₃ 这种结构也能很大地提高其抗氧化活性。

(ononin, 4)、异芒柄花苷(isoononin, 5)、新甘草苷(neoliquiritin, 6)、新异甘草苷(neoisoliquiritin, 7)、甘草苷(liquiritin, 8)。其中化合物 3 为首次从该植物中分离得到,其他化合物均为首次从该属植物中分离得到,结构式见图 1。体外抗氧化活性测试发现,化合物 1 在 DPPH、ABTS 和 FRAP 3 个不同的抗氧化实验中均显示出比阳性药 Trolox (抗氧化能力与维生素 E 相当) 更强的活性。通过对其构效关系的研究,验证了文献报道的黄酮 B 环上 3' 和 4' 位的邻二酚羟基能显著提高其抗氧化活性^[5],另外还发现黄酮的 B 环上的 3'-OH 和 4'-OCH₃ 这种结构也能很大地提高其抗氧化活性。

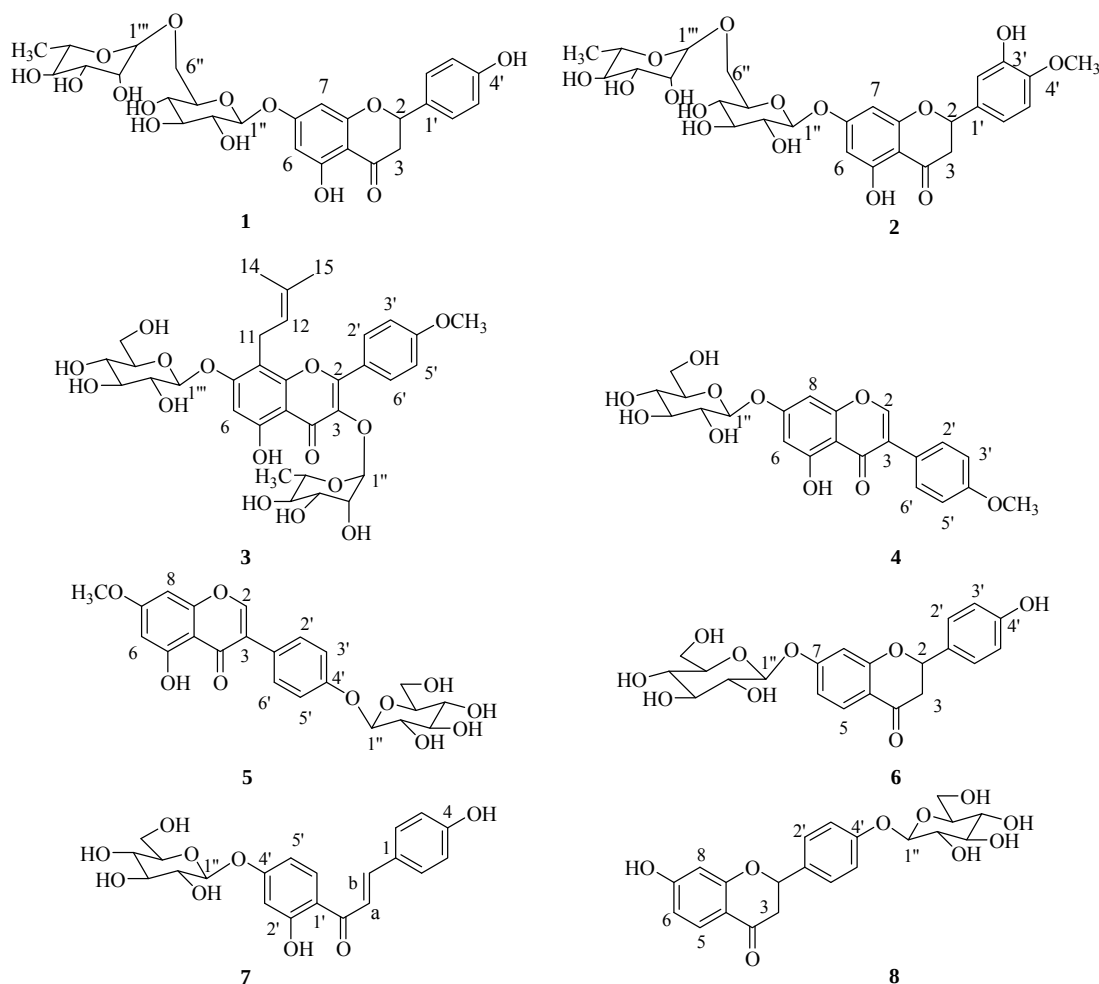


图 1 化合物 1~8 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1—8

1 仪器与材料

JASCO 制备型高效液相色谱仪, PU-2087 加压机, SPD-10AV 紫外检测器, 日本分光株式会社; 制备色谱柱 YMC-Pack Pro ODS-A C₁₈ (250 mm×10 mm, 10 μm)、RP-ODS (50 μm), 日本 YMC 公

司; Bruker ARX-300 核磁共振光谱仪, 瑞士 Bruker 公司; ESI-MS 质谱, 美国 AB 公司; EYELA-N1000、N1100 旋转蒸发仪, 日本东京理化; 酶标仪, 伯乐生命医学产品有限公司; Shimadzu 分析天平, 日本 Shimadzu 公司; HH-D4 数显恒温水浴锅, 巩义市英

峪予华公司; 薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶(100~140、200~300 目), 青岛海洋化工厂; Sephadex LH-20, 美国 Pharmacia 公司; 色谱乙腈, 德国 Merck 公司; 三氟乙酸(TFA), 国药集团; 重蒸水, 哇哈哈纯净水; DPPH, 美国 Sigma 公司; ABTS 和 FPAR 试剂盒、Torolox, 碧云天公司。

牛蒡根药材于2014年9月购自辽宁省沈阳市四方药店, 经沈阳药科大学路金才教授鉴定为菊科牛蒡属植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥根, 标本(2014JXWA)保存于沈阳军区总医院药剂科标本室。

2 提取与分离

干燥牛蒡根 5 kg, 粉碎后用 55%乙醇浸泡加热回流提取 3 次, 第 1 次 2 h, 第 2 次 2 h, 第 3 次 1 h, 滤过, 合并提取液, 减压回收溶剂得浸膏。加水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 减压浓缩, 得石油醚萃取物 65 g、醋酸乙酯萃取物 120 g、正丁醇萃取物 64 g。

对醋酸乙酯部位(120 g)进行硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)梯度洗脱, 得到 10 组分 Fr. 1~10。对 Fr. 8 (12.5 g) 进行 ODS 柱色谱, 甲醇-水(100:0→0:100)梯度洗脱, 得到 12 个组分 Fr. 8-1~8-12, 重结晶得到化合物 **6** (9.5 mg)。对 Fr. 8-9 (1.15 g) 进行 ODS 柱色谱, 采用甲醇-水(100:0→0:100)梯度洗脱, 得到 10 个组分。其中 Fr. 8-9-7 (0.40 g) 经 PHPLC 分离(30%乙腈-水+0.1%三氟乙酸, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 **1** (7.0 mg) 和 **2** (10.2 mg); Fr. 8-9-8 (0.16 g) 经 PHPLC 分离(35%乙腈-水+0.1%三氟乙酸, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 **7** (12.0 mg)。Fr. 8-11 (0.70 g) 经 PHPLC 分离(45%乙腈水+0.1%三氟乙酸, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 **3** (8.0 mg) 和 **4** (11.3 mg)。Fr. 9 (1.5 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇(50:50)洗脱, 得到 12 个组分。其中组分 Fr. 9-10 (80 mg) 经 PHPLC 分离(35%乙腈水+0.1%三氟乙酸, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 **5** (13.0 mg) 和 **6** (7.0 mg)。Fr. 9-8 (0.6 g) Sephadex LH-20 柱色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇(50:50)洗脱, 得到化合物 **7** (10 mg)。Fr. 9-9 (0.48 g) 经 PHPLC 分离(45%乙腈水+0.1%三氟乙酸, 1.5 mL/min, 210 nm), 得到化合物 **8** (12.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色无定形粉末, 盐酸-镁粉反应阳

性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。ESI-MS m/z : 581 $[M+H]^+$, 603 $[M+Na]^+$, 579 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) 谱中(表 1), δ 7.33 (2H, d, $J=8.4$ Hz), 6.82 (2H, d, $J=8.4$ Hz) 为 1 组 AA'BB'偶合系统芳香质子信号; 推测为 B 环 2'、6'和 3'、5'位质子; δ 6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz) 为间位耦合的芳香质子信号; δ 5.40 (1H, m) 为二氢黄酮 C-2 位的特征质子信号, 提示该化合物可能为二氢黄酮类; δ 4.95 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 4.69 (1H, brs) 为糖上端基氢信号, 提示该化合物中含有 2 个糖; 且 δ 1.19 (3H, dd, $J=6.2, 3.0$ Hz) 为鼠李糖 C-6 位甲基的特征信号, 提示其中 1 个糖为鼠李糖。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) 谱中, 出现 7 对 14 个化学位移相似但又裂开的碳信号 δ 166.8, 166.8, 165.0, 165.0, 164.5, 164.5, 129.2, 129.1, 116.4, 116.7, 97.1, 97.0, 80.7, 80.6。通过 HSQC 谱可以判定为 7 个碳信号, 进一步确定该化合物的苷元为二氢黄酮类。通过 HSQC 谱、HMBC 谱和文献报道^[6]比对, 可确定 δ 102.1, 72.1, 72.4, 74.1, 69.8, 17.9 为 1 组鼠李糖碳信号; δ 101.1, 74.6, 77.8, 77.1, 71.3, 67.3 为 1 组葡萄糖碳信号, δ 102.1, 101.1 分别为二者的端基碳。HMBC 谱中, δ 4.69 糖端基质子与 δ 67.3 碳相关, 提示糖的连接顺序为鼠李糖(1→6)葡萄糖, 推测此二聚糖为芸香糖; δ 4.69 糖端基质子与 δ 166.8 碳相关, 提示糖的连接位置为 C-7, 根据端基质子的耦合常数推断苷键构型为 β 型。故鉴定化合物 **1** 为柚皮素-7-芸香糖苷。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。ESI-MS m/z : 611 $[M+H]^+$, 633 $[M+Na]^+$, 609 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) 谱中, δ 12.02 (1H, s), 9.11 (1H, s) 为苯环上羟基活泼质子信号, 其中 δ 12.02 (1H, s) 可能为 C-5 位的羟基; δ 5.49 (1H, m) 可能为二氢黄酮 C-2 位的特征质子信号, 提示该化合物可能为二氢黄酮类; δ 4.98 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 4.51 (1H, brs) 为糖上端基氢信号, δ 1.08 (3H, dd, $J=6.1, 2.0$ Hz) 为鼠李糖-6 位甲基的特征信号, 提示该化合物中含有 2 个糖, 其中 1 个糖为鼠李糖; δ 3.37 (3H, s) 为 $-OCH_3$ 质子信号。 ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) 谱中, 出现 4 对 8 个化学位移相近但又裂开的碳信号 δ 148.0、147.9, 118.0、117.8, 114.2、114.1, 112.1、112.0, 通过 HSQC 谱可以判定为 4 个碳信号; δ 148.0, 146.5 提示存在苯环

表 1 化合物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, CD_3OD)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (600/150 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
2	80.6	5.40 (1H, m)	C-4, 1', 2', 6'
3	44.1	3.17 (1H, m) 2.75 (1H, m)	C-4, 1' —
4	198.6	—	—
5	165.0	—	—
6	97.1	6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	C-7, 8, 10
7	166.8	—	—
8	97.9	6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	C-5, 10, 7, 9
9	164.5	—	—
10	105.0	—	—
1'	130.9	—	—
2', 6'	129.2 $\times$ 2	7.33 (2H, d, $J=8.4$ Hz)	C-2, 4', 2', 6'
3', 5'	116.4 $\times$ 2	6.82 (2H, d, $J=8.4$ Hz)	C-1', 2', 6', 4'
4'	159.1	—	—
7- <i>O</i> -glu-1''	101.1	4.95 (1H, t, $J=7.2$ Hz)	C-7
2''	74.6	3.44 (1H, m)	—
3''	77.1	3.58 (1H, m)	C-2'', 5''
4''	71.3	3.38 (1H, m)	C-2''
5''	77.8	3.45 (1H, m)	—
6''	67.3	3.99 (1H, m) 3.62 (1H, m)	C-1''' C-1''', 4''
6''- <i>O</i> -rha-1'''	102.1	4.69 (1H, brs)	C-6'', 3''', 5'''
2'''	72.1	3.88 (1H, m)	—
3'''	72.4	3.68 (1H, m)	—
4'''	74.1	3.35 (1H, m)	—
5'''	69.8	3.63 (1H, m)	—
6'''	17.9	1.19 (3H, dd, $J=6.2, 3.0$ Hz)	C-4''', 5'''

上连二氧取代片段, 推测为 -OH 和 -OCH₃。通过 HSQC 谱、HMBC 谱和文献报道^[7]比对, 可确定 δ 100.6, 69.9, 70.7, 72.1, 68.3, 17.9 为 1 组鼠李糖碳信号; δ 99.4, 73.0, 70.3, 75.5, 76.3, 66.0 为 1 组葡萄糖碳信号, δ 100.6, 99.4 其中为端基碳。HMBC 谱中, δ 4.51 糖端基质子与 δ 66.0 碳相关, 提示糖的连接顺序为鼠李糖 (1 $\rightarrow$ 6) 葡萄糖, 推测此二聚糖为芸香糖; δ 4.98 糖端基质子与 δ 165.1 碳相关, 提示糖的连接位置为 C-7, 根据端基质子的偶合常数推断苷键构型为 β 型。该化合物的氢谱碳谱数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 2 为橙皮苷。

化合物 3: 黄色无定形粉末 (甲醇), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.57 (1H, s, 5-OH), 7.90 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.13 (2H, d,

$J=8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.63 (1H, s, H-6), 5.28 (1H, brs, H-1''), 5.15 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-12), 5.08 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-1''), 3.85 (3H, s, 4'-OCH₃), 1.68 (3H, s, H-14), 1.60 (3H, s, H-15); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 178.3 (C-4), 161.4 (C-7), 160.5 (C-5), 159.1 (C-4'), 157.3 (C-9), 153.0 (C-2), 134.6 (C-3), 131.1 (C-13), 130.6 (C-2', 6'), 122.3 (C-12), 122.1 (C-1'), 114.1 (C-3', 5'), 108.3 (C-8), 105.6 (C-10), 102.0 (C-1''), 100.5 (C-1'''), 98.1 (C-6), 77.2 (C-3'''), 76.6 (C-5'''), 73.4 (C-2''), 71.1 (C-4''), 70.7 (C-3''), 70.3 (C-2''), 70.1 (C-5''), 79.6 (C-4''), 60.6 (C-6''), 55.5 (4'-OCH₃), 25.5 (C-15), 21.4 (C-11), 17.9 (C-6''), 17.5 (C-14)。将其氢谱和碳谱数据与文献报道^[8]进行对比, 数据与淫羊藿苷基本一致。此外, 将该化合物与淫羊藿苷对照品在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上经 3 种

溶剂系统展开,呈现与淫羊藿苷对照品的R_f值相同的单一斑点。故鉴定化合物**3**为淫羊藿苷。

化合物**4**: 白色无定形粉末(甲醇), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.23 (1H, s, H-2), 8.15 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5), 7.48 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2', 6'), 7.25 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 7.22 (1H, dd, J = 9.0, 2.4 Hz, H-6), 7.00 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3', 5'), 5.11 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 3.83 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.35~3.94 (6H, m, sugar-H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 178.0 (C-4), 163.5 (C-7), 161.2 (C-4'), 159.3 (C-9), 155.2 (C-2), 131.4 (C-2', C-6'), 128.3 (C-5), 126.0 (C-1'), 125.3 (C-3), 120.2 (C-10), 117.1 (C-6), 114.9 (C-3', 5'), 105.0 (C-8), 101.8 (C-1''), 78.4 (C-5''), 77.9 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 55.7 (4'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物**4**为芒柄花苷。

化合物**5**: 白色针状结晶(甲醇), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.45 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.54 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.24 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 7.15 (1H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-6), 7.00 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 5.12 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.01~3.72 (6H, m, sugar-H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.7 (C-4), 161.4 (C-7), 159.0 (C-9), 157.1 (C-4'), 153.7 (C-2), 130.1 (C-2', C-6'), 127.0 (C-5), 124.0 (C-3), 123.4 (C-1'), 118.5 (C-10), 115.6 (C-6), 113.6 (C-3', 5'), 103.4 (C-1''), 100.0 (C-8), 77.2 (C-5''), 76.5 (C-3''), 73.1 (C-2''), 69.6 (C-4''), 60.6 (C-6''), 55.2 (4'-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物**5**为异芒柄花苷。

化合物**6**: 淡黄色无定形粉末(甲醇), 365 nm 下显蓝色荧光, 三氯化铁反应显墨绿色, 提示为黄酮苷类化合物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.53 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), 7.02 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, J = 8.0, 1.6 Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.22 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-5), 4.15 (1H, m, H-3), 3.75 (1H, m, H-4), 3.67 (3H, s, 7-OCH₃), 2.21 (2H, m, H-2e, 6e), 2.01 (2H, m, H-2a, 6a); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 175.4 (C-7), 168.3 (C-9'), 149.5 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.7 (C-3'), 127.5 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.5 (C-5'),

115.1 (C-8'), 115.0 (C-2'), 75.8 (C-1), 72.6 (C-3), 72.0 (C-4), 70.4 (C-5), 53.0 (7-OCH₃), 37.9 (C-6), 37.8 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物**6**为新甘草苷。

化合物**7**: 黄色粉末(甲醇), 10%硫酸乙醇显黄色, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'), 7.79 (1H, d, J = 15.6 Hz, H- β), 7.70 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2, 6), 7.68 (1H, d, J = 15.6 Hz, H- α), 7.14 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3, 5), 6.41 (1H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3'), 4.99 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1''), 3.31~3.92 (6H, m, sugar-H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 193.3 (C=O), 167.6 (C-4'), 166.8 (C-2'), 161.0 (C-4), 144.8 (C- β), 133.4 (C-6'), 131.4 (C-2, C-6), 130.6 (C-1), 120.1 (C- α), 118.0 (C-3, 5), 114.6 (C-1'), 109.3 (C-5), 103.9 (C-3), 101.8 (C-1''), 78.3 (C-3''), 77.9 (C-5''), 74.8 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.4 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物**7**为新异甘草苷。

化合物**8**: 黄色粉末(甲醇), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性, 提示为黄酮苷类化合物。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.73 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 7.44 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.14 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.50 (1H, dd, J = 8.7, 2.2 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 5.53 (1H, dd, J = 12.6, 2.4 Hz, H-2), 4.94 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1''), 3.90 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6''a), 3.70 (1H, dd, J = 12.0, 5.4 Hz, H-6''b), 3.37~3.48 (4H, m, H-2''~5''), 3.04 (1H, dd, J = 16.9, 12.8 Hz, H-3a), 2.67 (1H, dd, J = 16.9, 2.8 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 193.3 (C-4), 166.8 (C-7), 165.4 (C-9), 159.2 (C-4'), 134.4 (C-5), 129.8 (C-1'), 128.8 (C-2', 6'), 117.8 (C-3', 5'), 115.0 (C-10), 111.8 (C-6), 103.8 (C-8), 102.2 (C-1''), 80.7 (C-2), 78.2 (C-5''), 78.0 (C-3''), 74.9 (C-2''), 71.4 (C-4''), 62.5 (C-6''), 45.0 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物**8**为甘草苷。

4 抗氧化活性测试

DPPH 实验方法参照文献方法^[12]进行改进。配制浓度为 0.5 mmol/L 的 DPPH 工作液, 取 100 μ L 加到 96 孔板中。每个样品等比稀释成 7 个浓度(1.6~0.012 5 mmol/L), 随后每个孔分别加入 100 μ L 一系列样品溶液和阳性药(Trolox)溶液, 置于暗处

反应 25 min。反应完全后,在 517 nm 波长下用酶标仪检测吸光度 (A) 值。按照公式计算 DPPH 清除率。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}$$

每个浓度设 3 个复孔, DPPH 的清除能力用 IC_{50} 表示。ABTS 实验和 FRAP 实验操作参照试剂盒的说明书进行。ABTS 实验结果以 Trolox 等效抗氧化能力表示,即 Trolox 的总抗氧化能力为 1,相同浓度情况下,其他物质的抗氧化能力用其抗氧化能力和 Trolox 相比的倍数。FRAP 实验结果用 $FeSO_4$ 标准溶液的浓度来表示,即单位浓度的样品相当于 $FeSO_4$ 标准溶液的抗氧化能力。结果见表 2。

表 2 化合物 1~8 的抗氧化活性

Table 2 Anti-oxidant activities of compounds 1—8

化合物	DPPH/(mmol·L ⁻¹)	ABTS	FRAP/(mmol·L ⁻¹)
1	0.401	1.143	5.487
2	0.865	0.029	0.495
3	38.240	0.231	0.048
4	49.520	0.012	-0.019
5	50.200	0.009	0.062
6	0.833	0.005	0.240
7	0.978	0.012	0.149
8	0.764	1.132	2.729
阳性药	0.504	—	4.316

实验结果表明化合物 1 和 8 表现出较强的抗氧化活性,其他化合物活性较弱。通过比较这些化合物的结构,发现化合物 1 的 B 环上有 3'-OH 和 4'-OCH₃ 这种结构。文献报道^[2]黄酮 B 环上 3'和 4'位的邻二酚羟基能显著提高其抗氧化活性。本实验通过对这些分离得到的黄酮苷类化合物的构效关系研究,验证了这一观点,并且发现黄酮的 B 环上有 3'-OH 和 4'-OCH₃ 这种结构能够显著增强抗氧化活性(图 2)。

本课题组从牛蒡根中分离得到 8 个黄酮苷类化合物,其中化合物 3 为首次从该植物中分离得到,

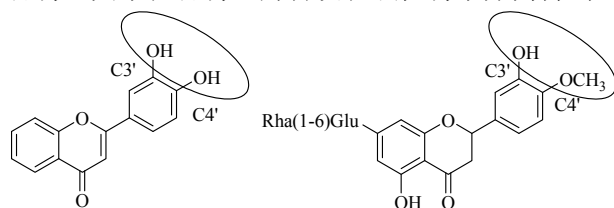


图 2 黄酮中具有强抗氧化活性的结构

Fig. 2 Structures of flavonoids with high anti-oxidant activity

其他化合物均为首次从该属中分离得到。本实验还对这些成分的抗氧化活性进行评价,得出了有意义的结论,为后期的研究提供理论支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Tian X, Sui S, Huang J, *et al.* Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1): 189-198.
- [3] Tian X, Guo L P, Hu X L, *et al.* Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury and potential mechanisms in SH-SY5Y cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4): 335-344.
- [4] 白俊鹏, 胡晓龙, 蒋晓文, 等. 牛蒡根中咖啡酸类化学成分及其神经保护活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(2): 163-168.
- [5] Dragan A, Dusanka D A, Drago B, *et al.* SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(7): 827-845.
- [6] Liu R, Kong L Y, Li A F, *et al.* Preparative isolation and purification of saponin and flavone glycoside compounds from *Clinopodium chinensis* (Benth) O. Kuntze by High-Speed Countercurrent Chromatography [J]. *J Liquid Chromatogr Related Technol*, 2007, 30(4): 521-532.
- [7] Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, *et al.* Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 29(6): 1005-1014.
- [8] 程 岩, 王乃利, 王新雷, 等. 朝鲜淫羊藿的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(10): 644-647.
- [9] Li J, Kadota S, Kawata Y, *et al.* Constituents of the roots of *Cynanchum bungei* Decne. isolation and structures of four new glucosides, Bunngeiside-A, -B, -C, and -D [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(12): 3133-3137.
- [10] An P J, Ja K H, Changbae J, *et al.* A new pterocarpan, (-)-maackiain sulfate, from the roots of *Sophora subprostrata* [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(12): 1009-1013.
- [11] 李 晓, 来国防, 王易芬, 等. 滇黄精的化学成分研究 (II) [J]. *中草药*, 2008, 39(6): 825-828.
- [12] Fan S J, Zhang Y, Sun Q H, *et al.* Extract of okra lowers blood glucose and serum lipids in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 25(7): 702-709.