

## 瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究

周蕙祯<sup>1,2</sup>, 罗伟<sup>2</sup>, 陈爽<sup>3</sup>, 陈胡兰<sup>2</sup>, 李国友<sup>3</sup>, 李丽梅<sup>1\*</sup>

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

3. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

**摘要:** 目的 研究瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* 花中的香豆素类化学成分及其抗菌和抗氧化活性。方法 综合运用多种色谱分离技术进行分离纯化, 并采用现代波谱学分析技术结合文献报道数据进行鉴定。对分离得到的9个香豆素类化合物进行了体内外抗氧化活性和体外抗菌活性研究。首先, 采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、铁离子还原/抗氧化能力法 (FRAP) 法评价单体化合物抗氧化活性。然后用模式生物秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 建立胡桃醌诱导氧化损伤应激模型, 通过 H<sub>2</sub>DCFDA 荧光染色实验, 评价化合物 9 对氧化应激条件下秀丽隐杆线虫生存能力及体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的影响。此外, 采用牛津杯法对单体化合物进行抗大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Saphylococcus epidermidis* 和酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的活性筛选。结果 从瑞香狼毒花甲醇提取物中分离得到11个化合物, 分别鉴定为7-羟基香豆素-8-O-β-D-葡萄糖苷 (1)、瑞香苷 (2)、瑞香素 (3)、7-羟基-8-甲氧基香豆素 (4)、东莨菪亭 (5)、5,7-二甲氧基香豆素 (6)、伞形花内酯 (7)、白瑞香素 (8)、双白瑞香素 (9)、3-O-咖啡酰奎尼酸 (10) 和腺苷 (11)。化合物 1、6、8、10、11 为首次从该植物中分离得到, 化合物 11 为首次从该属植物中分离得到。结论 体外抗氧化活性测试结果显示化合物 3 和 9 活性显著。体内抗氧化活性实验证实化合物 9 (28 μmol/L) 能显著延长线虫在氧化应激条件下的寿命 ( $P < 0.0001$ ), 且可显著降低线虫体内 ROS 水平 ( $P < 0.001$ ), 增强线虫的抗氧化应激能力。化合物 9 显示出一定的大肠杆菌抑制活性, 其最小抑菌浓度 (MIC) 值为 1.0 mg/mL。

**关键词:** 瑞香狼毒花; 香豆素; 抗氧化活性; 抗菌活性; 秀丽隐杆线虫; 5,7-二甲氧基香豆素; 白瑞香素; 双白瑞香素; 3-O-咖啡酰奎尼酸; 腺苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)04-0943-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.006

## Coumarins from flowers of *Stellera chamaejasme* and their biological activities

ZHOU Hui-zhen<sup>1,2</sup>, LUO Wei<sup>2</sup>, CHEN Shuang<sup>3</sup>, CHEN Hu-lan<sup>2</sup>, LI Guo-you<sup>3</sup>, LI Li-mei<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-construction by Province and Ministry, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To study the coumarins from the flowers of *Stellera chamaejasme* and their antioxidant and antimicrobial activities. **Methods** The chemical constituents were isolated by column chromatography packed with macroporous resin DH-101, silica gel, Sephadex LH-20, and ODS C18 silica gel, respectively, and the structures of the purified compounds were elucidated on the basis of spectroscopic analyses. Firstly, the *in vitro* antioxidant activities of compounds 1-9 were evaluated by DPPH, ABTS, and FRAP assays. Then, the *in vivo* antioxidant activity of compound 9 was further investigated on model organism *C. elegans* strain N2.

收稿日期: 2020-09-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2020NTD05); 四川省青年科技创新研究团队专项计划项目 (2016TD0006)

作者简介: 周蕙祯, 硕士研究生, 专业方向为中药有效成分分析。E-mail: 1312161673@qq.com

\*通信作者: 李丽梅, 博士, 教授, 研究方向为中药及民族药的研究与开发。E-mail: limeili@swun.edu.cn

which was evaluated by the survival of *C. elegans* under juglone-induced oxidative stress and the intracellular ROS level of *C. elegans* was determined by H<sub>2</sub>DCFDA. Moreover, the activities of compounds **1-9** against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saphylococcus epidermidis*, and *Saccharomyces cerevisiae* were studied by oxford cup method. **Results** The structures of compounds **1-11** were respectively identified as 7-hydroxycoumarin-8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (**1**), daphnin (**2**), daphnetin (**3**), 7-hydroxy-8-methoxycoumarin (**4**), scopoletin (**5**), 5,7-dimethoxycoumarin (**6**), umbelliferone (**7**), edgeworthin (**8**), daphnoretin (**9**), 3-*O*-caffeoylquinic acid (**10**), and adenosine (**11**). Compounds **1**, **6**, **8**, **10** and **11** are obtained from this plant for the first time. Compound **11** is firstly isolated from *Stellera*. **Conclusion** Compounds **3** and **9** showed significant antioxidant activity *in vitro*. And compound **9** (28  $\mu$ mol/L) significantly increased the lifespan ( $P < 0.0001$ ) and attenuated the ROS accumulation in *C. elegans* under oxidative stress ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, compound **9** showed moderate activity against *E. coli* with the MIC value of 1.0 mg/mL.

**Key words:** flowers of *Stellera chamaejasme* L.; coumarin; antioxidant activity; antimicrobial activity; *Caenorhabditis elegans*; 5,7-dimethoxycoumarin; edgeworthin; daphnoretin; 3-*O*-caffeoylquinic acid; adenosine

瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L. 是瑞香科 (Thymelaeaceae) 狼毒属 *Stellera* Linn. 植物, 又名续毒、山萝卜、生扯拢等, 始载于《神农本草经》, 为中药狼毒之正品, 主要药用部位为根<sup>[1]</sup>。瑞香狼毒性味辛、苦、平, 归肺、脾、肝经, 有毒, 有泻水逐饮、破积杀虫之效<sup>[1]</sup>。国内外学者对瑞香狼毒根茎中的化学成分进行了大量研究, 发现了双黄酮、木脂素、香豆素、二萜类等成分, 香豆素是其中的特征性化学成分, 目前有关瑞香狼毒花的研究并不多见<sup>[2-3]</sup>。近年来, 大量研究主要集中于具有强毒及抗肿瘤活性的二萜原酸酯类和双黄酮类成分, 而对香豆素及双香豆素类特征性成分活性研究较少<sup>[4-5]</sup>。香豆素类化合物广泛分布于多种植物中, 大量实验研究显示其具有抗凝血、抑菌等多种生物活性, 广泛用于多种领域, 以医学领域最常用<sup>[6]</sup>。香豆素相对分子质量较小, 毒性较小, 大部分香豆素类化合物吸收较快、生物利用度高, 且已有双香豆素类成分作为抗凝药物在临床使用, 故香豆素类成分已经成为药物研发的重要方向之一<sup>[6-7]</sup>。

本课题组前期开展了瑞香狼毒花部位中木脂素及黄酮类化学成分和体外抗氧化活性的研究<sup>[3]</sup>, 为了更全面地研究和阐明瑞香狼毒的活性物质基础, 深入挖掘其药用价值, 更好地开发利用该药用植物资源, 本研究以瑞香狼毒花为研究对象, 对其中的香豆素类成分进行了研究, 从其甲醇提取物中分离鉴定了 9 个香豆素类化合物和 2 个其他类化合物, 依次为 7-羟基香豆素-8-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 (7-hydroxycoumarin-8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, **1**)、瑞香苷 (daphnin, **2**)、瑞香素 (daphnetin, **3**)、7-羟基-8-甲氧基香豆素 (7-hydroxy-8-methoxycoumarin, **4**)、东莨菪亭 (scopoletin, **5**)、5,7-二甲氧基香豆素 (5,7-dimethoxycoumarin, **6**)、伞形花内酯

(umbelliferone, **7**)、白瑞香素 (edgeworthin, **8**)、双白瑞香素 (daphnoretin, **9**)、3-*O*-咖啡酰奎尼酸 (3-*O*-caffeoylquinic acid, **10**) 和腺苷 (adenosine, **11**)。其中化合物 **1**、**6**、**8**、**10**、**11** 为首次从该植物中分离得到, 化合物 **11** 为首次从该属植物中分离得到。鉴于既往研究表明瑞香狼毒具有杀虫、抗肿瘤、抗病毒、抗真菌、抗惊厥等多种药理活性, 本研究分别采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)、铁离子还原/抗氧化能力法 (FRAP) 法和牛津杯法筛选香豆素类化合物 **1-9** 体外抗氧化与抗菌活性, 结果表明化合物 **3** 和 **9** 表现出显著的体外抗氧化活性, 进一步以模式生物秀丽隐杆线虫氧化应激模型探讨化合物 **9** 体内抗氧化活性; 抗菌活性实验中, 化合物 **9** 显示出一定的抗大肠杆菌活性, 其最小抑菌浓度 (MIC) 值为 1.0 mg/mL。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Ascend 400 MHz 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); ODS C<sub>18</sub> 填料 (日本 YMC 公司); Sephadex LH-20 (GE Healthcare 公司); 制备色谱柱 (ODS, 20 mm $\times$ 10 mm, 10  $\mu$ m), 苏州纳微科技股份有限公司; LC-P100 高效液相色谱仪 (上海伍丰科学仪器有限公司); RE-2000 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); M5 型酶标仪 (Molecular Device 美国公司); 薄层色谱板、柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); D101 大孔树脂 (成都科龙化工试剂厂); Nikon-Eclipse Ti-E 荧光倒置显微镜; 96 孔培养板 (北京东方大林科技有限公司)。胡桃醌购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 其余实验所用试剂均为国产试剂。

### 1.2 药材、供试虫源与菌种

实验所用药材购自成都市荷花池药材市场, 经

成都中医药大学王光志教授鉴定为瑞香科狼毒属植物瑞香狼毒 *S. chamaejasme* L. 的花, 标本 (LMSC201801) 保存在西南民族大学药学院。秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 野生 N<sub>2</sub> 来自美国明尼苏达大学线虫遗传学中心 (Caenorhabditis Genetics Center)。抗菌活性筛选所用大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Saphylococcus epidermidis*、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 4 种菌种保存于中国科学院成都生物研究所。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

取干燥的瑞香狼毒花 5.0 kg, 粉碎后, 用纯甲醇 50 °C 回流提取 3 次, 每次 3 h, 滤过, 合并提取液, 减压回收后得到总浸膏 500.0 g。将总浸膏以温水分散后, 依次用醋酸乙酯和正丁醇等体积萃取, 分别得到醋酸乙酯部位 148.3 g 和正丁醇部位 113.3 g。正丁醇部位浸膏 (113.3 g) 经大孔树脂 DH-101, 甲醇-水 (0:100→100:0) 梯度洗脱, 经 TLC 检测合并得到 4 个组分 Fr. 1~4。Fr. 1 (3.0 g) 经 ODS C<sub>18</sub> 柱色谱, 甲醇-水 (10:100→100:0) 梯度洗脱, 其中 20% 甲醇洗脱部位经制备 HPLC 分离 (13% 乙腈, 8 mL/min, 254 nm) 得到化合物 **1** (20 mg,  $t_R=18$  min)、**10** (20 mg,  $t_R=15$  min), 40% 甲醇洗脱部位经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇) 分离得到化合物 **2** (0.4 g) 和 **3** (1.0 g)。Fr. 3 (18.6 g) 经正相硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯乙烷-甲醇 (50:1→1:1) 梯度洗脱, 经 TLC 检测合并为 3 个组分 Fr. 3-1~3-3。Fr. 3-1 (10.0 g) 经正相硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯乙烷-甲醇 (25:1→1:1) 洗脱, 洗脱流经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇) 分离后, 重结晶得到化合物 **4** (8 mg) 和 **5** (10 mg)。Fr. 4 (8.0 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯乙烷-甲醇 (50:1→1:1) 洗脱, TLC 检测合并得到 4 个组分 Fr. 4-1~4-4, Fr. 4-1 (0.6 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 [氯仿-甲醇 (1:1)] 和制备 HPLC 分离 (33% 乙腈, 8 mL/min, 254 nm) 分离得到化合物 **8** (15 mg,  $t_R=16$  min)。醋酸乙酯部位浸膏 (148.3 g) 经正相硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯乙烷-甲醇 (100:1→0:1) 梯度洗脱, 经 TLC 检测合并得到 5 个组分, 即 Fr. 5~9。Fr. 5 (1.0 g) 经二次硅胶柱色谱 (200~300 目), 二氯乙烷-甲醇 (60:1→10:1) 梯度洗脱, TLC 检测后合并为 3 个组分

Fr. 5-1~5-3。Fr. 5-1 (0.1 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 [氯仿-甲醇 (1:1)] 分离后, 重结晶得到化合物 **6** (10 mg) 和 **7** (20 mg)。Fr. 5-3 (0.7 g) 经制备 HPLC 分离 (35% 乙腈, 8 mL/min, 254 nm) 得到化合物 **9** (0.5 g,  $t_R=16$  min)。Fr. 6 经 Sephadex LH-20 柱色谱 [氯仿-甲醇 (1:1)] 分离得到化合物 **11** (10 mg)。

### 2.2 体外抗氧化与抗菌活性测试

#### 2.2.1 FRAP 法测定总抗氧化能力

总抗氧化能力检测参照文献采用 FRAP 法<sup>[8]</sup>, 总抗氧化能力用 FRAP 表示。

FRAP 工作液的配制: pH 3.6 的醋酸缓冲液、10.0 mmol/L Fe<sup>3+</sup>-三吡啶三嗪 (TPTZ) 溶液和 20.0 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液按比例 10:1:1 混合, 现配现用。FRAP 工作液配制后 37 °C 水浴 15 min, 并于 3 h 内使用完毕。

标准曲线的绘制: 于 96 孔板中依次加入浓度为 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 5.0 μL, 加入 180.0 μL FRAP 工作液, 混匀后 37 °C 孵育 10 min, 于 593 nm 处测定吸光度 (A), 由 A 值 (Y) 与硫酸亚铁浓度 (X) 得到线性回归方程  $Y=1.1564X+0.1202$ ,  $R^2=0.998$ 。

取化合物按照上述方法测定 A 值, 根据标准曲线计算样品 FRAP 值。

#### 2.2.2 DPPH 法测定自由基清除率

DPPH 自由基清除率测定参照文献方法<sup>[8]</sup>进行。准确称取 DPPH 2.0 mg, 以甲醇溶解, 配制成 0.2 mol/L DPPH 贮备液, 避光冷藏备用。选取维生素 C (Vc) 为阳性对照, 准确称取 1.0 mg Vc 和样品溶解于 DMSO 中, 稀释成系列浓度 (100.00~0.05 μmol/L) 溶液, 备用。DPPH 贮备液使用时用甲醇稀释, 在 517 nm 处测得 A 值为 (0.45±0.05)~(0.80±0.05)。取 100.0 μL DPPH 贮备液加至 96 孔板中, 再向各孔中加入一系列样品溶液和阳性对照溶液, 室温黑暗中放置 30 min, 反应完全后用酶标仪在 517 nm 处测定 A 值 (每个样品设置 3 个复孔, 取平均值)。样品对 DPPH 自由基清除率按照公式计算, DPPH 的清除能力用半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 表示。

$$\text{DPPH 清除率} = [A_0 - (A_i - A_1)] / A_0$$

A<sub>0</sub> 为未加样品的 DPPH A 值, A<sub>i</sub> 为样品与 DPPH 反应后的 A 值, A<sub>1</sub> 为溶剂与 DPPH 的 A 值

#### 2.2.3 ABTS<sup>•+</sup>法测定自由基清除率

ABTS<sup>•+</sup>自由基清除率测定参照文献方法<sup>[8]</sup>测定。ABTS<sup>•+</sup>工作母

液:分别量取 7.0 mmol/L ABTS<sup>+</sup>溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾水溶液 1 mL,两者等体积混合,室温避光反应 12~16 h。ABTS<sup>+</sup>工作液用甲醇稀释 30~60 倍,在 734 nm 处测定 A 值为 (0.45±0.05)~(0.80±0.05)。取 100.0 μL ABTS<sup>+</sup>工作液加至 96 孔板中,再向各孔中加入一系列样品溶液 (100.0~0.05 μmol/L) 和阳性对照 (Vc) 溶液,避光反应 1 h,反应完全后用酶标仪在 734 nm 处测定 A 值 (每个样品设置 3 个复孔,取平均值)。样品对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率按照公式计算,ABTS<sup>+</sup> 的清除能力用 IC<sub>50</sub> 表示。

$$\text{ABTS}^+\text{清除率}=[A_0-(A_i-A_1)]/A_0$$

A<sub>0</sub> 为未加样品的 ABTS<sup>+</sup> 的 A 值, A<sub>i</sub> 为样品与 ABTS<sup>+</sup> 反应后的 A 值, A<sub>1</sub> 为溶剂与 ABTS<sup>+</sup> 的 A 值

**2.2.4 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行数据统计分析,实验数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。

**2.2.5 牛津杯法测试抗菌活性** 实验采用牛津杯法<sup>[9]</sup>对化合物 1~9 进行抗大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌的活性筛选,将样品溶于 DMSO,加入对应的牛津杯中,并以 DMSO 为阴性对照,置于恒温培养箱 (细菌 37 °C,真菌 30 °C) 培养 12~24 h 后,检查抑菌圈的有无。并通过倍比稀释法测定具有一定抗菌活性化合物的 MIC 值。

### 2.3 体内抗氧化活性测试

**2.3.1 线虫同期化及寿命实验** 参考文献方法<sup>[10-12]</sup>,秀丽隐杆线虫 N2 株系于线虫培养基 (NGM) 固体培养基上 20 °C 培养,NGM 固体培养基上涂布大肠杆菌 OP50 作为线虫食物来源。将处于产卵期的秀丽线虫用 M9 缓冲液洗涤收集,采用 Bleach 裂解法对秀丽线虫进行同期化处理,处理后洗涤收集虫卵,加 M9 缓冲液后置于恒温摇床 (20 °C) 同步培养 12 h,待虫卵孵化至 L1 期后转移至新的 NGM 固体培养基。

NGM 的配制:称取 1.2 g NaCl、1.0 g 蛋白胨、7.0 g 琼脂溶于 400 mL 水中,高压灭菌后待温度降至 60~65 °C,加入 400 μL 抽滤除菌的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (1 mol/L)、MgSO<sub>4</sub> (1 mol/L)、CaCl<sub>2</sub> (1 mol/L) 及胆固醇溶液 (0.01 mol/L)。

M9 缓冲液的配制:称取 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 5 g NaCl 溶于 1 L 超纯水中,最后加入

1 mL 1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>。

实验分为对照组和给药组,实验中给予线虫的药物及对照组处理均为直接添加加入 NGM 固体培养基,每组 3 个平行板,每板约 50 条,置于 20 °C 恒温培养箱培养。从其进入产卵期起,每 24 小时将其转至新的已涂布 OP50 的 NGM 固体培养基中,至非产卵期后,隔天转板 1 次,直至各组秀丽线虫全部死亡,以秀丽线虫个体对机械性刺激无反应视为死亡,钻入琼脂内或逃至皿盖而干死不计入内。

参考文献方法<sup>[10-12]</sup>,初筛实验分为低、中、高剂量 (5、17、28 μmol/L) 组和对照组 (M9 缓冲液),低、中剂量组与对照组无明显差异,故仅采用高剂量组 (28 μmol/L) 进一步测试其抗氧化应激能力与线虫体内 ROS 水平。

**2.3.2 胡桃醌诱导秀丽隐杆线虫体内氧化应激模型的建立及其寿命测试** 参考文献方法<sup>[10-11]</sup>,线虫同期化处理同“2.3.1”项,待测药物用 20.0 μL DMSO 溶解后加入 S-basal 液体培养基中 (终浓度 28 μmol/L),实验分为对照组 (20.0 μL DMSO)、模型组 (胡桃醌 250 μmol/L) 和给药组 (化合物 9 28 μmol/L)。秀丽线虫孵育至 L1 期,将线虫转移至含药 S-basal 液体培养基,置于恒温摇床 20 °C 培养 72 h,离心制备线虫悬浊液,并于显微镜下计数,调整线虫悬浊液至每约 30 条/100 μL。取 96 孔板,每孔加入 100 μL 线虫悬浊液及胡桃醌 (终浓度 250 μmol/L) 处理 3 h,每隔 1 在显微镜下计线虫存活数,直至所有实验组的线虫全部死亡,实验重复 3 次。

**2.3.3 胡桃醌诱导的秀丽隐杆线虫氧化应激模型体内 ROS 水平检测** 参考文献方法<sup>[10-11]</sup>,实验分为模型组和给药组 (28 μmol/L 化合物 9),胡桃醌诱导秀丽隐杆线虫体内氧化应激模型同“2.3.2”项,加入 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (H2DCFDA) 荧光探针,使其终浓度 50 μmol/L,20 °C 孵育 2.5 h,将线虫挑至 1% 琼脂制片的载玻片中,于荧光显微镜 (激发波长 480 nm,发射波长 530 nm) 下观察拍照。

**2.3.4 统计学处理** 以 Image-Pro Plus 软件分析染色线虫图像,并测量荧光密度。采用 Graphpad Prism 5.0 软件对线虫进行 Kaplan-Meier 生存分析,两组间比较采用 *t* 检验。

## 3 结果与分析

### 3.1 结构鉴定

化合物 1:白色粉末 (甲醇),ESI-MS *m/z*: 341.28

[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.94 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.31 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.23 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 4.96 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.61~3.16 (6H, m, H-2'~6'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.3 (C-2), 153.9 (C-7), 148.2 (C-9), 145.2 (C-4), 131.6 (C-8), 124.5 (C-5), 113.7 (C-3), 112.6 (C-10), 112.1 (C-6), 104.4 (C-1'), 77.7 (C-3'), 76.8 (C-5'), 74.4 (C-2'), 70.4 (C-4'), 61.6 (C-6')。上述数据与文献报道一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物 **1** 为 7-羟基香豆素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

化合物 **2**: 白色针晶(甲醇), ESI-MS *m/z*: 363.28 [M+Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.96 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.13 (2H, overlapped, H-5, 6), 6.32 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 5.15 (1H, d, *J* = 4.7 Hz, H-1'), 5.10 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-6' $\alpha$ ), 4.86 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-6' $\beta$ ), 4.64 (1H, t, *J* = 5.0 Hz, H-2'), 3.77 (1H, m, H-5'), 3.48 (1H, m, H-4'), 3.23 (1H, m, H-3'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.1 (C-2), 148.2 (C-7), 144.7 (C-4), 142.6 (C-9), 133.9 (C-8), 118.3 (C-5), 114.5 (C-10), 113.4 (C-3), 112.1 (C-6), 101.8 (C-1'), 77.3 (C-3'), 75.7 (C-5'), 73.3 (C-2'), 69.7 (C-4'), 60.7 (C-6')。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **2** 为瑞香苷。

化合物 **3**: 淡黄色针晶(甲醇), ESI-MS *m/z*: 179.10 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.89 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-4), 7.01 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 6.79 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 6.18 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.3 (C-2), 149.7 (C-7), 145.0 (C-4), 143.7 (C-9), 132.1 (C-8), 118.8 (C-5), 112.8 (C-6), 112.0 (C-10), 111.1 (C-3)。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **3** 为瑞香素。

化合物 **4**: 黄色簇晶(甲醇), ESI-MS *m/z*: 191.05 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.63 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.11 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.89 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 4.10 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 160.2 (C-2), 151.9 (C-7), 147.0 (C-9), 144.2 (C-4), 133.4 (C-8), 123.1 (C-5), 113.0 (C-10), 112.2 (C-3), 112.0 (C-6), 61.3 (8-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为 7-羟基-8-甲氧基香豆素。

化合物 **5**: 淡黄色针晶(二氯乙烷-甲醇),

ESI-MS *m/z*: 191.17 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.91 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-4), 7.22 (1H, s, H-5), 6.78 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-3), 3.81 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.8 (C-2), 151.6 (C-7), 149.5 (C-9), 145.3 (C-6), 144.6 (C-4), 111.7 (C-10), 110.6 (C-5), 107.5 (C-3), 102.7 (C-8), 56.0 (6-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为东莨菪亭。

化合物 **6**: 淡黄色针晶(二氯乙烷-甲醇), ESI-MS *m/z*: 207.19 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.09 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-4), 7.66 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.09 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-3), 4.15 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 4.03 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 145.5 (C-8), 140.2 (C-4), 113.8 (C-3), 104.6 (C-6), 62.5 (5-OCH<sub>3</sub>), 61.3 (7-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为 5,7-二甲氧基香豆素。

化合物 **7**: 淡黄色针晶(二氯乙烷-甲醇), ESI-MS *m/z*: 163.4 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.93 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.52 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.78 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6), 6.71 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.2 (C-2), 160.1 (C-7), 155.4 (C-9), 144.5 (C-4), 129.6 (C-5), 113.0 (C-6), 111.2 (C-10), 111.3 (C-3), 103.1 (C-8)。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **7** 为伞形花内酯。

化合物 **8**: 淡黄色粉末(二氯乙烷-甲醇), ESI-MS *m/z*: 339.01 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.02 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.88 (1H, s, H-4'), 7.69 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 7.13 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.08 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6), 6.99 (1H, s, H-5'), 6.82 (1H, s, H-8'), 6.36 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 160.1 (C-2), 159.9 (C-2'), 157.2 (C-7), 155.1 (C-9), 149.8 (C-9'), 146.6 (C-7'), 144.2 (C-6'), 143.5 (C-4), 135.4 (C-3'), 131.5 (C-4'), 129.9 (C-5), 114.4 (C-10), 113.9 (C-3), 113.4 (C-6), 112.3 (C-5'), 110.5 (C-10'), 103.8 (C-8'), 102.7 (C-8)。上述数据与文献报道一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为白瑞香素。

化合物 **9**: 白色羽状晶体(二氯乙烷), ESI-MS *m/z*: 353.02 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.04 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.87 (1H, s, H-4'),

7.71 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-5), 7.21 (1H, s, H-5'), 7.19 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 7.11 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.4$  Hz, H-6), 6.86 (1H, s, H-8'), 6.38 (1H, d,  $J = 9.5$  Hz, H-3), 3.81 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 159.8 (C-2), 159.8 (C-2'), 156.9 (C-7), 154.9 (C-9), 150.3 (C-9'), 147.4 (C-7'), 145.6 (C-6'), 143.9 (C-4), 135.7 (C-3'), 130.7 (C-4'), 129.8 (C-5), 114.3 (C-10), 113.8 (C-3), 113.4 (C-6), 110.1 (C-10'), 109.5 (C-5'), 103.9 (C-8'), 102.7 (C-8), 58.0 (6-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **9** 为双白瑞香素。

化合物 **10**: 淡黄色粉末 (甲醇), ESI-MS  $m/z$ : 353.37 [M-H]<sup>-</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.42 (1H,  $J = 15.9$  Hz, H-7'), 7.05 (1H, s, H-2'), 6.98 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6'), 6.76 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5'), 6.15 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8'), 5.06 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-3), 3.92 (1H, dd,  $J = 8.4, 5.1$  Hz, H-4), 3.60 (1H, m, H-5), 2.09~1.69 (4H, m, H-2, 6); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 175.9 (C-7, COOH), 166.9 (C-9'), 148.8 (C-4'), 145.9 (C-7'), 145.8 (C-3'), 125.9 (C-1'), 121.1 (C-6'), 116.6 (C-5'), 115.4 (C-2'), 74.0 (C-1), 71.9 (C-4), 71.1 (C-3), 68.3 (C-5), 37.9 (C-2), 37.6 (C-6)。上述数据与文献报道一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化

合物 **10** 为 3-*O*-咖啡酰奎尼酸。

化合物 **11**: 白色粉末 (甲醇)。ESI-MS  $m/z$ : 268.04 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.35 (1H, s, H-8), 8.13 (1H, s, H-2), 7.35 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5.87 (1H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-1'), 5.44 (2H, m, 2', 5'-OH), 5.20 (1H, brs, 3'-OH), 4.60 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-2'), 4.14 (1H, brs, H-3'), 3.96 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz, H-4'), 3.65 (1H, m, H-5'a), 3.55 (1H, m, H-5'b); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 156.6 (C-6), 152.8 (C-2), 149.5 (C-4), 140.4 (C-8), 119.8 (C-5), 88.4 (C-1'), 86.4 (C-4'), 73.9 (C-2'), 71.1 (C-3'), 62.1 (C-5')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[19]</sup>, 故鉴定化合物 **11** 为腺苷。

### 3.2 体外抗氧化与抗菌活性结果

**3.2.1** FRAP、DPPH、ABTS 法抗氧化活性测试结果 采用 3 种不同的评价体系对分离得到的香豆素类化合物进行了体外抗氧化活性测试, 实验结果 (表 1) 显示化合物 **3**、**9** 的 DPPH、ABTS 清除能力均优于阳性对照 Vc, 总抗氧化能力大于其他化合物。说明化合物 **3**、**9** 体外抗氧化能力显著。

**3.2.2** 抗菌实验结果 实验结果表明, 化合物 **9** 显示出一定的抗大肠杆菌活性, 其余化合物未显示出明显活性。通过连续倍比稀释法测定化合物 **9** 的

表 1 化合物 1~4、7~9 的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of compounds 1-4, 7-9

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )		FRAP
	DPPH	ABTS <sup>•+</sup>	
<b>1</b>	1 958.00±105.18	215.24±0.05	0.10±0.13
<b>2</b>	959.64±10.72	13.20±0.24	6.34±0.12
<b>3</b>	23.20±0.67	6.81±0.12	5.95±0.19
<b>4</b>	—	129.40±12.80	0.11±0.04
<b>7</b>	334.64±88.37	115.60±0.59	0.97±0.01
<b>8</b>	28.84±0.13	131.70±1.30	0.86±0.15
<b>9</b>	64.91±1.10	17.85±0.59	6.68±0.12
Vc	345.43±1.00	97.26±1.10	—

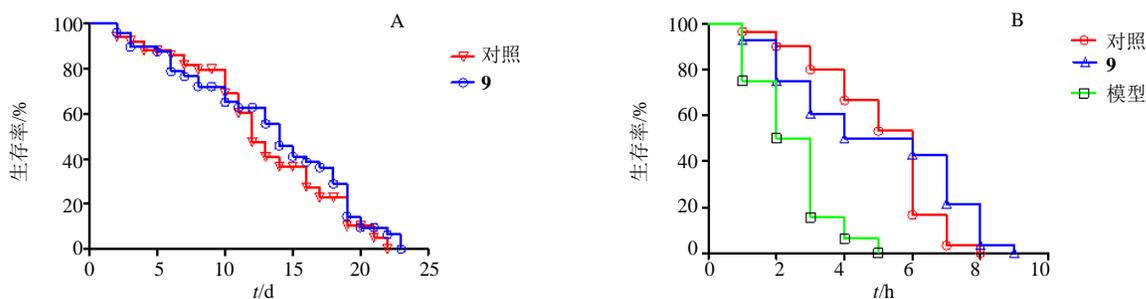
MIC 值为 1.0 mg/mL。

### 3.3 体内抗氧化活性测试结果

**3.3.1** 化合物 **9** 对野生型秀丽隐杆线虫寿命的影响 依据体外抗氧化活性测试结果, 以秀丽线虫为模型, 采用胡桃醌 (终浓度 250  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导线虫急性氧化损伤模型评价其体内抗氧化活性。如图 1 所示, 与对照组相比, 化合物 **9** (28  $\mu\text{mol/L}$ ) 对线虫寿命无明显影响, 而化合物 **9** 预处理的线虫在急性

氧化应激条件下寿命明显提高, 通过 Log-rank (Mantel-Cox) 计算, 化合物 **9** 与模型组存在显著差异 ( $P < 0.000 1$ )。

**3.3.2** 化合物 **9** 对氧化应激状态线虫体内 ROS 水平的影响 实验采用荧光探针 H<sub>2</sub>DCFDA 标记秀丽隐杆线虫体内 ROS, ROS 水平越高, 荧光强度越大, 相对荧光密度越大。结果表明 (图 2), 与对照组 (荧光密度 146.40±10.32) 相比, 化合物 **9** (28  $\mu\text{mol/L}$ )

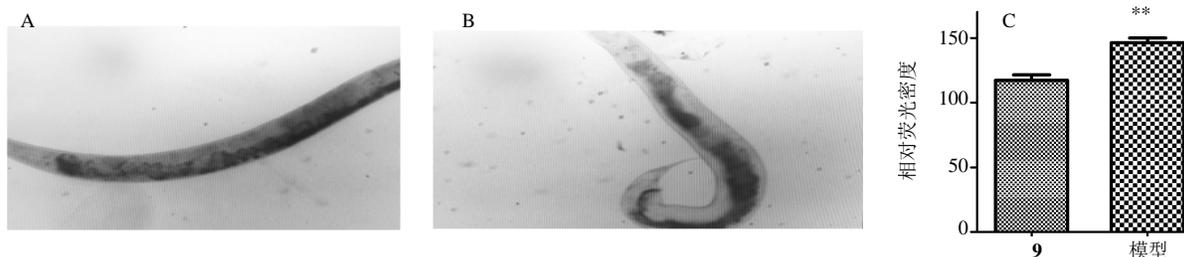


A-化合物 9 对正常状态下线虫寿命的影响 B-化合物 9 对氧化应激条件下线虫寿命的影响

A-The effect of compound 9 on the lifespan of *C. elegans* B-The lifespan of *C. elegans* treated with compound 9 under juglone-induced oxidative stress

图 1 化合物 9 对野生型秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig. 1 Effect of compound 9 on lifespan of *C. elegans* (wild-type)



A-氧化应激条件下秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平 B-化合物 9 作用后氧化应激条件下秀丽隐杆线虫体内 ROS 水平 C-各组相对荧光密度值,与模型组比较:\*\* $P < 0.01$

A-ROS of *C. elegans* under juglone-induced oxidative stress B-ROS of *C. elegans* under juglone-induced oxidative stress treated with compound 9

C-The relative fluorescence intensity of control and compound 9, \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 2 化合物 9 对氧化应激条件下线虫 ROS 水平的影响

Fig. 2 Effect of compound 9 on production of ROS in *C. elegans*

作用后的线虫体内荧光强度 (荧光密度值  $117.23 \pm 11.93$ ) 降低, ROS 水平降低, 且两组数据有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 表明  $28 \mu\text{mol/L}$  的化合物 9 能够抑制线虫体内 ROS 的产生, 对氧化损伤的线虫具有保护作用。

#### 4 讨论

体外抗氧化实验 (DPPH、ABTS、FRAP) 方便快速, 但测试环境与动物体内氧化环境不同, 很难仅通过体外实验来评价化合物的抗氧化能力。因此, 本研究采用体内外抗氧化评价体系综合评价单体化合物的抗氧化活性。

3 种体外抗氧化活性测试结果具有一致性, 化合物 3、9 的自由基清除能力优于或约等于阳性对照 Vc, 表现出较强的体外抗氧化活性。体内活性实验显示化合物 9 能显著延长氧化应激条件下线虫的寿命, 且可显著降低应激状态下线虫体内 ROS 水平, 增强线虫的抗氧化应激能力。体内抗氧化活性结果与体外抗氧化活性测试结果一致, 表明化合物

9 具有较强的抗氧化活性。实验结果表明, 双香豆素具有一定体内外抗氧化活性, 具体的作用机制尚需深入研究。

随着研究的深入, 现已发现的许多疾病均与自由基或者人体氧化应激状态有关, 包括肿瘤、血管动脉粥样硬化、神经保护、阿尔茨海默病、衰老等, 因而抑制自由基的产生、清除自由基的方法越来越受到重视。同时, 已有临床采用自由基清除剂作为辅助治疗的手段, 也有相关文献表明香豆素抗肿瘤、抗炎作用与其抗氧化作用有关<sup>[20-22]</sup>。现代药理研究<sup>[5]</sup>表明瑞香狼毒具有一定的抑菌活性, 许多香豆素类成分与抑菌活性相关<sup>[6-7]</sup>, 本研究初步筛选了瑞香狼毒中香豆素类成分对 4 种菌的抑菌作用, 丰富了该植物化学成分与生物活性研究内容, 为临床合理用药提供了一定参考, 同时对阐明其药用物质基础, 扩大瑞香狼毒药用部位, 进一步开发利用瑞香狼毒植物资源具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2673.
- [2] 吴春雨. 瑞香狼毒花化学成分的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2013: 7-15.
- [3] 周蕙祯, 汤良杰, 龚宇, 等. 瑞香狼毒花化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2395-2401.
- [4] 赵猛, 亢晶. 瑞香狼毒的民族植物学、植物化学及其药理学研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(3): 70-74.
- [5] 沈佳钰. 瑞香狼毒药理活性研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(8): 151-152.
- [6] 雷震, 马卫东, 於凯芹, 等. 香豆素类化合物的体内代谢研究进展 [J]. 中国药业, 2016, 25(23): 5-8.
- [7] 杨丽君, 丁超, 高川, 等. 双香豆素衍生物的生物活性 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 2019, 40(1): 56-64.
- [8] Lee C L, Liao K C, Chen C C, *et al.* Characterization of secondary metabolites from the rhizome of *Cynara scolymus* and their antioxidant properties [J]. *Nat Prod Res*, 2019, doi: 10.1080/14786419.2019.1645664.
- [9] 白欢欢, 吴林蔚, 杨涛, 等. 细丽毛壳霉次级代谢产物的分离鉴定及其抗菌活性 [J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 274-278.
- [10] Wei C C, Yu C W, Yen P L, *et al.* Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- $\beta$  toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(44): 10701-10707.
- [11] Peixoto H, Roxo M, Krstin S, *et al.* Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Funct Foods*, 2016, 26: 385-393.
- [12] Cheng S C, Li W H, Shi Y C, *et al.* Antioxidant activity and delayed aging effects of hot water extract from *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(18): 4159-4165.
- [13] Xue B L, Zhou L B, Liu J W, *et al.* Biotransformation of hydroxycoumarin derivatives by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus* [J]. *Pharmazie*, 2012, 67(5): 467-471.
- [14] 扈晓佳. 四种药用植物的化学成分及活性研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [15] 陈兴湘, 张广杰, 崔慧敏, 等. 倒吊笔根的化学成分研究 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44 (12): 1137-1140.
- [16] Glowinski K, Mroczek T, Zabza A, *et al.* Isolation and structure elucidation of 5, 7-disubstituted simple coumarins in the fruits of *Heracleum mantegazzianum* [J]. *Pharm Biol*, 2000, 38(4): 308-312.
- [17] 董俊丽, 黄传奇, 黄伟, 等. 绿萝花化学成分及其抗氧化活性 [J]. 中成药, 2019, 41(7): 1578-1582.
- [18] 李菁, 于德泉. 灯盏花化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1458-1462.
- [19] 黄玉玲, 马丽英, 荣先国, 等. 佩特曲霉菌次级代谢产物的研究 [J]. 中成药, 2017, 39 (7): 1415-1419.
- [20] Markesbery W R, Carney J M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease [J]. *Brain Pathol*, 1999, 9(1): 133-146.
- [21] 张娜, 陈文娟, 柳青青, 等. 香豆素类化合物清除自由基及抗肿瘤活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(1): 1-5.
- [22] 骆海坤, 袁耀辉, 王丽华. 自由基清除剂依达拉奉的作用机制及临床应用 [J]. 北方药学, 2018, 15(6): 138-139.

[责任编辑 王文倩]