

蒺藜果实化学成分及其抗氧化活性研究

刘晓敏¹, 赵佳敏¹, 兰嘉豪¹, 魏 婕¹, 程子芥¹, 梅 瀚¹, 曹金凤¹, 刘世巍¹, 赵江源², 李铭刚², 丁建海^{1*}

1. 宁夏师范学院化学化工学院, 宁夏 固原 756000

2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091

摘要: 目的 研究蒺藜 *Tribulus terrester* 果实的化学成分及其抗氧化活性。方法 综合利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等分离手段进行分离纯化; 结合 NMR、MS、IR、UV 等波谱学技术来鉴定化合物的结构; 通过 DPPH 法、ABTS 法以及羟基自由基清除方法测定化合物的抗氧化活性。结果 从蒺藜果实 75% 甲醇提取物中分离鉴定了 10 个化合物, 分别为 (*E*)-4-hydroxy-*N*-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)benzamide (1)、蒺藜酰胺 (2)、海柯皂苷元 (3)、25*R*-螺甾-4-烯-3,12-二酮 (4)、槲皮素 (5)、3,4'-二羟基-3'-甲氧基苯丙酮 (6)、对羟基苯甲酸 (7)、(9*Z*,11*E*)-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (8)、(8*E*,12*Z*)-10-hydroxy-8,12-octadecadienoic acid (9)、肉豆蔻酸 (10), 其中化合物 1~6 对 DPPH、ABTS 自由基以及羟基自由基均有较显著的活性, 并且化合物 5 清除 ABTS 自由基和羟基自由基半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 0.011、0.320 mmol/L, 与 Vc 阳性对照组的 IC₅₀ 值非常接近。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为蒺藜酰亚胺 D, 化合物 6~10 均为首次从蒺藜属植物中分离得到。化合物 1~6 清除自由基能力较强, 具有较好的抗氧化活性。

关键词: 蒺藜; 蒺藜酰胺; 蒺藜酰亚胺 D; 海柯皂苷元; 槲皮素; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-4774-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.002

Chemical constituents from fruits of *Tribulus terrester* and their antioxidant activity

LIU Xiao-min¹, ZHAO Jia-min¹, LAN Jia-hao¹, WEI Jie¹, CHENG Zi-jie¹, MEI Han¹, CAO Jin-feng¹, LIU Shi-wei¹, ZHAO Jiang-yuan², LI Ming-gang², DING Jian-hai¹

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia Normal University, Guyuan 756000, China

2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents from fruits of *Tribulus terrester* and their antioxidant activity. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gels column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. Their structures were identified based on NMR, MS, IR, UV and other spectroscopic techniques. Their antioxidant activity were evaluated by scavenging capacity on DPPH, ABTS and ·OH radicals. **Results** Ten compounds were isolated from 75% methanol extract of the fruits of *T. terrester* and identified as (*E*)-4-hydroxy-*N*-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)benzamide (1), tribulusamide (2), hecogenin (3), 25*R*-spirostan-4-ene-3,12-dione (4), quercetin (5), 3,4'-dihydroxy-3'-methoxyphenylacetone (6), *p*-hydroxybenzoic acid (7), (9*Z*,11*E*)-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (8), (8*E*,12*Z*)-10-hydroxy-8,12-octadecadienoic acid (9), and myristic acid (10). Compounds 1—6 had the stronger DPPH, ABTS and OH radicals scavenging abilities and compound 5 showed significant abilities with IC₅₀ values of 0.011 and 0.320 mmol/L. The IC₅₀ values were almost consistent with that of the Vc positive control group. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, named tribulusimide D. Compounds 6—10 are isolated from fruits of *Tribulus* for the first time and also from the fruit of *Tribulus terrestris* for the first time.

收稿日期: 2023-04-02

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC02049); 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03297); 宁夏高等学校科学研究项目 (NGY2022073); 宁夏师范学院 2022 年度大学生科技创新基金项目 (自然科学类 Z202202)

作者简介: 刘晓敏 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: 849064934@qq.com

*通信作者: 丁建海, 教授。E-mail: dingjh_nx@126.com Tel: 18809544664

The antioxidant activity experiment showed that compounds 1—6 exhibited significant scavenging capacity.

Key words: *Tribulus terrestris* L.; tribulus amide; tribulusimide D; hecogenin; quercetin; antioxidant activity

蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 为蒺藜科 (Zygophyllaceae) 蒺藜属 *Tribulus* L. 草本植物^[1]。《中国药典》记载, 蒺藜是一味临床上广泛应用的中药, 以其干燥成熟果实入药, 有平肝解郁、活血祛风、明目、止痒的功效^[2]。在国外, 蒺藜提取物早已被开发成为增强性功能的“Tribustan”和“Vitanone”及软化血管的“Tribusaponin”等制剂。国内现代中药提取分离和药理学研究也表明, 从蒺藜中分离到的甾体皂苷具有很好的改善心脑血管的作用, 并且以蒺藜总皂苷为主要成分的制剂心脑血管舒通已在临床取得了较好的疗效^[3]。

为进一步揭示其药理活性的化学物质基础, 本课题组对蒺藜果实的甲醇提取物进行了化学成分研究, 从中分离并鉴定出 10 个化合物, 分别为 (*E*)-4-hydroxy-*N*-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl) benzamide (**1**)、蒺藜酰胺 (terrestriamide, **2**)、海柯皂苷元 (hecogenin, **3**)、25*R*-螺甾-4-烯-3,12-二酮 (25*R*-spirostan-4-ene-3,12-dione, **4**)、槲皮素 (quercetin, **5**)、3,4'-二羟基-3'-甲氧基苯丙酮 (3,4'-dihydroxy-3'-methoxyphenylacetone, **6**)、对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic, **7**)、(9*Z*,11*E*)-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (**8**)、(8*E*,12*Z*)-10-hydroxy-8,12-octadecadienoic acid (**9**)、肉豆蔻酸 (myristic acid **10**)。化合物 **1** 为新的酰胺类化合物, 命名为蒺藜酰亚胺 D, 化合物 **6**~**10** 均为首次从蒺藜果实中分离得到。其中化合物 **1**~**6** 有较好的抗氧化活性效果。

1 仪器与材料

Bruker DRX-500 MHz 超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪 (上海光豪分析仪器有限公司); RE-2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); API QSTAR Pulsari 质谱仪 (加拿大 Applied Biosystem 公司); PT-3502B 型酶标分析仪 (北京普天新桥技术有限公司); Agilent Cary 3500 紫外可见分光光度计 (美国安捷伦公司); Thermo Scientific Nicolet iS5 FTIR 傅里叶红外光谱仪 (KBr 压片, 美国赛默飞公司)。Sephadex LH-20 凝胶 (瑞典 Amersham Biosciences 公司); 柱色谱硅胶 (80~100、200~300 目) 和薄层色谱 GF₂₅₄ TLC 预制板 (青岛海洋化工厂); 甲醇、石油醚、二氯甲

烷、*L*-抗坏血酸 (Vc)、2,2-联苯基-1-苦基肼基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]、过氧化氢、硫酸亚铁 (分析纯) 均由上海麦克林生化科技有限公司; 醋酸乙酯、乙醇、浓硫酸、氯化钠、香草醛 (分析纯) 均由国药集团化学试剂有限公司。

实验用干燥蒺藜药材于 2022 年 5 月购自安徽亳州皖草堂药店, 药材经宁夏师范学院丁建海教授鉴定为蒺藜科植物蒺藜 *T. terrestris* L. 果实, 样品标本 (20220506) 现保存于宁夏师范学院天然产物研究与开发实验室。

2 提取与分离

蒺藜果实 10 kg 粉碎, 用等倍量 75% 甲醇浸渍提取 3 次, 减压浓缩, 回收溶剂, 得到甲醇提取物浸膏, 将提取物浸膏用水分散均匀, 依次用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 浓缩得各溶剂萃取部位。取醋酸乙酯萃取部分 115 g, 用 80~100 目的硅胶拌样, 200~300 目正相硅胶装柱, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (1:0~0:1), 薄层色谱检识合并相同组分, 得到 7 个精细组分 (Fra. 1~7)。Fra. 3 通过正相硅胶柱色谱, 二氯甲烷为洗脱剂得到 3 个亚组分 (Fra. 3-1~3-3), Fra. 3-1 经过重结晶得到化合物 **2** (12.1 mg), Fra. 3-2 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 纯化得到化合物 **9** (10.5 mg)、**10** (10.1 mg)。Fra. 4 经正相硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (100:1) 洗脱得到 4 个亚组分 (Fra. 4-1~4-4), Fra. 4-3 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 纯化, 得到化合物 **8** (5.6 mg)、**11** (3.2 mg), Fra. 4-4 经过重结晶得到 **3** (12.1 mg)。Fra. 5 经正相硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (80:1~40:1) 洗脱得到 3 个亚组分 (Fra. 5-1~5-3), Fra. 5-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 分离纯化, 得到化合物 **1** (10.8 mg), Fra. 5-3 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇 1:1) 分离纯化, 得到化合物 **4** (12.7 mg)。Fra. 6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 纯化, 得到化合物 **5** (6.3 mg)、**6** (8.8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末, 分子式 C₁₇H₁₅NO₅。

HR-ESI-MS 给出分子离子峰 336.123 7 $[M+Na]^+$, 确定分子式为 $C_{17}H_{15}NO_5$, 计算不饱和度为 11。IR 谱图显示出明显的吸收峰 (3379、1655 和 1580 cm^{-1}), 暗示该化合物结构中应该含有酚羟基和酰胺基团, UV 谱图显示出 2 个明显得吸收峰 (240、320) nm, 暗示该化合物结构中应该含有双键和胺基。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) 数据 δ_H 7.89 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.84 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 表明结构中存在 2 个对位取代的苯环; δ_H 7.50 (1H, d, $J = 15.8$ Hz), 6.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz) 表明结构中存在 1 个反式双键。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) 数据中显示有 15 个碳信号, 结合 DEPT 谱和 HSQC 谱, 归属为 1 个甲氧基, 9 个次甲基, 5 个季碳。其中 2 个与氮或氧相连的羰基碳信号 δ_C 170.2 (C-9), 168.7 (C-1') 占有 2 个不饱和度, 2 个双键碳信号 δ_C 141.8 (C-7), 116.7 (C-8) 占 1 个不饱和度, 剩下的 8 个不饱和度为 2 个苯环, 故推测该化合物具有茛菪酰胺骨架。 1H - 1H COSY 谱中, δ_H 7.07 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-2) 与 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, H-3); δ_H 7.50 (d, $J = 15.8$ Hz, H-7) 与 6.47 (d, $J = 15.8$ Hz, H-8); δ_H 7.89 (d, $J = 8.7$ Hz, H-3') 与 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, H-4') 有相关, 可连接成 3 个小片段。在 HMBC 谱中, δ_H 6.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8) 与 δ_C 126.7 (C-1), 170.2 (C-9) 相关, δ_H 7.50 (d, $J = 15.8$ Hz, H-7) 与 δ_C 122.0 (C-2), 116.7 (C-8), 170.2 (C-9) 相关, 表明双键既与苯环相连又和羰基相连。 δ_H 7.89 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3') 与 δ_C 168.7 (C-1') 相关, 表明羰基和另一个苯环相连。在 ROESY 谱中, δ_H 3.89 (s, OCH_3) 甲氧基质子与 δ_H 7.14 (d, $J = 1.9$ Hz, H-6) 存在相关, 表明甲氧基位于 C-6 相邻位, 即甲氧基位于 C-5 位且与羟基相邻(图 1-1a)。结合 ESI-MS (+) m/s : 336.123 7 $[M+Na]^+$, 可

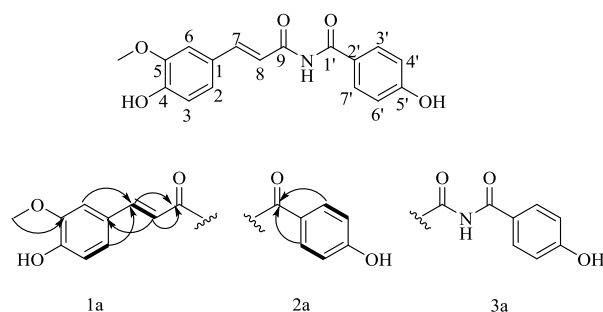


图 1 化合物 1 的结构片段

Fig. 1 Structure fragment of compound 1

以推出片段 1a 和 2a 由 NH 连接 (图 1-3a)。

综合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HSQC、HMBC、 1H - 1H COSY、ROESY 等信息, 推得化合物 1 的结构为 (*E*)-4-hydroxy-*N*-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl) benzamide, 如图 2 所示, 具体 NMR 信息见表 1。经 SciFinder Scholar 网络检索, 该化合物为未见文献报道的新化合物, 命名为茛菪酰亚胺 D。

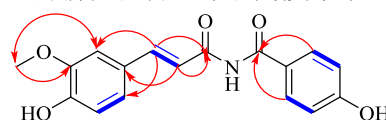


图 2 化合物 1 的结构及重要 HMBC、 1H - 1H COSY 相关
Fig. 2 Structure and key HMBC, 1H - 1H COSY correlations of compound 1

化合物 2: 针状结晶 (二氯甲烷-甲醇), 分子式为 $C_{18}H_{17}NO_5$ 。HR-ESI-MS m/z 350.141 9。 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.90 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4', 8'), 7.35 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-7), 7.17 (1H, t, $J = 2.9$ Hz, H-2), 7.02 (2H, dd, $J = 5.2, 3.2$ Hz, H-5', 7'), 6.70 (1H, m, H-8), 4.66 (2H, d, $J = 5.5$ Hz, H-1'), 3.82 (3H, s, H- OCH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 193.4 (C-2'), 165.8 (C-9), 162.4 (C-6'),

表 1 化合物 1 的核磁数据 (400/100 MHz, CD_3OD)Table 1 NMR data of compound 1 (400/100 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_C	δ_H	碳位	δ_C	δ_H
1	126.7		1'	168.7	
2	122.0	7.07 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz)	2'	121.3	
3	114.6	6.82 (d, $J = 8.2$ Hz)	3'	131.6	7.89 (d, $J = 8.7$ Hz)
4	147.9		4'	115.1	6.82 (d, $J = 8.7$ Hz)
5	148.6		5'	162.0	
6	110.2	7.14 (d, $J = 1.9$ Hz)	6'	115.1	6.82 (d, $J = 8.7$ Hz)
7	141.8	7.50 (d, $J = 15.8$ Hz)	7'	131.6	7.89 (d, $J = 8.7$ Hz)
8	116.7	6.47 (d, $J = 15.8$ Hz)	OCH_3	55.0	3.89 (s)
9	170.2				

148.4 (C-4), 147.9 (C-3), 139.5 (C-7), 130.4 (C-4', 8'), 126.6 (C-1), 126.4 (C-3'), 121.7 (C-6), 118.7 (C-8), 115.7 (C-5), 115.4 (C-5'), 115.1 (C-7'), 110.9 (C-2), 55.6 (OCH₃), 45.6 (C-1')。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为蒺藜酰胺。

化合物 **3**: 片状结晶 (二氯甲烷-甲醇), 分子式为 C₂₇H₄₂O₄。HR-ESI-MS *m/z* 431.318 4。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.65~3.54 (1H, m, H-3), 3.48 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.1 Hz, H-26a), 3.34 (1H, t, *J* = 10.9 Hz, H-26b), 1.05 (6H, d, *J* = 9.5 Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-19), 0.78 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-27); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 213.7 (C-12), 109.3 (C-22), 79.3 (C-16), 71.0 (C-3), 67.0 (C-26), 55.9 (C-14), 55.6 (C-9), 55.2 (C-13), 53.6 (C-17), 44.7 (C-5), 42.2 (C-20), 38.0 (C-4), 37.9 (C-11), 36.6 (C-1), 36.2 (C-10), 34.4 (C-8), 31.6 (C-15), 31.5 (C-7), 31.3 (C-23), 31.2 (C-2), 30.3 (C-25), 28.8 (C-24), 28.4 (C-6), 17.2 (C-27), 16.1 (C-18), 13.4 (C-21), 12.0 (C-19)。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为海柯皂苷元。

化合物 **4**: 针状结晶 (甲醇), 分子式为 C₂₇H₃₈O₄。HR-ESI-MS *m/z* 427.288 3。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.78 (1H, s, H-4), 3.55 (1H, m, H-26a), 3.35 (1H, t, *J* = 10.9 Hz, H-26b), 1.28 (3H, s, H-18), 1.12 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-21), 0.80 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-27); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 212.1 (C-12), 198.9 (C-3), 168.6 (C-5), 124.7 (C-4), 109.3 (C-22), 79.0 (C-16), 66.9 (C-26), 54.8 (C-14), 54.8 (C-9), 54.5 (C-13), 53.5 (C-17), 42.2 (C-20), 38.8 (C-10), 37.1 (C-11), 35.3 (C-1), 34.4 (C-8), 33.7 (C-6), 32.4 (C-2), 31.4 (C-15), 31.2 (C-23), 31.1 (C-7), 30.2 (C-25), 28.8 (C-24), 17.1 (C-27), 16.9 (C-19), 16.0 (C-18), 13.3 (C-21)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **4** 为 25*R*-螺甾 4-烯-3,12-二酮。

化合物 **5**: 黄色粉末, 分子式为 C₁₅H₁₀O₇。HR-ESI-MS *m/z* 301.136 7。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.75 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.65 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 161.1 (C-5), 97.8 (C-6), 164.2 (C-7), 93.0 (C-8), 156.8 (C-9), 103.1 (C-10), 122.7 (C-1'), 114.6 (C-2'), 144.8

(C-3'), 147.4 (C-4'), 114.8 (C-5'), 120.3 (C-6'), 146.6 (C-2), 135.8 (C-3), 175.9 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **5** 为槲皮素。

化合物 **6**: 淡黄色油状物, 分子式为 C₁₀H₁₂O₄。HR-ESI-MS *m/z* 195.066 9。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.55 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, H-6), 7.53 (1H, s, H-2), 6.95 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 4.01 (2H, d, *J* = 4.2 Hz, H-9), 3.95 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, -OCH₃), 3.18 (2H, t, *J* = 5.3 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.3 (C-1), 150.9 (C-4'), 146.8 (C-3'), 129.8 (C-1'), 123.8 (C-6'), 114.1 (C-5'), 109.7 (C-2'), 58.4 (C-3), 56.2 (OCH₃), 39.9 (C-2)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为 3,4'-二羟基-3'-甲氧基苯丙酮。

化合物 **7**: 黄色粉末, 分子式为 C₇H₆O₃。HR-ESI-MS *m/z* 137.024 7。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8.03 (2H, 2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-2, 6), 6.90 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 168.6 (C-1'), 163.7 (C-1), 132.8 (C-2, 6), 115.2 (C-3, 5)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **7** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **8**: 黄色油状, 分子式为 C₁₈H₃₂O₃。HR-ESI-MS *m/z* 350.141 9。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.50 (1H, m, H-12), 5.99 (1H, m, H-10), 5.65 (1H, m, H-11), 5.46 (1H, m, H-9), 4.16 (1H, dd, *J* = 13.9, 6.9 Hz, H-13), 0.90 (3H, t, *J* = 6.2 Hz, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 179.3 (C-1), 135.7 (C-12), 133.2 (C-9), 127.7 (C-11), 126.0 (C-10), 73.0 (C-13), 37.3 (C-14), 34.0 (C-2), 31.8 (C-16), 29.3 (C-7), 29.3 (C-6), 29.2 (C-5), 29.0 (C-4), 27.8 (C-8), 25.3 (C-15), 24.7 (C-3), 22.6 (C-17), 14.1 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **8** 为 (9*Z*,11*E*)-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid。

化合物 **9**: 黄色油状物, 分子式为 C₁₈H₃₂O₃。HR-ESI-MS *m/z* 313.273 4。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.03 (1H, m, H-12), 6.00 (1H, m, H-9), 5.68 (1H, m, H-10), 5.46 (1H, m, H-8), 4.19 (1H, dd, *J* = 13.9, 6.9 Hz, H-13), 0.90 (3H, t, *J* = 6.2 Hz, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 179.3 (C-1), 133.1 (C-8), 132.4 (C-9), 132.1 (C-13), 124.7 (C-12), 72.6 (C-10), 35.4 (C-11), 33.9 (C-7), 31.9 (C-2), 31.3 (C-16), 29.4 (C-15), 29.3 (C-4), 29.0 (C-6), 29.0 (C-5), 27.4 (C-14), 24.6 (C-3), 22.2 (C-17), 13.9 (C-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合

物 9 为 (8*E*,12*Z*)-10-hydroxy-8,12-octadecadienoic acid。

化合物 10: 白色固体, 分子式为 $C_{14}H_{28}O_2$ 。HR-ESI-MS m/z 229.063 4。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.36 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.64 (2H, m, H-3), 1.29 (20H, brs, H-4~13), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-14); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.3 (C-1), 34.1 (C-2), 32.0 (C-12), 29.7~29.1 (C-4~11), 24.7 (C-3), 22.7 (C-13), 14.2 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 10 为肉豆蔻酸。

4 抗氧化活性测定与评价

4.1 DPPH 法抗氧化活性的测定

将不同质量浓度的样品溶液 (0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL) 100 μ L 与 0.5 mmol/L 的 DPPH 母液 100 μ L 加入 96 孔酶标板中, 避光保存 30 min 后测定在 517 nm 下的吸光度值 (A_1), 并用无水乙醇代替 DPPH 设置待测样品空白对照组, 吸光度值为 A_2 , 以及 DPPH 空白对照组, 吸光度值为 A_0 。Vc 作为阳性对照, 重复 3 次, 根据公式计算 DPPH 自由基清除率^[14]。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

4.2 ABTS 法抗氧化活性的测定

将 7 mmol/L 的 ABTS 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾等体积混合, 室温条件黑暗处反应 12~16 h。第 2 天用无水乙醇稀释 40~60 倍 (在 734 nm 处 A 为 0.70 左右), 摇匀, 静置 5 min, 制成 ABTS 自由基工作液。将不同质量浓度的样品溶液 (0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mg/mL) 100 μ L 与制得的 ABTS 溶液 100 μ L 加入 96 孔酶标板中, 避光保存 30 min 后测定在 734 nm 下的吸光度值 (A_1'), 并用无水乙醇代替 ABTS 设置待测样品空白对照组吸光度值为 A_2' , 以及 ABTS 空白对照组, 吸光度值为 A_0' 。Vc 作为阳性对照, 重复 3 次, 根据公式计算 ABTS 自由基清除率^[14]。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_1' - A_2') / A_0'$$

4.3 羟基自由基清除法抗氧化活性的测定

将不同质量浓度的样品 (0.33、0.20、0.14、0.11、0.01 mg/mL)、2.50 mmol/L 的水杨酸、5.00 mmol/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1%过氧化氢 (1:1:1:1) 混合于 96 孔酶标板中, 37 $^{\circ}C$ 恒温水浴 30 min 后, 在 510 nm 下测定吸光度值 (A_1''), 并用蒸馏水代替过氧化氢设置待测样品空白对照组, 吸光度值为 A_2'' , 以及蒸馏水、水杨酸、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、过氧化氢 (1:1:1:1 混合) 为空白对照, 吸光度值为 A_0'' 。Vc

作为阳性对照, 重复 3 次, 根据公式计算羟基自由基清除率^[15]。

$$\text{羟基自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

4.4 抗氧化活性评价

抗氧化活性的测试结果显示, 化合物 7~10 无抗氧化活性 ($IC_{50} > 50$ mmol/L), 化合物 1~6 的抗氧化活性检测结果如表 1 所示, 其中酰胺类对 DPPH、ABTS、OH 自由基 3 种抗氧化测试均具有较好的活性; 甾体皂苷类对 DPPH、ABTS 2 种抗氧化活性测试效果不明显, 但是对 OH 自由基却具有较好的效果; 黄酮类和苯丙素类对 3 种抗氧化测试均具有较好的活性。在一定范围内, 这 6 个化合物对 3 种抗氧化活性的清除能力, 随着物质的量浓度的增加而增加, 呈明显量效关系。

表 1 化合物 1~6 的体外清除自由基能力结果 ($n = 3$)
Table 1 Antioxidant activity of compounds 1~6 ($n = 3$)

化合物	$IC_{50}/(mmol \cdot L^{-1})$		
	DPPH	ABTS	羟基自由基
Vc	0.180 \pm 0.010	0.025 \pm 0.030	0.340 \pm 0.020
1	1.247 \pm 0.210	1.203 \pm 0.098	3.535 \pm 0.125
2	1.525 \pm 0.040	1.392 \pm 0.010	3.580 \pm 0.162
3	>50	>50	7.519 \pm 0.480
4	49.560 \pm 0.290	>50	8.362 \pm 0.110
5	1.202 \pm 0.130	0.011	0.320
6	1.940 \pm 0.070	0.153	2.372 \pm 0.193

5 讨论

近年来, 我国关于蒺藜化学成分的研究报道较多, 已经从蒺藜全草、果实、地上部分等得到了多种单体化合物, 蒺藜根、茎、叶、花、果实均可入药, 《中国药典》收载了蒺藜果实作为药材, 其具有抗衰老、抗菌、镇痛、调节血脂、降血糖、抑癌、利尿、性强壮、抑制酪氨酸酶等药理作用, 通过文献检索发现, 对分离得到的化合物抗氧化活性研究却很少有报道。因此, 寻找单体化合物的抗氧化方面的活性成分, 和研究活性成分的作用机制将对蒺藜药材的进一步应用与开发具有着非常重要的意义。

本研究从蒺藜果实中分离并鉴定出 2 个酰胺类、2 个甾体皂苷类、1 个黄酮类、1 个苯丙素类。还有脂肪酸等 10 个化合物。化合物 1 为新的酰胺类化合物, 命名为蒺藜酰亚胺 D, 化合物 6~10 均为首次从蒺藜果实中分离得到。进一步, 本实验对化合物进行了抗氧化活性评估, 结果显示化合物 1~6 具有较好的抗氧化活性效果, 其中槲皮素对

ABTS 和 OH 自由基抗氧化活性的效果最好, IC₅₀ 分别为 0.011、0.32 mmol/L, 与 V_C 阳性对照组的 IC₅₀ 值几乎一致; 而甾体皂苷类化合物对 DPPH、ABTS 两种抗氧化活性测试效果一般 IC₅₀ > 50 mmol/L, 但是对 OH 自由基具有较好的效果 IC₅₀ 为 (7.519 ± 0.480)、(8.362 ± 0.110) mmol/L。本研究的结果丰富了蒺藜的化学成分以及抗氧化活性研究, 为蒺藜抗氧化的药效物质基础及开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 367.
- [2] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 83.
- [3] 李宝龙, 王康, 曾炜, 等. 蒺藜药理作用研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2011, 32(4): 223-225.
- [4] 吕阿丽, 张囡, 马宏宇, 等. 蒺藜果实的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(3): 170-172.
- [5] Eggert H, Djerassi C. ¹³C NMR spectra of sapogenins [J]. *Tetrahedron Lett*, 1975, 16(42): 3635-3638.
- [6] Wu T S, Shi L S, Kuo S C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50(8): 1411-1415.
- [7] 娜黑芽, 张晓玲, 陈怡璇, 等. 药用沙棘果汁中 1 个新的黄酮苷类化合物 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 659-666.
- [8] Okuyama E, Suzumura K, Yamazaki M. Pharmacologically active components of *Todopon Puok* (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(12): 2200-2204.
- [9] 王鹏程, 周先丽, 罗琴, 等. 青钱柳叶乙酸乙酯部位化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(6): 418-420.
- [10] 莫青胡, 周先丽, 周云, 等. 桃金娘叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2020, 43(3): 587-590.
- [11] Dong M, Oda Y, Hirota M. (10E,12Z,15Z)-9-hydroxy-10, 12,15-octadecatrienoic acid methyl ester as an anti-inflammatory compound from *Ehretia dicksonii* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(4): 882-886.
- [12] 韩清华, 谢兴林, 田晓清, 等. 两株南海真菌 *Aspergillus aculeatus* 1-P1 和 *Paraconiothyrium cyclothyrioides* 1-I2 的次级代谢产物研究 [J]. 海洋渔业, 2020, 42(4): 454-465.
- [13] 邓赞, 陆崇玉, 郭大乐, 等. 细罗伞化学成分研究 [J]. 中药材, 2011, 34(3): 380-383.
- [14] 和英, 顾婷, 杨永寿, 等. 美洲大蠊提取物抗氧化活性研究 [J]. 大理大学学报, 2021, 6(2): 10-14.
- [15] 那吉, 马娇, 张海芬, 等. 三种云南产鲜花醇提液对 ABTS 自由基的清除作用 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(1): 47-50.

[责任编辑 王文倩]