

八角莲中两对新的双黄酮对应异构体

王慧杰^{1,2,3}, 韩瑞杰^{1,3}, 孙彦君^{1,3*},

弓建红^{1,3}, 白红云^{1,3}, 王浩杰^{1,3}, 冯卫生^{1,3*}

¹河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046; ²周口职业技术学院, 周口 466000;

³河南中医药大学药学院, 郑州 450046

摘要: 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱和制备型高效液相色谱法, 从八角莲乙醇提取物中分离得到 5 个双黄酮类化合物。通过波谱数据分析 (MS、UV、IR、NMR) 与计算电子圆二色谱 (ECD) 技术, 分别鉴定为(+)-八角莲双黄酮 H (1a)、(-)-八角莲双黄酮 H (1b)、(+)-八角莲双黄酮 I (2a)、(-)-八角莲双黄酮 I (2b)、podoverine F (3), 其中, 1a 与 1b、2a 与 2b 为 2 对新的双黄酮对应异构体。DPPH 自由基清除实验结果显示, 化合物 2、2a、2b 对 DPPH 自由基具有较强的清除能力, IC₅₀ 值分别为 8.87、10.18、11.35 μmol/L, 且强于阳性药 trolox (14.95 μmol/L)。化合物 2、2a、2b 对 DPPH 自由基的清除能力分别强于化合物 1、1a、1b, 进一步的构效关系研究表明, B 环上邻二酚羟基是黄酮类化合物具有 DPPH 自由基清除活性的必需结构基团。

关键词: 八角莲; 双黄酮; DPPH 自由基清除; 抗氧化

中图分类号: R284.2; R285.5 文献标识码: A

Two pairs of new biflavonoid enantiomers from *Dysosma versipellis*

WANG Hui-jie^{1,2,3}, HAN Rui-jie^{1,3}, SUN Yan-jun^{1,3*},

GONG Jian-hong^{1,3}, BAI Hong-yun^{1,3}, WANG Hao-jie^{1,3}, FENG Wei-sheng^{1,3*}

¹Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P.R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; ²Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou 466000, China; ³School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Five biflavonoids were isolated and purified from the ethanol extract of *Dysosma versipellis* by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative HPLC. Their structures were identified as (+)-dysosmabiflavonoid H (1a), (-)-dysosmabiflavonoid H (1b), (+)-dysosmabiflavonoid I (2a), (-)-dysosmabiflavonoid I (2b), podoverine F (3) by extensive spectroscopic analysis (MS, UV, IR, NMR) and electronic circular dichroism (ECD) calculations. Compounds 1a and 1b, 2a and 2b are two pairs of new biflavonoid enantiomers. Compounds 2, 2a, and 2b showed significant DPPH scavenging capacity with IC₅₀ values of 8.87, 10.18, 11.35 μmol/L, respectively, in comparison

with trolox (IC_{50} , 14.95 $\mu\text{mol/L}$). Compounds **2**, **2a**, and **2b** displayed more potent DPPH radical scavenging activity than compounds **1**, **1a**, **1b**, and trolox, respectively. The preliminary structure-activity relationship exhibited that the catechol structure in flavonoids is essential for DPPH radical scavenging activity.

Key words: *Dysosma versipellis*; biflavonoid; DPPH radical scavenging activity; antioxidant

八角莲药材来源于小檗科植物八角莲 (*Dysosma versipellis*) 的干燥根茎, 是我国特有的药材, 主要分布于浙江、广西、湖北、湖南、四川、贵州等地^[1]。该药材始载于《神农本草经》, 其性凉, 味苦, 有小毒, 具有清热解毒、化痰散结、祛痛消肿之效。临床上常用于治疗跌打损伤、半身不遂、关节酸痛、毒蛇咬伤、疮痍肿毒、尖锐湿疣、流行性出血热、乳腺癌、食道癌、乙型脑炎、淋巴结对炎、腮腺炎, 以及其他的炎症疾病等^[1-4]。八角莲药材主要含有芳基萘类木脂素、黄酮类化合物。截至目前, 已分离得到黄酮类化合物 40 个, 其中包括双黄酮类化合物 14 个。八角莲中的双黄酮类化合物多为黄酮醇与二氢黄酮醇的聚合物, 具有较强的细胞毒、抗氧化、乙酰胆碱酯酶和神经氨酸酶抑制活性^[5-9]。本研究为寻找结构新颖的天然抗氧化剂, 阐明八角莲药材的药效物质基础, 对八角莲中的双黄酮类化合物进行了研究, 并测试其对 DPPH 自由基的清除能力。

1 材料与方法

1.1 材料

八角莲于2019年7月采集自贵州省清镇市, 经河南中医药大学董诚明教授鉴定为小檗科八角莲属植物八角莲 (*Dysosma versipellis*) 的干燥根茎, 样本 (DV 20190706) 保存于呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心。

1.2 仪器与试剂

Rudolph AP-IV旋光仪 (美国Rudolph公司); Chirascan圆二色谱仪 (英国Applied Photophysics公司); Thermo EVO 300紫外光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); Thermo Nicolet IS 10 红外光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); Bruker AVANCE III 500型核磁共振仪 (德国Bruker公司); Bruker maxis HD型飞行时间质谱 (德国Bruker公司); 制备型高效液相色谱仪 (北京赛谱锐思科技有限公司); Multiskan MK3 酶标仪 (美国Thermo Fisher); 薄层色谱硅胶GF254、柱色谱硅胶 (200~300目, 青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech公司); 甲醇, 色谱纯 (天津市四友精细化学品有限公司); 其他试剂均为分析级; 阳性对照药物水溶性维生素E (Trolox, 货号: 238813, 纯度为98%, Sigma公司)。

1.3 化合物的提取与分离方法

取干燥的八角莲药材 40 kg, 加入 95%的乙醇加热回流提取 3 次, 每次提取时间为 1 h, 减压回收 95%乙醇, 得浸膏状 95%乙醇提取物。药渣加入 50%的乙醇加热回流提取 1 次, 提取时间为 1 h,

减压回收 50%乙醇,得浸膏状 50%乙醇提取物。合并 95%乙醇提取物和 50%乙醇提取物,共计 5.4 kg,加入无水乙醇溶解,再加入硅藻土吸附,回收溶剂后,将载有提取物的硅藻土装入玻璃柱,依次加入二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇洗脱,回收溶剂,得二氯甲烷洗脱部位(1.2 kg)、乙酸乙酯洗脱部位(0.8 kg)、甲醇洗脱部位(3.4 kg)。甲醇洗脱部位经硅胶柱色谱分离,采用二氯甲烷-甲醇混合溶剂系统(100:0、100:1、100:3、100:5、100:7、100:10、100:30、100:50、0:100, V/V)进行梯度洗脱,各个流份经硅胶薄层色谱检测分析,合并得到组分 Fr. 1~Fr. 9。组分 Fr. 5(110.0 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇洗脱,得到亚组分 Fr. 5-1~Fr. 5-8。亚组分 Fr. 5-8(42.5 g)经硅胶柱色谱分离,石油醚-丙酮混合溶剂系统(体积比为 100:10、100:20、100:30、100:40、100:50、100:70、1:1、1:2、1:3)梯度洗脱,得到亚组分 Fr. 5-8-1~Fr. 5-8-9。组分 Fr. 5-8-4(0.5 g)经制备型高效液相色谱分离(60%甲醇-水, 3 mL/min),得到化合物 **3**($t_R=67.2$ min, 3.0 mg)。亚组分 Fr. 5-8-5(1.07 g)经制备型高效液相色谱分离(55%甲醇-水, 3 mL/min),收集保留时间为 72.2 min 的色谱峰,再经制备型高效液相色谱纯化(43%乙腈-水, 3 mL/min),得到化合物 **1**($t_R=31.5$ min, 8.5 mg)。化合物 **1**经手性色谱柱 Daicel chiral PAK AD-H(250 mm×10 mm, 5 μ m)进行拆分(环己烷-异丙醇=60:40, 2 mL/min),得到化合物 **1a**($t_R=10.1$ min, 3.0 mg)和 **1b**($t_R=50.0$ min, 3.0 mg)。组分 Fr. 6(130.0 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇洗脱,得到亚组分 Fr. 6-1 和 Fr. 6-2。亚组分 Fr. 6-2(60.5 g)经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇混合溶剂系统梯度洗脱(100:1、100:3、100:5、100:7、100:10、100:30, V/V),得到亚组分 Fr. 6-2-1~Fr. 6-2-6。亚组分 Fr. 6-2-4(1.69 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇洗脱,得到亚组分 Fr. 6-2-4-1~6-2-4-6。亚组分 Fr. 6-2-4-4(0.59 g)经制备型高效液相色谱纯化(60%甲醇-水, 3 mL/min),得到化合物 **2**($t_R=20.2$ min, 3.5 mg)。化合物 **2**经手性色谱柱 Daicel chiral PAK AD-H(250 mm×10 mm, 5 μ m)进行拆分(环己烷-异丙醇=70:30, 2 mL/min),得到化合物 **2a**($t_R=10.5$ min, 1.2 mg)和 **2b**($t_R=36.0$ min, 1.2 mg)。

1.4 ECD计算方法

采用 Spartan 软件通过 MMFF94S 力场对化合物 **1a**、**1b**、**2a**、**2b** 进行了构象搜索,分别得到了 4 种优势构象。利用密度泛函理论(DFT)经 B3LYP/6-31G*对所选优势构象进行进一步优化。在 MeOH 溶剂中,采用 CPCM 模型,利用含时密度泛函理论(TDDFT)经 B3LYP/6-31+G*对这些优势构象进行了 ECD 计算^[10]。

1.5 DPPH 自由基清除活性

采用 DPPH 自由基清除实验^[11],评价了所有被分离化合物的抗氧化活性。将不同浓度样品与 DPPH(终浓度为 100 μ mol/L)混合反应,设定 3 个重复孔,同时设置不含药物的空白对照和 Trolox 阳性对照,30 $^{\circ}$ C, 1 h,酶标仪测定 OD 值,检测波长为 515 nm。待测化合物对 DPPH 自由基清除

活性的 IC₅₀ 值采用 Reed-Muench 方法计算。

2 实验结果

2.1 化合物结构鉴定

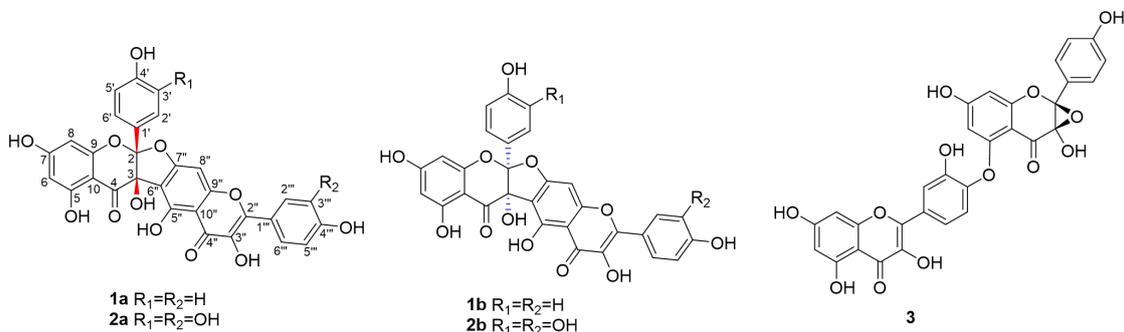


图 1 化合物 1~3 的结构

Fig. 1 The structures of compounds 1-3

化合物1 黄色无定形粉末；UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 202 (5.18), 230 (4.99), 264 (4.76), 300 (4.79), 359 (4.83) nm; IR (iTR) ν_{\max} 3 383、2 948、2 838、1 638、1 552、1 516、1 471、1 374、1 262、1 176、1 031 cm⁻¹。根据HR-ESI-MS: m/z 593.068 5 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₀H₁₈O₁₂Na, 593.069 0) 确定化合物1的分子式为C₃₀H₁₈O₁₂, 不饱和度为22。化合物1 (见图1) 的¹H NMR谱 (500 MHz, DMSO-*d*₆) (见表1) 给出四组芳环偶合系统, 包括两个对位二取代苯基 δ_{H} 7.27 (2H, d, $J=8.7$ Hz)、6.78 (2H, d, $J=8.7$ Hz)、8.08 (2H, d, $J=8.9$ Hz)、6.94 (2H, d, $J=8.9$ Hz), 一个五取代苯基 δ_{H} 7.01 (1H, s), 以及一个1,2,3,5-四取代苯基 δ_{H} 5.82 (1H, s)、5.88 (1H, s)。¹³C NMR谱 (125 MHz, DMSO-*d*₆) (见表2) 与HSQC谱给出两个羰基 δ_{C} 176.6 (为黄酮醇特征性羰基)、190.1 (为二氢黄酮醇特征性羰基), 四个苯环, 两个连氧烯碳 δ_{C} 147.9、136.1, 一个二连氧脂肪季碳信号 δ_{C} 117.6 (C-2), 一个单连氧脂肪季碳信号 δ_{C} 79.1 (C-3)。由对位取代苯基上的质子 δ_{H} 8.08 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-2''', 6''') 与连氧烯碳C-2'' (δ_{C} 147.9) 的HMBC的远程相关 (见图2), 以及一个五取代苯基氢信号 δ_{H} 7.01 (1H, s), 提示化合物1含有山柰酚结构单元。由对位取代苯基的氢信号 δ_{H} 7.27 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', H-6') 与连氧脂肪季碳C-2 (δ_{C} 117.6) 的HMBC远程相关, 一个1,2,3,5-四取代苯基 δ_{H} 5.88 (1H, s)、5.82 (1H, s), 提示另一个结构单元为二氢山柰酚结构片段。将化合物1的¹³C NMR数据与山柰酚的对比分析表明, 山柰酚的C-5、C-6、C-7、C-8与化合物1相应位置的¹³C NMR数据差异明显[化合物1: δ_{C} 156.8 (C-5''), 110.1 (C-6''), 164.3 (C-7''), 91.1 (C-8''); 山柰酚: δ_{C} 160.7 (C-5), 98.2 (C-6)、163.9 (C-7)、93.5 (C-8)^[12]], 提示山柰酚结构单元在C-6''和C-7''位被取代。由一个二连氧脂肪季碳信号 δ_{C} 117.6 (C-2) 与一个单连氧脂肪季碳信号 δ_{C} 79.1 (C-3), 提示山柰酚结构单元和二氢山柰酚结构单元通过一个醚桥C-2-O-C-7''和一个C-3-C-6''键相连 (见图1)。尽管反复地重结晶实

验，一直无法获得用于X-单晶衍射的晶体。NOESY实验无法提供两个结构单元相连的任何信息。化合物**1**的ECD光谱未显示任何Cotton效应（200~400 nm），且比旋光度值为零，说明其为外消旋体混合物。采用手性Daicel PAK AD-H色谱柱分离，得到等量的化合物**1a**和**1b**。通过ECD光谱数据分析，确定了C-2与C-3位的绝对构型。化合物**1a**与**1b**给出相反的Cotton效应，且测试的ECD光谱数据分别与异构体（2*S*, 3*S*）-**1**、（2*R*, 3*R*）-**1**的计算ECD光谱数据基本一致（见图3），由此确定化合物**1a**与**1b**的C-2、C-3位的绝对构型分别为2*S*, 3*S*与2*R*, 3*R*。根据HSQC和HMBC谱（见图2），对化合物**1**的¹H NMR和¹³C NMR数据进行归属，具体见表1和2。因此，化合物**1a**与**1b**的结构被鉴定为（2*S*,3*S*）-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavanone-(2-*O*-7'':3-6'')-3'',5'',4'''-trihydroxyflavone、（2*R*,3*R*）-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavanone-(2-*O*-7'':3-6'')-3'',5'',4'''-trihydroxyflavone，分别命名为(+)-八角莲双黄酮H、(-)-八角莲双黄酮H。

表 1 化合物 1 和 2 的 ¹H NMR 数据 (500 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 1 ¹H NMR Data of compounds **1** and **2**(500 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	1	2	No.	1	2
6	5.88 (1H, s)	5.86 (1H, s)	8''	7.01 (1H, s)	6.97 (1H, s)
8	5.82 (1H, s)	5.78 (1H, s)	2'''	8.08 (1H, d, <i>J</i> =8.9 Hz)	7.72 (1H, d, <i>J</i> =2.1 Hz)
2'	7.27 (1H, d, <i>J</i> =8.7 Hz)	6.88 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	3'''	6.94 (1H, d, <i>J</i> =8.9 Hz)	
3'	6.78 (1H, d, <i>J</i> =8.7 Hz)		5'''	6.94 (1H, d, <i>J</i> =8.9 Hz)	6.91 (1H, d, <i>J</i> =8.5 Hz)
5'	6.78 (1H, d, <i>J</i> =8.7 Hz)	6.72 (1H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	6'''	8.08 (1H, d, <i>J</i> =8.9 Hz)	7.57 (1H, dd, <i>J</i> =8.5, 2.1 Hz)
6'	7.27 (1H, d, <i>J</i> =8.7 Hz)	6.75 (1H, dd, <i>J</i> =8.4, 2.0 Hz)			

表 2 化合物 1 和 2 的 ¹³C NMR 数据 (125 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 2 ¹³C NMR Data of compounds **1** and **2** (125 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	1	2	No.	1	2
2	117.6, s	117.6, s	2''	147.9, s	147.8, s
3	79.1, s	79.1, s	3''	136.1, s	136.1, s
4	190.1, s	190.1, s	4''	176.6, s	176.5, s
5	163.4, s	163.3, s	5''	156.8, s	156.7, s
6	97.0, d	97.0, d	6''	110.1, s	110.2, s

7	168.5, s	170.2, s	7''	164.3, s	164.3, s
8	95.2, d	95.3, d	8''	91.1, d	91.0, d
9	160.3, s	160.4, s	9''	157.2, s	157.1, s
10	98.1, s	97.9, s	10''	105.7, s	105.6, s
1'	123.4, s	123.8, s	1'''	121.3, s	121.6, s
2'	128.4, d	114.5, d	2'''	129.7, d	115.3, d
3'	114.8, d	144.6, s	3'''	115.5, d	145.2, s
4'	158.7, s	146.8, s	4'''	159.6, s	148.1, s
5'	114.8, d	114.9, d	5'''	115.5, d	115.6, d
6'	128.4, d	118.1, d	6'''	129.7, d	120.1, d

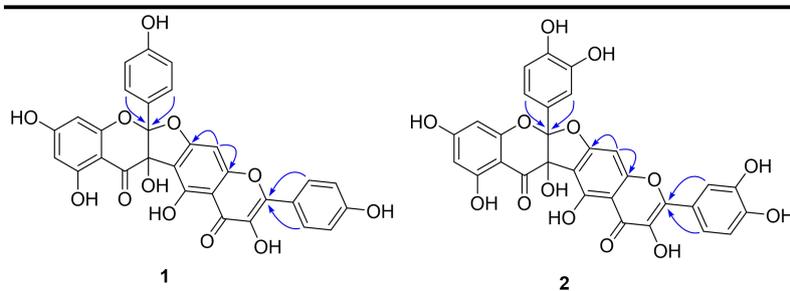
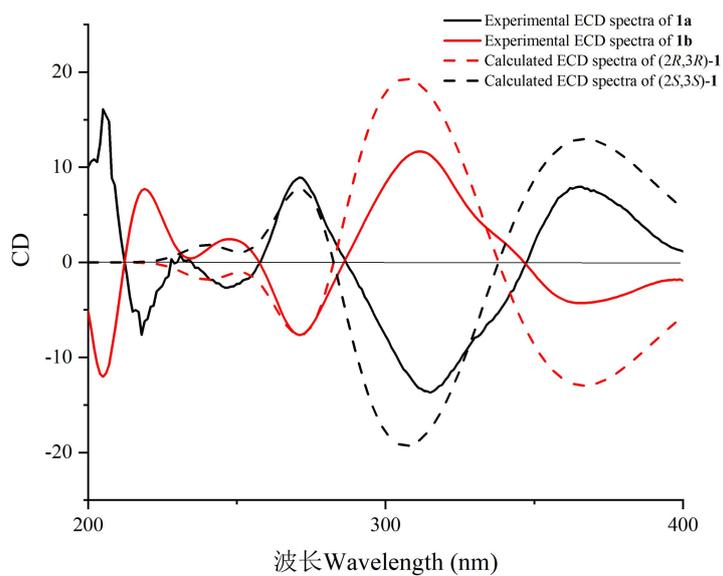


图2 化合物1和2主要的 HMBC 相关

Fig. 2 Key HMBC correlations of compounds 1 and 2



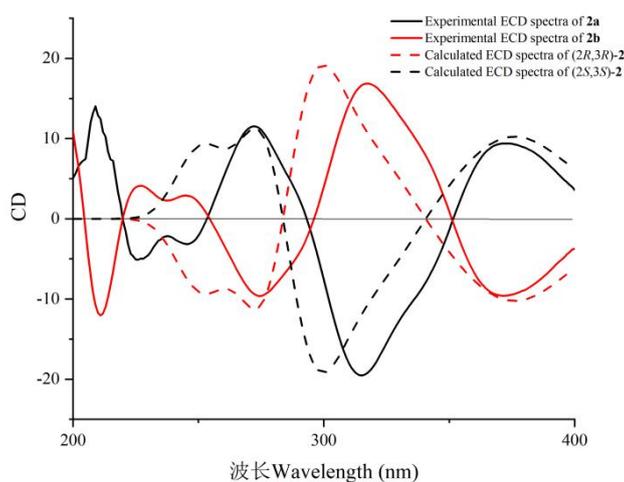


图 3 化合物 1a、2a、1b、2b 的实测和计算 ECD 谱图

Fig. 3 Experimental and calculated ECD spectra of compounds 1a, 1b, 2a, and 2b

化合物1a: 黄色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +39.16$ (c 0.02, MeOH); ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \epsilon$) 205 (+5.6), 218 (-2.6), 247 (-0.9), 271 (+3.1), 315 (-4.7), 366 (+2.7) nm。

化合物1b: 黄色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -37.04$ (c 0.02, MeOH); ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \epsilon$) 205 (-4.2), 219 (+2.7), 247 (+0.8), 271 (-2.6), 312 (+4.0), 366 (-1.5) nm。

化合物 2 黄色不定形粉末; UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 203 (3.74), 255 (3.26), 292 (3.20), 367 (3.23) nm; IR (iTR) ν_{max} 3 383, 2 924, 2 854, 1 636, 1 471, 1 359, 1 267, 1 169, 1 124 cm^{-1} 。根据 HR-ESI-MS: m/z 625.058 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{14}\text{Na}$, 625.059 4) 确定化合物 2 的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{14}$, 不饱和度为 22。化合物 2 (见图 1) 与 1 相比, ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据基本相似, 不同之处在于化合物 2 中的槲皮素和二氢槲皮素结构单元代替了化合物 1 中相应的山柰酚和二氢山柰酚结构单元。这也由两组 1,3,4-三取代苯基氢信号 δ_{H} 7.72 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2''')、7.57 (1H, dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, H-6'''), 6.88 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2')、6.75 (1H, dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, H-6') 分别与连氧烯碳 C-2'' (δ_{C} 147.8)、二连氧脂肪季碳信号 C-2 (δ_{C} 117.6) 的 HMBC 远程相关所证实。化合物 2 的 ECD 光谱没有明显的 Cotton 效应, 比旋光度值为零, 说明其为外消旋体。化合物 2 经 Daicel PAK AD-H 色谱柱手性分离, 得到等量的化合物 2a 与 2b。化合物 2a 与 2b 的测试 ECD 光谱数据分别与异构体 (2S, 3S)-2、(2R, 3R)-2 的计算 ECD 光谱数据一致 (见图 3), 由此确定化合物 2a 与 2b 的 C-2、C-3 位的绝对构型分别为 2S, 3S 与 2R, 3R。根据 HSQC、HMBC 谱 (见图 2), 对化合物 2 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据进行归属, 具体见表 1 和 2。因此, 化合物 2a 与 2b 的结构确定为 (2S,3S)-3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone-(2-O-7'':3-6'')-3'',5'',3''',4'''-tetrahydroxyflavone

(2*R*,3*R*)-3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone-(2-*O*-7''':3-6'')-3'',5'',3''',4''''-tetrahydroxyflavone, 分别命名为 (+)-八角莲双黄酮 I、(-)-八角莲双黄酮 I。

化合物2a: 黄色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20} +40.13$ (*c* 0.01, MeOH); ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$)209 (+5.1), 226 (-1.9), 237 (-0.8), 245 (-1.1), 272 (+4.2), 315 (-7.1), 373 (+3.4) nm。

化合物2b: 黄色无定形粉末; $[\alpha]_D^{20} -41.99$ (*c* 0.01, MeOH); ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$)211 (-4.4), 227 (+1.5), 238 (+0.8), 245 (+1.1), 275 (-3.5), 317 (+6.2), 371 (-3.5) nm。

化合物3 黄色无定型粉末。 $[\alpha]_D^{20} +26.49$ (*c* 0.12, MeOH)。UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$)202 (4.36), 250 (3.85), 264 (3.81), 303 (3.83), 358 (3.81) nm; IR (iTR) ν_{\max} 3 224、2 359、2 337、1 642、1 504、1 374、1 320、1 282、1 248、1 170、1 090、1 050、1 030 cm^{-1} ; HR-ESI-MS: *m/z* 587.081 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{O}_{13}$, 587.082 6), 609.063 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{13}\text{Na}$, 609.064 5)。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.86 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H-6'''), 7.82 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'''), 7.49 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 7.26 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'''), 6.75 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.46 (1H, s, H-8''), 6.18 (1H, s, H-6''), 5.98 (1H, s, H-6), 5.96 (1H, s, H-8); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 100.3 (C-2), 90.4 (C-3), 187.1 (C-4), 163.0 (C-5), 97.2 (C-6), 168.0 (C-7), 96.2 (C-8), 159.0 (C-9), 99.6 (C-10), 124.0 (C-1'), 129.3 (C-2'), 114.8 (C-3'), 158.7 (C-4'), 114.8 (C-5'), 129.3 (C-6'), 145.0 (C-2''), 136.7 (C-3''), 176.1 (C-4''), 160.7 (C-5''), 98.3 (C-6''), 164.1 (C-7''), 93.6 (C-8''), 156.2 (C-9''), 103.1 (C-10''), 125.7 (C-1'''), 116.6 (C-2'''), 140.4 (C-3'''), 141.6 (C-4'''), 117.1 (C-5'''), 122.3 (C-6''')。以上数据与文献^[7]报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 podoverine F。

2.2 DPPH 自由基清除活性

化合物**1**、**1b**、**2**、**2a**、**2b**、**3**对DPPH自由基均具有较强的清除能力(见表3), 其中化合物**2**、**2a**、**2b**对DPPH自由基的清除能力强于阳性药trolox (14.95 $\mu\text{mol/L}$), IC_{50} 值分别为8.87、10.18、11.35 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物**1**与**2**具有相同的结构骨架, 差异之处在于B环上羟基数目不同(化合物**1**中均为4-羟基-苯基, 而化合物**2**中均为3,4-二羟基苯基), 由化合物**2**、**2a**、**2b**对DPPH自由基的清除能力分别强于**1**、**1a**、**1b**, 表明B环上邻二酚羟基是黄酮类化合物具有DPPH自由基清除活性的必需结构基团。化合物**1**与**2**对DPPH自由基的清除能力分别强于它们的拆分体**1a**、**1b**与**2a**、**2b**, 其原因可能为中药活性成分之间的协同作用。

表 3 化合物 **1**、**1a**、**1b**、**2**、**2a**、**2b** 对 DPPH 自由基清除活性

Table 3 DPPH free radical scavenging activity of compounds **1**, **1a**, **1b**, **2**, **2a** and **2b**

No.	IC ₅₀ (μmol/L)	No.	IC ₅₀ (μmol/L)
1	28.27 ± 0.66	2a	10.18 ± 0.75
1a	>50	2b	11.35 ± 0.83
1b	35.02 ± 2.07	3	29.16 ± 2.08
2	8.87 ± 0.31	Trolox	14.95 ± 0.09

3 结论

本实验对八角莲 95%乙醇和 50%乙醇提取物中的双黄酮类化合物进行研究, 共分离鉴定了 2 对新的双黄酮对应异构体和 1 个双黄酮类化合物, 分别鉴定为(+)-八角莲双黄酮 H (**1a**)、(-)-八角莲双黄酮 H (**1b**)、(+)-八角莲双黄酮 I (**2a**)、(-)-八角莲双黄酮 I (**2b**)、podoverine F (**3**)。采用 DPPH 自由基清除实验, 测试化合物 **1**、**1a**、**1b**、**2**、**2a**、**2b** 的抗氧化活性, 结果显示, 化合物 **2**、**2a**、**2b** 对 DPPH 自由基具有较强的清除能力, 且强于阳性药 trolox。构效关系研究表明, B 环上邻二酚羟基是黄酮类化合物具有 DPPH 自由基清除活性的必需结构基团。本实验从八角莲中发现了结构新颖的双黄酮类化合物, 且对 DPPH 自由基具有较强清除作用, 为八角莲药材资源合理开发利用提供参考依据。

参考文献

- 1 Guan BC,Fu CX,Qiu YX,et al.Genetic structure and breeding system of a rare understory herb,*Dysosma versipellis*(Berberidaceae),from temperate deciduous forests in China[J].Am J Bot,2010,97:111-122.
- 2 Liu CX,Zhang CN,He T,et al.Study on potential toxic material base and mechanisms of hepatotoxicity induced by *Dysosma versipellis* based on toxicological evidence chain(TEC)concept[J].Ecotox Environ Safe,2020,190:110073.
- 3 Xu XQ,Gao XH,Jin LH,et al.Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Dysosma versipellis* in PC3 and Bcap-37 cell lines[J].Cell Div,2011,6:14.
- 4 Shi YC,Yuan HP,Zou R,et al.Complete chloroplast genome sequence of *Dysosma versipellis*(Berberidaceae),a rare and threatened species endemic to China[J].Mitochondrial DNA B,2019,4:4218-4219.
- 5 Jiang F,Tian HY,Zhang JL,et al.Chemical constituents from *Dysosma versipellis*[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2011,42:634-639.
- 6 Chen RD,Duan RG,Wei YN,et al.Flavonol dimers from callus cultures of *Dysosma versipellis* and their *in vitro* neuraminidase inhibitory activities[J].Fitoterapia,2015,107:77-84.
- 7 Yang Z,Wu YQ,Zhou H,et al.A novel strategy for screening new natural products by a combination of reversed-phase liquid chromatography fractionation and ¹³C NMR pattern recognition:the discovery of new anticancer flavone dimers from *Dysosma versipellis*(Hance)[J].RSC Adv,2015,5:77553-77564.

- 8 Sun YJ,Han RJ,Bai HY,et al.Structurally diverse biflavonoids from *Dysosma versipellis* and their bioactivity[J].RSC Adv,2022,12:34962-34970.
- 9 Sun YJ,Bai HY,Han RJ,et al.Dysosmaflavonoid A-F,new flavonols with potent DPPH radical scavenging activity from *Dysosma versipellis*[J].Fitoterapia,2023,166:105440.
- 10 Si YY,Wang WW,Feng QM,et al.Neuroinflammatory inhibitors from *Gardneria nutans* Siebold & Zuccarini[J].RSC Adv,2021,11:27085-27091.
- 11 Jaidee W,Mancerat W,Andersen RJ,et al.Antioxidant neolignans from the twigs and leaves of *Mitrephora wangii* HU[J].Fitoterapia,2018,130:219-224.
- 12 Zheng DD,Ruan JY,Zhang Y,et al.The flavonoids from *Cnidium monnieri*(L.) Cuss[J].Chin J Med Chem(中国药物化学杂志),2020,30:542-548.

收稿日期: 2023-07-03 接受日期:

基金项目: 河南中医药大学省属高校基本科研业务专项(2014KYYWF-QN26); 河南中医药大学科技创新人才(2016XCXRC01); 河南省中医药科学研究专项(20-21ZY1039); 河南省高校科技创新团队支持计划(24IRTSTHN039)

*通信作者 Tel: 86-371-65962746; E-mail: sunyanjunily@126.com, fwsh@hactcm.edu.cn