

紫红獐牙菜 7 种呋喃类成分分离及体外抗氧化研究

常晓沂, 宋家蕊, 刘璐萍, 张国泰, 王 婷, 李 冲*

兰州大学药学院, 兰州 730000

摘要: 本文研究紫红獐牙菜 7 个呋喃类的分离及抗氧化活性。采用大孔吸附树脂、硅胶、聚酰胺等柱色谱法、重结晶进行分离, NMR、紫外、质谱等波谱学方法进行结构鉴定; 以常用抗氧化剂 Vc 和 BHT 为阳性对照, 通过 DPPH· 法测定紫红獐牙菜呋喃成分清除自由基的能力, 并计算各单体 IC₅₀。得出在一定浓度范围内, 7 个单体化合物的清除能力与浓度呈量效关系; 由 IC₅₀ 得出 1, 3, 7, 8-四羟基呋喃、1, 5, 8-三羟基-3-甲氧基呋喃、2-D-吡喃葡萄糖基-1, 3, 6, 7-四羟基呋喃对 DPPH 自由基清除能力强于 Vc; 其他单体的抗氧化能力都低于 Vc 和 BHT。说明 1, 3, 7, 8-四羟基呋喃、1, 5, 8-三羟基-3-甲氧基呋喃、2-D-吡喃葡萄糖基-1, 3, 6, 7-四羟基呋喃具有很强抗氧化活性, 均可作为有效的天然自由基清除剂, 具有很大的开发利用前景。

关键词: 紫红獐牙菜; 呋喃; 分离; 抗氧化; DPPH·

中图分类号: R284. 1; Q946. 91

文献标识码: A

Isolation and Antioxidant Activity *in Vitro* of Seven Xanthenes Components from *Swertia Punicea* Hemsl

CHANG Xiao-li, SONG Jia-rui, LIU Lu-ping, ZHANG Guo-tai, WANG Ting, LI Chong*

Pharmacy College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: This study was to explore separation and antioxidant activity of seven xanthenes components from *Swertia Punicea* Hemsl. Column chromatography and recrystallization were used for separation, NMR, UV and MS spectroscopic methods were used for structure identification; Using Vc and BHT as positive controls, free radical scavenging ability of xanthenes components from *Swertia Punicea* Hemsl was determined by DPPH· method and IC₅₀ of each compound was calculated. Scavenging ability of seven compounds had dose-effect relationship with concentration in a certain concentration range; scavenging ability on DPPH radical of 1, 3, 7, 8-tetrahydroxy xanthenes, 1, 5, 8-trihydroxy-3-methoxy xanthenes, 2-D-glucopyranosyl-1, 3, 6, 7-tetrahydroxy xanthenes were stronger than Vc; others are lower than Vc and BHT deriving from the IC₅₀. 1, 3, 7, 8-tetrahydroxy xanthenes, 1, 5, 8-trihydroxy-3-methoxy xanthenes, 2-D-glucopyranosyl-1, 3, 6, 7-tetrahydroxy xanthenes, having strong antioxidant activities, can be used as effective natural free radical scavenger and has great prospects for development and utilization.

Key words: *Swertia Punicea* Hemsl; xanthenes; separation; antioxidant activity; DPPH·

紫红獐牙菜是龙胆科獐牙菜属植物紫红獐牙菜 *Swertia punicea* Hemsl 的干燥全草, 主要分布于云南、湖北、四川、贵州、西藏等省区。^[1] 紫红獐牙菜又名肝炎草, 味苦, 性凉, 入心、肝、肺、脾四经, 有利肝胆、清热解毒之功效, 为民间长期习用的一种抗肝炎药, 同时, 对胆囊炎也有显著疗效,^[2] 所以主用于肝炎、胆囊炎、风火牙痛、热淋、疮痍肿毒等症。目前, 已报道紫红獐牙菜主要有呋喃、三萜和环烯醚萜类等化学成分^[3-7], 而呋喃类化合物为本属植物的主

要成分之一, 有强心、利胆、利尿、保肝等作用, 还对中枢神经有兴奋作用, 并且是抗真菌的主要成分。近年来, 越来越多的中药被认为是外源性的“天然自由基清除剂”, 并开展各种清除自由基的实验研究^[8,9]。而一般研究都是以中药提取物进行, 以一种药材中某一类单体化合物进行抗氧化研究, 笔者未见文献报道过。本实验通过大孔吸附树脂、聚酰胺、硅胶柱等色谱技术分离、结合重结晶纯化, 制备 7 种呋喃类单体, 并采用 DPPH· 法测定各自对自由基的清除能力, 进一步丰富该植物呋喃类成分的研究内容, 寻找新的活性成分, 为更好的开发民族中草药奠定理论基础。

1 材料和仪器

1.1 材料与试剂

维生素 C(上海一基实业有限公司);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)(上海一基实业有限公司);1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)(上海一基实业有限公司)。

1.2 药材

药材于2011年9月采自云南省大理,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为龙胆科植物紫红獐牙菜 *S. punicea* Hemsl. 标本存放于兰州大学药学院药物化学研究所实验室。

1.3 样品

7个紫红獐牙菜吡喃酮类单体化合物,分别鉴定为8-O-D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基吡喃酮、Tetrahydrosertianolin、1,3,7,8-四羟基吡喃酮、1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡喃酮、1,7-二羟基-3,4,8-三甲氧基吡喃酮、2-D-吡喃葡萄糖基-1,3,6,7-四羟基吡喃酮、3-O-demethylswertipunicoside。此7个单体化合物均由本实验室经大孔吸附树脂柱层析、硅胶柱层析、聚酰胺柱层析等分离纯化得到,经¹³C NMR、¹H NMR、DEPT谱、质谱、紫外光谱等鉴定其结构,并采用HPLC面积归一法测定纯度>94%。以下分别简称C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7。

1.4 主要仪器

Lambda 25 紫外可见分光光度计(Perkin Elmer precisely, USA), Discovery 专业型分析天平 DV215CD(ohaus corporation pine Brook NJ. USA);超声波清洗机(昆明市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 7种吡喃酮单体的分离与鉴定

2.1.1 7种吡喃酮单体的提取与分离

紫红獐牙菜全草(干重12 kg),用80%乙醇回流提取3次,提取时间分别为2,1,1 h,回收乙醇得流浸膏1280 g,浸膏热水超声溶解,硅藻土过滤,离心,然后用大孔吸附树脂柱色谱分离,用不同浓度的乙醇梯度洗脱,得50%乙醇洗脱部分512 g,90%乙醇洗脱部分325 g。其中50%乙醇洗脱部分析出的絮状沉淀经热甲醇重结晶,得C6(116 mg);90%乙醇洗脱部分析出的絮状沉淀经热甲醇重结晶,得C1(92 mg);90%乙醇洗脱其他部分经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(3:1)洗脱得C2(34 mg);经硅胶柱色谱,

以氯仿-丙酮(7:1)洗脱得C3(30 mg);经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮-甲醇(7:1:0.1)洗脱得C4(46 mg);经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮-甲醇(3:1:0.1)洗脱得C5(15 mg);经聚酰胺柱色谱,以甲醇-水(15:1)洗脱得C7(28 mg)。

2.1.2 7种吡喃酮单体的鉴定

C1 乳黄色结晶(甲醇)。ESI-MS m/z : 435 [M-H]⁻。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 13.06 (1H, s, -OH), 10.04 (1H, s, -OH), 7.26 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.11 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, H-7), 6.54 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.33 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 4.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.19 ~ 3.73 (m, H-2' ~ H-6'), 3.86 (3H, s, -OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 181.2 (C=O), 166.3 (C-3), 162.7 (C-1), 156.5 (C-4a), 149.5 (C-8), 145.1 (C-4b), 141.1 (C-5), 121.2 (C-6), 112.4 (C-7), 112.0 (C-8a), 103.6 (C-1'), 103.2 (C-8b), 97.3 (C-2), 92.2 (C-4), 77.5 (C-5'), 76.2 (C-3'), 73.6 (C-2'), 69.8 (C-4'), 60.9 (C-6'), 56.2 (-OCH₃)。以上数据与文献^[10]当中报道的基本一致,故鉴定C1为8-O-D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基吡喃酮。

C2 淡黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 439 [M-H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 6.47 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4), 6.31 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-2), 4.92 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-8), 4.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1'), 4.64 (1H, d, $J = 9.6, 7.8$ Hz, H-5), 3.17 ~ 3.93 (m, H-2 ~ H-6'), 3.89 (3H, s, -OCH₃), 2.28 (1H, dq, $J = 13.2, 2.4$ Hz, Heq-7), 2.15 (2H, m, H-6), 1.51 (1H, tt, $J = 13.2, 2.4$ Hz, Hax-7); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 180.1 (C=O), 166.3 (C-4b), 164.1 (C-3), 159.5 (C-1), 156.9 (C-4a), 115.1 (C-8a), 103.3 (C-8b), 102.4 (C-1'), 98.4 (C-2), 93.8 (C-4), 75.8 (C-5'), 75.5 (C-3'), 72.3 (C-2'), 68.9 (C-4'), 68.3 (C-8), 64.8 (C-5), 60.6 (C-6'), 54.1 (-OCH₃), 26.2 (C-7), 25.1 (C-6)。以上数据与文献^[10]当中报道的基本一致,故鉴定C2为Tetrahydrosertianolin。

C3 黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 259 [M-H]⁻。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 11.90 (1H, s, -OH), 11.75 (1H, s, -OH), 11.18 (1H, s, -OH), 9.37 (1H, s, -OH), 7.25 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6), 6.62 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.40 (1H, d, $J = 2.4$

Hz, H-4), 6.21 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 183.7 (C=O), 166.5 (C-3), 162.3 (C-1), 157.5 (C-4a), 148.3 (C-4b), 147.7 (C-8), 139.3 (C-7), 123.6 (C-6), 107.5 (C-8a), 106.3 (C-5), 101.1 (C-8b), 98.5 (C-2), 94.3 (C-4)。以上数据与文献^[11]当中报道的基本一致,故鉴定 **C3** 为 1,3,7,8-四羟基吡啶酮。

C4 黄色针晶(丙酮)。ESI-MS m/z : 273 [M-H]⁻。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 11.89 (1H, s, OH), 11.06 (1H, s, OH), 9.68 (1H, s, OH), 7.26 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6), 6.64 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-7), 6.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.37 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2), 3.89 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 185.6 (C=O), 168.5 (C-3), 163.5 (C-1), 158.6 (C-4a), 153.9 (C-8), 144.3 (C-4b), 137.7 (C-5), 124.5 (C-6), 109.5 (C-7), 107.9 (C-8a), 102.9 (C-8b), 97.9 (C-2), 93.3 (C-4), 56.2 (-OCH₃)。以上数据与文献^[10]当中报道的基本一致,故鉴定 **C4** 为 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡啶酮。

C5 淡黄色针晶(丙酮)。ESI-MS m/z : 317 [M-H]⁻。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 13.13 (1H, s, -OH), 9.60 (1H, s, -OH), 7.39 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6), 7.28 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-5), 6.51 (1H, s, H-2), 3.92 (3H, s, -OCH₃), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.78 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 180.8 (C=O), 159.2 (C-1), 158.4 (C-3), 149.4 (C-4b), 148.2 (C-4a), 147.0 (C-7), 145.3 (C-8), 127.5 (C-4), 124.4 (C-6), 114.6 (C-8a), 113.4 (C-5), 102.7 (C-8b), 94.6 (C-2), 61.1 (-OCH₃), 60.9 (-OCH₃), 56.4 (-OCH₃)。以上数据与文献^[12]当中报道的基本一致,故鉴定 **C5** 为 1,7-二羟基-3,4,8-三甲氧基吡啶酮。

C6 黄色针状结晶(丙酮)。ESI-MS m/z : 421 [M-H]⁻。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 13.76 (1H, s, -OH), 10.68 (1H, s, -OH), 10.57 (1H, s, -OH), 9.80 (1H, s, -OH), 7.38 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, s, H-5), 6.37 (1H, s, H-4), 4.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-1'), 3.17 ~ 3.70 (m, H-2' ~ H-6'); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 179.6 (C=O), 164.3 (C-3), 162.3 (C-1), 156.7 (C-4a), 154.5 (C-6), 151.3 (C-4b), 144.2 (C-7), 112.2 (C-8a), 108.6 (C-8), 108.1 (C-2), 103.1 (C-5), 101.8 (C-8b), 93.8 (C-4), 82.2 (C-1'), 79.5 (C-5'), 73.6 (C-

2'), 71.1 (C-3'), 70.7 (C-4'), 62.0 (C-6')。以上数据与文献^[10]当中报道的基本一致,故鉴定 **C6** 为 2-D-吡喃葡萄糖基-1,3,6,7-四羟基吡啶酮。

C7 淡黄色粉末(甲醇)。ES I-MS m/z : 679 [M-H]⁻。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 13.91 (1H, s, -OH), 6.24 (1H, br s, H-2), 6.47 (1H, br s, H-4), 7.20 (1H, s, H-6), 6.54 (1H, s, H-5'), 7.37 (1H, s, H-8'), 4.82 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-1"); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 183.9 (C-9), 180.5 (C-9'), 166.5 (C-3), 163.1 (C-1), 161.2 (C-3'), 160.1 (C-1'), 157.5 (C-4a), 155.3 (C-6'), 153.5 (C-4a'), 151.2 (C-4b'), 150.5 (C-8), 144.1 (C-7'), 144.2 (C-4b), 136.6 (C-5), 126.8 (C-6), 113.2 (C-7), 111.6 (C-8a'), 107.6 (C-8'), 107.2 (C-8a), 106.8 (C-2'), 102.8 (C-4'), 102.4 (C-5'), 101.1 (C-8b'), 101.0 (C-8b), 98.6 (C-2), 94.3 (C-4), 81.2 (C-5"), 78.9 (C-3"), 75.8 (C-1"), 71.7 (C-2"), 69.7 (C-4"), 60.2 (C-6")。以上数据与文献^[13]当中报道的基本一致,故鉴定 **C7** 为 3-O-demethylswertipunicoside。

2.2 DPPH·稳定性试验及最大吸收峰的测定

参照汤昆等^[14]研究 DPPH·稳定性试验,分别在 0, 30, 60 min 测定其吸光度,重复 30 次,结果统计学无差异,表明 DPPH·是一种稳定的自由基,室温放置 1 h,其吸光度基本不变,可用于紫红獐牙菜吡啶酮化合物抗氧化研究。

配制三个浓度的 DPPH·自由基甲醇溶液放于紫外可见分光光度计下进行全波长扫描(300 nm ~ 800 nm),测得 DPPH 吸收峰在 516 nm 附近。这与 Larrauri^[15]报道 DPPH 吸收峰在 517 nm 基本吻合。

2.3 试剂的配制

2.3.1 DPPH·甲醇溶液的配制

每次精密称取 5 mg DPPH·,用无水甲醇溶解并定容于 50 mL 容量瓶中,浓度为 100 mg/L,避光保存,现配现用。

2.3.2 受试品溶液的配制

对于每个样品(包括标准品维生素 C 和 BHT),分别配制成 7 个不同浓度的甲醇溶液。精确称取 5 mg 的受试物于 50 mL 的容量瓶中,用甲醇定容至刻度线,配制成 100 mg/L 的样品溶液。再取 7 个 25 mL 刻度的容量瓶分别编号为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 号,用移液管依次向 7 个容量瓶中加入 0.25, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 mL 的 100 mg/L 的样品溶液,分别定

容至刻度线,分别配制成浓度为1,5,10,20,40,50,60 mg/L的溶液,现配现用。

2.3.3 清除率(IP)的测定

对于每种受试物,分别取3个带塞干净的小瓶子,在3个小瓶中分别加入2 mL DPPH·甲醇溶液和2 mL 甲醇混合液;2 mL 不同浓度的受试物溶液和2 mL DPPH·甲醇溶液;2 mL 不同浓度的受试物溶液与2 mL 甲醇,同时在室温下放置30 min后,在516 nm处测定3个瓶中混合液的吸光度分别为 A_c , A_i , A_j 。同一种浓度做三组平行试验,求平均值。按照下式计算不同浓度的受试物的清除率(IP)。

$$IP(\%) = [(A_c + A_j - A_i) \div A_c] \times 100\%$$

然后计算半数清除浓度 IC_{50} (DPPH·自由基清除率为50%时所需抗氧化剂的浓度),平行测定3次,取其平均值, IC_{50} 越小,则表明该物质的抗氧化能力越强。再以对照品清除DPPH·自由基的活性为基准计算各单体的相对活性,与 IC_{50} 同时作为参照判定单体的抗氧化活性。

$$\text{单体相对活性}(\%) = \frac{\text{对照品 } IC_{50}}{\text{单体 } IC_{50}} \times 100\%$$

3 结果及分析

由表1和图1可知,单体化合物中有7个样品对DPPH·均有一定的清除作用,除C2不太明显,且随着浓度的增加逐渐增强,但随着浓度增加到一定值后抗氧化能力都开始趋于稳定。其中C6、C3和C4对DPPH·的清除能力都很强;C7在高于30 mg/L浓度后,清除率也达到80%以上,而C1、C5、C2清除能力较弱。

然后由图1中浓度与清除率的关系,可得出不同单体化合物的 IC_{50} (见表1),再得出单体化合物相对于对照品Vc和BHT的活性(见表1)。由表1得出,C2的 IC_{50} 最小,所以其对DPPH自由基清除能力最强,C4、C6次之,但都强于Vc。

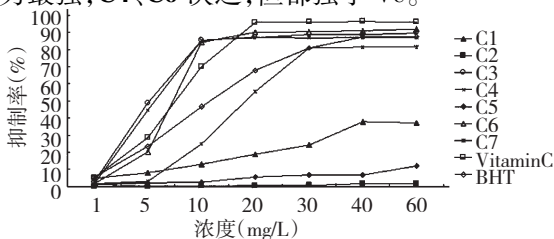


图1 不同单体化合物对DPPH自由基的清除作用

Fig. 1 Scavenging effect on DPPH radical of different monomer compounds

表1 不同单体化合物清除DPPH自由基的 IC_{50} 结果

Table 1 IC_{50} of scavenging DPPH radical of monomeric compounds

样品 Sample	IC_{50} (mg/L)	相对于Vc活性 Relative activity to Vc(%)	相对于BHT活性 Relative activity to BHT(%)
vitamin C	6.54	100.00	163.30
BHT	10.68	61.24	100.00
C1	247.39	2.64	4.32
C2	9.14×10^{41}	0.00	0.00
C3	4.65	140.64	232.26
C4	5.40	121.11	197.78
C5	29853826.19	0.00	0.00
C6	6.35	102.99	168.19
C7	19.21	34.04	55.60

4 结果与讨论

本研究用DPPH·法考察了紫红獐牙菜中7个吡啶酮类单体化合物抗氧化能力。研究表明,在一定浓度范围内,7个吡啶酮单体化合物对DPPH·都具有一定的清除作用,且7个单体的清除能力与浓度呈量效关系,其清除能力大小依次是:1,3,7,8-四羟基吡啶酮>1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡啶酮>2-D-吡喃葡萄糖基-1,5,6,7-四羟基吡啶酮>3-O-demethylswertipunicoside>8-O-D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基吡啶酮>1,7-二羟基-3,4,8-甲氧基吡啶酮>Tetrahydrosertianolin,其中Tetrahydrosertianolin基本无清除作用。之所以会出现以上清除能力的大小,通过比较各化合物酚羟基数目和 IC_{50} 值的关系,发现吡啶酮两个苯环上羟基的数目可能对其清除自由基能力影响较大,例如,C6和C3都具有4个酚羟基,具极强的清除能力,而C5和C2都只有1个酚羟基,清除能力都很差。有研究^[16,17]报道,化合物分子中酚羟基数目越多,抗氧化性越强,本研究所测试的7个吡啶酮化合物也属于黄酮类化合物这一大类,所以其清除自由基的机理可能与上述研究中阐述的一致。以上研究结果表明紫红獐牙菜吡啶酮中有些单体化合物具有较好的抗氧化活性,是一种理想的天然抗氧化剂,具有开发成优良抗氧化剂的前景。

参考文献

- 1 Wan DR(万定容), Chen JC(陈家春), Yu HH(余汉华). Codex of Hubei Medicina Materials(湖北药材志). Wuhan: Hubei Science and Technology Publishing Company, 2002. 533.