

荷包山桂花根化学成分研究

张国栋^{1,3}, 王腾龙^{1,3}, 魏 健⁴, 王春华^{1,2*}, 李 正²¹天津中医药大学天津市现代中药重点实验室; ²天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 300193;³天津国际生物医药联合研究院中药新药研发中心, 天津 300457; ⁴重庆市公安局物证鉴定中心, 重庆 400707

摘要: 研究荷包山桂花 75% 乙醇提取部分的化学成分。应用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶、制备高效液相等方法分离纯化化合物, 并通过核磁共振、质谱等方法对化合物进行结构分析鉴定。从荷包山桂花根 75% 乙醇提取部分分离鉴定了 10 个化合物, 分别为: 3,6'-二芥子酰基蔗糖(1)、顺式松柏苷(2)、 α -菠甾醇(3)、2'-脱氧胸苷(4)、 α -菠甾醇-3-氧- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)、 β -谷甾醇(6)、丁香酸葡萄糖苷(7)、葡萄糖(8)、蔗糖(9)、对羟基苯甲醛(10)。化合物 2~5 和 7 为首次从荷包山桂花中分离得到。采用 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 和 ABTS(2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)) 自由基清除实验对化合物 1~7、10 进行了抗氧化活性研究, 结果表明仅化合物 1 具有较强的清除自由基活性。

关键词: 荷包山桂花; 远志科; 化学成分; 结构鉴定; 抗氧化

中图分类号: R284.2; Q946

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.014

Chemical Constituents from the Roots of *Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. DonZHANG Guo-dong^{1,3}, WANG Teng-long^{1,3}, WEI Jian⁴, WANG Chun-hua^{1,2*}, LI Zheng²¹Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of TraditionalChinese Medicine; ²College of Pharmaceutical Engineering of Traditional

Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine Tianjin 300193, China ;

³Research and Development Center of traditional Chinese Medicine, Tianjin International JointAcademy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China; ⁴Chongqing Municipal Public

Security Bureau Evidence Identification Center, Chongqing 400707, China

Abstract: To investigate the chemical constituents from the 75% alcohol fraction of the roots of *Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. Don. Column chromatographies of silica gel, preparative HPLC and Sephadex LH-20 were applied to isolate the chemical constituents. Pure compounds were elucidated by means of ¹H NMR, ¹³C NMR and LC-MS. Ten compounds were isolated and identified as β -D-(3-O-sinapoyl)-fructofuranosyl- α -D-(6-O-sinapoyl)-glucopyranoside (1), *cis*-coniferin (2), α -spinasterol (3), 2'-deoxythymidine (4), α -spinasteryl 3-O- β -D-glucopyranoside (5), β -sitosterol (6), glucosyringic acid (7), glucose (8), sucrose (9), *p*-hydroxybenzaldehyde (10). Compounds 2-5 and 7 were obtained from *Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. Don for the first time. The antioxidant activities of compounds 1~7 and 10 were tested by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assays, and only compound 1 exhibited moderate antioxidant activity compared to ascorbic acid.

Key words: *Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. Don; Polygalaceae; chemical constituents; structure elucidation; antioxidant

荷包山桂花 (*Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. Don) 系远志科 (Polygalaceae) 远志属 (*Polygala*) 的灌木或小乔木植物, 又称黄花远志、鸡根等。国外常见于尼泊尔、印度、锡金及东南亚地区。《本草纲

目》中载远志科植物“服之能益智强志”, 用其干燥根皮入药, 有清热解毒、祛风除湿、补虚消肿等功效。现代研究也证明远志在镇静催眠、镇咳祛痰、抗炎降压、抗诱变、改善脑功能等方面具有多种作用^[1]。我国远志属药用植物相当丰富, 有 4 属 51 种, 国内常见于西南、华南等地区, 前人对其的化学研究表明远志属药用植物含有多种类别成分, 主要有皂苷类、

酮类、香豆素类、黄酮类、木脂素类、生物碱类及糖酯类等^[2]。我们对荷包山桂花的研究中,分离得到 10 个化合物,分别鉴定为 3,6'-二芥子酰基蔗糖(1)、顺式松柏苷(2)、 α -菠甾醇(3)、2'-脱氧胸苷(4)、 α -菠甾醇-3-氧- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)、 β -谷甾醇(6)、丁香酸葡萄糖苷(7)、葡萄糖(8)、蔗糖(9)和对羟基苯甲醛(10)。其中化合物 2~5 和 7 为首次从荷包山桂花中分离得到。在对分离得到的化合物进行自由基清除实验中,运用 DPPH、ABTS 自由基清除两种方法对荷包山桂花中分离得到的化合物 1~7、10 进行抗氧化活性评价,以抗坏血酸为阳性对照药,与其进行抗氧化活性的比较,结果表明化合物 1 具有一定的抗氧化活性。

1 仪器与材料

1.1 提取分离仪器与试剂

Aglient 1260 高效液相色谱仪, Aglient 1260 制备液相色谱仪, Waters 2489 制备液相色谱仪, Synapt G2 mass 质谱仪由美国 Waters 公司制造, Bruker AV-III 核磁共振波谱仪(TMS 为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz), RE-52AA 旋转蒸发器购于上海亚荣生化仪器厂, RE-5205 旋转蒸发器购于上海亚荣生化仪器厂, TH-II 型薄层加热器由上海科哲生化科技有限公司, ZF-20D 暗箱式紫外分析仪由上海顾村电光仪器厂生产, TGL-16C 飞鸽牌系列离心机购于上海安亭科学仪器厂, HHS 型电热恒温水浴锅由上海博讯实业有限公司医疗设备厂, Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶由瑞士 GE Healthcare 公司生产, 反向 C_{18} 柱层析硅胶(ODS-A-HG 5~50 μm) 由日本 YMC 公司生产, 薄层制备硅胶(GF₂₅₄ 0.4~0.5 mm) 由于成化工上海有限公司生产, 薄层层析硅胶(GF-254 10~40 μm) 购于青岛海洋化工厂, 柱层析硅胶(100~200 目, 200~300 目) 购于青岛海洋化工厂。所用试剂: 甲醇、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚均为分析纯, 购于天津市康科德化学试剂公司。

1.2 抗氧化实验试剂

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 购于上海绿叶生物科技有限公司, 甲醇(色谱纯) 购于天津市康科德化学试剂公司, 抗坏血酸(分析纯) 天津市北方天医化学试剂厂, ABTS(分析纯) 购于上海绿叶生物科技有限公司, 过硫酸钾(分析纯) 购于天津市风船化学试剂科技有限公司, 96 微孔白板由美国 Corning 公司生产。

1.3 药材

所用荷包山桂花根采自云南, 经天津中医药大学王春华副研究员鉴定为远志科植物荷包山桂花(*Polygala arillata* Buch.-Ham. ex D. Don) 的根, 样品储存于天津中医药大学滨海实验室药材库。

2 提取和分离

干燥荷包山桂花根 15 kg, 粉碎后加入 75% 乙醇加热回流, 每次加热回流 3 h, 共提取 3 次, 合并提取液减压浓缩成流浸膏。所得流浸膏加水制成混悬液, 分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 各萃取 3 次合并各部分萃取液减压浓缩, 分别得到石油醚部分(80 g), 乙酸乙酯部分(138 g) 和正丁醇部分(152 g)。正丁醇层浸膏经硅胶柱层析以二氯甲烷-甲醇按一定比例梯度(二氯甲烷-甲醇: 100:0, 100:1, 100:3, 100:5, 100:7, 10:1, 8:2, 7:3, 1:1) 洗脱划分为 Fr. 1~9 共 9 个组分。Fr. 7(2.3 g) 经 Sephadex LH-20 反复柱色谱, 以水为洗脱剂, 再经制备液相色谱, 以 6% 乙腈为洗脱剂, 得到化合物 4(7 mg)。其余部分采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(甲醇-水梯度洗脱)、HPLC 制备与半制备(甲醇-水洗梯度脱)、薄层色谱等方法得到化合物 1(20.0 mg)、2(30.4 mg)、3(20.1 mg)、5(27.1 mg)、6(24.0 mg)、7(11.7 mg)、8(8.0 mg)、9(37.5 mg)、10(15.6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 753 [M-H]⁻; 推测分子式为 $C_{34}H_{42}O_{19}$; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 3.50 (1H, ddd, J = 9.8, 3.9, 2.3 Hz, H-2'), 3.61 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-1a), 3.63 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-1b), 3.78-3.96 (13H, m), 4.23 (1H, dd, J = 11.6, 7.2 Hz, H-6'a), 4.68 (1H, dd, J = 11.6, 1.5 Hz, H-6'b), 4.65-4.71 (1H, m, H-6'), 5.53 (1H, d, J = 3.7 Hz, H-1'), 6.42-6.52 (2H, m, H-8'', H-8'''), 6.89 (1H, s, H-2'''), 6.93 (1H, s, H-2''), 7.61 (1H, dd, J = 15.9, 6.7 Hz, H-7'''), 7.69 (1H, dd, J = 15.8, 7.7 Hz, H-7''); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 56.5 (C-3'''' -MeO), 56.8 (C-5'''' -MeO), 56.9 (C-3''' -MeO), 56.9 (C-5''' -MeO), 63.8 (C-6), 65.6 (C-6'), 65.7 (C-1), 71.9 (C-4'), 72.5 (C-5'), 73.1

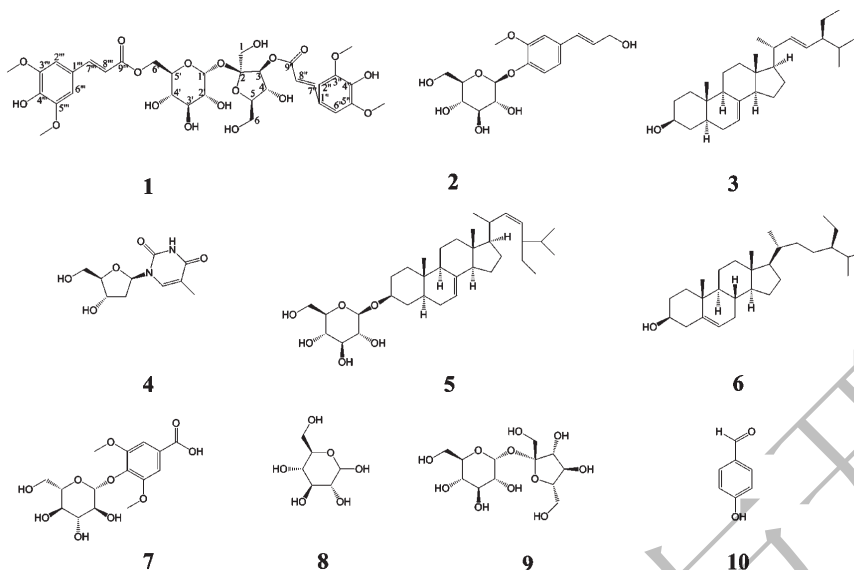


图1 化合物1~10的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-10

(C-2'), 74.2 (C-4), 75.1 (C-3'), 79.3 (C-3), 84.3 (C-5), 92.7 (C-1'), 104.8 (C-2), 106.9 (C-6''), 107.1 (C-6'''), 112.1 (C-8''), 115.0 (C-8'''), 126.6 (C-1''), 126.6 (C-1'''), 139.5 (C-4''), 139.6 (C-4'''), 147.3 (C-7''), 147.9 (C-7'''), 149.4 (C-5''), 149.4 (C-5'''), 168.2 (C-9''), 169.1 (C-9'''). NMR 数据与3,6'-二芥子酰基蔗糖文献^[3]报道一致,故鉴定化合物1为3,6'-二芥子酰基蔗糖。

化合物2 白色无定形粉末(甲醇); mp. 184 ~ 185 °C; ESI-MS m/z : 365 [M + Na]⁺; 推测分子式为 C₁₆H₂₂O₈。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 3.31 (1H, m, H-5 of Glc), 3.41 (1H, m, H-2 of Glc), 3.49 (1H, m, H-4 of Glc), 3.69 (1H, dd, J = 12.1, 5.1 Hz, H-6b of Glc), 3.83 (1H, dd, H-6a of Glc), 3.86 (6H, m, 2MeO), 4.35 (2H, dd, J = 6.6, 1.8 Hz, H-9a, H-9b), 4.59 (1H, s, H-1 of Glc), 5.78 (1H, dt, J = 11.7, 6.4 Hz, H-8), 6.49 (1H, d, J = 11.7 Hz, H-7), 6.78 (2H, s, H-2, 6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 56.8 (MeO), 59.9 (C-9), 62.5 (C-6 of Glc), 71.3 (C-4 of Glc), 74.9 (C-2 of Glc), 77.9 (C-3 of Glc), 78.2 (C-5 of Glc), 102.7 (C-1 of Glc), 114.4 (C-2, 6), 122.9 (C-8), 131.0 (C-7), 131.9 (C-1), 133.2 (C-4), 150.5 (C-3, 5)。NMR 数据与顺式松柏苷文献^[4]报道一致,故鉴定化合物2为顺式松柏苷。

化合物3 白色无定形粉末(氯仿); ESI-MS m/z : 435 [M + Na]⁺; 分子式为 C₂₉H₄₈O; ¹H NMR (400 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 0.63 (3H, s, H-18), 0.70 ~ 1.00 (12H, m, H-19, 26, 27, 29), 1.11 (3H, m, H-21), 3.88 (1H, m, H-3), 5.00 (1H, m, H-1'), 5.10 (1H, m, H-7), 5.23 (1H, m, H-22); ¹³C NMR (100 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 12.7 (C-1), 12.9 (C-18), 13.7 (C-19), 19.6 (C-27), 21.7 (C-26), 22.1 (C-21), 22.3 (C-11), 23.8 (C-15), 26.1 (C-28), 29.4 (C-16), 30.6 (C-6), 32.9 (C-25), 34.9 (C-10), 38.1 (C-1), 39.5 (C-4), 40.1 (C-12), 41.1 (C-5), 41.6 (C-20), 43.9 (C-13), 50.2 (C-9), 51.9 (C-24), 55.8 (C-14), 56.5 (C-17), 70.7 (C-3), 118.4 (C-7), 130.1 (C-23), 139.1 (C-22), 140.1 (C-8)。NMR 数据与文献^[5]报道一致,故鉴定该化合物3是α-菠甾醇。

化合物4 白色粉末(甲醇), mp. 186 ~ 188 °C; ESI-MS m/z : 243 [M + H]⁺; 推测分子式为 C₁₀H₁₄N₂O₅; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.74 (3H, s, Me-5), 2.03 (2H, m, H-2'), 3.48 ~ 3.60 (2H, m, H-5'a, 5'b), 3.72 (1H, s, H-4'), 4.20 (1H, s, H-3'), 6.13 (1H, m, H-1'), 7.66 (1H, s, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.3 (Me-5), 39.5 (C-2'), 61.3 (C-5'), 70.4 (C-3'), 83.7 (C-1'), 87.5 (C-4'), 109.4 (C-5), 136.1 (C-6), 150.5 (C-4), 163.8 (C-2)。NMR 数据与2'-脱氧胸苷文

献^[6]报道一致,故鉴定该化合物**4**是2'-脱氧胸苷。

化合物5 白色片状结晶(二氯甲烷-甲醇); ESI-MS m/z : 575 $[M + H]^+$; 推测分子式为 $C_{35}H_{58}O_6$; 1H NMR (400 MHz, Pyridine- d_5) δ : 0.61 (3H, s, H-18), 0.74 (3H, s, H-19), 0.80-1.30 (9H, m, H-29, 27, 26), 1.10 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 4.04 (1H, m, H-3), 5.00 (1H, m, H-1'), 5.08 (1H, m, H-23), 5.21 (1H, m, H-22); ^{13}C NMR (100 MHz, Pyridine- d_5) δ : 12.7 (C-18), 13.0 (C-29), 13.6 (C-19), 19.7 (C-27), 21.8 (C-26), 22.1 (C-11), 22.2 (C-21), 23.8 (C-15), 26.2 (C-28), 29.4 (C-16), 30.5 (C-2), 30.5 (C-6), 32.7 (C-25), 35.0 (C-10), 35.2 (C-4), 37.8 (C-1), 40.1 (C-12), 40.7 (C-5), 41.6 (C-20), 43.9 (C-13), 50.1 (C-9), 51.9 (C-24), 55.8 (C-14), 56.5 (C-17), 63.4 (Glc-C-6'), 72.3 (Glc-C-4'), 75.9 (Glc-C-2'), 77.6 (C-3), 79.0 (Glc-C-3'), 79.2 (Glc-C-5'), 102.8 (Glc-C-1'), 118.3 (C-7), 130.1 (C-23), 136.3 (C-22), 139.2 (C-8)。NMR 数据与文献^[7]报道一致,故鉴定该化合物**5**为 α -菠甾醇-3-氧- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物6 白色针状结晶(甲醇); mp. 139 ~ 140 °C。与 β -谷甾醇对照品在薄层板上展开, R_f 值完全一致,显色以硫酸乙醇溶液加热显色后显色相同。NMR 数据与文献^[8]报道一致,故鉴定该化合物**6**为 β -谷甾醇。

化合物7 白色无定形粉末(甲醇); ESI-MS m/z : 383 $[M + Na]^+$; 推测分子式为 $C_{15}H_{20}O_{10}$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.10 (1H, m, Glc-H-4'), 3.16 (1H, m, Glc-H-3'), 3.23 (1H, m, Glc-H-2'), 3.42 (1H, m, Glc-H-5'), 3.60 (1H, m, Glc-H-6'a), 3.83 (6H, s, 2OMe), 4.32 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, Glc-H-6'b), 5.12 (1H, m, Glc-H-1'), 7.25 (2H, s, H-2, 6); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 56.4 (2OMe), 60.8 (C-6'), 69.9 (C-4'), 74.2 (C-2'), 76.6 (C-3'), 77.4 (C-5'), 101.9 (C-1'), 107.3 (C-2, 6), 125.6 (C-1), 138.2 (C-4), 152.2 (C-3, 5), 166.9 (C-7)。以上数据与丁香酸葡萄糖苷文献^[9]报道一致,故鉴定化合物**7**为丁香酸葡萄糖苷。

化合物8 白色颗粒状结晶(甲醇-水); mp. 145 ~ 147 °C。以葡萄糖标准品与化合物**8**同一块薄层板对照, R_f 值相同,斑点显色颜色相同。混合熔点不下降; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 61.2

(C-6), 70.6 (C-4), 71.9 (C-2), 72.4 (C-3), 73.1 (C-5), 92.2 (C-1)。与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物**8**为葡萄糖。

化合物9 白色块状结晶(甲醇-水); mp. 186 ~ 187 °C; 1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 2.78 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7), 3.75 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 6.76 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 7.09 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 60.9 (C-5), 62.5 (C-6'), 62.6 (C-6), 70.3 (C-4'), 72.1 (C-2'), 73.3 (C-3'), 73.4 (C-5'), 74.8 (C-4), 77.5 (C-3), 83.0 (C-2), 92.2 (C-1'), 104.5 (C-1)。NMR 数据与文献^[11]中蔗糖报道一致,故鉴定化合物**9**为蔗糖。

化合物10 白色结晶(丙酮); mp. 112 ~ 116 °C; ESI-MS m/z : 145 $[M + Na]^+$; 分子式为 $C_7H_6O_2$; 1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.90 (2H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3, 5), 7.76 (2H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2, 6), 9.75 (1H, s, -CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 116.9 (C-3, 5), 129.0 (C-1), 133.4 (C-2, 6), 161.2 (C-4), 192.8 (-CHO)。对照 NMR 数据与文献^[12]中对羟基苯甲醛报道一致,故鉴定化合物**10**为对羟基苯甲醛。

4 抗氧化活性

DPPH 和 ABTS 自由基的清除方法常被用来评价天然产物的抗氧化活性。DPPH 自由基是一种合成的稳定的以氮原子为中心的自由基,由于具有3个苯环的共轭稳定作用和空间障碍效应,使氮原子电子单个存在。清除 DPPH 自由基试验为抗氧化剂和 DPPH 自由基中的孤对电子配对,颜色由紫色消失变为黄色,使测得的紫外 517 nm 波长处吸光度变小,抗氧化剂的清除能力越强吸光度越小。因为其结构简单并且容易控制反应,所以清除 DPPH 自由基方法成为抗氧化活性评价和筛选应用最广泛的方法之一。ABTS 与过硫酸铵氧化作用会产生 ABTS \cdot^+ , 这种单阳离子自由基可以在 734 nm 处形成一个蓝/绿发色团。抗氧化剂加入到预先形成的 ABTS \cdot^+ 中,一段时间后,ABTS \cdot^+ 变为 ABTS,其变化程度的大小主要取决于样品的抗氧化活性和浓度,通常以 734 nm 处的吸光度来表示褪色的程度,以百分率(%)表示 ABTS \cdot^+ 的抑制率^[13]。本实验首次研究从荷包山桂花中分离得到的化合物的自由基清除作用。

4.1 样品、试剂

4.1.1 样品

化合物 **1**~**7**、**10**, 样品纯度均在 90% 以上。

4.1.2 供试品溶液的配制

4.1.2.1 DPPH 自由基溶液的配制

0.25 mmol/L DPPH 甲醇溶液:精密称取 DPPH 试剂 5.02 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 甲醇溶解, 并定容至刻度, 混匀, 即得, 现配现用。

4.1.2.2 ABTS 自由基溶液的配制

7.0 mmol/L ABTS 甲醇溶液:精密称取 ABTS 38.40 mg, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 50% 甲醇水溶解, 并定容至刻度, 混匀, 即得, 现配现用。

4.1.2.3 K₂S₂O₈ 溶液的配制

精密称取过硫酸钾 (K₂S₂O₈) 6.63 mg, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 50% 甲醇水溶解, 并定容至刻度, 混匀, 即得。

4.1.2.4 0.88 mmol/L ABTS 自由基溶液的配制

等体积的 ABTS 甲醇溶液和 K₂S₂O₈ 溶液混合, 置于棕色容量瓶中, 混匀, 静置。反应 20 h 后, 用甲醇按照 1:3 的比例稀释得供试液。

4.1.2.5 样品的配置

将上述 8 个从荷包山桂花中分离得到的单体分别精密称量加入适量溶剂超声溶解, 用甲醇定容, 得到母液, 再以合适比例进行稀释, 分成若干个梯度浓度, 得到供试的样品溶液。

4.2 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性的实验方法

实验共分为药物组、DPPH(ABTS)对照组、空白对照组, 每组 3 个复孔, 药物组依次加入不同浓度的样品溶液各 50 μL, 加入 150 μL DPPH(ABTS) 甲醇溶液; 为了消除药物本身的影响, 空白对照组依次加入不同浓度样品溶液各 50 μL, 各加入 150 μL 甲醇溶液。而 DPPH(ABTS) 对照组则加入 50 μL 甲醇

和 150 μL DPPH 甲醇溶液 (ABTS 溶液)。各样品组置于多功能读板机中, 每隔 1 min 记录一次吸光度值。所有实验均平行操作 3 次, 计算其清除率。抗坏血酸被使用作为本实验的阳性对照。

DPPH 自由基清除活性实验的反应条件在 517 nm 波长处测定, 于微孔板中先加入样品溶液, 再用排枪统一加入 DPPH 自由基溶液, 在 37 °C 下记录 45 min 内吸光度变化情况, 并计算清除率, 绘制出剂量-效应曲线, 并由此计算 IC₅₀ 值^[14]。

ABTS 自由基清除活性实验的反应条件在 734 nm 波长处测定吸光度值, 于微孔板中先加入样品溶液, 再统一加入 ABTS 自由基溶液, 在 37 °C 下, 记录 20 min 吸光度值的变化情况。根据前述公式计算出清除率, 得到剂量-效应曲线并计算 IC₅₀ 值^[15]。

DPPH (ABTS) 自由基清除活性计算公式如下:

$$\text{DPPH (ABTS) 自由基清除活性 (SR\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / \text{OD}_{\text{对照}}] \times 100\%$$

其中 OD_{样品} 是 DPPH (ABTS) 自由基 + 样品吸光度值, OD_{空白} 是甲醇 + 样品吸光度值, OD_{对照} 是 DPPH (ABTS) 自由基 + 甲醇吸光度值。当 SR% = 50% 时, 求出的浓度为 IC₅₀ 值。IC₅₀ (半数抑制率) 是值清除率达到一半时所需要样品的浓度, 由剂量曲线计算得出, 是评价抗氧化活性的重要指标之一。

4.3 实验结果

根据荷包山桂花分离的部分化合物的 DPPH (ABTS) 自由基清除活性测定结果表明大部分化合物抗氧化能力较弱, 其中以化合物 **1** (3,6'-二芥子酰基蔗糖) 显示出较强的抗氧化活性。化合物 **1** 的剂量和效应曲线如下图 2 所示。

阳性药抗坏血酸的剂量和效应曲线如下图 3 所示。

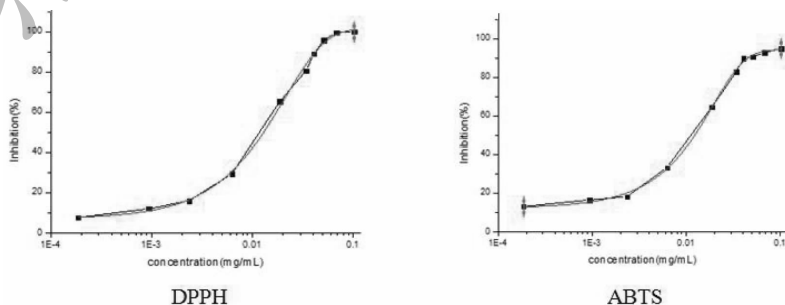


图2 化合物 **1** 的剂量和效应曲线

Fig.2 The dose and effect curve of compound **1**

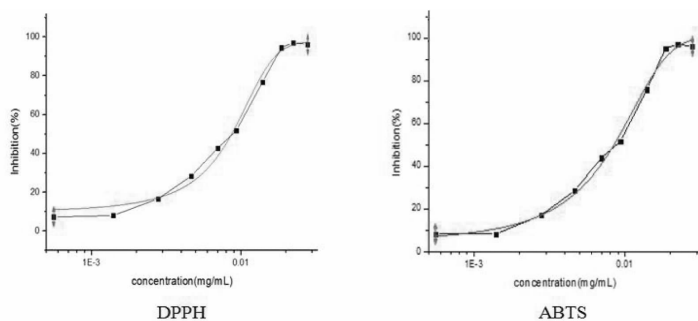


图3 抗坏血酸的剂量和效应曲线

Fig. 3 The dose and effect curve of ascorbic acid

化合物 **1** 的 DPPH 自由基清除的 $IC_{50} = 0.01294$ mg/mL, ABTS 自由基清除的 $IC_{50} = 0.01236$ mg/mL; 抗坏血酸的 DPPH 自由基清除 $IC_{50} = 0.0086$ mg/mL, ABTS 自由基清除的 $IC_{50} = 0.00845$ mg/mL。另外以 DPPH 自由基清除和 ABTS 自由基清除两种方法对化合物 **3**、**5**、**6** 抗氧化试验中, 发现其抗氧化能力较弱, 而化合物 **2** (顺式松柏苷) 和化合物 **7** (丁香酸葡萄糖苷) 在较低浓度时显示出较化合物 **3**、**5**、**6** 强的抗氧化活性。

5 结论

荷包山桂花作为远志属药材的一个重要品种来源, 特别是作为苗、壮等少数民族用药, 有着悠久的历史 and 广泛的应用, 对多种疾病有着很好的疗效^[16]。由于远志属植物适应性较强, 地域范围较广, 且远志属植物种类较多, 这些因素导致其种间植株所含有化学成分及含量并不完全一致, 同种植株其不同部位所含化学成分及含量也有不同, 这对用药的质量规范会产生一定的影响。故对远志属植物化学成分研究一直以来是药物研究者所关注的重点, 本课题组在总结前人经验的基础上, 就荷包山桂花根的乙醇提取物的正丁醇萃取部分进行了深入系统的研究, 并从中分离鉴定了 10 个化合物, 其中化合物 **2**~**5** 和 **7** 为首次从荷包山桂花种中分离得到。在抗氧化实验中, 对其中的 8 个化合物进行了抗氧化活性筛选, 以 DPPH、ABTS 自由基清除两种方法进行比较, 发现仅化合物 **1** 具有较强的抗氧化活性。本研究阐述了荷包山桂花的化学成分的组成及抗氧化药理活性, 为进一步的定性定量分析, 更多药理活性筛选及构效关系的探讨提供了一定的物质基础, 同时也为荷包山桂花进一步开发研究提供了一定的科学研究数据。

参考文献

- 1 Compilation of Chinese medicinal materials company. The Chinese traditional medicine resource records (中国中药资源志要) [M]. Beijing: Science Press, 1990: 662-666.
- 2 Li J (李军), Wang J (王珺), Jiang Y (姜勇), et al. Chemical constituents from roots of *Polygala tricornis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36: 1124-1126.
- 3 Zhao D (赵迪), Geng YY (耿圆圆), Wang JM (王军民), et al. Oligosaccharide polyesters from *Polygala crotalarioides* [J]. *Chin J Ethn Ethn* (中国民族民间医药), 2015, 24 (16): 13-16.
- 4 Anke D, Gisela V, Vincenz G, et al. Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defence against *Cryptococcus fagisuga* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(1): 51.
- 5 Yuan L (袁琳), Wang W (王微), Shen F (沈放), et al. Chemical constituents in effective proportion of *Psammosilene tunicoides* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(14): 92-94.
- 6 Wen B (文波), Li B (李博), Shen YH (沈云亨). Chemical constituents from the aerial parts of *Psammosilene tunicoides* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 675-678.
- 7 Xiong J (熊江), Zhou J (周俊), Dai HF (戴好富), et al. Chemical constituents from *Phytolacca polyandra* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2002, 24: 401-405.
- 8 Huang Y (黄艳), Chai L (柴玲), Jiang XZ (蒋秀珍), et al. Chemical constituents in roots and rhizomes of *Curacuma aromatic* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45: 2307-2311.
- 9 Su DM (苏东敏), Tang WZ (唐文照), Yu SS (庾石山), et al. Water-soluble constituents from roots of *Capparis tenera* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 1021-1023.