

牛筋果中酚性化合物及其对 DPPH 自由基的清除活性

唐小涵^{1,2}, 陈艳妮², 汤红玉^{1,2}, 李博婷², 汪云松¹, 曾 英², 郝小江², 邸迎彤^{2*}¹云南大学化学科学与工程学院, 昆明 650091;²中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

摘要: 本文对牛筋果 *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. 中的酚性成分及其抗氧化活性进行了研究。从牛筋果小枝中分离得到了 14 个酚性化合物, 分别鉴定为: 去甲丁香色原酮(1)、柴胡色原酮 A(2)、5,7-dimethoxy-2-methylchromone(3)、2-hydroxymethylalloptaeroxylin(4)、羟苯乙酯(5)、苯丙酮(6)、cephafortin B(7)、去氢双松柏醇(8)、hawthornnin C(9)、hawthornnin D(10)、丁香树脂酚(11)、皮树脂醇(12)、4-ketopinonesinol(13)、罗汉松脂酚(14)。化合物 1,3,5~10 和 12~13 共 10 个化合物为首次从植物牛筋果中分离得到。使用 DPPH 法筛选了化合物的抗氧化活性, 其中, 化合物 13 和 14 抗氧化活性优于阳性对照(其 EC₅₀ 值分别为 53.88 ± 5.34 和 32.67 ± 3.96 μM), 并对其构效关系进行了初步探讨。该结果为牛筋果的深度开发利用提供了理论依据。

关键词: 牛筋果; 化学成分; 酚性化合物; 抗氧化活性; 构效关系。

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)10-1738-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.10.010

Phenolic compounds from *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. and their DPPH radical scavenging antioxidant activityTANG Xiao-han^{1,2}, CHEN Yan-ni², TANG Hong-yu^{1,2},LI Bo-ting², WANG Yun-song¹, ZENG Ying², HAO Xiao-jiang², DI Ying-tong^{2*}¹School of Chemical Science and Engineering, Yunnan University, Kunming 650091, China;²State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

Abstract: The study was focus on the phenolic compounds of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. and their antioxidant activity. Fourteen compounds were isolated from the branches of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. by various column chromatography. Their structures were identified as noreugenin (1), saikochromone A (2), 5,7-dimethoxy-2-methylchromone (3), 2-hydroxymethylalloptaeroxylin (4), ethylparaben (5), propiophenone (6), cephafortin B (7), dehydroconiferyl alcohol (8), hawthornnin C (9), hawthornnin D (10), syringaresinol (11), medioresinol (12), 4-ketopinonesinol (13) and matairesinol (14) based on ESI-MS, ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data. Among them, compound 1,3,5-10, and 12-13 were isolated from this plant for the first time. In addition, DPPH radical scavenging method was used to evaluate antioxidant activity, compound 13 and 14 showed strong DPPH free radical scavenging capacity. And then, we discussed the structure activity relationship of these phenolic compounds. The results provided a theoretical basis for deep development and utilization of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.

Key words: *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.; chemical constituents; phenolic compounds; antioxidant activity; structure activity relationship

牛筋果 *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. 是苦木科牛筋果属植物, 该属植物全球共四种, 产热带非

洲、热带亚洲和大洋洲。我国只产一种, 多产福建、广东和海南等地; 常见于低海拔的灌木林和疏林中^[1]。牛筋果根、茎、叶均可入药, 具有清热、解毒、截疟等功效, 在民间常用于治疗疟疾、疮痍、外感风热、咳嗽、咯痰及咽喉肿痛等^[2,3]。目前, 国内外学

收稿日期: 2019-06-17 接受日期: 2019-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(3177011633)

* 通信作者 Tel: 86-871-65223070; E-mail: diyt@mail.kib.ac.cn

者在对牛筋果化学成分的研究中发现,其根、茎、叶富含色原酮、聚酮、香豆素类、柠檬苦素类以及苦木素类化合物^[4,5],同时发现其粗提物表现出很好的抗疟活性和选择性^[6]、昆虫拒食活性和杀蚊活性^[7,8]以及一定的抗菌活性^[9]。该属植物的化学成分研究主要集中在具有环系复杂多变、重排现象普遍特点的柠檬苦素成分^[10,11]以及苦木科的特征性次生代谢产物苦木素上。本课题组在前期的研究中分离鉴定了具有优异杀虫活性的新颖结构 C-25 型苦木素 perforalactone A^[12]以及具有新颖骨架类型的柠檬苦素类化合物 perforanoid A^[13]。为了寻找植物牛筋果中的活性化学成分,作者对牛筋果小枝的乙酸乙酯部位进行了研究,从中分离鉴定了 14 个酚性化合物,其中化合物 **1**、**3**、**5** ~ **10**、和 **12** ~ **13** 共 10 个化合物为首次从牛筋果中分离得到。本研究进一步丰富了牛筋果的化学成分多样性,为牛筋果资源的深入开发利用提供了一定的依据。

1 仪器、试剂与材料

¹H 和 ¹³C NMR 谱由 DRX-500 和 Avance III-600 型超导核磁共振仪 (Bruker, 德国) 测定;ESI 由岛津 UPLC-IT-TOF 液相-离子阱飞行时间质谱联用仪 (Shimadzu, 日本) 测定;HPLC 分离用安捷伦 1260 液相色谱仪 (Agilent, 美国) 开展,色谱柱为沃特世 XSelect CSH C₁₈ (5 μm, 10 × 250 nm);凝胶 Sephadex LH-20 (40 ~ 70 μm) 购自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司;反向填充材料 Lichrorep RP-18 gel (40 ~ 63 μm) 购自德国默克公司;柱层析用硅胶 (100 ~ 200 目, 200 ~ 300 目, 300 ~ 400 目), 薄层层析硅胶板 (GF254) 购自青岛海洋化工厂;甲醇, 乙酸乙酯, 丙酮, 二氯甲烷, 石油醚等有机溶剂均为工业纯经重蒸后使用;液相甲醇和液相乙腈购自新蓝景公司;显色剂为 10% 的硫酸-乙醇溶液。

TECAN Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 (TECAN, 瑞士);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;水溶性维生素 E (Trolox) 购自上海碧云天生物技术有限公司;二甲基亚砜 (分析纯) 购自西陇科学股份有限公司。

牛筋果 *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. 的枝叶于 2018 年 1 月采自海南;植物样品由海南热带生物技术研究所在黄圣卓副研究员采集并鉴定。标本 (NO. 20180104) 存放于昆明植物研究所植物化学国家重点实验室。

2 实验方法

2.1 提取与分离

牛筋果植物样品采自牛筋果茎 100 kg。粉碎后经甲醇回流提取三次,合并提取液减压回收溶剂。将浓缩后的提取物加水悬浮,分别用石油醚和乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯萃取物 (1000 g) MCI 小孔树脂进行脱色,采用甲醇-水 (30% ~ 100%) 梯度洗脱后经 TLC 检测合并分为 5 个部分 (Fr.1 ~ 5)。Fr.3 部分经正相硅胶柱层析 (石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱) 分为 5 个流分 (Fr. 3.1 ~ Fr. 3.5)。Fr. 3.2 部分利用重结晶方法分离得到化合物 **1** (76 mg) 和 **2** (25 mg)。Fr. 3.3 经 RP-18 反相色谱层析,水-甲醇 (30% ~ 100%) 梯度洗脱, TLC 检验合并相同流分得到 6 个流分 (Fr. 3.3.1 ~ Fr. 3.3.6)。Fr. 3.3.1 经半制备 HPLC (Waters X-Select CSH C-18, 5 μm, 10 × 250 nm, 3 mL/min, acetonitrile:H₂O = 25%) 得到化合物 **7** (4.1 mg)。Fr. 3.3.2 部分经反复 Sephadex LH-20 柱 (甲醇) 凝胶层析及正相硅胶柱色谱层析后,经半制备 HPLC (Waters X-Select CSH C-18, 5 μm, 10 × 250 nm, 3 mL/min, acetonitrile:H₂O = 28%) 得到化合物 **8** (11 mg)、**9** (2.2 mg) 和 **10** (2.1 mg)。Fr. 3.3.4 部分经 Sephadex LH-20 柱 (二氯甲烷:甲醇 = 1:1) 凝胶层析后得到化合物 **4** (26.5 mg)。Fr. 3.3.5 部分经 Sephadex LH-20 柱 (二氯甲烷:甲醇 = 1:1) 凝胶层析和正相硅胶板色谱层析后得到化合物 **5** (13.7 mg) 和 **6** (34.6 mg)。Fr.4 部分经正相硅胶柱层析,二氯甲烷:甲醇 (120:1 ~ 0:1 梯度洗脱) 分为 3 个流分 (Fr. 4.1 ~ Fr. 4.3)。Fr. 4.2 经 RP-18 反相色谱层析,水-甲醇 (30% ~ 100%) 梯度洗脱, TLC 检验合并相同流分得到 5 个流分 (Fr. 4.2.1 ~ Fr. 4.2.5)。Fr. 4.2.2 部分经反复 Sephadex LH-20 柱 (甲醇) 凝胶层析及硅胶柱色谱层析后,经半制备 HPLC (Waters X-Select CSH C-18, 5 μm, 10 × 250 nm, 3 mL/min, acetonitrile:H₂O = 30%) 纯化得到化合物 **3** (2 mg)、**11** (25.4 mg)、**12** (1.5 mg)。Fr. 4.2.3 部分经反复凝胶及硅胶柱色谱层析后得到化合物 **13** (12.8 mg) 和 **14** (16.1 mg)。

2.2 DPPH 自由基清除活性

本实验参考 Brand-williams 等^[14,15]报道的方法并加以改进。精密配置 2 mM 浓度的 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 溶液作为储备液待用。将样品溶解于 DMSO 溶液,配置成 10 mg/mL 作为样品母液。实验过程中,将 DPPH 储备液稀释 10 倍至 0.2

μM , 得到 DPPH 工作液; 将样品母液逐级稀释配制浓度梯度的样品溶液, 以 Trolox 作为阳性对照; 配制反应体系: 取样品溶液 $100 \mu\text{L}$ 及 DPPH 溶液 $100 \mu\text{L}$, 室温下震荡混匀, 在 96 孔板中室温避光反应 30 min 后, 用酶标仪测量各孔在 517 nm 处的吸光值, 平行测定三次。DPPH 自由基清除率 = $[A_0 - (A_1 -$

$A_2)] / A_0 \times 100\%$, 其中 A_0 为以相同体积甲醇代替样品溶液的阴性对照组吸光值, A_1 为加样组的吸光值, A_2 为甲醇代替 DPPH 工作液的空白组吸光值。初筛浓度为 $500 \mu\text{M}$, 对初筛清除率大于 50% 的化合物进行复筛, 使用 GraphPad Prism7 软件计算半数有效浓度 (EC_{50})。

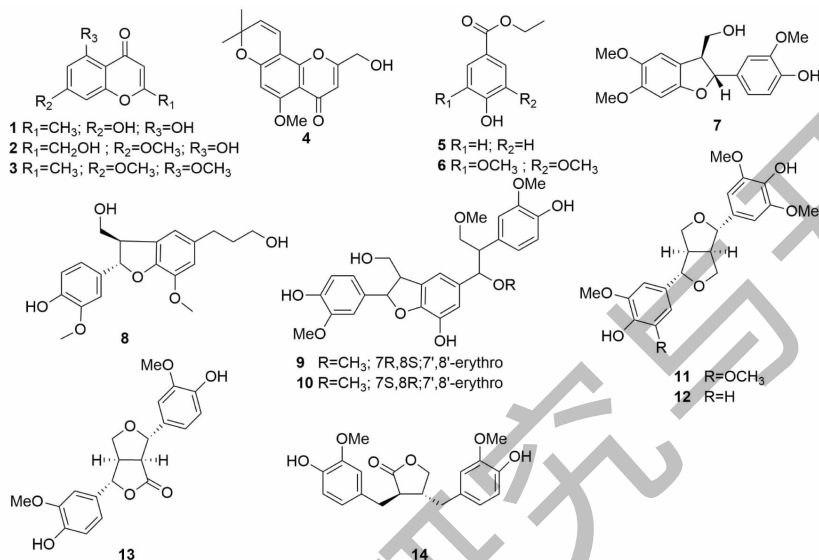


图 1 化合物 1~14 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-14

3 结果与讨论

3.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末; ESI-MS: m/z 191 $[M - H]^-$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ : 6.29 (1H, d, $J = 2.1$, H-2), 6.18 (1H, d, $J = 2.1$, H-5), 6.01 (1H, s, H-7), 2.32 (3H, s, H-CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ : 183.9 (C-1), 169.1 (C-6), 166.0 (C-3), 163.3 (C-8), 159.9 (C-4), 109.0 (C-2), 105.1 (C-9), 100.1 (C-8), 95.0 (C-5), 20.3 (CH₃)。以上数据与文献^[16]报道一致, 故鉴定为去甲丁香色原酮 (noreugenin)。

化合物 2 白色粉末; ESI-MS: m/z 221 $[M - H]^-$, 分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 6.48 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2), 6.31 (2H, m, H-5, H-7), 4.53 (2H, d, $J = 4.8$ Hz, H-3-CH₂OH), 3.89 (3H, s, H-6-OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 184.3 (C-1), 171.5 (C-3), 166.6 (C-6), 163.1 (C-8), 158.8 (C-4), 106.6 (C-2), 98.6 (C-7), 93.0 (C-5), 61.1 (C-3-CH₂OH), 56.4 (C-6-OCH₃)。以上数据与文献^[17]报道一致, 故鉴

定为柴胡色原酮 A (Saikochromone A)。

化合物 3 黄色油状; ESI-MS: m/z 243 $[M + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.42 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-5), 6.33 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2), 6.01 (1H, s, H-7), 3.93 (s, 3H, H-8-OCH₃), 3.87 (s, 3H, H-6-OCH₃), 2.27 (s, 3H, H-3-CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 177.5 (C-1), 163.7 (C-2), 163.0 (C-6), 160.9 (C-4), 160.2 (C-8), 112.0 (C-2 and C-9), 95.9 (C-7), 92.6 (C-5), 56.4 (C-8-OCH₃), 55.7 (C-6-OCH₃), 19.8 (C-3-CH₃)。以上数据与文献^[18]报道一致, 故鉴定为 5,7-二甲氧基-2-甲基色原酮。

化合物 4 白色粉末; ESI-MS: m/z 311 $[M + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.43 (6H, s, gem-Me), 3.87 (3H, s, H-OMe), 4.49 (2H, s, H-CH₂OH), 5.52 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-3'), 6.21 (1H, s, H-3), 6.26 (1H, s, H-6), 6.61 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-4'); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 178.3 (C-4), 165.6 (C-2), 160.4 (C-8a), 157.9 (C-8), 153.9 (C-4a), 127.3 (C-3'),

115.0 (C-4'), 109.6 (C-3), 108.5 (C-8), 102.4 (C-4a), 96.5 (C-6), 78.1 (C-2'), 60.9 (C-CH₂OH), 56.3 (C-OCH₃), 28.2 (C-gem-Me)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定为 2-hydroxymethylalloptaeroxilin。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS: m/z 165 ([M-H]⁻), 分子式 C₉H₁₀O₃; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-2, 6), 6.86 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-3, 5), 4.33 (2H, q, J = 7.1 Hz, H-1'), 1.37 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-2'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 166.8 (C-7), 160.5 (C-4), 155.1 (C-5), 131.8 (C-2), 130.0 (C-6), 122.4 (C-1), 115.2 (C-3), 60.8 (C-1'), 14.3 (C-2')。以上数据与文献^[20]报道一致,故鉴定为羟苯乙酯 (ethylparaben)。

化合物 6 黄色粉末;ESI-MS: m/z 249 ([M + Na]⁺), 分子式 C₁₁H₁₄O₅; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.34 (2H, s, H-2, H-6), 5.93 (1H, brs, H-OH), 4.35 (2H, q, J = 7.0 Hz, H-OCH₂CH₃), 3.92 (6H, s, 2 × OCH₃), 1.38 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 166.4 (C-7), 146.6 (C-3, C-5), 139.2 (C-4), 121.4 (C-1), 106.6 (C-2, C-6), 70.0 (C-1'), 56.4 (2 × OCH₃), 14.4 (C-2')。以上数据与文献^[21]报道一致,故鉴定为苯丙酮 (propiophenone)。

化合物 7 白色粉末;ESI-MS: m/z 355 ([M + Na]⁺), 分子式 C₁₈H₂₀O₆; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.89 (1H, s, H-2), 6.89 (1H, s, H-5), 6.89 (1H, s, H-6), 6.78 (1H, s, H-6'), 6.53 (1H, s, H-3'), 5.49 (1H, d, J = 6.7 Hz, H-7), 3.90 (2H, m, H-9), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃), 3.86 (3H, s, 2'-OCH₃), 3.84 (3H, s, 1'-OCH₃), 3.54 (1H, dd, J = 11.7, 5.8 Hz, H-8), ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 154.3 (C-4'), 150.3 (C-2'), 146.7 (C-3), 145.7 (C-4), 133.5 (C-1), 119.1 (C-2), 116.1 (C-5'), 114.4 (C-5), 108.4 (C-6), 108.4 (C-6'), 95.1 (C-3'), 87.5 (C-7), 64.4 (C-9), 57.0 (C-1'), 57.0 (C-1'-OCH₃), 56.1 (C-3'-OCH₃), 56.0 (C-3-OCH₃), 53.7 (C-8)。以上数据与文献^[22]报道一致,故鉴定为 cephafortin B。

化合物 8 淡黄色粉末;ESI-MS: m/z 383 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₀H₂₄O₆; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.94 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2), 6.81 (1H, dd, J = 8.2, 1.7 Hz, H-6), 6.75 (1H, d, J = 8.1

Hz, H-5), 6.72 (2H, s, H-4', H-6'), 5.48 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-7), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.80 (1H, m, H-9b), 3.75 (1H, dd, J = 11.0, 7.2 Hz, H-9a), 3.56 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-9'), 3.46 (1H, dd, J = 12.3, 6.3 Hz, H-8), 2.62 (2H, m, H-7'), 1.81 (1H, m, H-8'); ¹³C NMR (150 MHz, MeOD) δ : 149.1 (C-3), 147.5 (C-4), 147.5 (C-2'), 145.2 (C-3'), 136.9 (C-5'), 134.8 (C-1), 129.9 (C-1'), 119.7 (C-6), 117.9 (C-6'), 116.1 (C-5), 114.0 (C-4'), 110.5 (C-2), 89.0 (C-7), 65.0 (C-9), 62.2 (C-9'), 56.7 (C-3'-OCH₃), 56.3 (C-3-OCH₃), 55.4 (C-8), 35.8 (C-8'), 32.9 (C-7')。以上数据与文献^[23]报道一致,故鉴定为去氢双松柏醇 (dehydroconiferyl alcohol)。

化合物 9 黄色油状;ESI-MS: m/z 535 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₈H₃₂O₉; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.92 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-2), 6.80 (1H, dd, J = 8.2, 1.5 Hz, H-6), 6.75 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.66 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5''), 6.59 (1H, s, H-6'), 6.58 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-2''), 6.56 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz, H-6''), 6.48 (1H, s, H-2'), 5.51 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-7), 4.52 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-7'), 3.89 (1H, dd, J = 10.7, 7.1 Hz, H-9'), 3.72 (1H, m, H-9), 3.80 (3H, s, 3-OH₃), 3.71 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.69 (3H, s, 3''-OH₃), 3.68 (1H, m, H-9'), 3.64 (1H, m, H-9), 3.44 (1H, dd, J = 12.6, 5.5 Hz, H-8), 3.18 (3H, s, 7'-OH₃), 2.84 (1H, dd, J = 12.2, 6.8 Hz, H-8'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 149.2 (C-3), 148.6 (C-4'), 148.3 (C-3''), 147.8 (C-4), 146.3 (C-4''), 145.1 (C-3'), 135.4 (C-1), 134.5 (C-1'), 132.0 (C-1''), 129.3 (C-5'), 123.2 (C-6''), 119.7 (C-6), 117.2 (C-6'), 116.2 (C-5), 115.6 (C-5''), 114.7 (C-2''), 112.7 (C-2'), 110.5 (C-2), 89.3 (C-7), 85.0 (C-7'), 65.3 (C-9), 64.3 (C-9'), 57.2 (7'-OCH₃), 56.7 (3-OCH₃), 56.5 (C-8'), 56.3 (3'-OCH₃), 56.3 (3''-OCH₃), 55.3 (C-8)。以上数据与文献^[24]报道一致,故鉴定为 hawthornnin C。

化合物 10 黄色油状;ESI-MS: m/z 535 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₈H₃₂O₉; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.90 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2), 6.78 (1H, dd, J = 8.2, 1.6 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.67 (1H, s, H-6'), 6.66 (1H, d, J = 7.7 Hz,

H-5"), 6.58 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2"), 6.57 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, H-6"), 6.47 (1H, s, H-2'), 5.49 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 4.51 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-7'), 3.89 (1H, dd, $J = 10.7, 6.9$ Hz, H-9'), 3.80 (1H, dd, $J = 10.9, 5.7$ Hz, H-9), 3.79 (3H, s, H-3-OCH₃), 3.72 (3H, s, H-3'-OH₃), 3.68 (3H, s, H-3"-OCH₃), 3.73 (1H, dd, $J = 11.1, 7.3$ Hz, H-9'), 3.66 (1H, dd, $J = 10.8, 6.8$ Hz, H-9), 3.45 (1H, dd, $J = 12.3, 6.3$ Hz, H-8), 3.18 (3H, s, 7'-OH₃), 2.87 (1H, dd, $J = 12.5, 6.6$ Hz, H-8'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 149.7 (C-3), 149.3 (C-4'), 148.7 (C-3"), 148.5 (C-4), 146.7 (C-4"), 145.1 (C-3'), 135.2 (C-1), 133.4 (C-1'), 131.8 (C-1"), 129.6 (C-5'), 123.2 (C-6"), 119.9 (C-6), 117.2 (C-6'), 116.6 (C-5), 115.7 (C-5"), 114.7 (C-2"), 112.7 (C-2'), 110.5 (C-2), 89.4 (C-7), 85.0 (C-7'), 65.0 (C-9), 64.3 (C-9'), 57.2 (C-7'-OCH₃), 56.5 (C-3-OCH₃), 56.4 (C-8'), 56.4 (C-3-OCH₃), 56.3 (C-3'-OCH₃), 55.2 (C-8)。以上数据与文献^[24]报道一致,故鉴定为 hawthornin D。

化合物 11 白色粉末;ESI-MS: m/z 441 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₂H₂₆O₈; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ : 6.65 (4H, s, H-2', 2", 6', 6"), 4.71 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, H-2, 6), 4.26 (2H, dd, $J = 8.9, 6.8$ Hz, H-4, 8), 3.87 (2H, dd, $J = 9.1, 3.3$ Hz, H-4, 8), 3.84 (12H, s, 4 × OCH₃), 3.14 (2H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1, 5); ¹³C NMR (150 MHz, MeOD) δ : 149.4 (C-3', 3", 5', 5"), 136.5 (C-4', 4"), 132.9 (C-1', 1"), 104.5 (C-2', 2", 6', 6"), 87.7 (C-2, 6), 72.6 (C-4, 8), 56.8 (C-3', 3", 5', 5"-OCH₃), 55.5 (C-1, 5)。以上数据与文献^[25]报道一致,故鉴定为丁香树脂酚 (syringaresinol)。

化合物 12 白色粉末;ESI-MS: m/z 387 ([M - H]⁻), 分子式 C₂₁H₂₄O₇; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.90 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-3), 6.89 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6"), 6.82 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, H-2"), 6.58 (2H, s, H-2', 6), 5.64 (1H, s, H-4' or 4" OH), 5.53 (1H, s, H-4' or 4" OH), 4.73 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-2), 4.71 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-6), 4.27 (2H, m, H-4a, 8a), 3.90 (9H, s, C-3', 5', 5"-OCH₃), 3.4 (2H, m, H-4b, 8b), 3.10 (2H, m, H-1, 5); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 147.1 (C-5' and C-3'), 146.7 (C-5"), 145.2 (C-1"), 134.2 (C-1'),

132.8 (C-4"), 132.1 (C-4'), 118.9 (C-2"), 114.3 (C-3"), 108.6 (C-6"), 102.7 (C-2' and C-6'), 86.1 (C-2), 85.8 (C-6), 71.8 (C-8), 71.6 (C-4), 56.3 (C-5'-OCH₃ and C-3'-OCH₃), 55.9 (C-5" - OCH₃), 54.4 (C-5), 54.1 (C-1)。以上数据与文献^[26]报道一致,故鉴定为皮树脂醇 (medioresinol)。

化合物 13 白色粉末;ESI-MS: m/z 395 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₀H₂₀O₇; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.93 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2"), 6.91 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6"), 6.88 (1H, dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5"), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 5.33 (dt, $J = 7.4, 3.6$ Hz, 2H, H-3 and H-7), 4.33 (1H, dd, $J = 6.9, 1.3$ Hz, Hb-1), 4.04 (1H, dd, $J = 9.4, 4.6$ Hz, Ha-1), 3.90 (3H, s, OCH₃), 3.90 (1H, m, H-8), 3.91 (3H, s, OCH₃), 3.46 (1H, dd, $J = 8.8, 3.4$ Hz, H-4); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 177.1 (C-5), 147.0 (C-3'), 146.8 (C-3"), 145.6 (C-4'), 145.3 (C-4"), 132.4 (C-1'), 132.3 (C-1"), 118.4 (C-6'), 118.1 (C-6"), 114.7 (C-5'), 114.4 (C-5"), 108.2 (C-2"), 108.1 (C-2'), 84.7 (C-7), 83.4 (C-3), 72.7 (C-1), 56.1 (OCH₃), 56.0 (OCH₃)。以上数据与文献^[27]报道一致,故鉴定为 4-ketopinonesinol。

化合物 14 白色粉末;ESI-MS: m/z 381 ([M + Na]⁺), 分子式 C₂₀H₂₂O₆; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.70 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5), 6.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.56 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.50 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.48 (1H, dd, $J = 7.9, 2.0$ Hz, H-6), 4.13 (1H, dd, $J = 9.1, 7.0$ Hz, H-9'), 3.89 (1H, dd, $J = 9.1, 7.4$ Hz, H-9), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 2.87 (1H, dd, $J = 14.0, 5.4$ Hz, H-7a), 2.80 (1H, dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, H-7b), 2.62 ~ 2.43 (4H, m, H-7, H-8, H-8'); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 181.6 (C-9), 149.0 (C-3 and C-3'), 146.3 (C-4), 146.2 (C-4'), 131.3 (C-1), 130.7 (C-1'), 123.1 (C-6), 122.3 (C-6'), 116.3 (C-5), 116.2 (C-5'), 113.8 (C-2), 113.2 (C-2'), 73.0 (C-9'), 56.5 (C-3-OCH₃), 56.4 (C-3'-OCH₃), 47.8 (C-8), 42.5 (C-8'), 39.0 (C-7), 35.4 (C-7')。以上数据与文献^[28]报道一致,故鉴定为罗汉松脂酚 (matairesinol)。

3.2 对 DPPH 自由基的清除活性

DPPH 自由基是一种稳定的含氮自由基, 结构中存在单电子。当化合物具有酚羟基时, 可以提供氧原子, 与自由基结构中的孤对单电子配对, 从而减少电子数目, 起到清除自由基的作用。使用清除 DPPH 自由基的方法, 对牛筋果中酚性化合物 **1** ~ **14** 进行了体外抗氧化活性筛选, 从表 1 可以看出化合物 **7** ~ **14** 在 500 μM 的初筛浓度下, 对 DPPH 自由基的清除率达到了 50% 以上, 说明其具有一定的抗氧化能力。进一步测定这几个化合物在不同浓度下的 DPPH 自由基清除率, 牛筋果酚性物质对 DPPH 自由基的清除作用如图 2 所示, 由图可以看出, 化合物 **7** ~ **14** 在 1 ~ 500 μM 对 DPPH 自由基均有清除作用, 且随浓度升高, 清除作用增强。其中, 化合物 **11** 和 **12** 清除自由基能力与阳性对照 Trolox (64.42 \pm 4.65 μM) 相当; 而化合物 **13** 和 **14** EC_{50} 分别为 53.88 \pm 5.34 和 32.67 \pm 3.96 μM , 优于阳性对照。对比化合物 **1** ~ **6**, 化合物 **7** ~ **14** 活性更好, 应当是由于邻对位酚羟基及其个数增强了其自由基清除能力; 此外, 化合物 **13** ~ **14** 活性优于 **11** ~ **12**, 对比结构发现前两者包含有 γ -内酯结构单元, 而后两者是呋喃结构单元, 这可能是由于 γ -内酯结构单元结构单元显著提高了其生物利用度。

表 1 DPPH 自由基清除能力筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Screening of DPPH radical scavenging antioxidant activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

序号 No.	化合物 Compound	清除率 Scavenge rate (%)	EC_{50} (μM)
1	去甲丁香色原酮 Noreugenin	6.652	-
2	柴胡色原酮 A Saikochromone A	9.208	-
3	5,7-Dimethoxy-2-methylchromone	1.631	-
4	2-Hydroxymethylalloptaeroxylin	20.68	-
5	羟苯乙酯 Ethylparaben	5.864	-
6	苯丙酮 Propiophenone	5.498	-
7	Cephafortin B	60.22	-
8	去氢双松柏醇 Dehydroconiferyl alcohol	53.93	-
9	Hawthornnin C	76.10	125.4 \pm 26.5
10	Hawthornnin D	67.73	133.6 \pm 31.1
11	丁香树脂酚 Syringaresinol	93.37	68.4 \pm 5.65
12	皮树脂醇 Medioresinol	92.04	77.73 \pm 4.87
13	4-Ketopinoresinol	87.55	53.88 \pm 5.34
14	罗汉松脂酚 Matairesinol	88.68	32.67 \pm 3.96
	水溶性维生素 E Trolox	-	64.42 \pm 4.65

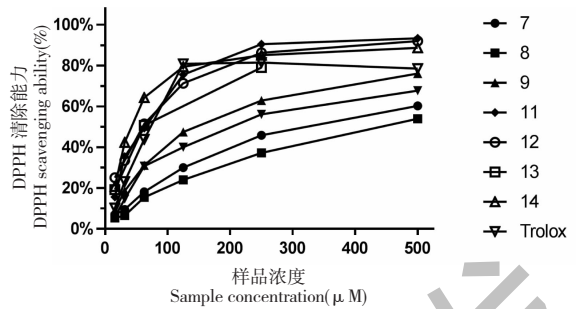


图 2 不同浓度样品对 DPPH 清除能力的影响

Fig. 2 Effects of different concentration samples on DPPH radical scavenging antioxidant activity

4 结论

本研究从采自我国海南的牛筋果中分离鉴定了 14 个化合物, 其中 10 个化合物为首次从牛筋果中分离得到。此外, 化合物 **13** 和 **14** 表现出显著的 DPPH 自由基清除能力, 并开展了其抗氧化构效关系初步的研究, 初步分析认为邻对位酚羟基及其个数与 γ -内酯结构单元是牛筋果中酚性化合物对 DPPH 自由基清除能力的主要活性位点。本文首次揭示了牛筋果中抗氧化的活性成分, 为合理开发牛筋果的药用资源和新型抗氧化剂提供了科学依据。

参考文献

- Zhang HD, Huang YH, Miu RH, et al. Systematics of spermatophyta (种子植物系统学) [M]. Beijing: Science Press, 2004:300-313.
- Flora of China Commission. Flora of China (中国植物) [M]. Beijing: Science Press, 1997, 43(3):15-17.
- Rong H, Duan A. Plant chemotaxonomy (植物化学分类学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2005, 834-835.
- Choodej S, Sommit D, Pudhom K, et al. Rearranged limonoids and chromones from *Harrisonia perforate* and their anti-inflammatory activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 3896-3900.
- Khuong-Huu Q, Chiaroni A, Riche C, et al. New rearranged limonoids from *Harrisonia perforate* [J]. J Nat Prod, 2000, 63:1015-1018.
- Yuan WJ, Gao WF, Zhang JH, et al. (\pm)-Perforison A, a pair of new chromone enantiomers from *Harrisonia perforate* [J]. Nat Prod Commun, 2017, 12(1):63-65.
- Li YM, Zhang ZK, Jia YT, et al. 3-Acetyony-3-hydroxyoxindole: a new inducer of systemic acquired resistance in plants [J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6:301-308.
- Li YM, Jia YT, Zhang ZK, et al. Purification and character-

- ization of a new ribosome inactivating protein from cinchonaglycoside C-treated tobacco leaves [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49, 1327-1334.
- 9 Wang YH, Zhang ZK, Yang FM, et al. Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity against tobacco mosaic virus and acetylcholinesterase [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70, 1458-1461.
- 10 Yan XH, Yi P, Cao P, et al. 16-nor limonoids from *Harrisonia perforata* as promising selective 11 β -HSD1 inhibitors [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36927.
- 11 Yan XH, Di YT, Fang X, et al. 2011. Chemical constituents from fruits of *Harrisonia perforata*. *Phytochemistry*, 2011, 72: 508-513.
- 12 Fang X, Di YT, Zhang Y, et al. Unprecedented quassinoids with promising biological activity from *Harrisonia perforata* [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54, 5592-5595.
- 13 Chao L, Yan XH, Tu Q, et al. Isolation and asymmetric total Synthesis of perforanoid A [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55, 7539-7543.
- 14 Brand-williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28(1):25-30.
- 15 Hu Y, Li YN, Li X, et al. Study on the flavonoids in *Blumea balsamifera* DC. and their antioxidant activity as well as α -glucosidase inhibitory activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:1898-1903.
- 16 Bruder M, Haseler PL, Muscarella M, et al. Synthesis of the oxepinochromone natural products ptaeroxylin (Desoxykarenin), ptaeroxylinol, and eranthin [J]. *J Org Chem*, 2010, 75: 353-358.
- 17 Kobayashi M, Tawara T, Tsuchida T, et al. Studies on the constituents of umbelliferae plants. XVIII. Minor constituents of bupleuri radix: occurrence of saikogenins, polyhydroxysterols, a trihydroxy C18 fatty acid, a lignan and a new chromone [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38:3169-3171.
- 18 Morimoto M, Tanimoto K, Nakano S, et al. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura* [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:389-393.
- 19 Balde AM, Vanhaelen M, Ottinger R. A chromone from the root-bark of *Harrisonia abyssinica* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26:2415-2416.
- 20 Quevrain E, Domart-Coulon I, Pernice M, et al. Novel natural parabens produced by a microbulbifer bacterium in its calcareous sponge host *Leuconianivea* [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11:1527-1539.
- 21 Hufnagel JC, Hofmann T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56:1376-1386.
- 22 Zhao JX, Fan YY, Xu JB, et al. Diterpenoids and lignans from *Cephalotaxus fortune* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80:356-362.
- 23 Li Y, Seeram NP. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58:11673-11679.
- 24 Huang XX, Bai M, Zhou L, et al. Food byproducts as a new and cheap source of bioactive compounds: lignans with antioxidant and anti-inflammatory properties from *Crataegus pinnatifida* Seeds [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 7252-7260.
- 25 Cai XF, Lee IS, Dat NT, et al. Inhibitory lignans against NFAT transcription factor from *Acanthopanax koreanum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27:738-741.
- 26 Nakasone Y, Takara K, Wada K, et al. Antioxidative compounds isolated from *Kokuto*, non-centrifugal cane sugar diosci [J]. *Biosci Biochem*, 1996, 60:1714-1716.
- 27 Moon SS, Rahman AA, Kim JY, et al. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* [J]. *Biorg Med Chem*, 2008, 16:7264-7269.
- 28 Maiada MAR, Paul MD, David EJ, et al. Lignans of *Forsythia intermedia* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29:1971-1980.