

千里香中黄酮类成分的分离鉴定及抗氧化活性研究

向方桃¹,陈封政^{2,3},陈建明⁴,田冲²,杨孝蓉²,李书华^{2*}¹乐山师范学院附属医院;²乐山师范学院 乐山特色农产品药用成分研发工程中心,乐山 614000;³固态发酵资源利用四川省重点实验室,宜宾 644000;⁴成都格纯生物医药有限公司,成都 610000

摘要:采用乙酸乙酯提取千里香的化学成分,以硅胶柱色谱法,结合制备色谱法和重结晶法等技术手段进行分离纯化,得到6个化合物,通过核磁共振波谱及文献数据分别鉴定为5,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮(1)、5,7,8,3',4',5'-六甲氧基黄酮(2)、5,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮(3)、5,6,7,3',4',5'-六甲氧基黄酮(4)、5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮(5)和5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮(6)。化合物1为首次从九里香属植物中分离得到,同时也是首次从千里香植物中分离得到。清除DPPH自由基实验结果显示化合物1~4抗氧化活性很弱,含有5位羟基的化合物5、6抗氧化活性相对较强。

关键词:千里香;化学成分;黄酮;多甲氧基黄酮;抗氧化

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)10-1683-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.10.008

Isolation, identification and antioxidant activity of the flavones from *Murraya paniculata* (L.) Jack

XIANG Fang-tao¹, CHEN Feng-zheng^{2,3}, CHEN Jian-ming⁴, TIAN Chong², YANG Xiao-rong², LI Shu-hua^{2*}¹The Affiliated Hospital, Leshan Normal University; ²Leshan Engineering Research Center for Medicinal Components of Characteristic Agro-Products, Leshan Normal University, Leshan 614000, China;³Soild-state Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China;⁴Chengdu Greenpure Biopharma Co., Ltd., Chengdu 610000, China

Abstract: The plant of *Murraya paniculata* (L.) Jack was powered, extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate extract was separated by silica gel column chromatography, preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and recrystallization methods, then six compounds have been isolated. On the basis of nuclear magnetic resonance (NMR) and comparison of their spectra with values reported in the literature, the compounds designated as 5,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone (1), 5,7,8,3',4',5'-hexamethoxyflavone (2), 5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone (3), 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone (4), 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone (5) and 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone (6). Compound 1 was isolated from the *Murraya* species and *M. paniculata* for the first time. The DPPH radical scavenging experiments of compounds showed that all of six compounds had antioxidant activity, among which 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone (5) and 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone (6) had stonger antioxidant activity.

Key words: *Murraya paniculata* (L.) Jack; chemical composition; flavonoid; polymethoxylated flavonoids; antioxidant activity

千里香(*Murraya paniculata* (L.) Jack)为芸香科九里香属植物,主要分布于我国南方等地。九里香属在我国有6种及2个变种^[1],1978年植物分类

学家黄成就将*M. paniculata* (L.) Jack的中文名称由九里香更名为千里香^[2]。2015版《中国药典》记载的九里香为千里香(*M. paniculata* (L.) Jack)和九里香(*M. exotica* L.)的干燥叶和带叶嫩枝,其主要功能为行气止痛,活血化瘀^[3]。药典里对九里香仅有性状鉴别、显微鉴别以及水分和总灰分检查,缺少成分鉴别和有效成分的含量测定。国内外对九里香的研究报道较多,但仔细分析发现这些文献研究的

收稿日期:2020-04-14 接受日期:2020-08-26

基金项目:四川省科技厅项目(2018JY0065);药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室项目(10Y201602);乐山师范学院科研项目(LZD001);固态发酵资源利用四川省重点实验室项目(2018GJTJ011)

* 通信作者 E-mail:lishuhua7011@sina.com

品种多为九里香(*M. exotica* L.),主要侧重于九里香的提取物的生理活性研究:抑菌、抗炎、杀虫、抗生育、消炎、镇痛等药理作用^[4-6]以及成分分析、分离与鉴定^[7,8]。目前国内外对千里香的研究主要集中在挥发性成分分布^[9],精油的抑菌活性及成分分析^[10],氯仿萃取物提取物对家蝇成虫、萝卜蚜、椰心菜甲和斜纹夜蛾有杀灭作用和对香蕉、芒果的炭疽病的抑制作用^[11],醇提取物对稻瘟病病原菌的抑制作用^[12]以及千里香的多甲氧基基黄酮成分分离与鉴定^[13,14]等方面。

国内外对黄酮的抗氧化活性研究较多,黄酮抗氧化活性的机理是其酚羟基可能被氧化成羰基等因素,多甲氧基基黄酮由于酚羟基较少,其抗氧化活性比对应的黄酮弱^[15]。

为了进一步阐明千里香的活性成分,我们对千里香枝叶的化学成分进行了分离鉴定,并对所得到的单体化合物进行了抗氧化活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

旋转蒸发器 YRE-501(巩义市予华仪器有限责任公司),电子天平 FA1004(鹤壁市力科电子有限公司),7200 型可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),制备液相色谱 SACID100 mm(成都格莱精密仪器有限公司);Varian INOVA 400 核磁共振谱仪。

薄层色谱硅胶 GF254 和柱色谱硅胶(300~400 目,青岛海洋化工有限公司产品);维生素 C(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)(百灵威科技有限公司)。

千里香,2018 年 7 月购自安国冷背药材有限公司,经乐山师范学院成英副教授鉴定为芸香科九里香属植物千里香(*M. paniculata* (L.) Jack)的干燥叶及嫩枝,标本保存于乐山师范学院乐山特色农产品药用成分研发工程中心(20180701)。

1.2 方法

1.2.1 提取与分离

称取 10 kg 千里香干燥叶及嫩枝,粉碎,平均分装于 2 个 50 L 的塑料桶中,分别向每个桶中加入 25 L 乙酸乙酯,室温浸泡 5 天后过滤,得到第一次浸提液。然后再次分别向每个桶中加入 20 L 乙酸乙酯,室温浸泡 5 天,过滤,得到第二次浸提液。合并两次浸提液,在 50 °C 条件下减压浓缩,得到流浸膏 408 g。将流浸膏用乙酸乙酯溶解,上清液滴加于 300 g 300~400 目硅胶上,水浴挥干溶剂,得到吸附了样

品的硅胶。将 2 500 g 300~400 目硅胶湿法装入玻璃层析柱中,然后将吸附了样品的硅胶置于柱上端,以不同比例的石油醚:丙酮混合液(8:1→1:1)为洗脱液,得到 6 个部分。将每个部分通过制备液相分离,结合多次硅胶柱层析分离和重结晶纯化,得到 6 个化合物:1(50 mg)、2(15 2mg)、3(95 mg)、4(30 mg)、5(110 mg)和 6(36 mg)。

1.2.2 化合物抗氧化活性的测定

根据 Hu 等^[15]的研究方法,以维生素 C 为阳性对照,采用 DPPH 自由基清除率检测法,研究化合物的抗氧化活性。

抗氧化反应体系:用移液器分别准确取 100 μL 不同浓度的化合物或 Vc 溶液,3.90 mL 75 μmol/L 的 DPPH 溶液,摇匀后放置于暗处 30 min 后,在 517 nm 波长处测定吸光度 A_0 ,同时测定 100 μL 化合物溶液 + 3.90 mL 甲醇的吸光度 A_1 以及 3.90 mL 75 μmol/L 的 DPPH 溶液 + 100 μL 甲醇的吸光度 A_2 。所有样品均做三个重复,取平均值。按照下面公式计算化合物对 DPPH 自由基的清除率。

DPPH 自由基的清除率 = $[1 - (A_0 - A_1)/A_2] \times 100\%$

式中: A_0 = 100 μL 化合物溶液 + 3.90 mL DPPH 溶液; A_1 = 100 μL 化合物溶液 + 3.90 mL 甲醇的吸光度; A_2 = 3.90 mL DPPH 溶液 + 100 μL 甲醇的吸光度。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.56 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.39 (1H, s, H-2'), 6.96 (1H, d, J = 8 Hz, H-5'), 6.59 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, s, H-6), 3.98 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.95 (6H, s, 3'-OCH₃, 8-OCH₃), 3.93 (6H, s, 5-OCH₃, 7-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 178.2 (C-4), 160.8 (C-2), 156.6 (C-7), 156.3 (C-9), 151.9 (C-5), 151.8 (C-4'), 149.2 (C-3'), 130.5 (C-8), 123.9 (C-1'), 119.7 (C-6'), 112.2 (C-5'), 108.7 (C-10), 108.5 (C-2'), 106.9 (C-3), 92.4 (C-6), 61.5 (8-OCH₃), 56.4 (5-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃), 56.0 (4'-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[16]报道的 5, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮基本一致。

化合物 2 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.17 (2H, s, H-2', 6'), 6.64 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, s, H-

6), 4.01 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.99 (3H, s, 8-OCH₃), 3.95 (9H, s, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃, 5-OCH₃), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 177.9 (C-4), 160.3 (C-2), 156.7 (C-7), 156.4 (C-9), 153.5 (C-3'), 153.5 (C-5'), 151.9 (C-5), 140.8 (C-4'), 130.6 (C-8), 126.7 (C-1'), 108.8 (C-10), 107.9 (C-3), 103.2 (C-2'), 103.2 (C-6'), 92.5 (C-6), 61.4 (8-OCH₃), 61.0 (4'-OCH₃), 56.6 (5-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃), 56.2 (3'-OCH₃), 56.2 (5'-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[17]报道的5,7,8,3',4',5'-六甲氧基黄酮基本一致。

化合物 3 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.08 (2H, s, H-2',6'), 6.64 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, s, H-8), 6.44 (1H, s, H-6), 3.97 (3H, s, 5-OCH₃), 3.95 (6H, s, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 3.94 (3H, s, 7-OCH₃), 3.92 (3H, s, 4'-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 177.6 (C-4), 164.1 (C-7), 160.9 (C-5), 160.5 (C-2), 159.9 (C-9), 153.5 (C-3'), 153.5 (C-5'), 140.8 (C-4'), 126.8 (C-1'), 109.2 (C-10), 108.9 (C-3), 103.4 (C-2'), 103.4 (C-6'), 96.2 (C-6), 92.9 (C-8), 61.1 (4'-OCH₃), 56.5 (5-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃), 56.4 (5'-OCH₃), 55.8 (7-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[7]报道的5,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮基本一致。

化合物 4 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.08 (2H, s, H-2',6'), 6.81 (1H, s, H-8), 6.70 (1H, s, H-3), 4.00 (3H, s, 5-OCH₃), 3.99 (3H, s, 7-OCH₃), 3.94 (6H, s, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 3.92 (6H, s, 4'-OCH₃, 6-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 177.6 (C-4), 161.4 (C-2), 158.0 (C-7), 154.6 (C-9), 153.6 (C-3'), 153.6 (C-5'), 152.5 (C-5), 141.0 (C-4'), 140.5 (C-6), 126.7 (C-1'), 112.7 (C-10), 107.9 (C-3), 103.5 (C-2'), 103.5 (C-6'), 96.3 (C-8), 62.2 (5-OCH₃), 61.6 (6-OCH₃), 61.1 (4'-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃), 56.4 (5'-OCH₃), 56.4 (7-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[18]报道的5,7,3',4',5'-六甲氧基黄酮基本一致。

化合物 5 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.54 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-6'), 7.35 (1H, s, H-2'), 6.99

(1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 6.70 (1H, s, H-8), 6.57 (1H, s, H-3), 3.99 (6H, s, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃), 3.98 (3H, s, 7-OCH₃), 3.92 (3H, s, 6-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 182.7 (C-4), 164.3 (C-2), 158.9 (C-7), 153.3 (C-9), 152.9 (C-4'), 152.4 (C-5), 149.4 (C-3'), 132.7 (C-6), 123.6 (C-1'), 120.2 (C-6'), 111.2 (C-5'), 108.8 (C-2'), 106.0 (C-10), 104.2 (C-3), 90.7 (C-8), 60.9 (4'-OCH₃), 56.4 (6-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃), 56.1 (7-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[7]报道的5-羟基-6,7,3',4'-四甲氧基黄酮基本一致。

化合物 6 淡黄色粉末;10% 硫酸-乙醇喷雾加热后显黄色。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.61 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-6'), 7.44 (1H, s, H-2'), 7.01 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 6.74 (1H, s, H-3), 4.13 (3H, s, 7-OCH₃), 3.99 (9H, s, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃, 8-OCH₃), 3.96 (3H, s, 6-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 183.1 (C-4), 164.4 (C-2), 153.2 (C-4'), 152.6 (C-7), 149.9 (C-9), 149.9 (C-3'), 145.9 (C-5), 136.7 (C-6), 132.9 (C-8), 123.5 (C-6'), 120.3 (C-1'), 111.3 (C-5'), 108.8 (C-2'), 106.8 (C-10), 103.7 (C-3), 62.1 (6-OCH₃), 61.8 (7-OCH₃), 61.2 (6-OCH₃), 56.2 (3'-OCH₃), 56.0 (4'-OCH₃)。上述核磁数据与文献^[7]报道的化合物5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮基本一致。

2.2 化合物抗氧化活性的测定结果与分析

对从千里香中分得的6个化合物及千里香的乙酸乙酯提取物进行了抗氧化试验,结果显示千里香的乙酸乙酯提取物浓度为250 μg/mL时对DPPH自由基的清除率为15.26%,维生素C浓度为40 μM时对DPPH自由基的清除率为48.06%,6个化合物表现出不同程度的抗氧化作用(各化合物对DPPH自由基的清除率见图1),化合物1~4的抗氧化作用很弱,化合物5和6的有一定的抗氧化作用,但明显弱于维生素C。通过结构分析,化合物5和化合物6均含有5位酚羟基,5位羟基与4位的羰基协同作用,形成一个六元环系来稳定和清除自由基^[25],故表现出一定的抗氧化活性;而化合物1~4则不含有酚羟基,缺少这种体系,故其抗氧化能力很弱。化合物1和3的抗氧化活性几乎没有差别,化合物2和4的抗氧化活性也很一致,但化合物2和4的抗氧化能力略强于化合物1和3。从上述结果可以看出,结构类似的多甲氧基黄酮在均无酚羟基存

在的情况下,含甲氧基多的化合物抗氧化活性略强 于含甲氧基少的化合物。

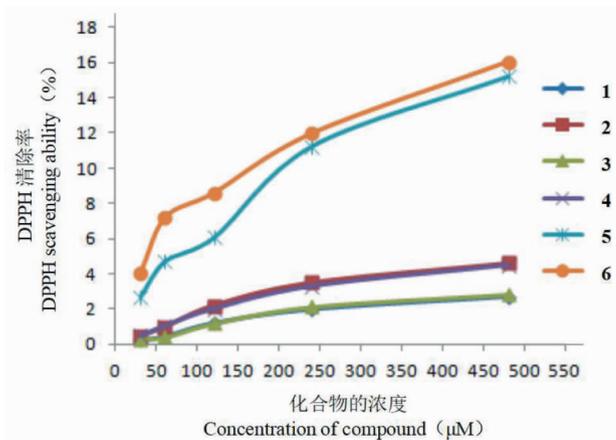


图1 化合物对 DPPH 的清除曲线

Fig. 1 DPPH free radical scavenging abilities of compounds

3 结论

本文对千里香的乙酸乙酯提取物进行了分离纯化,得到了6个多甲氧基黄酮,其中化合物1是首次从九里香属植物里分离得到,也是首次从千里香植物里分离得到,丰富了千里香化合物的结构类型。化合物2和5填补了chembook资源平台对照品的空白。对分离得到的6个多甲氧基黄酮进行了清除DPPH自由基试验,结果显示6个化合物均具有一定的抗氧化活性,其中含有5位酚羟基的多甲氧基黄酮的抗氧化活性明显强于不含酚羟基的多甲氧基黄酮,对于结构类似均无酚羟基的多甲氧基黄酮,则含甲氧基多的化合物抗氧化活性略强于含甲氧基少的化合物。

通过本文的研究结合文献^[13,14],可以看出千里香(*M. paniculata* (L.) Jack)一般不含有香豆素类化合物,而九里香(*M. exotica* L.)^[19,20]则富含香豆素类化合物,这从植物化学分类学上佐证了千里香和九里香的区别,以此推测《中国药典》将千里香和九里香不加区别使用值得商榷。

致谢:感谢成都格纯生物医药有限公司在分离工作中提供的部分设备和帮助。

参考文献

- Huang CJ. The study on the Rutaceae in China[J]. J Syst Evol(植物分类学报),1959,9:96-104.
- Huang CJ. Materials of Chinese Rutaceae[J]. J Syst Evol(植物分类学报),1978,9:85.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药

- 典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:39.
- Huang YS, Wang Y, Luo XP, et al. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Murraya exotica* from Hainan of China[J]. Asian J Chem, 2013, 25: 5055-5058.
- Li WQ, Jiang CH, Chu SS, et al. Chemical composition and toxicity against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* of the essential oil of *Murraya exotica* aerial parts[J]. Molecules, 2010, 15: 5831-5839.
- Wu LH, Liu HQ, Zhang R, et al. Chondroprotective activity of *Murraya exotica* through inhibiting β -atenin signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 75: 2150.
- Peng AY, Qu XW, Li H, et al. Isolation and purification of flavones from *Murraya exotica* L. by high-speed counter current chromatography[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2010, 28: 383-387.
- Li LF, Xiao H, Hu HB, et al. Chemical constituents I leaves of *Murraya exotica*[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 50-53.
- Huang JL, Jiang HM, Cao CY. Analysis and identification of volatile constituents in different parts of *Murraya exotica* by HS-SPME-GC-MS[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2019, 46: 532-537.
- Lu YQ, Wang LY, Luo YP. The antifungal activities and composition analysis of the essential oil from *Murraya paniculata* [J]. Agrochemicals(农药), 2011, 50: 56-58.
- Lu YQ. The antifungal activities and composition analysis of the essential oil from *Murraya paniculata* [D]. Haikou: Hainan University(海南大学), 2012.

- 12 Lin XP. Antibacterial activity of different extracts of *Murraya paniculata* on rice blast pathogen [J]. *J Fujian Forestry Sci Technol* (福建林业科技), 2017, 44: 15-18.
- 13 Kinoshita T, Firman K. Highly oxygenated flavonoids from *Murraya paniculata* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1207-1210.
- 14 Zhang Y, Li J, Zhou SX, et al. Polymethoxylated flavonoids from the leaves of *Murraya paniculata* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2010, 45: 1139-1141.
- 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 Li M. Study on chemical constituents from *Aurantii fructus* [D]. Jilin: Jilin University (吉林大学), 2014.
- 17 Yang JS, Du HM. Studies on the constituents of *Murraya paniculata* (L.) Jack grown in Yunnan [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1984, 26: 184-188.
- 18 Butler MS, Healy PC, Forster PI, et al. 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone from the Australian plant *Eremophila debilis* (Myoporaceae) [J]. *Fitoterapia*, 2018, 126: 90-92.
- 19 Xi YB. Two new dicoumarols of *Murraya exotica* [J]. *Int J Tradit Chin Med* (国际中医中药杂志), 2006, 28: 106.
- 20 Wu HL, Liu ZW, Zeng J, et al. Anti-inflammation and analgesic activities of coumarins compounds from the leaves of *Murraya exotica* (L.) [J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2011, 28: 2999-3003.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	陈益华	林昌俊	欧阳杰	易华西
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	CHEN Yihua	LIN Changjun	OU Yangjie	YI Huaxi
罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚	高慧敏
LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang	GAO Huimin
唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武	蓝蔚青
TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu	LAN Weiqing
廖晨钟	薛永波				
LIAO Chenzhong	XUE Yongbo				