

酸豆外果皮黄酮类成分及其抗氧化活性评价

申子佳,陈飞龙,贾朝玉,李大山,张庆芝,李维熙*,王文静*

云南中医药大学中药学院,昆明 650500

摘要:为了研究酸豆外果皮成分及其抗氧化活性,采用现代色谱分离技术从酸豆(*Tamarindus indica* Linn.)外果皮丙酮提取物中分离和纯化得到18个黄酮类化合物,通过核磁共振波谱数据对它们进行鉴定,分别为木犀草素(1)、7,3',4'-三羟基黄酮(2)、芹菜素(3)、7,4'-二羟基黄酮(4)、7,4'-二羟基-3'-甲氧基黄酮(5)、紫云英苷(6)、槲皮素(7)、山柰酚(8)、金合欢素(9)、圣草酚(10)、柚皮素(11)、紫柳素(12)、二氢山柰酚(13)、5,7,3',5'-四羟基二氢黄酮(14)、5,6,7,4'-四羟基二氢黄酮(15)、3,5,7,3',5'-五羟基二氢黄酮醇(16)、儿茶素(17)、表儿茶素(18)。10个化合物(2,4~6,9,11,13~16)为首次从该属植物中分离得到;采用ORAC法体外抗氧化活性测定,发现酸豆外果皮的4份萃取物及9个化合物(1,2,7~10,12,13,17)有较好的抗氧化活性。

关键词:酸豆外果皮;黄酮;分离;结构鉴定;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)11-1877-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.11.005

Flavonoids from the pericarp of *Tamarindus indica* Linn. and their antioxidant activity

SHEN Zi-jia, CHEN Fei-long, JIA Zhao-yu, LI Da-shan, ZHANG Qing-zhi, LI Wei-xi*, WANG Wen-jing*

School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: This study aims to study the constituents from the pericarp of *Tamarindus indica* Linn. and their antioxidant activity. Eighteen compounds were isolated from the acetone extract by chromatographic separation technology. On the basis of NMR spectroscopic data, they were identified as luteolin (1), 7,3',4'-trihydroxyflavone (2), apigenin (3), 7,4'-dihydroxyflavone (4), geraldone (5), astragalol (6), quercetin (7), kaempferol (8), acacetin (9), eriodictyol (10), naringenin (11), butin (12), dihydrokaempferol (13), 3',5,5',7-tetrahydroxyflavanone (14), 5,6,7,4'-tetrahydroxyflavanone (15), 3,3',5,5',7-pentahydroxyflavanone (16), catechin (17), epicatechin (18). Ten of them (2,4,6,9,11,13-16) were isolated from this genus for the first time. By ORAC assay *in vitro*, it was found that four extracts and nine compounds (1,2,7-10,12,13,17) exhibited antioxidant activity.

Key words: the pericarp of *Tamarindus indica* Linn.; flavonoids; isolation; structure identification; antioxidant activity

酸豆(*Tamarindus indica* Linn.)为豆科植物,其果实又名罗晃子、酸角、甜角、罗望子等,原产于非洲,现各热带地均有栽培。我国台湾、福建、广东、广西、云南南部、中部和北部(金沙江河谷)常见^[1]。酸豆药用历史悠久,《本草纲目拾遗》中记载“罗晃子……治疗脏腑生虫及小儿食土腹痛”;《滇南本草》中记载“酸饺……治酒化为痰,隔于胃中”。酸豆含有黄酮、原花青素、低聚原花青素、萜类、多糖类

及有机酸类等不同结构类型的物质,具有抗氧化、抗炎、抗衰老及降压等生物学活性^[2]。

近年来,国内外对酸豆的花、叶、果实及种子的研究逐渐增多,但目前鲜见关于酸豆外果皮成分及其活性研究的报道^[3]。为了明确酸豆外果皮的成分及其抗氧化活性,本实验对酸豆外果皮丙酮提取物的化学成分及其抗氧化活性进行了研究,以便对后续酸豆的药用与开发提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

市售酸豆经云南中医药大学普春霞副教授鉴定为酸豆 *Tamarindus indica* Linn., 剥离外果皮、果肉

收稿日期:2023-05-10 接受日期:2023-08-25

基金项目:国家自然科学基金(81960780);云南中医药大学“云中学者”青年学者项目(2018—2021)

*通信作者 E-mail:liwei1001@163.com, notoww@163.com

及种子,并分别收集,将外果皮粉碎至粗粉,置于干燥阴凉处备用,并取 100 g 粗粉留样保存,植物标本(标本编号 2021011901)存放于云南中医药大学医鉴戊楼实验室。

Bruker Avance III 400 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);Hanbon 制备液相色谱仪(江苏汉邦科技有限公司);Agilent 1100 HPLC/TOF 高分辨质谱仪(安捷伦科技有限公司);柱色谱硅胶粉(200~300 目)和薄层色谱硅胶 G 板(青岛海洋化工厂);MCI 精细分离树脂(日本三菱化工);D101 型大孔吸附树脂(天津波鸿树脂科技有限公司);RP-18 反相硅胶(德国 Merck 公司);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(GE Pharmacia 公司);M200PRO 多功能荧光酶标仪(瑞士 Tecan 公司);PBS 磷酸盐缓冲溶液(Solarbio);荧光素钠(Lot:SLBL5470V, Sigma-Aldrich 公司);2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(纯度:100%, Lot:WXBB6080V, Sigma-Aldrich 公司);水溶性维生素 E(纯度 \geq 98.0%, Lot:N2203050045, 南京都莱生物科技公司)

1.2 方法

1.2.1 提取分离

酸豆外果皮粗粉 23 kg,以三倍体积丙酮室温下浸提 4 次,每次 4 d,合并提取液,减压浓缩 642.2 g。取 20 g 浸膏冷冻干燥备用,其余浸膏用水混悬,依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,各萃取液经减压浓缩合并得二氯甲烷萃取部位浸膏 135.1 g (Fr. 1)、乙酸乙酯萃取部位浸膏 86.9 g (Fr. 2)、正丁醇萃取部位浸膏 161.2 g (Fr. 3)。Fr. 1 经正相硅胶柱层析二氯甲烷-甲醇(50:1 \rightarrow 0:1, V/V) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同组分得到 5 部分 Fr. 1.1~Fr. 1.5。Fr. 1.2 经反复正向硅胶柱层析石油醚-丙酮(5:1 \rightarrow 0:1, V/V) 及重结晶得到化合物 **11** (18 mg)。Fr. 1.3 经正相硅胶柱层析二氯甲烷-甲醇(50:1 \rightarrow 0:1, V/V) 梯度洗脱,得到 4 个组分 Fr. 1.3.1~Fr. 1.3.4, Fr. 1.3.1 经正相硅胶柱层析及 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱反复洗脱得化合物 **3** (5 mg)、**4** (7 mg)、**5** (3 mg)。Fr. 1.3.3 经半制备高效液相色谱(甲醇-水 40:60 \rightarrow 55:45), 得化合物 **10** (28 mg, $t_R = 18$ min)、**12** (5 mg, $t_R = 13$ min)。经 Fr. 1.4 经正相硅胶柱层析二氯甲烷-甲醇(18:1 \rightarrow 0:1, V/V) 梯度洗脱,得到 6 个组分 Fr. 1.4.1~Fr. 1.4.6, Fr. 1.4.5 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱洗脱得化合物 **1** (6 mg)、**8** (8 mg)。乙酸乙酯部位经正相柱层析二氯甲

烷-甲醇(50:1 \rightarrow 0:1, V/V) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同组分,得到 6 部分 Fr. 2.1~Fr. 2.6。Fr. 2.4 经二氯甲烷-甲醇(100:1 \rightarrow 0:1, V/V) 梯度洗脱,得到 10 个组分 Fr. 2.4.1~Fr. 2.4.8。Fr. 2.4.3 经正相硅胶色谱柱二氯甲烷-甲醇(100:1 \rightarrow 0:1, V/V) 以及半制备高效液相色谱(甲醇-水 50:50) 分离得到化合物 **2** (4 mg, $t_R = 6$ min)。Fr. 2.4.5 经正相硅胶色谱柱二氯甲烷-甲醇(10:1 \rightarrow 0:1, V/V) 以及半制备高效液相色谱(甲醇-水 65:35) 得化合物 **17** (10 mg, $t_R = 6$ min)、**18** (10 mg, $t_R = 7$ min)。Fr. 2.4.7 经反向硅胶柱层析、Sephadex LH-20 及半制备色谱分离,得到化合物 **9** (7 mg)、**13** (10 mg)。正丁醇部位经 D101 大孔树脂分离,以甲醇-水(0:100 \rightarrow 100:0, V/V) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同部分,得到 5 部分 Fr. 3.1~Fr. 3.5, 各部分经反向硅胶柱层析, Sephadex LH-20 及半制备色谱(水-甲醇 20:50 \rightarrow 50:50) 分离,得到化合物 **6** (10 mg)、**7** (8 mg)、**14** (6 mg)、**15** (5 mg) 和 **16** (5 mg, $t_R = 8$ min)。

1.2.2 体外抗氧化能力评价

抗氧化能力指数(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)是一种常用的抗氧化能力测定方法。该方法通过抑制氢转移过程终止自由基链式反应。实验采用荧光素钠做荧光指示剂,2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)作为过氧自由基并使用标准抗氧化物水溶性维生素 E(trolox)进行定量,通过曲线下面积(area under the curve, AUC)进行定量比测定抗氧化能力。本文通过该方法,对酸豆外果皮总提取物、各相萃取物以及分离所得的部分黄酮类化合物进行了体外抗氧化能力测定。具体方法^[4]为:在 96 孔板中分别加入 20 μ L 样品、20 μ L PBS 及加入 20 μ L 630 nmol/L 荧光素钠,设定没有添加 AAPH 的荧光自然衰减对照组(-AAPH)和没有抗氧化剂存在时的自由基自然释放对照组(+AAPH),置于酶标仪中 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,随后于 -AAPH 对照组加入 140 μ L PBS,其余组迅速加入 140 μ L 18.2 mmol/LAAPH 混匀并启动反应。以激发波长 485 nm、发射波长 538 nm 测定荧光强度,每 2 min 读数 1 次,直到荧光衰减至基线为止。将读数值导入 Excel 连成曲线,以下列公式计算 AUC, Trolox 的 AUC 及样品的 AUC 减去 +AAPH 组的 AUC 所得差值为净 AUC(net AUC),基于 Trolox 定量计算 ORAC 值。
$$AUC = 0.5 \times [2 \times (f_0 + f_1 + \dots + f_{n-1} + f_n) - f_0 - f_n] \times \Delta t$$
(n 为测定次数, f 为荧光

强度, Δt 为相邻两个测定点之间的时间间隔);
 $ORAC = [(AUC_{\text{样品}} - AUC_{+AAPH}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{+AAPH})] \times [M_{\text{Trolox}} / M_{\text{样品}}]$, M 为物质的量浓度 ($\mu\text{mol/L}$)。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 287.055 3 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.97 (1H, s, OH-5), 7.41 (2H, m, H-2', H-6'), 6.89 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.9 (C-2), 102.9 (C-3), 181.7 (C-4), 157.3 (C-5), 98.9 (C-6), 164.2 (C-7), 93.9 (C-8), 161.5 (C-9), 103.7 (C-10), 119.0 (C-1'), 113.4 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.7 (C-4'), 116.1 (C-5'), 121.5 (C-6')。以上数据与文献^[5]报道一致, 故鉴定该化合物为木犀草素。

化合物 2 黄色结晶(甲醇); HR-ESI-MS: m/z 271.060 4 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.85 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.38 (2H, m, H-2', H-6'), 6.85 ~ 6.95 (3H, m, H-5', H-6, H-8), 6.59 (1H, s, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.7 (C-2), 104.5 (C-3), 176.2 (C-4), 126.5 (C-5), 113.1 (C-6), 162.6 (C-7), 102.4 (C-8), 157.4 (C-9), 116.0 (C-10), 122.1 (C-1'), 114.8 (C-2'), 145.7 (C-3'), 149.3 (C-4'), 116.0 (C-5'), 118.5 (C-6')。以上数据与文献^[6]报道一致, 故鉴定该化合物为 7,3',4'-三羟基黄酮。

化合物 3 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 271.060 4 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.96 (1H, s, OH-5), 7.92 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', H-6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.78 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C-2), 102.9 (C-3), 181.8 (C-4), 157.4 (C-5), 98.9 (C-6), 163.8 (C-7), 94.0 (C-8), 161.5 (C-9), 103.7 (C-10), 121.2 (C-1'), 128.6 (C-2'), 116.0 (C-3'), 161.2 (C-4'), 116.0 (C-5'), 128.6 (C-6')。以上数据与文献^[7]报道一致, 故鉴定该化合物为芹菜素。

化合物 4 黄色结晶(甲醇); HR-ESI-MS: m/z

255.065 1 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.84 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', H-6'), 7.80 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 6.91 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.86 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', H-5'), 6.83 (1H, m, H-6), 6.65 (1H, s, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.6 (C-2), 104.5 (C-3), 176.4 (C-4), 126.5 (C-5), 114.8 (C-6), 162.6 (C-7), 102.5 (C-8), 160.7 (C-9), 116.1 (C-10), 121.8 (C-1'), 128.2 (C-2'), 116.0 (C-3'), 157.4 (C-4'), 116.0 (C-5'), 128.2 (C-6')。以上数据与文献^[8]报道一致, 故鉴定该化合物为 7,4'-二羟基黄酮。

化合物 5 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 285.075 4 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.86 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 7.54 (2H, m, H-2', H-6'), 7.00 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.90 (1H, m, H-6), 6.82 (1H, s, H-3), 3.89 (3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.5 (C-2), 104.9 (C-3), 176.4 (C-4), 126.5 (C-5), 114.8 (C-6), 162.6 (C-7), 102.6 (C-8), 157.5 (C-9), 116.2 (C-10), 122.2 (C-1'), 110.0 (C-2'), 148.0 (C-3'), 150.2 (C-4'), 115.8 (C-5'), 120.0 (C-6'), 60.0 (3'-OCH₃)。以上数据与文献^[9]报道一致, 故鉴定该化合物为 7,4'-二羟基-3'-甲氧基黄酮。

化合物 6 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 449.108 0 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$; 1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.98 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.78 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.30 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.10 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.02 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 157.7 (C-2), 134.2 (C-3), 178.2 (C-4), 161.6 (C-5), 98.5 (C-6), 164.6 (C-7), 93.4 (C-8), 157.1 (C-9), 104.2 (C-10), 121.3 (C-1'), 130.9 (C-2'), 114.7 (C-3'), 160.1 (C-4'), 114.7 (C-5'), 130.9 (C-6'), 103.6 (C-1''), 71.6 (C-2''), 73.6 (C-3''), 68.6 (C-4''), 75.7 (C-5''), 60.5 (C-6'')。以上数据与文献^[10,11]报道一致, 故鉴定该化合物为紫云英苷。

化合物 7 黄色粉末; 分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$; 1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.75 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.65 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$

Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 147.3 (C-2), 135.8 (C-3), 178.3 (C-4), 161.3 (C-5), 97.8 (C-6), 164.2 (C-7), 93.0 (C-8), 156.8 (C-9), 103.1 (C-10), 122.7 (C-1'), 114.6 (C-2'), 145.4 (C-3'), 149.5 (C-4'), 114.8 (C-5'), 120.2 (C-6')。以上数据与文献^[12]报道一致,故鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 8 黄色粉末;HR-ESI-MS: m/z 287.055 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.48 (1H, s, OH-5), 8.04 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.92 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 146.8 (C-2), 135.7 (C-3), 175.9 (C-4), 160.7 (C-5), 98.2 (C-6), 163.9 (C-7), 93.5 (C-8), 159.2 (C-9), 103.1 (C-10), 121.7 (C-1'), 129.5 (C-2'), 115.5 (C-3'), 156.2 (C-4'), 115.5 (C-5'), 129.5 (C-6')。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定该化合物为山柰酚。

化合物 9 黄色粉末;分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.76 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6), 3.88 (3H, s, 4'-OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 164.9 (C-2), 103.2 (C-3), 182.1 (C-4), 161.6 (C-5), 99.3 (C-6), 164.1 (C-7), 94.4 (C-8), 157.8 (C-9), 103.9 (C-10), 121.6 (C-1'), 128.9 (C-2'), 116.4 (C-3'), 161.9 (C-4'), 116.4 (C-5'), 128.9 (C-6'), 56.8 (4'-OCH₃)。以上数据与文献^[13,14]报道一致,故鉴定该化合物为金合欢素。

化合物 10 白色粉末;HR-ESI-MS: m/z 289.070 7 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.92 (1H, s, H-2'), 6.79 (2H, brs, H-5', H-6'), 5.90 (1H, brs, H-8), 5.88 (1H, brs, H-6), 5.27 (1H, dd, $J = 12.7, 3.0$ Hz, H-2), 3.06 (1H, dd, $J = 17.1, 12.7$ Hz, H-3), 2.69 (1H, dd, $J = 17.2, 3.0$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 80.5 (C-2), 44.1 (C-3), 197.8 (C-4), 165.4 (C-5), 97.0 (C-6), 168.3 (C-7), 96.2 (C-8), 164.8 (C-9), 103.4 (C-10), 131.8 (C-1'), 114.7 (C-2'), 146.5 (C-3'), 146.9 (C-4'), 116.3 (C-5'), 119.3 (C-6')。以上数据与文献^[15,16]报道一致,故鉴定该化合物为圣草酚。

化合物 11 黄色粉末;HR-ESI-MS: m/z 273.0754 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 5.88 (2H, q, $J = 2.2$ Hz, H-6, H-8), 5.29 (1H, dd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, $J = 17.1, 13.0$ Hz, H-3), 2.66 (1H, dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 80.4 (C-2), 44.0 (C-3), 197.7 (C-4), 165.4 (C-5), 97.1 (C-6), 168.3 (C-7), 96.2 (C-8), 164.8 (C-9), 103.4 (C-10), 131.1 (C-1'), 129.0 (C-2'), 116.3 (C-3'), 159.0 (C-4'), 116.3 (C-5'), 129.0 (C-6')。以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定该化合物为柚皮素。

化合物 12 黄色粉末(甲醇);HR-ESI-MS: m/z 271.061 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.73 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 6.93 (1H, brs, H-2'), 6.79-6.82 (2H, m, H-5', H-6'), 6.50 (1H, dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, H-6), 6.36 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.32 (1H, dd, $J = 12.8, 2.9$ Hz, H-2), 3.01 (1H, dd, $J = 16.9, 12.8$ Hz, H-3), 2.70 (1H, dd, $J = 16.9, 3.0$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 81.1 (C-2), 45.0 (C-3), 193.5 (C-4), 129.8 (C-5), 111.7 (C-6), 166.8 (C-7), 103.8 (C-8), 165.5 (C-9), 115.0 (C-10), 132.1 (C-1'), 114.7 (C-2'), 146.5 (C-3'), 146.8 (C-4'), 116.3 (C-5'), 119.2 (C-6')。以上数据与文献报道一致,故鉴定该化合物为紫柳素。

化合物 13 白色粉末;分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.31 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.80 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 5.89 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 5.84 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-6), 5.03 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-2), 4.56 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 83.3 (C-2), 71.9 (C-3), 198.0 (C-4), 165.2 (C-5), 96.6 (C-6), 168.0 (C-7), 95.6 (C-8), 163.8 (C-9), 100.7 (C-10), 128.0 (C-1'), 129.8 (C-2'), 115.3 (C-3'), 158.2 (C-4'), 115.3 (C-5'), 129.8 (C-6')。以上数据与文献^[18]报道一致,故鉴定该化合物为二氢山柰酚。

化合物 14 淡黄色粉末;HR-ESI-MS: m/z 289.0704 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.87 (1H, s, H-4'), 6.74 (2H, s, H-2', H-6'), 5.87 (2H, s, H-6, H-8), 5.37

(1H, dd, $J = 12.4, 2.7$ Hz, H-2), 3.17 (1H, dd, $J = 17.0, 12.4$ Hz, H-3), 2.67 (1H, dd, $J = 17.0, 2.7$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 78.9 (C-2), 42.5 (C-3), 196.7 (C-4), 163.9 (C-5), 96.2 (C-6), 167.1 (C-7), 95.4 (C-8), 163.3 (C-9), 102.2 (C-10), 129.9 (C-1'), 114.7 (C-2'), 145.6 (C-3'), 115.8 (C-4'), 146.1 (C-5'), 118.4 (C-6')。以上数据与文献^[19,20]报道一致,故鉴定该化合物为5,7,3',5'-四羟基二氢黄酮。

化合物 15 淡黄色粉末; HR-ESI-MS: m/z 287.055 8 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₅H₁₂O₆; ^1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.32 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', H-5'), 5.89 (1H, s, H-8), 5.34 (1H, dd, $J = 12.9, 3.1$ Hz, H-2), 3.11 (1H, dd, $J = 17.1, 12.9$ Hz, H-3 β), 2.70 (1H, dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, H-3 α); ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 80.5 (C-2), 44.0 (C-3), 197.7 (C-4), 159.0 (C-5), 155.5 (C-6), 165.5 (C-7), 96.3 (C-8), 168.5 (C-9), 103.2 (C-10), 131.1 (C-1'), 129.0 (C-2'), 116.4 (C-3'), 164.9 (C-4'), 116.4 (C-5'), 129.0 (C-6')。以上数据与文献^[21,22]报道一致,故鉴定该化合物为5,6,7,4'-四羟基二氢黄酮。

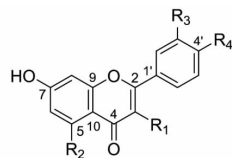
化合物 16 黄色粉末; 分子式为 C₁₅H₁₂O₇; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.88 (1H, s, H-4'), 6.74 (2H, s, H-2', H-6'), 5.90 (1H, s, H-8), 5.86 (1H, s, H-6), 4.97 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-2), 4.49 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 83.5 (C-2), 72.0 (C-3), 198.0 (C-4), 163.7 (C-5), 96.5 (C-6), 167.5 (C-7), 95.5 (C-8), 162.9 (C-9), 100.8 (C-10), 128.5 (C-1'), 115.8 (C-2'), 146.2 (C-3'), 119.8 (C-4'), 145.4 (C-5'), 115.6 (C-6')。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴

定该化合物为3,5,7,3',5'-五羟基二氢黄酮醇。

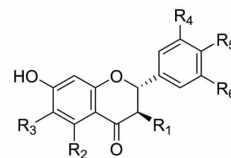
化合物 17 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 289.071 4 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₅H₁₄O₆; ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 5.94 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.86 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 4.57 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2), 3.98 (1H, td, $J = 7.8, 5.4$ Hz, H-3), 2.84 (1H, dd, $J = 16.7, 4.7$ Hz, H-4), 2.51 (1H, dd, $J = 16.1, 8.1$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 82.8 (C-2), 68.8 (C-3), 28.5 (C-4), 157.6 (C-5), 96.3 (C-6), 157.9 (C-7), 95.5 (C-8), 156.9 (C-9), 100.8 (C-10), 132.2 (C-1'), 115.2 (C-2'), 146.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.1 (C-6')。以上数据与文献^[23]报道一致,故鉴定该化合物为儿茶素。

化合物 18 白色粉末; HR-ESI-MS: m/z 289.072 2 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₅H₁₄O₆; ^1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 5.95 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.92 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 4.82 (1H, s, H-2), 4.18 (1H, m, H-3), 2.86 (1H, dd, $J = 16.7, 4.7$ Hz, H-4), 2.73 (1H, dd, $J = 16.8, 3.1$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 78.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.2 (C-4), 158.0 (C-5), 96.4 (C-6), 157.3 (C-7), 95.9 (C-8), 157.6 (C-9), 100.1 (C-10), 132.3 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.9 (C-3'), 145.7 (C-4'), 115.9 (C-5'), 119.4 (C-6')。以上数据与文献^[24]报道一致,故鉴定该化合物为表儿茶素。

化合物 1~18 结构见图 1。



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	OH	OH	OH
2	H	H	OH	OH
3	H	OH	H	OH
4	H	H	H	OH
5	H	H	OCH ₃	OH
6	O-Glc	OH	H	OH
7	OH	OH	OH	OH
8	OH	OH	H	OH
9	H	OH	H	OCH ₃



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
12	H	H	H	H	OH	OH
13	OH	OH	H	H	OH	H
14	H	OH	H	OH	H	OH
15	H	OH	OH	H	OH	H
16	OH	OH	H	OH	H	OH

续图 1 (Continued Fig.1)

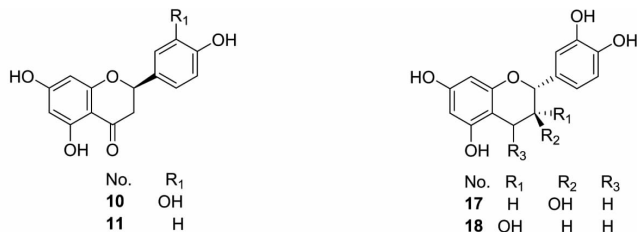


图1 酸豆外果皮中化合物的结构式

Fig. 1 The structures of compounds from *T. indica* pericarp

2.2 体外抗氧化活性

本文通过 ORAC 法对酸豆外果皮丙酮总提物、各萃取物以及其中的槲皮素、山柰酚、柚皮素等 11 个化合物进行了体外抗氧化活性测定。

2.2.1 标准抗氧化物质 Trolox 的 ORAC

以浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25 和 3.125

$\mu\text{mol/L}$ 的 Trolox 按“2.2”项下的方法测定其 AUC 及 net AUC, 以浓度为横坐标, net AUC 为纵坐标的标准曲线如图 2, 回归方程为: $Y = 0.431X + 4.1558$, $R^2 = 0.9991$ (Y 表示抗氧化剂的 AUC, X 表示抗氧化剂的浓度), 实验结果表明 Trolox 在此实验条件下其 AUC 与浓度具有良好的线性关系。

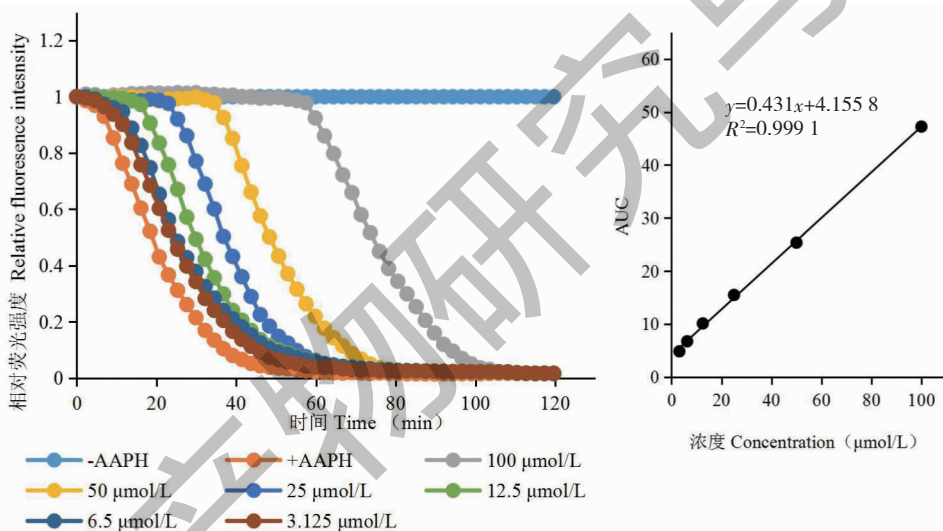


图2 Trolox 的荧光衰退曲线及标准曲线

Fig. 2 The fluorescence decay curve and standard curve of trolox

2.2.2 酸豆外果皮丙酮提取物的 ORAC

以浓度分别为 0.1、0.05、0.025 mg/mL 的酸豆外果皮丙酮提取物作为抗氧化剂, 按“2.2”项下的方法测定其 ORAC 值。如图 3 所示, 荧光衰退曲线延缓面积随着浓度的增大而增大, 以 Trolox ($\mu\text{mol/L}$) 当量表示酸豆外果皮丙酮提取物的抗氧化能力, 其浓度与保护时间及 ORAC 值呈正相关, 表明酸豆外果皮丙酮提取物具有较好的抗氧化作用。

2.2.3 酸豆外果皮二氯甲烷萃取物的 ORAC

以浓度分别为 0.1、0.05、0.025 mg/mL 的酸豆外果皮二氯甲烷萃取物作为抗氧化剂, 按“2.2”项下的方法测定其 ORAC 值, 如图 4 所示, 荧光衰退曲

线延缓面积随着浓度的增大而增大, 以 Trolox ($\mu\text{mol/L}$) 当量表示酸豆外果皮二氯甲烷萃取物的抗氧化能力, 其浓度与保护时间及 ORAC 值呈正相关, 表明酸豆外果皮二氯甲烷萃取物具有较好的抗氧化作用。

2.2.4 酸豆外果皮乙酸乙酯萃取物的 ORAC

以浓度分别为 0.1、0.05、0.025 mg/mL 的酸豆外果皮乙酸乙酯萃取物作为抗氧化剂, 按“2.2”项下的方法测定其 ORAC 值, 如图 5 所示, 荧光衰退曲线延缓面积随着浓度的增大而增大, 以 Trolox ($\mu\text{mol/L}$) 当量表示酸豆外果皮乙酸乙酯萃取物的抗氧化能力, 其浓度与保护时间及 ORAC 值呈正相

关,表明酸豆外果皮乙酸乙酯萃取物具有较好的抗氧化作用。

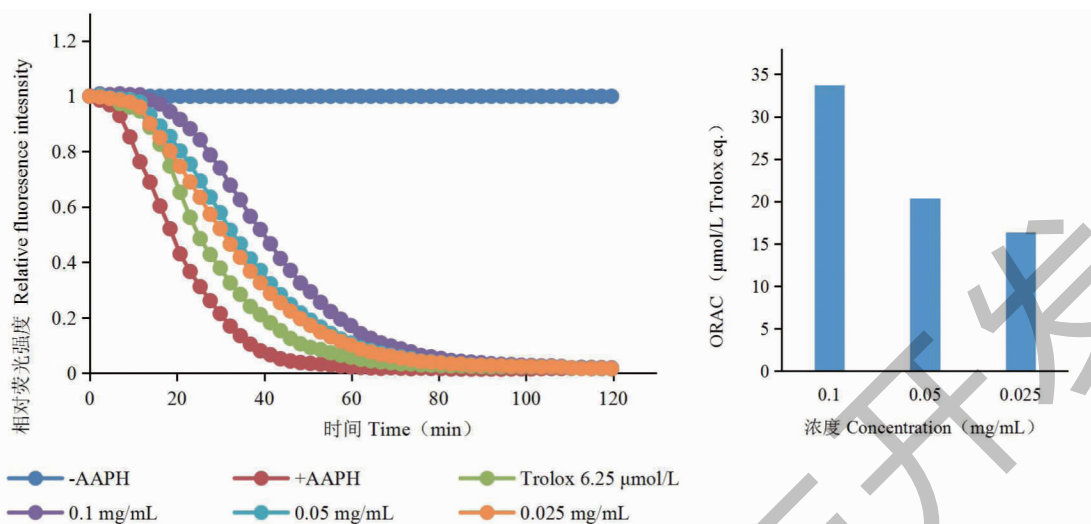


图3 酸豆外果皮丙酮提取物的荧光衰退曲线及ORAC

Fig. 3 The fluorescence decay curve and ORAC of acetone extract from *T. indica* pericarp

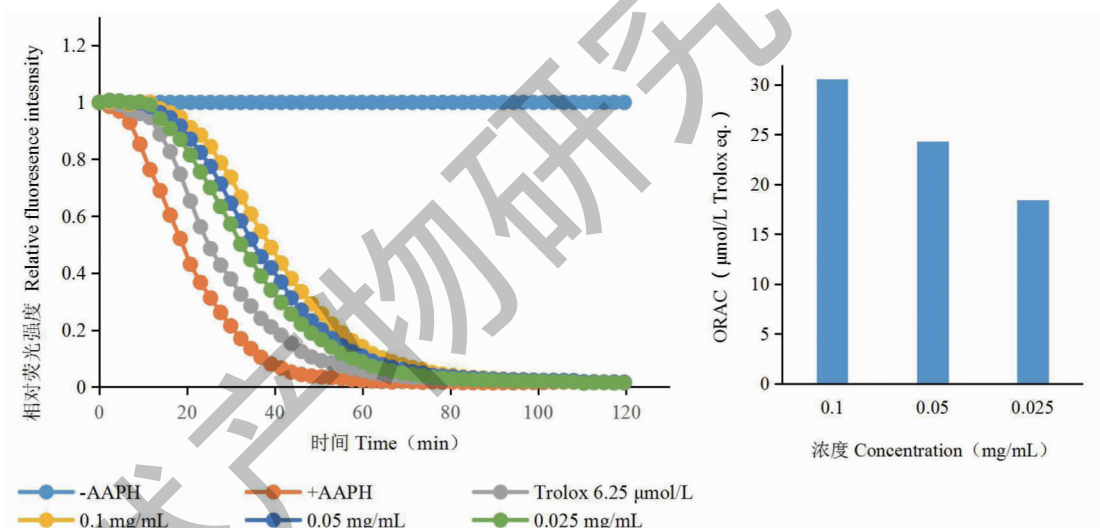


图4 酸豆外果皮二氯甲烷萃取物的荧光衰退曲线及ORAC

Fig. 4 The fluorescence decay curve and ORAC of dichloromethane extract from *T. indica* pericarp

2.2.5 酸豆外果皮正丁醇萃取物的ORAC

以浓度分别为0.1、0.05、0.025 mg/mL的酸豆外果皮正丁醇萃取物作为抗氧化剂,按“2.2”项下的方法测定其ORAC值,如图6所示,荧光衰退曲线延缓面积随着浓度的增大而增大,以Trolox ($\mu\text{mol/L}$)当量表示酸豆外果皮正丁醇萃取物的抗氧化能力,其浓度与保护时间及ORAC值呈正相关,表明酸豆外果皮正丁醇萃取物具有较好的抗氧化作用。

2.2.6 黄酮类单体化合物的ORAC

对从酸豆外果皮中分离所得的部分黄酮类化合

物进行了体外抗氧化活性的测定,测定结果如表1,ORAC值越大,代表其抗氧化能力越强。

本实验以AAPH为底物,Trolox做阳性对照,测定酸豆外果皮丙酮提取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物以及部分单体黄酮的体外抗氧化活性。实验结果表明总提取物及各项萃取物都具有较好的抗氧化活性。单体化合物除紫柳素外,其他9个黄酮类化合物相较于阳性对照均具有良好的体外抗氧化活性。

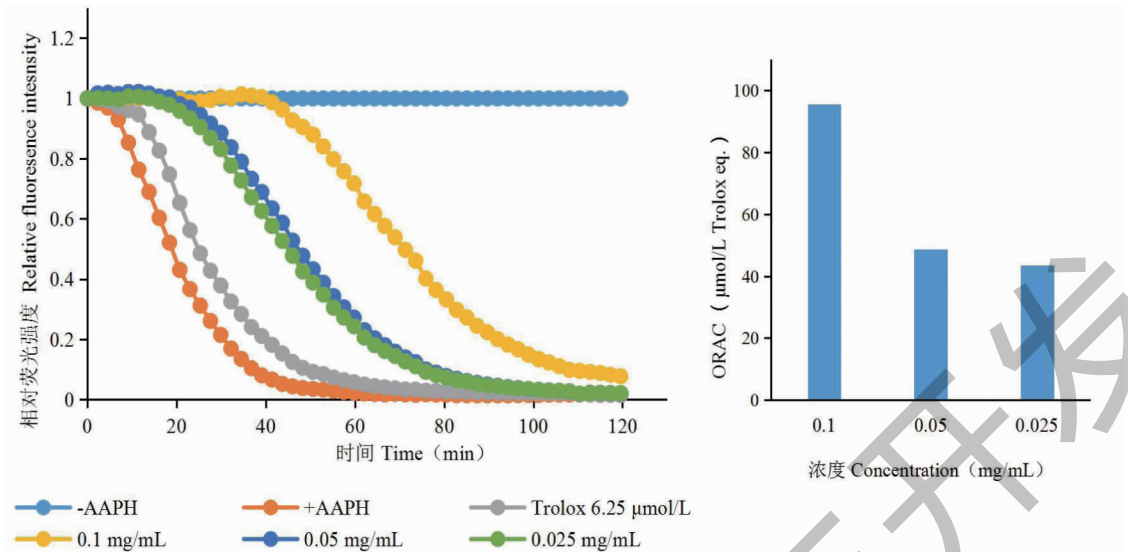


图5 酸豆外果皮乙酸乙酯萃取物的荧光衰退曲线及ORAC

Fig. 5 The fluorescence decay curve and ORAC of ethyl acetate extract from *T. indica* pericarp

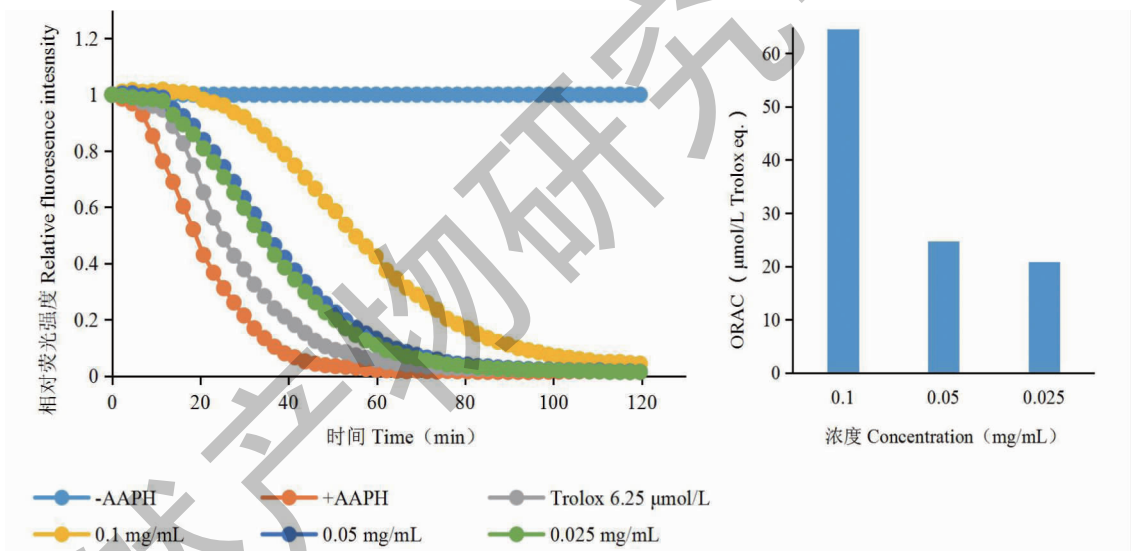


图6 酸豆外果皮正丁醇萃取物的荧光衰退曲线及ORAC

Fig. 6 The fluorescence decay curve and ORAC of n-butanol extract from *T. indica* pericarp

表1 化合物的ORAC

Table 1 The ORAC of compounds

化合物 Compound	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol}$)	化合物 Compound	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol}$)
木犀草素 Luteolin(1)	3.17	圣草酚 Eriodictyol(10)	1.53
7,3',4'-三羟基黄酮 7,3',4'-Trihydroxyflavone(2)	3.12	柚皮素 Naringenin(11)	3.79
槲皮素 Quercetin(7)	3.51	紫柳素 Butin(12)	0.23
山奈酚 Kaempferol(8)	3.08	二氢山奈酚 Dihydrokaempferol(13)	4.07
金合欢素 Acacetin(9)	2.97	儿茶素 Catechin(17)	2.58

3 讨论与结论

酸豆中含有黄酮、有机酸、原花青素、低聚原花青素,多糖类及萜类等不同结构类型的物质^[25],而酸豆外果皮作为食品加工的副产物通常被人所忽略,本实验从酸豆外果皮中共分离得到 18 个黄酮类化合物,包括 6 个黄酮类(1~5、9),2 个黄酮醇类(7、8),5 个二氢黄酮类(10~12、14、15),2 个二氢黄酮醇类(13、16),2 个黄烷醇类(17、18),以及一个黄酮苷(6)。其中 10 个化合物(2、4~6、9、11、13~16)为首次从该属植物中分离得到,提示酸豆外果皮中含有大量黄酮类化合物,与酸豆中所含的大量成分相一致。ORAC 实验结果表明,酸豆外果皮的丙酮提取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物及 9 个(1、2、7~10、12、13、17)化合物均具有良好的体外抗氧化活性。

黄酮类化合物的抗氧化活性与其结构之间的关系密不可分,羟基的数量和位置、C 环是否存在羰基等对黄酮类化合物的抗氧化作用都具有一定影响^[26]。由于黄酮的酚羟基直接参与自由基的清除,因此酚羟基的取代数量对黄酮类化合物的抗氧化效果有着重要的作用。实验结果显示,二氢黄酮类型中的二氢山奈酚的 ORAC 值大于柚皮素,槲皮素高于木犀草素、山奈酚等其他黄酮类型化合物,可见羟基数量越多,化合物的抗氧化能力越强。研究表明,黄酮类化合物发挥抗氧化活性的主要部位为 B 环的羟基取代,以 B 环邻二酚羟基活性最强,该现象可能是由于 B 环上的邻二酚羟基更易受到电子的进攻所导致^[27],实验结果显示木犀草素和山奈酚羟基数量相同,但木犀草素的 ORAC 值更高,推测可能 B 环羟基较 A 环羟基更具抗氧化活性,其邻二酚羟基发挥的作用显著;双键为吸电子基团,其诱导效应可使黄酮的抗氧化能力降低,而双键的存在又可延长黄酮的共轭体系,增强自由基产物的稳定性,提高抗氧化活性;实验结果显示当取代基均相同时,二氢山奈酚的 ORAC 值大于山奈酚,而紫柳素的 ORAC 值大于 7,3',4'-三羟基黄酮,可见 C 环双键的存在对其抗氧化作用的影响还有待研究;二氢山奈酚的 ORAC 值显著大于儿茶素,可见 4 位羰基的存在对抗氧化效果具有一定促进作用。本实验对部分黄酮类的抗氧化效果及其结构之间的关系进行了分析,对上述结构影响抗氧化能力强弱的相关结论进行了验证。

参考文献

- 1 Chinese Flora Editing Committee. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 2007: 217.
- 2 Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, et al. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp[J]. Food Chem Toxicol, 2005, 43: 1673-82.
- 3 Bhadoriya SS, Ganeshpurkar A, Narwaria J, et al. *Tamarindus indica*: extent of explored potential [J]. Pharmacogn Rev, 2011, 5: 73-81.
- 4 Xu JK, Yao XS, Li YB. Determination principle and application of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2006, 22: 1015-1021.
- 5 Lu XH, Li ZL, Liu SH, et al. Chemical constituents from leaves of *Adinandra nitida* (II) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 1272-1276.
- 6 Zhang M, Xu QM, Wang TY, et al. Chemical constituents from pods of *Glycine max* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46: 344-347.
- 7 Zhang XY, Wang XQ, Wen AP. Chemical constituents from flowers of *Gentiana dahurica* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48: 241-246.
- 8 Ibrahim AR, Abul-Hajj YJ. Microbiological transformation of chromone, chromanone, and ring A hydroxyflavones [J]. J Nat Prod, 1990, 53: 1471-1478.
- 9 Jung MJ, Kang SS, Jung HA, et al. Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrissin* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27: 593-599.
- 10 ao YP, Wu Q, Liang J, et al. Chemical constituents of *Corydalis hendersonii* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 60-63.
- 11 Kaoudji M. Acylated and non-acylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* buds [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 2295-2297.
- 12 Zhao YJ, Li JK, Zhang X, et al. Study on antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Psidium guajava* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43: 760-765.
- 13 Xu D, Huang Z, Cen YJ, et al. Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata* [J]. J Pest Sci, 2009, 82: 195-202.
- 14 Feng WS, Chen WJ, Zheng XK, et al. Flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2017, 52: 1497-1502.
- 15 Gao C, Zhang Y, Tian YX, et al. Isolation and structure iden-

- tification of flavonoids from *Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. var. *sinica* Rehd. et Wils. [J]. China J Med Chem (中国药物化学杂志), 2022, 32 :111-116.
- 16 Junior GMV, Sousa CMM, Cavalheiro AJ, et al. Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities [J]. Helv Chim Acta, 2008, 91 :2159-2167.
- 17 Duan CC, Li CB, Zhang XJ, et al. A study on hesperidin and naringin from *Pteris multifida* Poir [J]. J Dalian Nation Univ (大连民族大学学报), 2021, 23 :214-217.
- 18 Yin W, Yu Y, Ma QL, et al. Study on chemical constituents and antitumor activities of leaves of *Osmanthus fragrans* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2018, 26 :178-184.
- 19 Yan QX, Tan DP, Kang H, et al. Study on flavonoids constituents of *Blumea balsamifera* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18 :86-89.
- 20 Nessa F, Ismail Z, Mohamed N, et al. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leave [J]. Food Chem, 2004, 88 :243-252.
- 21 Yin YZ, Wang RS, Chen RD, et al. Studies on the Chemical constituents of suspension cultured cells of *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37 :3734-3737.
- 22 Obata H, Onodera J, Kurihara Y, et al. Synthesis of 2', 3', 4, 4', 6'-pentahydroxychalcone, an aglycone of carthamin, and its isomerization into 4', 5, 6, 7- and 4', 5, 7, 8-tetrahydroxyflavanone, carthamidin and isocarthamidin [J]. B Chem Soc Jpn, 1978, 51 :3627-3630.
- 23 Lee KJ, Song NY, Oh YC, et al. Isolation and bioactivity analysis of ethyl acetate extract from *Acer tegmentosum* using *in vitro* assay and on-line screening HPLC-ABTS (+) system [J]. J Anal Methods Chem, 2014, 2014 :150509.
- 24 Jeon JS, Kang SW, Um YH, et al. Preparative isolation of antioxidant flavonoids from small black soybeans by centrifugal partition chromatography and sequential solid-phase extraction [J]. Sep Sci Technol, 2014, 49 :2756-2764.
- 25 Zhuang JY, Li BS, Wang SY. Study on the anti-diabetic activities of *Tamarindus pericarp* [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2011, 27 :773-776.
- 26 Guo CM, Liu SQ, Guo YM, et al. Function-structure association of flavonoid phytochemicals on scavenging hydroxyl radical (HO ·) [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24 :1724-1728.
- 27 Sun QL, Wang X, Liu JH, et al. Study on structure-antioxidation relationship of plant flavonoids [J]. Food Sci (食品科学), 2005, 26 :69-74.