

# 窄叶芍药的化学成分及其抗氧化活性

马英, 高婷婷, 田丽萍, 谭勇\*, 王金辉

(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源重点实验室, 新疆石河子 832002)

**[摘要]** 目的:研究窄叶芍药的化学成分,并对分离得到的化合物进行抗氧化活性评价。方法:采用反复硅胶柱色谱法和 Sephadex LH-20 柱色谱法等进行分离纯化,并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构;并采用 1,1-二苯基-2-硝基苯肼自由基清除法(DPPH)和 2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸-6)二铵盐自由基清除法(ABTS)对化合物的体外活性进行评价。结果:从窄叶芍药中分离得到 5 个化合物,并鉴定为没食子酸乙酯(1),没食子酸甲酯(2),齐墩果酸(3),丁香酸(4), $\beta$ -谷甾醇(5);对化合物 1~4 进行抗氧化活性测试,结果表明:阳性药(维生素 C, VC)及化合物 1 和 2 对 DPPH 自由基的半数清除率( $IC_{50}$ )分别达到 $(35.13 \pm 0.28)$ ,  $(44.64 \pm 0.37) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,均低于阳性对照抗坏血酸  $IC_{50}$  ( $60.17 \pm 0.98) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;阳性药及化合物 1 和 2 对 ABTS 自由基的  $IC_{50}$  分别达到 $(25.13 \pm 0.68)$ ,  $(35.76 \pm 1.48) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,均低于阳性对照抗坏血酸  $IC_{50}$  ( $38.55 \pm 0.78) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:化合物 3, 4 首次从该植物中分离得到,并且化合物 1 和化合物 2 具有很强的抗氧化活性,其余化合物的抗氧化活性较弱。

**[关键词]** 窄叶芍药; 化学成分; 结构鉴定; 抗氧化活性

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0070-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020070

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0959.006.html>

**[网络出版时间]** 2014124 9:59

**Chemical Constituents and Antioxidant Evaluation of *Paeonia anomala*** MA Ying, GAO Ting-ting, TIAN Li-ping, TAN Yong\*, WANG Jin-hui (College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the chemical constituents from *Paeonia anomala* and to evaluate their antioxidant activities. **Method:** The compounds were isolated by chromatography on silicagel, Sephadex LH-20 column and identified on the basis of physicochemical constants and spectral analysis. Their antioxidant activities were evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2-amino-di (3-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt (ABTS) radical scavenging methods. **Result:** Five compounds were isolated and their structures were identified as ethyl gallate (1), methyl gallate (2), oleanic acid (3), syringate (4) and  $\beta$ -sitosterol (5). The results showed that the DPPH radical scavenging activity of compounds 1 and 2 were lower than the positive control of Vitamin C with  $IC_{50}$  values  $(35.13 \pm 0.28)$ ,  $(44.64 \pm 0.37) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Their ABTS radical scavenging activity were lower than Vitamin C with  $IC_{50}$  values of  $(25.13 \pm 0.68)$ ,  $(35.76 \pm 1.48) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. **Conclusion:** Compounds 3, 4 are isolated from this plant for the first time. Compounds 1, 2 have powerful antioxidant activities, and the others have little antioxidant activities.

**[Key words]** *Paeonia anomala*; chemical constituents; identification; antioxidant activities

窄叶芍药为牡丹科多年生草本植物,其块根纺锤形或近球形,多以花及根为主要入药部位,主要分布在阿勒泰、天山和准格尔西部山地。在《哈萨克

药志》中记载,其味苦,微寒,具有活血化瘀、解毒消肿功效,在哈萨克药中用其治疗月经不调,痛经,闭经,瘀血腹痛,胸疼痛,疥疮等<sup>[1]</sup>,其化学成分鲜有

**[收稿日期]** 20140424(010)

**[基金项目]** 石河子大学自然科学重点项目(ZRXX2009ZD05);石河子大学“3152”青年骨干教师项目

**[第一作者]** 马英,硕士,从事天然产物化学研究, Tel:13279933939, E-mail:466041219@qq.com

**[通讯作者]** \* 谭勇,博士,教授,硕士生导师,从事药物资源及天然产物化学研究, Tel:13579762501, E-mail:xjty123@163.com

报道,为探讨其药效物质基础,对其进行化学成分及其抗氧化活性的研究。

本实验以窄叶芍药为对象,对其根的乙酸乙酯萃取层反复柱色谱与高效液相制备色谱,得到5个化合物,并采用波谱学解析化合物的结构,采用1,1-二苯基-2-硝基苯肼自由基清除法(DPPH)和2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸-6)二铵盐自由基清除法(ABTS)对分离得到的化合物进行抗氧化活性评价,这为更深入的研究和开发窄叶芍药的药用价值及资源的充分利用提供理论依据。

## 1 材料

窄叶芍药根采集于2012年10月新疆塔城地区裕民县,经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为牡丹科芍药属植物窄叶芍药根 *Paonia anomala*。

薄层色谱用硅胶 GF254、柱色谱用硅胶(200~300目,均为青岛海洋化工有限公司),Sephadex LH-20(瑞典 Pharmacia 公司),DPPH, ABTS(Sigma 公司),过硫酸钾、无水乙醇、抗坏血酸(维生素 C, VC)、三氯甲烷、石油醚(沸程 60~90℃)、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等均为分析纯试剂,水为双蒸水。

2695 Separations Module 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),APX-600 型核磁共振光谱仪(TMS 作内标,瑞士 Bruker 公司),INOVA-600 型核磁共振光谱仪(TMS 作内标,美国 Varian 公司),LCT Premier XE time-of-flying 质谱仪(美国 Waters),EYBLA 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),SK5200HP 型超声波清洗器(上海科导仪器有限公司),X-5 型显微熔点测试仪(北京泰克仪器有限公司),UV-2401 型紫外-可见分光光度计(日本岛津制作所)。

## 2 方法

**2.1 化合物的提取与分离**<sup>[2]</sup> 窄叶芍药根 11.50 kg 干燥后,粉碎,分别用 10, 8, 8 倍量 95%, 70% 乙醇热回流提取 3 次,每次 2~3 h,减压回收溶剂后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别减压浓缩,回收溶剂,得到乙酸乙酯浸膏 410 g(其中通过 TLC 图谱发现 95% 乙醇和 70% 乙醇提取物乙酸乙酯萃取层所含化学成分大致相同,因此,将其合并)。将乙酸乙酯浸膏经硅胶柱色谱分离,以石油醚-乙酸乙酯(100:0~0:100)溶剂体系梯度洗脱,得化合物 **1**(80.7 mg),再经过 Sephadex LH-20 柱、制备液相等分离手段,得到化合物 **2**(4.0 mg),**3**(5.3 mg),**4**(4.4 mg),**5**(10.3 mg)。

**2.2 化合物抗氧化活性测定** 化合物抗氧化活性分别采用 DPPH 自由基清除法和 ABTS 自由基清除

法测定。

**2.2.1 DPPH 自由基清除法** 按照文献的方法<sup>[3-4]</sup>进行活性测定。取样品 2 mg 溶于 10 mL 的量瓶中,在依次吸取适当的体积稀释配置成 0.20, 0.15, 0.10, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。样品组:将 2 mL 样品溶液及 2 mL 1.0 × 10<sup>-4</sup> mol·mL<sup>-1</sup> DPPH (95% 乙醇溶液)加入同一试管中,摇匀,室温下暗处静置 30 min 后测定其吸光度(A<sub>1</sub>);同时测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 溶剂(蒸馏水)混合后的吸光度(A<sub>2</sub>);测定 2 mL 测试样品溶液与 2 mL 95% 乙醇溶液混合后的吸光度(A<sub>3</sub>)。以抗坏血酸作为阳性组,进行 DPPH 自由基清除测定。抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = [1 - (A_1 - A_3) / A_2] \times 100\%$$

**2.2.2 ABTS 自由基清除法** 按照文献[5-6]的方法进行活性测定。贮备液配置:7 mmol·L<sup>-1</sup> ABTS 水溶液,2.45 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 水溶液按体积比混合定容至 25 mL,在黑暗室温条件下反应 12~16 h。测定前,将上述混合液用无水乙醇稀释,直至于波长 734 nm 处测得其吸光度为 0.70 ± 0.02,于 30℃ 保温备用。按 2.2.1 样品溶液的配制方法,配制不同浓度的样品溶液,再分别移取不同浓度样品溶液 200 μL 与 4 mL 贮备液混合均匀,在 30℃ 黑暗条件下反应 30 min,用蒸馏水调零,测定波长 734 nm 处的 A<sub>1</sub>。同时测定 4 mL 贮备液与 200 μL 蒸馏水混合后的 A<sub>2</sub>。以抗坏血酸作为阳性组,每个样品平行测定 3 次。

$$\text{清除率} = (A_2 - A_1) / A_2 \times 100\%$$

## 3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末(甲醇),C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, mp 166~167℃。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.05(2H, s), 4.27(2H, q, J = 7.2 Hz), 1.34(3H, t, J = 6.0 Hz);<sup>13</sup>C-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 121.81(C-1), 110.05(C-2, 6), 146.51(C-3, 5), 139.71(C-4), 168.60(C=O), 14.68(-CH<sub>3</sub>), 61.71(-C<sup>-</sup>)。以上数据与文献[7]一致,鉴定该化合物为没食子酸乙酯。

化合物 **2** 白色粉末(甲醇),C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>, mp 129~131℃,FeCl<sub>3</sub> 反应呈阳性(蓝色),Molish 反应呈阴性。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.05(2H, s, H-2, 6), 3.80(3H, s, -OCH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 121.81(C-1), 110.05(C-2, 6), 146.51(C-3, 5), 139.71(C-4), 168.60(-COOCH<sub>3</sub>), 61.71(-C<sup>-</sup>)。以上数据与文献[8]一致,鉴定该化合物为没食子酸甲酯。

化合物3 白色簇晶(三氯甲烷),  $C_{30}H_{48}O_3$ , mp 302 ~ 304 °C, 醋酸-浓硫酸反应阳性。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5.18 (1H, t,  $J = 3.6$  Hz H-12), 1.10 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, s, H-25), 0.89 (3H, s, H-30), 0.88 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-29), 0.76 (3H, s, H-27), 0.72 (3H, s, H-26)。<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 38.2 (C-1), 27.9 (C-2), 79.7 (C-3), 39.8 (C-4), 56.8 (C-5), 19.5 (C-6), 34.0 (C-7), 40.6 (C-8), 47.6 (C-9), 39.8 (C-10), 24.0 (C-11), 123.7 (C-12), 145.2 (C-13), 42.9 (C-14), 28.7 (C-15), 24.1 (C-16), 48.5 (C-17), 42.7 (C-18), 47.3 (C-19), 31.6 (C-20), 34.9 (C-21), 33.6 (C-22), 28.8 (C-23), 15.9 (C-24), 16.3 (C-25), 17.7 (C-26), 26.4 (C-27), 181.8 (C-28), 33.8 (C-29), 24.5 (C-30)。以上数据与文献[9]一致, 鉴定该化合物为齐墩果酸。

化合物4 白色簇晶(三氯甲烷),  $C_9H_{10}O_5$ , mp 210 ~ 212 °C。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 3.81 (6H, s, -OCH<sub>3</sub>), 7.04 (2H, s, H-2, 6)。<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 50.81 (-OCH<sub>3</sub>, 2), 108.61 (C-2, 6), 120.04 (C-1), 138.32 (C-4), 145.07 (C-3, 5), 167.57 (C-1)。以上数据与文献[10]一致, 鉴定该化合物为丁香酸。

化合物5 白色针晶(石油醚),  $C_{29}H_{50}O$ , mp 139 ~ 141 °C。喷硫酸-香草醛溶液(5%)加热显紫红色。与 $\beta$ -谷甾醇对照品共薄层, 在石油醚-乙酸乙酯, 三氯甲烷-丙酮, 石油醚-乙酸乙酯-丙酮3种不同展开剂条件下, 其色谱行为均一致。故鉴定该化合物为 $\beta$ -谷甾醇<sup>[11]</sup>。

#### 4 化合物抗氧化活性

4.1 DPPH法测定结果 化合物1对自由基清除能力最强, 其次是化合物2, 其余2个化合物的抗氧化活性较弱。在0.10 g·L<sup>-1</sup>时化合物1, 2及维生素C基本达到最大抑制率, 之后随着浓度的增大清除率逐渐增加, 并趋于平稳。其中化合物1, 2对DPPH自由基的半数清除率( $IC_{50}$ )分别达到(35.13 ± 0.28), (44.64 ± 0.37)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 而阳性药抗坏血酸的 $IC_{50}$ 达到(60.17 ± 0.98)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 结果表明, 化合物1, 2均对DPPH自由基抑制能力强于抗坏血酸, 说明化合物1, 2均具有较强的抗氧化能力, 且化合物1抗氧化能力强于化合物2, 见图1。

4.2 ABTS法测定结果 化合物1, 2对自由基清除率均大于阳性对照药抗坏血酸, 且化合物1对ABTS

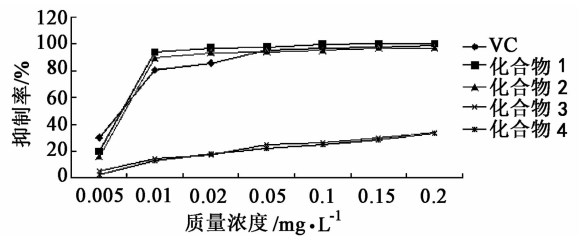


图1 化合物的DPPH自由基清除活性效果  
Fig.1 DPPH free radical scavenging effect of compounds

自由基清除率大于化合物2, 其余2个化合物的抗氧化活性较差。随着浓度的增加, 化合物1, 2及阳性药对自由基清除能力逐渐增加并趋向平稳。其中化合物1, 2对ABTS自由基的 $IC_{50}$ 分别达到(25.13 ± 0.68), (35.76 ± 1.48)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 而阳性药抗坏血酸的 $IC_{50}$ 达到(38.55 ± 0.78)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其二者的 $IC_{50}$ 均低于阳性药的 $IC_{50}$ , 因此, 化合物1, 2对ABTS自由基的清除能力均强于阳性药, 结果表明化合物1, 2具有较强的抗氧化活性, 见图2。

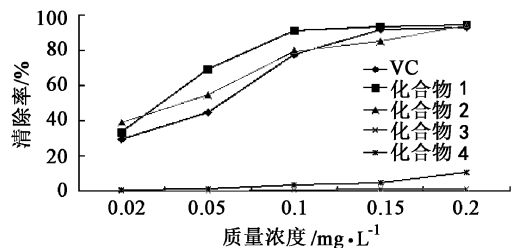


图2 化合物的ABTS自由基清除活性效果  
Fig.2 ABTS free radical scavenging effect of compounds

#### 5 结论

窄叶芍药根95%, 70%乙醇提取物乙酸乙酯萃取部分, 分离得的没食子酸乙酯(1), 没食子酸甲酯(2), 齐墩果酸(3), 丁香酸(4),  $\beta$ -谷甾醇(5), 其中化合物3, 4首次从窄叶芍药中分离得到, 化合物1和2对DPPH自由基的半数清除率 $IC_{50}$ 分别达到(35.13 ± 0.28), (44.64 ± 0.37)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而阳性药抗坏血酸(维生素C)的半数清除率 $IC_{50}$ 分别达到(60.17 ± 0.98)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 其中化合物1和2对ABTS自由基的半数清除率 $IC_{50}$ 分别达到(25.13 ± 0.68), (35.76 ± 1.48)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 而阳性药抗坏血酸的半数清除率 $IC_{50}$ 分别达到(38.55 ± 0.78)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 二者对DPPH自由基和ABTS自由基清除率的 $IC_{50}$ 均低于阳性药的 $IC_{50}$ , 说明化合物1和2具有较强的抗氧化活性与参考文献[13]一致, 该研究结果为进一步开发新疆道地药材窄叶芍药的

资源利用和药用价值提供理论基础。

[参考文献]

- [1] 巴哈尔古丽·黄尔汗,徐新. 哈萨克药志[M]. 北京:中国医药科技出版社,2012:443-446.
- [2] 吴炎,李永伟,戚进,等. 短葶山麦冬须根乙酸乙酯部位化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):40-43.
- [3] Xican Li, Jing Lin, Yaoxiang Gao, et al. Antioxidant activity and mechanism of Cimicifugae Rhizoma [J]. Chem Cent J,2012,6(1):140.
- [4] 邓超澄,霍丽妮,李培源,等. 广西阴香叶挥发油化学成分及其抗氧化性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):105-109.
- [5] 潘心禾,史小娟,张新风,等. 柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):99-101.
- [6] Shanab S M M, Mostafa S S M, Shalaby E A. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2012, 2(8): 608-615.
- [7] 赵燕燕,崔承彬,蔡兵,等. 洋紫荆化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2005,15(5):302-304.
- [8] 李宁,李旸,冯志国,等. 刀豆的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(11):676-678.
- [9] 韩贺东,胡海清,林燕,等. 贵州糯米藤化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):82-85.
- [10] 张海波,孔丽娟,梁侨丽,等. 地胆草的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):101-103.
- [11] 蓝树彬. 齿叶泥花草化学成分研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(1):38-39.
- [12] 刘志军,戚进,朱丹妮,等. 头花蓼化学成分及抗氧化活性研究[J]. 中药材,2008,31(7):995-998.

[责任编辑 邹晓翠]

## 欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,242页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx\_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。