

分心木中的化学成分及抗氧化活性研究

赵焕新^{1,2}, 景援朝², 白虹^{2,3}, 王英爱², 周洪雷^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省医学科学院药物研究所, 济南 250062;
3. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

[摘要] 目的:对中药分心木的化学成分进行分离鉴定,并对分得的单体化合物进行抗氧化活性考察。方法:应用各种柱色谱对分心木中的化合物进行分离、纯化,根据波谱数据鉴定其结构;采用1,1-二苯基-2-硝基苯肼(DPPH)自由基清除法对化合物进行抗氧化活性考察。结果:从分心木乙醇提取物中分离得到7个单体化合物,分别鉴定为二氢吐叶醇-9-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(1),紫杉叶素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷(2),槲皮素-3-*O*-(4'-*O*-乙酰基)- α -*L*-鼠李糖苷(3),山柰酚-3-*O*- α -*L*-鼠李糖苷(4),山柰酚(5),柚皮素(6)和香草醛(7)。其中1~5,7为首次从分心木中分离得到。由于肾脏疾病的发病机制与机体的抗氧化平衡失调关系密切,为阐明分心木补肾功效的物质基础,结合前期的实验结果,采用DPPH自由基清除法考察了分心木中3个酚酸类及5个黄酮类化合物的抗氧化活性,发现8个化合物均显示不同程度的自由基清除能力。结论:分心木中的化学成分具有一定的抗氧化活性,为进一步阐明其传统功效提供了理论依据。

[关键词] 分心木; 化学成分; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0054-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070054

Chemical Constituents from Diaphragma Juglandis Fructus and Their Antioxidant Activity

ZHAO Huan-xin^{1,2}, JING Yuan-chao², BAI Hong^{2,3}, WANG Ying-ai², ZHOU Hong-lei^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China;

3. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the chemical constituents of Diaphragma Juglandis Fructus and investigate the antioxidant activity of their monomeric compounds. **Method:** Various column chromatography methods were used to isolate and purify the compounds and their structures were identified on the basis of spectral data. In addition, the antioxidant activities of compounds were evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. **Result:** Seven monomeric compounds were isolated from ethanol extracts of Diaphragma Juglandis Fructus and their structures were identified as dihydrovomifoliol-9-*O*- β -*D*-glucopyranoside (1), taxifolin-3-*O*- α -*L*-arabinofuranoside (2), quercetin-3-*O*-(4'-*O*-acetyl)- α -*L*-rhamnopyranoside (3), kaempferol-3-*O*- α -*L*-rhamnopyranoside (4), kaempferol (5), naringenin (6) and vanillin (7). Compounds 1-5 and 7 were isolated from Diaphragma Juglandis Fructus for the first time. As the pathogenesis of kidney disease is closely related to the body's disorder of antioxidant balance, in order to illustrate the material basis for kidney-reinforcing efficacy of Diaphragma Juglandis Fructus, three phenolic acid compounds and five flavonoids compounds were investigated for their antioxidant activity using DPPH radical scavenging assay combined with the

[收稿日期] 20150722(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072544)

[第一作者] 赵焕新,在读博士,助理研究员,从事中药化学研究,E-mail:jdnl@163.com

[通讯作者] *周洪雷,博士,教授,博士生导师,从事中药化学成分与质量控制研究,E-mail:zhouhongleitcm@163.com

previous experimental results. All the compounds indicated radical scavenging capacity to different extents. **Conclusion:** The chemical constituents of Diaphragma Juglandis Fructus have certain antioxidant activities, providing theoretical basis for the elaboration of its traditional efficacy.

[**Key words**] Diaphragma Juglandis Fructus; antioxidant activity

分心木又名胡桃衣、胡桃隔、胡桃夹,主产于河北、山西、山东等地。具有利尿清热、健脾固肾、涩精等功效,主要用于治疗遗精,崩漏,带下,痢疾,肾炎等疾病^[1-2],其化学成分主要包括酚酸类、黄酮类、醌类等^[3]。为更好地开发利用分心木,本课题组对分心木乙醇提取物的化学成分进行了初步研究,从中分离得到 12 个化合物^[4]。在后期研究中,从同一提取物中又分离得到 7 个单体化合物,其中 6 个为首次从分心木中分离得到。目前国内外对分心木的化学成分及药理活性研究较少,对其传统功效补肾作用的物质基础研究未见报道,研究发现,肾脏疾病的发病机制与机体的抗氧化平衡失调有密切关系^[5]。杨明珠等^[6]考察过分心木不同提取物的抗氧化活性,但未对其中化学成分的活性进行测定。因此,笔者在前期工作基础上对分心木的化学成分进一步深入研究,并以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力为指标考察了分心木中主要成分的抗氧化活性,为阐明其补肾功效提供理论依据。

1 材料

Avance III HD 型 400M 核磁共振仪(Bruker Bio Spin 公司), TrapVL 型质谱仪(Agilent 公司), 1100 series 型高效液相分析仪(Agilent 公司), XS105 型天平(瑞士 Mettler), Rotavapor R-3 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi), DFD-700 型恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司), UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司)。

薄层色谱硅胶 G 及柱色谱用硅胶(200 ~ 300 目)青岛海洋化工产品;羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences 公司), ODS (50 μm , 日本 YMC 公司), HPLC 制备用色谱柱 ODS-A (20 mm \times 150 mm, 5 μm , 日本 YMC 公司), 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, Sigma 公司), 试剂均为分析纯。

分心木购自济南市建联中药公司,原产地山东,由山东省医学科学院药物研究所白虹副研究员鉴定为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* 果核内的木质隔膜。

2 方法

2.1 提取与分离 分心木药材 3.6 kg,用 70% 乙

醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,减压回收溶剂得乙醇提取物。水混悬后,采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇提取,分别得石油醚提取物 45 g,乙酸乙酯提取物 51 g,正丁醇提取物 120 g。乙酸乙酯提取物经硅胶柱色谱,三氯甲烷-甲醇系统梯度洗脱(100:0,95:5,92:8,9:1,85:15,7:3,0:100)得 14 个流份(Fr. A ~ Fr. N),其中 Fr. I 经反复硅胶柱色谱,Sephadex LH-20 柱色谱,得化合物 **5**(7 mg)和 **6**(5 mg);Fr. J 经反复硅胶柱色谱,Sephadex LH-20 柱色谱及制备高效液相色谱(甲醇-水,20:80),得到化合物 **2**(108 mg);Fr. M 经反复硅胶柱色谱,Sephadex LH-20 柱色谱以及 ODS 柱色谱纯化(甲醇-水,60:40),得到化合物 **1**(21 mg)。正丁醇提取物经大孔树脂色谱,乙醇-水系统梯度洗脱(0:100,30:70,60:40,95:5),得 4 个流份(Fr. I ~ Fr. IV),其中 Fr. II 经 Sephadex LH-20 柱色谱及制备高效液相色谱分离,得到化合物 **3**(20 mg),**4**(8 mg)和 **7**(112 mg)。

2.2 抗氧化活性测定 采用 DPPH 自由基清除法。取 DPPH 样品 10 mg,无水乙醇溶解后,定容于 250 mL 棕色量瓶,溶液备用。取待测样品适量,配制质量浓度分别为 1.25,2.5,5,10,15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液。取样品溶液 1 mL 及 DPPH 溶液 2 mL,加入具塞试管中,摇匀,室温下避光静置 30 min 后测定吸光度 A_1 ;同时测定无水乙醇 1 mL + DPPH 溶液 2 mL 混合、静置后的吸光度 A_2 以及样品溶液 1 mL + 无水乙醇 2 mL 混合、静置后的吸光度 A_3 ,维生素 C 为阳性对照。

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

3 结构鉴定

化合物 **1** 棕黄色粉末,ESI-MS m/z 411 $[M + Na]^+$, 387 $[M - H]^-$ 。¹H-NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 2.16 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-2a), 2.62 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-2b), 5.85 (1H, s, H-4), 2.06 (1H, m, H-7a), 1.81 (1H, m, H-7b), 1.80 (1H, m, H-8a), 1.50 (1H, m, H-8b), 3.85 (1H, m, H-9), 1.19 (3H, d, $J = 6$ Hz, H-10), 1.01 (3H, s, H-11), 1.10 (3H, s, H-12), 2.06 (3H, s, H-13), 4.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.14 (1H, dd, $J = 9.2, 8.0$ Hz, H-2'), 3.35 (1H, t, $J = 9.2, 8.0$ Hz, H-3'), 3.31 (1H, m, H-4'), 3.26

(1H, m, H-5') 3.89 (1H, dd, $J = 11.0, 1.2$ Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, $J = 11.0, 4.8$ Hz, H-6'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 41.1 (C-1), 49.4 (C-2), 199.6 (C-3), 125.4 (C-4), 170.2 (C-5), 77.8 (C-6), 33.8 (C-7), 32.8 (C-8), 74.8 (C-9), 18.7 (C-10), 23.1 (C-11), 22.8 (C-12), 20.9 (C-13), 100.9 (C-1'), 73.6 (C-2'), 76.8 (C-3'), 70.5 (C-4'), 76.5 (C-5'), 61.2 (C-6')。以上数据与文献[7]基本一致,故确定化合物为二氢吐叶醇-9- O - β -D-葡萄糖苷。

化合物2 棕黄色粉末,ESI-MS m/z 459 [M + Na] $^+$, 435 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.92 (1H, d, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 5.94 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.07 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.91 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3), 4.23 (1H, s, H-1''), 3.92 (1H, br s, H-2''), 3.82 (1H, br s, H-3''), 4.28 (1H, m, H-4''), 3.66 (2H, m, H-5''); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 196.1 (C-4), 168.0 (C-7), 164.2 (C-9), 163.2 (C-5), 146.2 (C-4'), 145.2 (C-3'), 127.8 (C-1'), 119.4 (C-6'), 114.9 (C-5'), 114.3 (C-2'), 100.8 (C-10), 96.1 (C-6), 95.2 (C-8), 82.5 (C-2), 73.4 (C-3), 106.4 (C-1''), 79.8 (C-2''), 77.9 (C-3''), 87.5 (C-4''), 61.9 (C-5'')。以上数据与文献[8]基本一致,故确定化合物为紫杉叶素-3- O - α -L-呋喃阿拉伯糖苷。

化合物3 金黄色固体,ESI-MS m/z 491 [M + H] $^+$, 513 [M + Na] $^+$, 489 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 6.18 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 6.34 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 7.28 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.24 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 5.47 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-1''), 4.19 (1H, dd, $J = 3.0, 1.8$ Hz, H-2''), 3.86 (1H, dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz, H-3''), 4.80 (1H, overlapped, H-4''), 3.28 (1H, m, H-5''), 0.76 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''), 2.04 (3H, s, -COCH $_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol- d_4 , 100 MHz) δ : 157.1 (C-2), 134.1 (C-3), 178.0 (C-4), 161.8 (C-5), 98.5 (C-6), 164.5 (C-7), 93.4 (C-8), 158.1 (C-9), 104.5 (C-10), 121.4 (C-1'), 114.9 (C-2'), 145.2 (C-3'), 148.4 (C-4'), 115.5 (C-5'), 121.3 (C-6'), 101.1 (C-1''), 70.2 (C-2''), 68.6 (C-3''), 73.5 (C-4''), 68.1 (C-5''), 16.2 (C-6''), 171.1 (C=O), 19.6 (-COCH $_3$)。以上数据与文献[9]基本一致,故确定化合物为槲皮素-3- O - $(4''$ -

O -乙酰基)- α -L-鼠李糖苷。

化合物4 黄色粉末,ESI-MS m/z 433 [M + H] $^+$, 431 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 8.00 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.34 (1H, s, H-1''), 4.20 (1H, m, H-2''), 3.68 (1H, m, H-3''), 3.30 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, H-4''), 3.42 (1H, m, H-5''), 0.90 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH $_3$ -6'')。以上波谱数据与文献[10]基本一致,故鉴定化合物为山柰酚-3- O - α -L-鼠李糖苷。

化合物5 黄色粉末,ESI-MS m/z 287 [M + H] $^+$, 285 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.94 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.14 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)。以上数据与文献[11]基本一致,故鉴定化合物为山柰酚。

化合物6 白色结晶,ESI-MS m/z 273 [M + H] $^+$, 271 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 7.28 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 6.76 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 5.82 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.84 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.30 (1H, dd, $J = 12.8, 3.0$ Hz, H-2), 3.28 (1H, dd, $J = 17.0, 12.8$ Hz, H-3a), 3.01 (1H, dd, $J = 17.0, 3.0$ Hz, H-3b)。以上数据与文献[12]基本一致,故鉴定化合物为柚皮素。

化合物7 白色固体,ESI-MS m/z 153 [M + H] $^+$, 151 [M - H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (Methanol- d_4 , 400 MHz) δ : 9.73 (1H, s, -CHO), 7.44 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6), 7.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.17 (1H, br s, -OH), 3.90 (3H, s, -OCH $_3$)。以上数据与文献[13]基本一致,故鉴定化合物为香草醛。

4 抗氧化活性测定

受化合物量、溶解度的影响,并结合化合物在 15 mg·L $^{-1}$ 初始浓度下的活性结果,笔者选取了分心木中的3个酚酸类及5个黄酮类化合物,考察其不同浓度下的DPPH自由基清除能力,试验方法如2.2项下所示。测试的化合物分别为没食子酸、没食子酸乙酯、原儿茶酸、儿茶素、二氢槲皮素、槲皮素、槲皮苷、槲皮素-3- O - $(4''$ - O -乙酰基)- α -L-鼠李糖苷。结果表明,8个化合物均显示了不同程度的DPPH自由基清除活性。其中,酚酸类化合物显示了较强的活性,按清除能力大小排序,没食子酸>没

食子酸乙酯 > 原儿茶酸, 其半抑制浓度 IC_{50} 分别为 2.10, 3.55, 4.99 $mg \cdot L^{-1}$ (维生素 C 为 5.96 $mg \cdot L^{-1}$), 与文献[14]报道的数据基本一致。黄酮类化合物中, 槲皮素和二氢槲皮素的活性较强, IC_{50} 分别为 3.81, 4.82 $mg \cdot L^{-1}$, 成苷后活性降低, 如槲皮苷和槲皮素-3-O-(4''-O-乙酰基)- α -L-鼠李糖苷的 IC_{50} 分别为 7.98, 7.03 $mg \cdot L^{-1}$ 。除槲皮素-3-O-(4''-O-乙酰基)- α -L-鼠李糖苷外, 文献[15-17]也报道了槲皮素、二氢槲皮素、槲皮苷的 DPPH 自由基清除活性, 受不同试验条件影响, 本文测定值与文献的 IC_{50} 数据有少许差异, 但均发现黄酮类化合物具有较强的抗氧化活性, 且得出的黄酮类化合物的活性强弱顺序一致, 即槲皮素 > 二氢槲皮素 > 槲皮苷。

5 结论

分心木为我国民间用药, 维吾尔族医用其治疗肾虚、遗精功效显著。为探索其药用物质基础, 本试验继续对分心木的化学成分进行了深入研究, 得到 7 个单体化合物, 其中 6 个为该种首次分离。结合前期试验基础, 对分心木中的 8 个单体化合物进行了抗氧化方面的活性考察, 发现其中的酚酸类和黄酮类化合物均显示较强的 DPPH 自由基清除能力, 推测可能是其发挥药效的主要成分, 为深入研究和开发分心木的药用价值及资源的充分利用提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 638.
[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 686.
[3] 景援朝, 赵焕新, 白虹. 分心木的研究进展[J]. 药学研究, 2014, 33(3): 167-170.
[4] 景援朝, 赵焕新, 白虹. 分心木的化学成分研究[J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 85-88.
[5] 牛爱军, 涂晓文, 张爱平, 等. 原发性肾病综合征患者体内氧化及抗氧化系统改变的探讨[J]. 中国现代医

学杂志, 2002, 12(24): 47-49.

[6] 杨明珠, 田新雁, 肖朝江, 等. 核桃分心木化学成分与生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1707-1711.
[7] Matsuyoshi K, Otsuka H, Takeda Y. Reinvestigation of the absolute stereochemistry of megastigmane glucoside, icariside B-5 [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58(10): 1399-1402.
[8] 吴兆圆, 李蓉涛. 碎米花杜鹃根的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 253-257.
[9] 赵焕新, 白虹, 李巍, 等. 头花蓼化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 262-266.
[10] 贾忠, 张培芬, 陶保全, 等. 核桃花的黄酮类化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(7): 496-497.
[11] 程森, 孟令杰, 周兴栋, 等. 地稔中黄酮及其苷类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3301-3305.
[12] 丁艳霞, 郭洋静, 任莹璐, 等. 杜仲雄花中黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(3): 323-327.
[13] 钟金栋, 李艳平, 李洪梅, 等. 毛叶巴豆的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1658-1661.
[14] Zhang Z J, Liao L P, Moore J, et al. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia*) [J]. Food Chem, 2009, 113(1): 160-165.
[15] Du Q Z, Li B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation-DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity [J]. Food Chem, 2012, 131(4): 1181-1186.
[16] 刘敏, 肖颖, 左爱仁, 等. 槲皮素、根皮素、水飞蓟宾清除自由基和抑制脂质过氧化活性研究[J]. 中成药, 2012, 34(4): 753-756.
[17] 唐勋, 喇晓琴, 宋永朋, 等. 翁布中黄酮类化合物的体外抗氧化活性研究[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(1): 30-32.

[责任编辑 顾雪竹]