

连翘化学成分与抗氧化活性研究

秦宇, 张文丽*, 林媛媛, 杨默媛
(解放军 316 医院, 北京 100093)

[摘要] 目的:对中药连翘进行化学成分分离与鉴定,并对连翘酯苷 A 的抗氧化活性进行研究。方法:连翘 85% 的乙醇提取物经 D101 大孔树脂,以水和不同体积分数乙醇洗脱,60% 与 30% 乙醇洗脱部分采用硅胶柱色谱、凝胶色谱和制备液相等手段纯化;利用理化和谱学分析(NMR、ESI-MS)的方法进行结构鉴定。利用 DMPD⁺法和 DPPH 法测试连翘酯苷 A 的抗氧化活性。结果:分离得 6 个化合物,分别鉴定为连翘酯苷 A (forsythoside A) (1)、木通苯乙醇 B (calceolarioside B) (2)、芦丁 (rutin) (3)、连翘苷 (forsythoside) (4)、异橄榄脂素 (isoolivil) (5)、胡萝卜苷 (daucosterol) (6)。结论:连翘酯苷 A 有很好的抗氧化活性。

[关键词] 连翘; 化学成分; 结构鉴定; 连翘苷; 连翘酯苷 A; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0149-04

[doi] 10.11653/syfy2013100149

Study on the Chemical Constituents from the Fruits of *Forsythia suspensa* and the Antioxidant Activity of Forsythoside A

QIU Yu, ZHANG Wen-li*, LIN Yuan-yuan, YANG Mo-yuan

(The 316 Hospital of Peoples Liberation Army, Beijing 100093, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of *Forsythia suspensa* and antioxidant activity of forsythoside A. **Method:** The compounds were isolated and purified by column chromatography on silica gel Sephadex LH-20 and preparative HPLC, and their structures were identified by physicochemical properties and spectral analysis. DMPD⁺ and DPPH experiments were conducted to examine the antioxidant activity of forsythoside A. **Result:** Six compounds were isolated from the fruits of *F. suspensa*. The structures of the compounds were determined as forsythoside A (1), calceolarioside B (2), rutin (3) and forsythoside (4), isoolivil (5), daucosterol (6), respectively. **Conclusion:** Forsythoside A showed excellent antioxidant activity.

[Key words] *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; chemical constituents; structure identification; forsythoside; forsythoside A; antioxidant activity

连翘性微寒、味苦,有清热解毒、消肿散结之功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等症^[1]。其含有多种化学成分,包括苯乙醇苷类、木脂素及其苷类、五环三萜类、黄酮类、挥发油类等^[2]。连翘的药理活性研究主要集中在抗炎、抗病毒、抗内

毒素、保肝利尿、解热镇痛等作用^[3-4],其主要活性成分连翘酯苷与公认的天然抗氧化剂绿原酸同属咖啡酸衍生物^[5],与国内现已大量使用的天然抗氧化剂迷迭香酸在结构上非常相似,因此本文着重研究化学成分和连翘酯苷 A 的抗氧化活性。

1 材料

Agilent 1200 系列制备液相, Buchi 恒温水浴锅, 岛津 UV-2401PC 紫外-可见分光光度计。

连翘酯苷 A (自制), 胡萝卜苷对照品购自上海尚谊化工科技有限公司, BHT (2,6-二叔丁基对甲基苯酚), 河南华美食品添加剂有限公司, DPPH (1,1-二苯基苦基苯肼)、水溶性维生素 E、DMPD (N,N-

[收稿日期] 20121015 (556)

[第一作者] 秦宇, 副主任药师, 从事医院药学及卫生事业管理, Tel:010-66779325, E-mail: zlr010826@126.com

[通讯作者] * 张文丽, 副主任药师, 从事医院药学, Tel:010-66320272, E-mail: zhangwenli1027@sina.com

二甲基-对苯二胺)均购自 Sigma 公司。

2 提取分离

连翘药材(4 kg)经 85% 乙醇 80 °C 下回流提取,过滤,合并滤液,回收溶剂至无醇味,水溶液过 D101 大孔树脂,依次以水、30% 乙醇、60% 乙醇与 95% 乙醇进行洗脱。60% 乙醇洗脱部分(约 70 g)经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(50:1)为流动相进行洗脱,每份 200 mL,共收集 25 份。其中馏分 15~19 合并,TLC 检测,含有 3 个主要斑点,反复硅胶柱层析,丙酮-氯仿(10:1)洗脱,最后经制备液相纯化[甲醇-水(30:70)]得到化合物 **1**($t_R = 22$ min, 20 mg)、**3**($t_R = 12$ min, 32 mg)和 **4**($t_R = 31$ min, 27 mg)。30% 乙醇洗脱部分(约 100 g)经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(20:1)为流动相进行洗脱,其中馏分 2026 含有 3 个主斑点,将这几个馏分合并,反复硅胶柱色谱,乙酸乙酯-丙酮(1:1)进行洗脱,得到 20 个馏分,将含有主斑点的馏分 13-18 最后经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以甲醇-水(70:30)洗脱,纯化得到化合物 **2**(23 mg)、**5**(45 mg)、**6**(67 mg)^[6]。

3 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末,Molish 反应阳性,三氯化铁反应阳性。¹H-NMR(DMSO- d_6) δ : 9.60(1H, br, 3-OH), 9.15(1H, br, 4-OH), 8.71(1H, s, 3'-OH), 8.65(1H, s, 4'-OH), 7.49(1H, d, $J = 15.6$ Hz, 7'-H), 6.25(1H, d, $J = 15.6$ Hz, 8'-H), 7.04(1H, brs, 2'-H), 7.01(1H, d, $J = 8.0$ Hz, 6'-H), 6.75(1H, d, $J = 8.0$ Hz, 5'-H), 6.68(1H, brs, 2-H), 6.61(1H, d, $J = 7.8$ Hz, 5-H), 6.48(1H, d, $J = 7.8$ Hz, 6-H), 5.28(1H, m, 4''-H), 4.29(1H, d, $J = 7.8$ Hz, 1''-H), 4.61(1H, s, 1-H), 3.86(1H, m, α -H), 3.62(1H, M, α -H), 2.68(2H, t, $J = 7.5$ Hz, β -H), 1.03(3H, d, $J = 6.0$ Hz, 6-H)。¹³C-NMR(DMSO- d_6) δ : 129.1(C-1), 116.3(C-2), 143.5(C-3), 143.5(C-4), 115.5(C-5), 119.5(C-6), 125.4(C-1'), 114.8(C-2'), 144.9(C-3'), 148.4(C-4'), 115.8(C-5'), 121.3(C-6'), 145.5(C-7'), 113.7(C-8'), 165.8(C-9'), 72.9(C- α), 36.6(C- β), 102.8(C-1''), 73.4(C-2''), 73.9(C-3''), 71.0(C-4''), 72.9(C-5''), 66.0(C-6''), 100.5(C-1'''), 70.2(C-2'''), 70.6(C-3'''), 71.8(C-4'''), 68.3(C-5'''), 17.9(C-6''')。与文献[7]对照,各数据基本一致,确定结构为 3,4-二羟基- β -苯乙基- O - α -L-鼠李糖基(1 \rightarrow 6)-4- O -咖啡酰基- β -D-葡萄糖苷。即连翘酯苷 A (*forsythiaside*)^[8]。

化合物 **2** 浅黄白色粉末,三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色,提示该化合物为酚性化合物。ESI-MS m/z : 477[M-H]⁻。¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 6.68(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.65(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.54(1H, dd, $J = 2.0, 8.1$ Hz, H-6), 7.06(1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.78(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.95(1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6'), 7.56(1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 6.31(1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 2.78(2H, m, H-7), 3.72(2H, m, H-8), 4.32(1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 4.52(1H, dd, $J = 1.9, 12.0$ Hz, H-6''a), 4.36(1H, dd, $J = 5.9, 9.3$ Hz, H-6''b)。¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 149.5(C-4'), 147.2(C-3'), 146.6(C-7'), 145.9(C-3), 144.5(C-4), 131.2(C-1), 127.6(C-1'), 123.1(C-6'), 121.3(C-6), 117.0(C-2), 116.5(C-5'), 116.3(C-5), 115.2(C-2'), 114.8(C-8'), 169.1(C-9'), 72.3(C-8), 36.6(C-7), 104.4(C-1''), 77.8(C-3''), 75.4(C-5''), 74.9(C-2''), 71.6(C-4''), 64.5(C-6'')。以上数据与文献[9]报道的木通苯乙醇 B 基本一致。

化合物 **3** 黄色结晶性粉末,Molish 反应阳性。盐酸-镁粉反应呈阳性(紫红色)。三氯化铁反应阳性(暗绿色)。¹H-NMR(DMSO- d_6) δ : 12.59(1H, s, 5-OH), 10.82(1H, s, 7-OH), 9.66(1H, s, 3'-OH), 9.17(1H, s, 4'-OH), 7.53(1H, q, $J = 1.5$ Hz, 9.0 Hz, 6'-H), 7.55(1H, d, $J = 1.5$ Hz, 2'-H), 6.82(1H, d, $J = 9.0$ Hz, 5'-H), 5.33(1H, d, $J = 7.2$ Hz, 1''-H), 5.08(1H, m, 2-H), 3.69(1H, d, $J = 9.0$ Hz, 1'''-H), 0.977(3H, d, $J = 6.0$ Hz, 6'''-H), 6.38(1H, d, $J = 2.5$ Hz, 8-H), 6.18(1H, d, $J = 2.5$ Hz, 6-H)。¹³C-NMR(DMSO- d_6) δ : 156.3(C-2), 133.2(C-3), 177.3(C-4), 161.2(C-5), 98.6(C-6), 164.0(C-7), 93.5(C-8), 156.5(C-9), 103.9(C-10), 121.2(C-1'), 115.1(C-2'), 148.3(C-4'), 144.7(C-3'), 116.2(C-5'), 121.5(C-6'), 100.8(C-1''), 74.0(C-2''), 76.4(C-3''), 69.9(C-4''), 75.8(C-5''), 66.9(C-6''), 100.7(C'''-1), 70.3(C'''-2), 70.5(C'''-3), 71.8(C'''-4), 68.2(C'''-5), 17.7(C-6)。经与文献[10]对照,各数据基本一致,因此确定为芦丁。

化合物 **4** 白色针晶(甲醇)。mp 155.0~156.0 °C。¹H-NMR(300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.05(1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2'), 6.96(1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6'), 6.92(2H, m, H-3', 2), 6.87(2H, m, H-3, 6), 5.19(1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-9a'), 5.05(1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-9b'), 4.88(1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 4.80

(1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-7e'), 4.51 (1H, t, H-9a), 4.38 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7a), 4.10 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-9b), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.74 (3H, s, OCH₃), 3.08 ~ 3.50 (7H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 8'), 2.85 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-8)。¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 148.9 (C-4), 148.5 (C-4'), 147.7 (C-3'), 146.0 (C-3), 135.3 (C-1), 131.4 (C-1'), 118.2 (C-6), 117.6 (C-5'), 115.2 (C-5), 111.6 (C-6'), 110.4 (C-2), 109.4 (C-2'), 100.2 (C-1''), 86.7 (C-7), 81.3 (C-7'), 77.1 (C-5''), 76.9 (C-3''), 73.3 (C-2''), 70.4 (C-9), 69.8 (C-4''), 69.1 (C-9'), 60.8 (C-6''), 55.6 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 54.1 (C-8), 49.4 (C-8')。上述数据经与文献[11]对照,鉴定化合物为连翘苷。

化合物 5 白色粉末。三氯化铁-铁氰化钾显色为蓝色,提示该化合物为酚性化合物。ESI-MS m/z : 377 [M + H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.64 (1H, s, H-2), 6.18 (1H, s, H-5), 6.69 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, dd, $J = 1.8, 7.9$ Hz, H-6'), 2.02 (1H, m, H-8'), 3.81 (1H, m, H-9'a), 3.54 (1H, m, H-9'b), 3.77 (1H, m, H-9a), 3.59 (1H, m, H-9b), 3.19 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-7a), 2.58 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-7b), 4.00 (1H, m, H-7'), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.80 (3H, s, -OCH₃)。¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 149.2 (C-3), 147.5 (C-3'), 145.3 (C-4), 146.2 (C-4'), 138.5 (C-1'), 133.6 (C-6), 126.4 (C-1), 123.6 (C-6'), 117.4 (C-5), 116.0 (C-5'), 113.0 (C-2), 114.0 (C-2'), 69.4 (C-9), 60.8 (C-9'), 47.6 (C-8'), 44.8 (C-7'), 75.0 (C-8), 39.9 (C-7), 56.4 (2 \times -OCH₃)。以上数据与文献[12]报道的异橄榄脂素数据基本一致。

化合物 6 白色粉末(甲醇),难溶于一般有机溶剂,易溶于氯仿-甲醇的混合溶剂及吡啶。Libermann-burchard 反应阳性, Molish 反应阳性。mp 296 ~ 298 °C。TLC 检测:与胡萝卜苷对照品共薄层,经乙酸乙酯-甲醇(8:2)展开, Rf 0.58;经氯仿-甲醇(9:1)展开, Rf 0.30;经氯仿-正丁醇(9:2)展开, Rf 0.38,且所呈斑点颜色均一致,与胡萝卜苷对照品混合后测熔点,并未下降,故鉴定该化合物为胡萝卜苷。

4 抗氧化活性研究^[13]

自由基是生物体正常代谢产物,如果自由基产生过多或清除过慢,则可引起体内自由基浓度升高。

过量的自由基会攻击脂质、核酸和蛋白质等生物大分子,导致细胞结构和功能破坏^[14-15]。因此,自由基集聚是人类衰老和许多疾病如肿瘤、心脑血管病等的重要诱因^[16]。鉴于连翘酯苷 A 与天然抗氧化剂结构很相近,对其进行如下几方面的抗氧化活性研究。

4.1 DMPD^{·+}法测定^[17-18]

4.1.1 方法 酸性条件下, DMPD 可被 ABAP, FeCl₃, CuCl₂, H₂O₂ 氧化生成稳定有颜色的 DMPD^{·+}, 在 505 nm 处有最大吸收峰。当加入抗氧化剂时,抗氧化剂能转移 1 个氢原子给 DMPD^{·+},使其溶液脱色。脱色程度越强,说明抗氧化剂的抗氧化能力越强。此反应迅速、稳定, DMPD^{·+} 的吸光值在室温下 12 h 内基本恒定。所以用此方法测试连翘酯苷 A 抗氧化活性。将 0.1 mol·L⁻¹ DMPD 溶液和 0.1 mol·L⁻¹, pH 5.25 的醋酸盐缓冲液各 10 mL 混匀,加入 5 mL 0.05 mol·L⁻¹ 的 FeCl₃ 溶液启动反应,产生 DMPD^{·+} 自由基溶液。取 1 mL DMPD^{·+} 溶液,分别加入不同浓度的连翘酯苷 A 和水溶性维生素 E, 25 °C 下反应 10 min, 在 505 nm 处测吸光值。

$$\text{DMPD}^{\cdot+} \text{清除率} = 1 - A_{505-1} / A_{505-2} \times 100\%$$

其中 A_{505-2} 为 DMPD^{·+} 初始浓度的吸光值; A_{505-1} 为存在抗氧化剂时剩余 DMPD^{·+} 浓度的吸光值,该实验重复 3 次。

4.1.2 结果 连翘酯苷 A 与水溶性维生素 E 相比能有效清除 DMPD^{·+}。浓度为 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的时候,其清除率为 16%。随着连翘酯苷 A 浓度升高,其对 DMPD^{·+} 的清除作用逐渐增强,当浓度达到 1 024 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,清除率几乎达到 100%,而水溶性维生素 E 与之相比对 DMPD^{·+} 的清除作用较弱些。见表 1。

表 1 连翘酯苷 A 与维生素 E 清除 DMPD^{·+} 的对比

浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	连翘酯苷 A 对 DMPD ^{·+} 的清除率/%	维生素 E 对 DMPD ^{·+} 的清除率/%
4	16	18
8	30	32
16	60	55
32	80	74
64	85	76
128	90	85
256	96	90
512	98	92
1 024	100	95

4.2 DPPH 自由基清除能力测定^[19] DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其在 517 nm 附近有强吸收(呈深紫色)。当自由基清除剂存在时,DPPH 的孤对电子被配对,其在 517 nm 吸收消失或减弱,通过测定吸收减弱的程度,可评价自由基清除剂的活性,因此该方法被用于连翘酯苷 A 清除自由基能力的研究。在试管中依次加入 2.5 mL 6.5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH 溶液,一定体积的浓度为 1 g·L⁻¹ 的连翘酯苷 A,最后用体积分数 70% 的乙醇补足到 5 mL,摇匀,避光 20 min 后于 517 nm 处测定吸光度,根据吸光度值计算清除率,同时以等体积的 1 g·L⁻¹ 的 BHT 代替连翘酯苷 A 作为阳性对照。见表 2。

表 2 连翘酯苷 A 与 BHT 清除 DPPH 自由基的对比

体积 /mL	连翘酯苷 A 对 DPPH 自由基清除率/%	BHT 对 DPPH 自由基清除率/%
0.2	19	18
0.4	39	32
0.6	54	41
0.8	65	51
1.0	72	65

从表 2 可以看出,连翘酯苷 A 对 DPPH 自由基具有很强的清除活性,1 g·L⁻¹ 的连翘酯苷 A 对 DPPH 自由基的清除活性强于 1 g·L⁻¹ 的 BHT。

5 结论

连翘酯苷 A 是连翘里的重要的化学成分,有报道认为连翘酯苷 A 是连翘中最主要的活性成分,在评价连翘及连翘制剂的质量时,应该以此成分而非连翘苷作为一种主要指标,可见连翘酯苷 A 的重要性。本实验对连翘酯苷 A 进行的抗氧化活性研究表明,与维生素 E 清除 DMPD⁺ 和 BHT 清除 DPPH 自由基相比,连翘酯苷 A 具有更强的抗氧化活性,且该活性随连翘酯苷 A 的浓度增加而增强,这为连翘的抗氧化活性提供佐证。本实验为连翘的进一步开发应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 刘悦,宋少江,徐绥绪,等.连翘化学成分研究[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):101.
[2] 段文娟,耿岩玲,祝贺,等.中药连翘化学成分和分析方法的研究进展[J].山东科学,2010,23(2):33.

[3] 简永耀,靳龙文.连翘的化学成分及药理学研究[J].淮海医药,2009,27(4):349.
[4] 张海燕.连翘化学成分及药理活性的研究进展[J].中药材,2000,23(10):657.
[5] 耿慧君,王文科,毕润成.连翘叶的体外抗氧化活性研究[J].山西师范大学学报:自然科学版,2005,19(4):71.
[6] 史秀峰,杨骏,黄孝春,等.连翘中连翘酯苷的大孔树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):14.
[7] SANSEIN,KAZUKOO,HIROKIT,et al. The structure of Forsythiaside isolatede from Forsythia Suspensa [J]. Chem Pharm Bull,1982, 30(3):1048.
[8] 郭强,王智民,林丽美,等.连翘属药用植物化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (5): 74.
[9] 高慧敏,王智民,王家明.白木通茎的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志,2006,41(5):333.
[10] 匡海学,张宁,陆志博.青连翘抗菌活性成分的研究 [J]. 中药通报,1988,13(7):32.
[11] Ralman MMA, Dewick P M, Jackon D E, Lucas JA et al. Lignans of Forsythia intermedia [J]. Phytochemistry, 1990,29(6): 1971.
[12] KATO Y. Structure of (+)-isoolivil (+)-cyclooilivil and some lignans [J]. Chem Pharm Bull, 1964, 12 (4): 512.
[13] 卢婷,朴香淑.连翘提取物抗氧化活性的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志,2009,45(15):57.
[14] 刘文博,李德朋,张桂林,等.连翘酯苷药理活性研究进展 [J]. 中国畜牧兽医,2011,38(7):236.
[15] 付鹏亮,王东强,李志军,等.连翘酯苷药理作用研究进展 [J]. 长春中医药大学学报,2011,27(6):1062.
[16] 赵咏梅,黄新炜,马蕊,等.连翘苷对氧自由基清除作用的研究 [J]. 西安文理学院学报:自然科学版, 2008,11(4):14.
[17] 曲欢欢,李白雪,燕菲,等,用清除有机自由基 DPPH 法评价连翘不同部位抗氧化作用 [J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(5):32.
[18] Tuba Ak, İlhami Gülcin. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin [J]. Chemicobiological Interactions,2008,174(1):27.
[19] Brand-Williams W,Cuvelier M E,Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Lebensm wiss Tehnol, 1995,28(1):25.

[责任编辑 顾雪竹]