

柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究

潘心禾¹, 史小娟², 张新风^{2*}, 斯金平²

(1. 浙江省丽水林业科学研究院 中药材研究所, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江农林大学
亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 天然药物研究开发中心, 浙江 临安 311300)

[摘要] 目的: 研究柳叶蜡梅 *Chimonanthus salicifolius* 叶中的化学成分及其抗氧化活性。方法: 采用各种柱色谱法进行分离纯化柳叶蜡梅叶中的化学成分, 采用理化性质和 NMR 等波谱学方法鉴定化合物结构; 采用 ABTS 法评价各化合物的抗氧化活性。结果: 从柳叶蜡梅叶乙醇提取物中分离得到 7 个化合物, 分别为 7-羟基-6-甲氧基香豆素(1)、茛菪亭-7-O-β-D-葡萄糖苷(2)、山萘酚-3-O-β-D-葡萄糖苷(3)、山萘酚-3-O-芸香糖苷(4)、山萘酚(5)、槲皮素(6)和大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷(7)。抗氧化活性结果表明化合物 1, 5, 6 具有较好的清除抗氧化活性 (ABTS) 自由基的作用, 其半数抑制率 (IC₅₀) 分别为 8.72, 1.62, 0.563 mmol·L⁻¹。结论: 化合物 2, 3, 7 均是首次从蜡梅属植物中分离得到, 部分化合物具有较好的抗氧化活性。

[关键词] 柳叶蜡梅; 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(2012)01-0099-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111107.1624.004 **[网络出版时间]** 2011-11-07 16:24

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111107.1624.004.html>

Constituents of *Chimonanthus salicifolius* and Their Antioxidant Activity

PAN Xin-he¹, SHI Xiao-juan², ZHANG Xin-feng^{2*}, SI Jin-ping²

(1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Lishui Institute of Forestry Sciences, Lishui 323000, China;
2. Nurturing Station for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Research and Development Center
for Natural Medicine, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China)

[Abstract] **Objective:** To study the constituents from *Chimonanthus salicifolius* and their antioxidant activities. **Method:** Constituent isolation and purification was carried by kinds of column chromatography, and their structures were elucidated on the basis of spectral data analysis. ABTS method was used to evaluate the free radical scavenging activity of the isolated compounds. **Result:** Seven compounds (1-7) were isolated and their structures were identified as follows: scopoletin (1), scopoletin-7-O-β-D-glucoside (2), kaempferol-3-O-β-D-glucoside (3), kaempferol-3-O-β-D-rutinoside (4), kaempferol (5), quercetin (6), emodin-8-O-β-D-glucopyranoside (7). The compounds 1, 5 and 6 showed higher antioxidant activity than positive control trolox with IC₅₀ values 8.72, 1.53, 0.563 mmol·L⁻¹ respectively. **Conclusion:** Compounds 2, 3 and 7 were isolated from this genus for the first time. Some compounds had the significant antioxidant activity.

[Key words] *Chimonanthus salicifolius*; chemical constituents; antioxidant activity

柳叶蜡梅是中国特有种^[1], 仅分布于安徽、江

西及浙江一带^[2], 已被列为安徽省省级珍稀濒危保护植物^[3]。柳叶蜡梅在民间多作茶饮品, 兼具药用^[4-5], 其性味微苦、辛、凉, 具有解表祛风、清热解毒等功能, 临床上可用于治疗寒湿困脾、肝胃不和引起的肠胃不适、腹部胀痛、泄泻等消化道疾病, 也可用于预防感冒、流行性感、预防中暑、治疗慢性气管炎、胸闷等症状, 还能增强人体免疫力。以柳叶蜡梅叶为主要原料的畚药“食凉茶”, 已被《浙江省中

[收稿日期] 20110817(002)

[基金项目] 浙江省重大科技计划项目(2009C02005)

[第一作者] 潘心禾, 高级工程师, 主要从事中药资源研究,
Tel: 0578-2271129, E-mail: lkspsh@126.com

[通讯作者] *张新风, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学
研究, Tel: 0571-63742885, E-mail: xinfengxh@
hotmail.com

药炮制规范》载。

目前国内外学者对柳叶蜡梅挥发油及药理作用有一定的研究^[6-8]。但在系统化学成分的研究方面进展不如同属植物山蜡梅,已有报道山蜡梅叶中含有生物碱、黄酮、香豆素等类型成分^[9]。为了阐明柳叶蜡梅叶的化学成分,作者对柳叶蜡梅叶乙醇提取物进行了分离纯化,得到了 7 个化合物,其中 2 个是香豆素类化合物,4 个为黄酮类化合物,1 个为蒽醌类化合物;其中化合物 2,3,7 均是首次从蜡梅属植物中分离得到,并且化合物 1,5,6 具有一定的抗氧化活性。

1 材料

X-4 型数字显微熔点仪(温度未校正),瑞士 Bruker Avance 600 核磁共振波谱仪(TMS 为内标),R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),UV2550 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。柱色谱用硅胶(300~400 目,青岛海洋化工厂),Sephadex LH-20(Pharmacia 公司),140 C₁₈-PREP(Hacalai 公司),YMC(SL12 S-50),AB-8 型大孔吸附树脂(南开大学),正相及反相硅胶薄层色谱板(德国 MERCK 公司)。

2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸),ABTS, Sigma 公司),Trolox(Sigma 公司),过硫酸钾(宜兴市第二化学试剂厂)。分离用甲醇、乙醇、正丁醇、丙酮、二氯甲烷等试剂均为分析纯。

柳叶蜡梅嫩枝叶于 2008 年 6 月在浙江丽水市大东坝镇灯塔村蜡梅种植基地采集,经浙江农林大学楼焯教授鉴定为蜡梅属植物柳叶蜡梅 *Chimonanthus salicifolius* S. Y. hu。

2 提取与分离

柳叶蜡梅嫩枝叶(3.3 kg)阴干,粉碎成粗粉,装入渗漉筒内,用 95% 的乙醇浸泡 24 h,采用渗漉法进行提取。将渗漉液减压真空浓缩,得柳叶蜡梅叶总浸膏(297 g)。将总浸膏用水溶解,用石油醚进行脱脂处理,得到石油醚萃取部分和水溶部分。将水溶部分上大孔树脂柱,依次用水、30% 乙醇、50% 乙醇、100% 乙醇梯度洗脱进行洗脱,分别得到水、30% 流份(146.7 g)、50% 流份(42.4 g)、100% 流份(25 g)4 个流份。将 30% 流份用硅胶拌匀,上硅胶柱,流动相采用二氯甲烷、甲醇(30:1,20:1,15:1,10:1,8:1,5:1,2:1,1:1)进行梯度洗脱,TLC 检测合并相同组分,并经多次硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20,后经反相硅胶 C₁₈ 柱进行分离及结晶纯化,得化合物 1(35 mg),2(53 mg),3(265 mg),4(2.3

g);50% 流份经反复硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 及 C₁₈ 柱色谱分离得到化合物 5(125 mg),6(864 mg),7(21 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色晶体(MeOH),mp 193.4 °C。UV (MeOH) λ_{max}: 230.0,254.0,299.0,347.0 nm; IR (KBr) ν_{max}/cm⁻¹: 3 330 (OH),1 700 (C=O),1 605,1 560,1 510 (aromatic ring); ¹H-NMR (300 MHz, Methanol-d₄) δ: 4.16 (3H, s, OCH₃), 6.21 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-3), 6.78 (1H, s, H-5), 7.11 (1H, s, H-8), 7.85 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-4)。¹³C-NMR (75 MHz, methanol-d₄) δ: 55.8 (OCH₃), 103.0 (C-8), 109.0 (C-5), 111.5 (C-10), 111.6 (C-3), 145.1 (C-4), 146.1 (C-6), 150.4 (C-9), 151.9 (C-7), 163.0 (C-2)。以上数据与文献[10-11]报道的基本一致,故鉴定为 7-羟基-6-甲氧基香豆素即东莨菪亭(scopoletin)。

化合物 2 黄色晶体(MeOH),¹H-NMR (300 MHz, methanol-d₄) δ: 6.31 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 7.94 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4), 7.26 (1H, s, H-5), 7.13 (1H, s, H-8), 5.31 (1H, J = 5.2 Hz, H-1'), 3.81 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (75 MHz, methanol-d₄) δ: 56.5 (OCH₃), 161.0 (C-2), 113.8 (C-3), 144.7 (C-4), 110.2 (C-5), 149.4 (C-6), 150.7 (C-7), 103.5 (C-8), 146.5 (C-9), 112.7 (C-10), 100.1 (C-1'), 73.5 (C-2'), 77.6 (C-3'), 70.1 (C-4'), 77.2 (C-5'), 61.1 (C-6')。以上数据与化合物 1 相比较,出现了一个葡萄糖基的信号,故鉴定为东莨菪亭-7-O-β-D-葡萄糖苷(scopoletin-7-O-β-D-glucoside)。

化合物 3 淡黄色针晶(丙酮),¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.17 (1H, d, J = 1.9 Hz), 6.41 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.98 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.85 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3', 5'), 5.35 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1" of glc)。 ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 156.9 (C-2), 133.6 (C-3), 177.9 (C-4), 160.2 (C-5), 99.2 (C-6), 164.5 (C-7), 94.2 (C-8), 156.9 (C-9), 104.4 (C-10), 121.3 (C-1'), 131.4 (C-2', 6'), 115.6 (C-3', 5'), 159.5 (C-4'), 101.3 (C-1"), 74.5 (C-2"), 77.6 (C-3"), 70.2 (C-4"), 76.7 (C-5"), 61.2 (C-6")。以上数据与文献[12-13]一致,鉴定该化合物为山萘酚 3-O-β-D-葡萄糖苷(kaempferol-3-O-β-D-glucoside)。

化合物 4 黄色针状结晶(MeOH),mp 191 ~

192 °C, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, methanol- d_4) δ : 6.39 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.19 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.86 (2H, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.97 (2H, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 5.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1" of glc), 4.52 (1H, br s, H-1" of rha), 0.96 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, CH_3 -6" of rha)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, methanol- d_4) δ : 157.0 (C-2), 133.7 (C-3), 177.9 (C-4), 161.7 (C-5), 99.2 (C-6), 164.6 (C-7), 94.2 (C-8), 157.3 (C-9), 104.5 (C-10), 121.4 (C-1'), 131.3 (C-2', 6'), 115.6 (C-3', 5'), 160.3 (C-4'), 101.8 (C-1"), 74.6 (C-2"), 76.8 (C-3"), 70.4 (C-4"), 76.2 (C-5"), 67.3 (C-6"), 101.2 (C-1"), 70.8 (C-2"), 71.1 (C-3"), 72.3 (C-4"), 68.7 (C-5"), 18.2 (C-6")。以上数据与文献报道^[14-15]的基本一致,故鉴定为山萘酚-3-*O*-芸香糖苷(kaempferol-3-*O*- β -D-rutinoside)。

化合物 5 黄色粉末 (MeOH), mp 230 ~ 232 °C, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.20 (1H, s, H-6), 6.45 (1H, s, H-8), 6.94 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 8.04 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.2 (C-2), 136.0 (C-3), 176.2 (C-4), 161.2 (C-5), 98.5 (C-6), 164.2 (C-7), 93.9 (C-8), 156.7 (C-9), 103.4 (C-10), 122.1 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 115.8 (C-3', 5'), 159.5 (C-4')。以上数据与文献报道^[11, 16]的基本一致,故鉴定为山萘酚(kaempferol)。

化合物 6 黄色粉末 (MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.45 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.65 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 6$ Hz), 7.51 (1H, dd, $J = 6, 1.8$ Hz)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 145.5 (C-2), 136.2 (C-3), 176.3 (C-4), 156.6 (C-5), 98.6 (C-6), 164.3 (C-7), 93.8 (C-8), 161.2 (C-9), 103.5 (C-10), 122.4 (C-1'), 115.5 (C-2), 147.3 (C-3'), 148.2 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.4 (C-6')。以上数据与文献^[11]报道的基本一致,故鉴定为槲皮素(quercetin)。

化合物 7 橘红色粉末 (MeOH), mp 219.3 ~ 220.1 °C, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.99 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.27 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.44 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 5.04 (1H, d, $J = 7.5$)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 161.5 (C-1), 124.6 (C-2), 147.4 (C-3), 119.7 (C-4), 108.8 (C-5), 164.6 (C-6), 108.8 (C-7),

161.2 (C-8), 186.9 (C-9), 182.6 (C-10), 136.9 (C-11), 114.9 (C-12), 113.8 (C-13), 132.6 (C-14), 21.8 (-CH₃), 101.2 (C-1), 73.7 (C-2'), 76.8 (C-3'), 69.9 (C-4'), 77.7 (C-5'), 61.1 (C-6')。以上数据与文献^[17-18]报道的基本一致,故鉴定为大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside)。

4 化合物清除抗氧化活性(ABTS)自由基的作用

采用 ABTS 法对化合物 1 ~ 7 的体外抗氧化活性进行了评价,方法参照 Roberta 等^[19]的报道并作了相应的改动。配置好的 ABTS 自由基稳定液用水稀释,使其在 734 nm 下吸光度为 0.7 ± 0.02 。测定时,在比色皿中加入 10 μL 不同浓度的样品,再加入 490 μL 的 ABTS⁺ 工作液,混合 10 s, 30 °C 静置 6 min, 在 734 nm 波长下读取吸光度,每份样品平行操作 3 次。以 500 μL 的无水乙醇作为空白,以 490 μL ABTS⁺ 溶液与 10 μL 无水乙醇混合后的吸光度为对照,计算清除率。

结果表明在 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 起始质量浓度下,只有化合物 1, 5, 6 表现出较好的清除自由基能力,清除率均 > 85%, 而化合物 2, 3, 4, 7 仅表现出微弱的清除自由基能力,清除率均低于 30%; 与阳性对照 Trolox [半数抑制率 (IC_{50}) = $0.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 相比,化合物 1, 5, 6 的 IC_{50} 分别为 8.72, 1.53, 0.563 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明化合物 1 和 5 的清除 ABTS 自由基能力一般,化合物 6 表现出较好的清除 ABTS 自由基能力。总体看来,柳叶蜡梅叶中的黄酮苷元比黄酮苷类化合物表现出较好的体外抗氧化活性。

[参考文献]

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 1.
- [2] 安徽植物志协作组. 安徽植物志: 第 2 卷[M]. 北京: 中国展望出版社, 1987: 267.
- [3] 张光富. 安徽珍稀濒危植物及其保护[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2000, 23(1): 36.
- [4] 陈斐, 刘忠达. 柳叶蜡梅挥发油诱导细胞凋亡的研究[C]. 台州: 第二届中国医学细胞生物学学术大会暨细胞生物学教学改革会议论文集, 2008: 9.
- [5] 刘南祥, 程文亮, 诸葛华. 柳叶蜡梅 GAP 基地生态环境质量评价[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(5): 10.
- [6] 李阳春, 孙静芸, 盛春, 等. 柳叶蜡梅挥发油 GC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1190.

双黄连注射剂中黄芩苷致敏原性的研究

曾姣丽¹, 贺福元^{1,2*}, 唐昱¹, 段晓鹏¹, 王海琴¹, 谢相贵¹, 包小燕¹

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学药学院中药药性与药效国家重点中医药管理局重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 研究双黄连注射剂中黄芩苷的致敏原性。方法: 通过运用酶联免疫双抗夹心和免疫指纹图谱 2 种方法结合对双黄连注射剂中黄芩苷的致敏原性进行研究。结果: 运用酶联免疫双抗夹心法检测黄芩苷的致敏性, 结果呈阳性反应; 运用免疫指纹图谱法检测黄芩苷的致敏性, 致敏率为 86.28%。结论: 通过运用以上方法结合确定了双黄连注射剂中黄芩苷为致敏原, 建立了快速筛查中药注射剂中致敏原的分析方法。

[关键词] 黄芩苷; 致敏原; 酶联免疫; 指纹图谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0102-05

Study of Allergenicity of Baicalin in Shuanghuanglian Injection

ZENG Jiao-li¹, HE Fu-yuan^{1,2*}, TANG Yu¹, DUAN Xiao-peng¹, WANG Hai-qin¹,
XIE Xiang-gui¹, BAO Xiao-yan¹

(1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Traditional

[收稿日期] 20110816(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073142); 湖南省教育厅重点项目(09A068); 湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2055)

[第一作者] 曾姣丽, 在读硕士研究生, 主要从事中药药剂及其质量控制研究, Tel: 0731-5381372, E-mail: zengjiaoli295 @ 163. com

[通讯作者] * 贺福元, 教授, 硕士生导师, Tel: 13787213681, E-mail: pharmsharking@ tom. com

- [7] 欧阳婷, 麦曦, 夏红英, 等. 柳叶蜡梅叶挥发油化学成分 GC-MS 分析 [J]. 南昌大学学报, 2010, 34 (1): 77.
- [8] 史小娟, 潘心禾, 张新风, 等. 柳叶蜡梅叶挥发性成分的提取及 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1995, 33(2): 171.
- [9] 熊义权, 肖纯, 龙秀娟. 蜡梅属植物叶、花化学成分及药理性质研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 8, 15.
- [10] Vasconcelos J M J, Silva A M S, Cavaleiro J A S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* Subsp. Maritima [J]. Phytochemistry, 1998, 49 (5): 1421.
- [11] 孙丽仁, 何明珍, 冯育林, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1214.
- [12] 陈靖, 张朝凤, 张勉. 卷茎蓼地上部分化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3165.
- [13] 张援虎, 何丽, 关焕玉, 等. 追风伞中黄酮类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (14): 1824.
- [14] 张雷红, 江永南, 罗懿斌, 等. 宽叶大戟中黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 366.
- [15] 王梦月, 卫莹芳, 李晓波. 荨麻抗风湿活性部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1300.
- [16] Kim J E, Jung M J, Jung H A, et al. A new kaempferol 7-O-triglucoside from the leaves of *Brassica juncea* L. [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25: 621.
- [17] Zhang X F, Thuong P T, Jin W Y, et al. Antioxidant activity of anthraquinones and flavonoids from flower of *Reynoutria sachalinensis* [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (1): 22.
- [18] 胡军, 屠鹏飞, 果德安, 等. 秦岭大黄化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 1997, 12(4): 153.
- [19] Roberta R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26(9): 1231.

[责任编辑 邹晓翠]