

· 质量评价 ·

地胆草抗氧化活性成分分离鉴定

付露^{1,2}, 沙合尼西·赛力克江^{2,3}, 洪吟秋^{2,4}, 司金光², 张涛², 邹忠梅^{2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450008;

2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 新疆师范大学, 乌鲁木齐 830054; 4. 浙江工业大学, 杭州 310024)

[摘要] 目的:研究地胆草(*Elephantopus scaber*)全草95%乙醇提取物的化学成分,并测定其抗氧化活性。方法:采用硅胶柱色谱, LH-20型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20), 开放 ODS 柱色谱和半制备高效液相色谱及重结晶等技术手段进行分离纯化, 通过核磁共振波谱和质谱技术, 结合文献数据进行结构鉴定。结果:分离得到14个化合物, 分别鉴定为(*E*)-3-(3, 4-二羟基苯亚甲基)-5-(3, 4-二羟基苯基)-2(3H)-呋喃酮(**1**), 秦皮乙素(**2**), 二氢芥子醇(**3**), 异地芫普内酯(**4**), 咖啡酸(**5**), 木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(**6**), 木犀草素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷甲酯(**7**), 绿原酸甲酯(**8**), blumenol A(**9**), (6*R*, 9*R*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(**10**), byzantionoside B(**11**), 3, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(**12**), 3, 4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(**13**), 4, 5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(**14**)。结论:其中化合物**1**~**4**和**8**~**10**为首次从地胆草属植物中分离得到, 化合物**11**为首次从地胆草植物中分离得到。对从地胆草中分离的12个化合物进行了清除1, 1-二苯基-2-三磷基苯酚(DPPH)自由基和2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS⁺)自由基实验, 结果显示化合物**1, 2, 5, 6, 12**和**13**具有显著的抗氧化活性。

[关键词] 地胆草; 95%乙醇提取物; 抗氧化活性; 秦皮乙素; 咖啡酸

[中图分类号] R284.2; R22; R2-031; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0156-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190109

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181016.0923.004.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 9:46

Isolation and Identification of Antioxidant Activity Constituents from *Elephantopus scaber*

FU Lu^{1,2}, SERIKJAN · Sahinix^{2,3}, HONG Yin-qiu^{2,4}, SI Jin-guang², ZHANG Tao², ZOU Zhong-mei^{2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

4. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310024, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of 95% ethanol extract of the whole plant of *Elephantopus scaber* and investigate its antioxidant activity. **Method:** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography, semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and recrystallization methods, while their structures were identified on the basis of nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry and comparison of their spectral data with those reported in the literature. **Result:** Fourteen compounds were isolated and their structures were identified as: (*E*)-3-(3, 4-dihydroxybenzylidene)-5-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2(3H)-furanone (**1**), esculetin (**2**), dihydrosyringenin (**3**), (+)-isolololide (**4**), caffeic acid (**5**),

[收稿日期] 20180524(012)

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-015); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09735008)

[第一作者] 付露, 硕士, 从事天然药物化学研究, Tel:010-57833281, E-mail:lufu_kclz110@126.com

[通信作者] * 邹忠梅, 博士, 研究员, 从事天然药物化学研究, Tel:010-57833290, E-mail:zmzou@implad.ac.cn

luteolin-7-*O*- β -*D*-glucuronide (6), luteolin-7-*O*- β -*D*-glucuronide methyl ester (7), chlorogenic acid methyl ester (8), blumenol A (9), (6*R*, 9*R*) -3-oxo- α -ionol- β -*D*-glucopyranoside (10), byzantionoside B (11), 3, 5-*O*-dicaffeoyl quinic acid methyl ester (12), 3, 4-*O*-dicaffeoyl quinic acid methyl ester (13) and 4, 5-*O*-dicaffeoyl quinic acid methyl ester (14). **Conclusion:** Compounds 1-4 and 8-10 were isolated from the genus *Elephantopus* for the first time. Compound 11 was isolated from *E. scaber* for the first time. The DPPH radical and ABTS⁺ radical scavenging experiments on twelve of these compounds showed that compounds 1, 2, 5, 6, 12 and 13 had significant antioxidant activity.

[**Key words**] *Elephantopus scaber*; 95% ethanol extract; antioxidant activity; esculetin; dihydroxyrungenin

地胆草为菊科地胆草属植物,又名苦地胆,被 1977 年版《中国药典》收录^[1]。主治感冒、扁桃体炎、眼结膜炎、肾炎、肝炎、黄疸、湿疹等,有清热、凉血、解毒、利湿之功效^[2-3]。化学成分研究显示地胆草主要含有倍半萜内酯类、三萜类、黄酮类、甾醇类等成分^[4-5],其中倍半萜内酯类成分有显著的细胞增殖抑制作用^[6]。目前国内外对地胆草化学成分研究主要集中在低极性部位,而对于较大极性部位研究少。为进一步研究地胆草中新活性成分,对其全草 95% 乙醇提取物的化学成分进行研究,从其大孔树脂 30% 乙醇洗脱部位中分离得到 14 个化合物,分别鉴定为 (*E*)-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯基)-2(3*H*)-咪喃酮(1),秦皮乙素(2),二氢芥子醇(3),异地芫苢内酯(4),咖啡酸(5),木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(6),木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷甲酯(7),绿原酸甲酯(8),blumenol A(9), (6*R*, 9*R*)-3-氧代- α -紫罗兰醇- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(10),byzantionoside B(11),3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(12),3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(13)和 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯(14),其中化合物 1~4 和 8~10 为首次从地胆草属中分离得到,化合物 11 为首次从该植物中分离得到。对从地胆草中分离的 12 个化合物进行清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基和 2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS⁺)自由基试验,结果显示化合物 1,2,5,6,12 和 13 具有显著的抗氧化活性。

1 材料

X6 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司),LTQ Orbitrap XL Spectrometer 型质谱仪(美国 Thermo), Synapt G2 型 HD MS(美国 Waters), AVANCE III 500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker), EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(日本 Tokyo Rikakai),真空隔膜泵(德国 ILMVAC),SHB-B 型循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司),JY02S

型紫外分析仪(北京君意设备有限公司),分液器(天津科诺仪器设备有限公司),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),2535 型 semi-PLC(配置 2489 型 UV 检测器,美国 Waters), YMC-Pack ODS-A 色谱柱(10 mm \times 250 mm, 5 μ m, 日本 YMC)。薄层色谱硅胶(GF₂₅₄)和柱色谱硅胶(60~100, 100~200, 200~300, 300~400 目,青岛海洋化工有限公司产品),LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,瑞典 GE Healthcare),DIAION HP20 型大孔吸附树脂(日本三菱公司),ODS-A-HG 12 nm S-50 μ m(日本 YMC),DPPH(美国 Sigma-Aldrich 公司),ABTS(美国 Sigma-Aldrich 公司),K₂S₂O₈(国药集团化学试剂有限公司),维生素 C(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 1010E035,纯度 \geq 99.0%,简称 Vc)。其他试剂均为分析纯。

地胆草于 2016 年 8 月购自安国冷背药材有限公司,经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为菊科地胆草属植物地胆草 *Elephantopus scaber* 干燥全草。标本(20160928)现存于中国医学科学院药用植物研究所国家中药化合物库。

2 方法

2.1 提取与分离 取地胆草全草 20 kg,切成小段后用 8 倍量的 95% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,减压浓缩得粗提物 1.4 kg。粗提物用 30% 乙醇溶解,过大孔树脂,依次用 30% 乙醇,50% 乙醇和 90% 的乙醇洗脱,各洗脱 3 个柱体积,得 30% 乙醇部位(513 g),50% 乙醇部位(80 g)和 90% 乙醇部位(47 g)。取 30% 乙醇部位 510 g 用水溶解,过大孔树脂,依次用水,10% 乙醇,20% 乙醇,40% 乙醇和 90% 乙醇洗脱,得水部位(350 g),10% 乙醇部位(24 g),20% 乙醇部位(27 g),40% 乙醇部位(21 g)和 90% 乙醇部位(7 g)。取其中 40% 乙醇部位 20 g 进行硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(100:5~0:100)梯度洗脱,每份为 40 mL,得

210 个馏分,根据薄层色谱(TLC)检测合并得到 8 个组分(Fr. A ~ Fr. H)。

Fr. G (5 g) 反复重结晶得化合物 **6** (300 mg); Fr. B (130 mg) 经 semi-PHPLC, 以 20% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **3** (11 mg), **4** (12 mg); Fr. C (300 mg) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(100:1 ~ 100:4) 梯度洗脱, 共收集 44 份, Fr. C. 27-38 (100 mg) 以 20% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **9** (10 mg); Fr. D (686 mg) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(100:2 ~ 100:10) 梯度洗脱, 共收集 53 份, Fr. D. 15-19 (27 mg) 以 20% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **2** (10 mg); Fr. D. 29-43 (371 mg) 以 40% 甲醇等度洗脱分离纯化, 得化合物 **5** (80 mg); Fr. E (3.5 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱以甲醇洗脱, 得化合物 **1** (10 mg), **7** (12 mg), 其余馏分合并经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(40:1 ~ 8:1) 梯度洗脱, 共收集 63 份, 经 TLC 分析合并为 5 个组分(Fr. Ea ~ Ee), Fr. Ec (1.09 g) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(100:5 ~ 8:1) 梯度洗脱, 共收集 23 份, Fr. Ec. 8-24 (800 mg) 以 21% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **8** (16 mg); Fr. Ed (1.2 g) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(15:1 ~ 10:1) 梯度洗脱, 共收集 30 份, Fr. Ed. 9-18 (0.8 g) 以 23% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **10** (18 mg), 化合物 **11** (10 mg); Fr. G (6.0 g) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(20:1 ~ 3:1) 梯度洗脱, 共收集 81 份, 经 TLC 分析合并为 5 个组分(Fr. Ga ~ Fr. Ge), Fr. Ga (203 mg) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(20:1) 等度洗脱, 共收集 25 份, Fr. Ga. 12-14 (26 mg) 以 26% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **14** (7 mg); Fr. Gb (891 mg) 经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇(20:1 ~ 15:1) 梯度洗脱, 共收集 23 份, Fr. Gb. 11-12 (163 mg) 以 26% 乙腈水等度洗脱分离纯化, 得化合物 **12** (42 mg); Fr. Gb. 13-15 (360 mg) 以 40% 甲醇水等度洗脱分离纯化化合物 **13** (200 mg)。

2.2 抗氧化活性的筛选

2.2.1 供试品和对照品的配制 化合物 **1** ~ **10**, **12**, **13** 和对照品 Vc 称质量后溶解在无水乙醇中, 配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液备用, 取适量母液用无水乙醇依次梯度稀释成质量浓度为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, $1.5625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2.2 DPPH 自由基清除率测定 参照文献[7]的方法, 略有改进。称取 DPPH 粉末 3.94 mg, 用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 配制成浓度为

$2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 自由基溶液。分别取质量浓度为 $1.5625 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的各个样品溶液及对照品 Vc 溶液, DPPH 自由基测定液各 100 μL 混合, 在 517 nm 处测定其吸光度。所有样品均做 3 个复孔取平均值。计算清除率及半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{清除率} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

(A_0 为空白组吸光度值; A_1 为实验组吸光度值)。

2.2.3 ABTS⁺ 自由基清除率测定 参照文献[8]的方法, 略有改进。分别称取 ABTS⁺ 粉末 3.94 mg 和 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 粉末 6.6 mg, 分别用去离子水溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 配制成 $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液和 $7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ABTS}^+$ 溶液, 二者等体积混合, 避光条件下静置 16 h 后, 用磷酸盐缓冲液(PBS, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 稀释, 使其吸光度在 734 nm 波长处达到 0.700 ± 0.020 。分别取质量浓度为 $1.5625 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的各个样品溶液及对照品 Vc 溶液和 ABTS⁺ 自由基测定液各 100 μL 混合, 在 734 nm 处测定其吸光度。所有样品均做 3 个复孔取平均值。计算清除率及 IC_{50} 。

3 结构鉴定

化合物 **1** 红色粉末, HR-ESI-MS m/z 313.071 6 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (理论值 313.071 2), 提示化合物分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。¹H-NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.91 (1H, s, H-3), 7.19 (3H, d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-6, 10, 13), 6.85 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-9), 7.12 (1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, H-11), 6.87 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, H-16), 7.17 (1H, s, H-17); ¹³C-NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.0 (C-1), 123.3 (C-2), 98.8 (C-3), 157.2 (C-4), 121.5 (C-5), 113.0 (C-6), 146.9 (C-7), 149.2 (C-8), 116.7 (C-9), 118.9 (C-10), 135.7 (C-11), 128.7 (C-12), 117.6 (C-13), 146.8 (C-14), 149.7 (C-15), 116.9 (C-16), 125.3 (C-17)。以上数据与文献[9]报道基本一致, 故鉴定为 (*E*)-3-(3,4-二羟基苯亚甲基)-5-(3,4-二羟基苯基)-2(3H)-咪喃酮。

化合物 **2** 黄色针晶(甲醇), HR-ESI-MS m/z 179.035 1 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (理论值 179.034 4), 提示化合物分子式为 $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.15 (1H, d, $J = 9.4 \text{ Hz}$, H-3), 7.85 (1H, d, $J = 9.4 \text{ Hz}$, H-4), 6.96 (1H, s, H-5), 6.96 (1H, s, H-8), 9.67 (2H, br s, 6, 7-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 160.8 (C-2), 111.3 (C-3), 144.4 (C-4), 112.1 (C-5), 143.0 (C-6), 150.7 (C-7), 102.6 (C-8),

148.6(C-9), 112.1(C-10)。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定为秦皮乙素。

化合物 3 无色油状, HR-ESI-MS m/z 211.095 9 [M - H]⁻ (理论值 211.097 0), 提示化合物分子式为 C₁₁H₁₆O₄。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.42(2H, s, H-2, 6), 2.49(2H, m, H-7), 1.68(2H, m, H-8), 3.40(2H, m, H-9), 3.72(6H, s, 3, 5-OCH₃), 8.00(1H, s, 4-OH), 4.42(1H, t, *J* = 5.1 Hz, 9-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 133.4(C-1), 105.6(C-2, 6), 147.8(C-3, 5), 132.1(C-4), 31.8(C-7), 34.6(C-8), 60.2(C-9), 55.9(3, 5-OCH₃)。以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定为二氢芥子醇。

化合物 4 白色粉末, HR-ESI-MS m/z 197.118 1 [M + H]⁺ (理论值 197.117 8), 提示化合物分子式为 C₁₁H₁₆O₃。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.34(1H, ddd, *J* = 11.6, 4.1, 2.2 Hz, H-2a), 1.27(1H, dd, *J* = 11.6, 11.6 Hz, H-2b), 3.97(1H, m, H-3), 1.88(1H, ddd, *J* = 12.7, 4.3, 2.2 Hz, H-4a), 1.16(1H, dd, *J* = 12.7, 12.7 Hz, H-4b), 5.80(1H, s, H-8), 1.19(1H, s, H-10), 1.22(1H, s, H-11), 1.50(1H, s, H-12), 4.86(1H, s, 3-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 34.7(C-1), 47.9(C-2), 63.0(C-3), 49.7(C-4), 86.4(C-5), 170.9(C-7), 112.3(C-8), 181.7(C-9), 25.3(C-10), 29.7(C-11), 24.6(C-12)。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定为异地芫普内酯。

化合物 5 淡黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 179.033 8 [M - H]⁻ (理论值 179.034 4), 提示化合物分子式为 C₉H₈O₄。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.02(1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 6.75(1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.96(1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 7.40(1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 6.16(1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-8)。以上数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定为咖啡酸。

化合物 6 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 463.087 6 [M + H]⁺ (理论值 463.087 7), 提示化合物分子式为 C₂₁H₁₈O₁₂。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.74(1H, s, H-3), 6.43(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.79(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.42 ~ 7.44(2H, overlap, H-2', 6'), 6.89(1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 5.16(1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 3.79(1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-5''), 12.99(1H, br s, 5-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.5(C-2), 103.1(C-3),

181.9(C-4), 161.1(C-5), 99.4(C-6), 162.8(C-7), 94.6(C-8), 157.0(C-9), 105.4(C-10), 119.1(C-1'), 113.5(C-2'), 145.8(C-3'), 150.0(C-4'), 116.0(C-5'), 121.3(C-6'), 99.5(C-1''), 72.9(C-2''), 74.5(C-3''), 71.9(C-4''), 76.1(C-5''), 171.4(C-6'')。以上数据与文献[14]报道基本一致,故鉴定为木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷。

化合物 7 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 477.103 4 [M + H]⁺ (理论值 477.103 3), 提示化合物分子式为 C₂₂H₂₀O₁₂。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.75(1H, s, H-3), 6.47(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.82(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.42(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2'), 6.91(1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.45(1H, dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, H-6'), 5.35(1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''), 4.21(1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-5''), 13.01(1H, br s, 5-OH), 3.67(3H, s, 6-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.5(C-2), 103.2(C-3), 181.9(C-4), 157.0(C-5), 99.3(C-6), 162.4(C-7), 94.5(C-8), 161.2(C-9), 105.5(C-10), 119.2(C-1'), 113.6(C-2'), 145.8(C-3'), 150.0(C-4'), 116.0(C-5'), 121.3(C-6'), 99.0(C-1''), 72.7(C-2''), 75.4(C-3''), 71.3(C-4''), 75.1(C-5''), 169.2(C-6''), 52.0(6''-OCH₃)。以上数据与文献[15]报道基本一致,故鉴定为木犀草素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖醛酸苷甲酯。

化合物 8 绿色油状物, HR-ESI-MS m/z 369.118 2 [M + H]⁺ (理论值 369.118 6), 提示化合物分子式为 C₁₇H₂₀O₉。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.02(1H, dd, *J* = 6.9, 13.5 Hz, H-2a), 2.19(1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-2b), 5.28(1H, dt, *J* = 4.5, 7.6 Hz, H-3), 3.74(1H, dd, *J* = 7.5, 3.1 Hz, H-4), 4.14(1H, dt, *J* = 6.9, 3.5 Hz, H-5), 2.15(1H, dd, *J* = 13.6, 8.0 Hz, H-6a), 2.22(1H, dd, *J* = 13.6, 3.7 Hz, H-6b), 7.05(1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.79(1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 6.96(1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, H-6'), 7.53(1H, dd, *J* = 15.9 Hz, H-7'), 6.22(1H, dd, *J* = 15.9 Hz, H-8'), 3.67(3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 75.8(C-1), 38.0(C-2), 70.3(C-3), 72.5(C-4), 72.1(C-5), 37.8(C-6), 175.4(C-7), 127.6(C-1'), 116.5(C-2'), 147.2(C-3'), 146.8(C-4'), 115.1(C-5'), 123.0(C-6'), 149.7(C-7'), 115.0(C-8'), 168.3(C-9'), 53.0(7-OCH₃)。以上数据与文献[16]报道基本一致,故鉴定为绿原酸甲酯。

化合物 9 白色粉末, HR-ESI-MS m/z 223.1321 [M-H]⁻ (理论值 223.1310), 提示化合物分子式为 C₁₃H₂₀O₃。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.44 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H-2a), 2.24 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H-2b), 5.90 (1H, br s, H-4), 5.79 (1H, dd, *J* = 15.7, 1.0 Hz, H-7), 5.85 (1H, dd, *J* = 15.7, 5.4 Hz, H-8), 4.41 (1H, dq, *J* = 6.2, 5.4 Hz, H-9), 1.30 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H-10), 1.01 (3H, s, H-11), 1.08 (3H, s, H-12), 1.89 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, H-13); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 41.3 (C-1), 49.4 (C-2), 198.0 (C-3), 127.1 (C-4), 162.7 (C-5), 79.2 (C-6), 135.9 (C-7), 129.1 (C-8), 68.2 (C-9), 23.9 (C-10), 23.1 (C-11), 23.1 (C-12), 19.0 (C-13)。以上数据与文献[17]报道基本一致, 故鉴定为 blumenol A。

化合物 10 白色粉末, HR-ESI-MS m/z 371.2070 [M+H]⁺ (理论值 371.2070), 提示化合物分子式为 C₁₉H₃₀O₇。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.45 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-2a), 2.06 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-2b), 5.89 (1H, br s, H-4), 2.69 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-6), 5.66 (1H, ddd, *J* = 15.4, 9.3, 1.1 Hz, H-7), 5.79 (1H, dd, *J* = 15.4, 6.4 Hz, H-8), 4.41 (1H, dq, *J* = 6.4, 6.4 Hz, H-9), 1.30 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-10), 1.04 (3H, s, H-11), 1.02 (3H, s, H-12), 1.95 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, H-13), 4.37 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.17 ~ 3.37 (4H, m, H-2' ~ 5'), 3.83 (1H, dd, *J* = 11.8, 2.4 Hz, H-6'a), 3.67 (1H, dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, H-6'b); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 37.1 (C-1), 48.2 (C-2), 202.0 (C-3), 126.1 (C-4), 165.9 (C-5), 56.8 (C-6), 128.8 (C-7), 138.2 (C-8), 77.0 (C-9), 21.0 (C-10), 27.6 (C-11), 28.1 (C-12), 23.8 (C-13), 102.4 (C-1'), 75.3 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.7 (C-6')。以上数据与文献[17-19]报道基本一致, 故鉴定为 (6*R*, 9*R*)-3-氧代-α-紫罗兰醇-β-*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 11 白色粉末, HR-ESI-MS m/z 373.2230 [M+H]⁺ (理论值 373.2226), 提示化合物分子式为 C₁₉H₃₂O₇。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.48 (1H, d, *J* = 17.3 Hz, H-2a), 1.99 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-2b), 5.80 (1H, s, H-4), 1.52 (1H, m, H-6), 1.65 (2H, m, H-7), 1.95 (2H, m, H-8), 3.90 (1H, m, H-9), 1.20 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-10), 1.04 (3H, s, H-11), 1.11 (3H, s, H-12), 2.06 (3H, d, *J* =

1.3 Hz, H-13), 4.34 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.14 ~ 3.38 (4H, m, H-2' ~ 5'), 3.87 (1H, dd, *J* = 11.8, 1.7 Hz, H-6'a), 3.66 (1H, dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, H-6'b); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 37.3 (C-1), 48.1 (C-2), 202.4 (C-3), 125.4 (C-4), 170.1 (C-5), 52.4 (C-6), 26.8 (C-7), 37.8 (C-8), 75.1 (C-9), 19.9 (C-10), 27.5 (C-11), 29.1 (C-12), 25.0 (C-13), 102.1 (C-1'), 75.5 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.8 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.9 (C-6')。以上数据与文献[19]报道基本一致, 故鉴定为 byzantionoside B。

化合物 12 黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 531.1503 [M+H]⁺ (理论值 531.1503), 提示化合物分子式为 C₂₆H₂₆O₁₂。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.20 (2H, dd, *J* = 12.9, 4.2 Hz, H-2a, 6a), 1.99 (2H, m, H-2b, 6b), 5.07 (1H, m, H-3), 3.85 (1H, dd, *J* = 5.8, 3.0 Hz, H-4), 5.17 (1H, dt, *J* = 5.9, 3.6 Hz, H-5), 7.04 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.99 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7'), 6.13 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8'), 7.05 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2''), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5''), 7.01 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, H-6''), 7.49 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7''), 6.26 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8''), 3.59 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 72.4 (C-1), 34.4 (C-2), 69.9 (C-3), 66.5 (C-4), 70.9 (C-5), 34.5 (C-6), 173.7 (C-7), 125.3 (C-1'), 114.7 (C-2'), 145.4 (C-3'), 148.7 (C-4'), 115.8 (C-5'), 121.2 (C-6'), 145.7 (C-7'), 113.6 (C-8'), 165.3 (C-9'), 125.6 (C-1''), 114.8 (C-2''), 145.0 (C-3''), 148.4 (C-4''), 115.9 (C-5''), 121.4 (C-6''), 145.6 (C-7''), 114.5 (C-8''), 166.0 (C-9''), 52.0 (7-OCH₃)。以上数据与文献[20]报道基本一致, 故鉴定为 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 13 浅黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 531.1503 [M+H]⁺ (理论值 531.1503), 提示化合物分子式为 C₂₆H₂₆O₁₂。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.23 (1H, m, H-2a), 2.08 (1H, m, H-6a), 1.95 (2H, m, H-2b, 6b), 4.04 (1H, m, H-3), 4.98 (1H, dd, *J* = 6.9, 3.2 Hz, H-4), 5.40 (1H, dt, *J* = 7.9, 3.8 Hz, H-5), 7.01 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.94 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, H-6'), 7.44 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7'), 6.12 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-8'), 7.04 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2''), 6.74 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5''), 6.98 (1H, dd, *J* =

8.2, 2.2 Hz, H-6''), 7.47 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 6.26 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 3.63 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 72.6 (C-1), 40.1 (C-2), 64.7 (C-3), 72.3 (C-4), 67.9 (C-5), 35.6 (C-6), 174.1 (C-7), 125.4 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.3 (C-3'), 148.4 (C-4'), 114.7 (C-5'), 121.4 (C-6'), 145.6 (C-7'), 113.9 (C-8'), 165.8 (C-9'), 125.5 (C-1''), 115.8 (C-2''), 145.5 (C-3''), 148.5 (C-4''), 114.9 (C-5''), 121.5 (C-6''), 145.6 (C-7''), 114.1 (C-8''), 165.9 (C-9''), 51.8 (7-OCH₃)。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定为 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 14 浅黄色粉末, HR-ESI-MS m/z 531.151 2 [M + H]⁺ (理论值 531.150 3), 提示化合物分子式为 C₂₆H₂₆O₁₂。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.24 (2H, m, H-2a, 6a), 1.88 (1H, dd, $J = 13.3, 8.5$ Hz, H-2b), 1.99 (1H, dd, $J = 13.9, 3.9$ Hz, H-6b), 4.14 (1H, dt, $J = 7.9, 3.5$ Hz, H-3), 4.96 (1H, dd, $J = 6.6, 3.1$ Hz, H-4), 5.26 (1H, m, $J = 5.7$ Hz, H-5), 7.02 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, s, H-5'), 7.00 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, H-6'), 7.41 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 6.12 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 7.04 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2''), 6.76 (1H, s, H-5''), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, H-6''), 7.50 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 6.26 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 3.59 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 73.7 (C-1), 37.7 (C-2), 65.4 (C-3), 73.1 (C-4), 67.8 (C-5), 36.8 (C-6), 173.4 (C-7), 125.2 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.5 (C-3'), 148.6 (C-4'), 113.2 (C-5'), 121.4 (C-6'), 145.7 (C-7'), 114.7 (C-8'), 165.2 (C-9'), 125.4 (C-1''), 115.8 (C-2''), 145.6 (C-3''), 148.8 (C-4''), 113.8 (C-5''), 121.5 (C-6''), 145.8 (C-7''), 114.8 (C-8''), 165.9 (C-9''), 52.0 (7-OCH₃)。以上数据与文献[22]报道基本一致,故鉴定为 4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯。

4 抗氧化活性筛选

4.1 DPPH 自由基清除率测定 对分离得到的化合物进行 DPPH 自由基清除实验,结果显示化合物 **1, 2, 5, 6, 12** 和 **13** 清除 DPPH 自由基的能力比 Vc 稍好。各化合物清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 见表 1。

4.2 ABTS⁺ 自由基清除率测定 对分离得到的化合物进行 ABTS⁺ 自由基清除实验,结果显示化合物 **1, 2, 5, 6** 和 **13** 清除 ABTS⁺ 自由基的能力比 Vc 稍

表 1 各个化合物清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 IC₅₀ values of DPPH and ABTS⁺ radical scavenging of isolated compounds ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

化合物	DPPH	ABTS ⁺
1	8.79 ± 0.40	9.46 ± 0.40
2	6.01 ± 0.30	6.13 ± 0.21
3	31.30 ± 0.74	29.67 ± 2.22
4	46.50 ± 8.56	66.71 ± 8.03
5	3.72 ± 0.22	4.82 ± 0.07
6	6.48 ± 0.46	7.78 ± 0.49
7	19.21 ± 1.90	30.14 ± 1.59
8	14.42 ± 0.77	20.25 ± 0.66
9	> 100	> 100
10	> 100	> 100
12	5.47 ± 0.40	16.67 ± 0.44
13	4.63 ± 0.278	11.50 ± 0.72
Vc	11.16 ± 0.80	14.42 ± 0.53

好。各化合物清除 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 见表 1。

4.3 抗氧化活性结果分析与讨论 分离得到的化合物抗氧化活性筛选仅见 DPPH 自由基实验的报道^[11, 23-25], 如秦皮乙素 (**2**), 咖啡酸 (**5**)^[23], 木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷 (**6**)^[24], 3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯 (**12**) 和 3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸甲酯抗氧化能力较强 (**13**)^[11] 抗氧化活性较强, 二氢芥子醇 (**3**)^[11] 抗氧化能力较弱, 异地芫普内酯 (**4**)^[25] 几乎无抗氧化能力等。笔者通过清除 DPPH 和 ABTS⁺ 两种自由基实验方法对上述化合物抗氧化活性进行研究, 结果显示化合物 **1, 2, 5, 6, 12** 和 **13** 具有显著的抗氧化活性。因文献中 DPPH 自由基测定液浓度和化合物的剂量单位不统一, 本实验根据实际情况采用优化的 DPPH 自由基测定液浓度, 因此测得的样品 IC₅₀ 与文献报道不同, 但与 Vc 对比抗氧化活性趋势一致, 且本文增加了 ABTS⁺ 自由基的测定, 两种自由基实验测定方法相互佐证更能体现化合物抗氧化活性强弱。

5 讨论

本实验对地胆草 95% 乙醇提取部分进行分离纯化, 得到 14 个化合物, 其中化合物 **1 ~ 4** 和 **8 ~ 10** 为首次从地胆草属植物中分离得到, 化合物 **11** 为首次从地胆草植物中分离得到, 丰富了地胆草属植物化合物结构类型。此外对分离到的其中 12 个化合物进行了清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基实验,

结果显示6个化合物具有显著的抗氧化活性,这可能与其结构中含有酚羟基有关,为进一步阐明地胆草传统功效与化学成分的相关性提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:202.

[2] 郭妍,陈晨,高纯,等. 地胆草的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(7):1051-1054.

[3] 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.

[4] But P P H, Hon P M, CAO H, et al. Sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* [J]. *Phytochemistry*, 1997,44(1):113-116.

[5] 李阳,张春云,林挺,等. 白花地胆草的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(11):1751-1756.

[6] 梁侨丽,龚祝南,绪广林,等. 地胆草倍半萜内酯化合物体外抗肿瘤作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(3):436-439.

[7] 王淑慧,张屏,伊丽娜,等. 蒙药材藜芦的化学成分和抗氧化活性研究[J]. 中药材,2018,41(3):618-622.

[8] 张小娜,邹先伟,李莹,等. 茯砖茶不同溶剂提取物抗氧化活性研究[J]. 中国医药导报,2014,11(10):9-13.

[9] Tanka S, Okabe T, Naka Jima S, et al. BE-23372M, a novel protein tyrosine kinase inhibitor. III. Synthesis [J]. *J Antibiot*,1994,47(3):297-300.

[10] 曹捷,秦艳,尹成乐,等. 紫花地丁化学成分及抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):77-81.

[11] 毛晨梅,李杉杉,许琼明,等. 枸骨茎的化学成分研究[J]. 中草药,2016,47(6):891-896.

[12] 阎新佳,郑威,温静,等. 白花败酱草的化学成分研究

[J]. 中草药,2017,48(2):247-251.

[13] 贾献慧,王晓,张永清. 忍冬藤酚酸类化学成分分离[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):69-71.

[14] XUE P F, LIANG H, WANG B, et al. Chemical constituents from *Potentilla multifida* L. [J]. *J Pharm Sci US*,2005,14(2):86-88.

[15] 邵帅,严铭铭,毕胜男,等. 小飞蓬中黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(19):2902-2905.

[16] ZHU X D, DONG X J, WANG Y F, et al. Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum* [J]. *Helv Chim Acta*,2005,88(2):339-342.

[17] XIA L Z, ZHOU M, XIAO Y H, et al. Chemical constituents from *Helwingia japonica* [J]. *Chin J Nat Med*,2010,8(1):16-20.

[18] 赵建强,辛海量,蒋益萍,等. 唐古特白刺叶的化学成分研究[J]. 中草药,2016,47(7):1090-1093.

[19] 崔锡强,李杏翠,王磊,等. 蚕沙化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2493-2496.

[20] 孙昱,马晓斌,刘建勋. 野菊花心血管活性部位化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(1):61-65.

[21] 张婷婷,曹跃,曹佳,等. 火绒草的咖啡酰类成分研究[J]. 中药材,2017,40(1):90-93.

[22] 周岳,曾婷,李丽梅. 光叶丁公藤酚性成分研究[J]. 中草药,2016,47(9):1496-1500.

[23] 郭林新,马羊民,乔珂,等. 三叶木通化学成分及抗氧化活性[J]. 中成药,2017,39(2):338-342.

[24] 刘飞,李佳,张永清. 栝楼雄株茎叶黄酮类化合物的分离及其清除 DPPH 能力研究[J]. 中草药,2016,47(23):4141-4145.

[25] 朱求方,王永毅,瞿海斌. 连线草的化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(4):387-390.

[责任编辑 顾雪竹]