

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201410002

李树立,刘玉衡. 毛药忍冬花蕾抗氧化活性部位化学成分研究[J]. 广西植物, 2015, 35(4):586—589

Li SL, Liu YH. Chemical constituents with antioxidative activity from the flower buds of *Lonicera serreana*[J]. Guihaia, 2015, 35(4):586—589

毛药忍冬花蕾抗氧化活性部位化学成分研究

李树立^{1*}, 刘玉衡²

(1. 河北经贸大学 生物科学与工程学院, 石家庄 050061; 2. 河北医科大学 基础医学院, 石家庄 050017)

摘要: 毛药忍冬 (*Lonicera serreana*) 为忍冬属 (*Lonicera*) 植物, 其花和果实入药, 具有清热解毒、凉散风热之功效, 但至今缺乏系统化学成分及药理活性研究。为了寻找毛药忍冬中天然抗氧化活性成分, 进一步开发利用忍冬属药用植物资源, 该研究以 DPPH 自由基清除法为活性指导, 首次对毛药忍冬干燥花蕾 75% 乙醇提取物的不同极性萃取部位进行抗氧化活性测试, 结果发现乙酸乙酯萃取物表现出最强的抗氧化活性 (平均清除率为 89.45%)。进一步应用现代色谱手段 (硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等), 从毛药忍冬花蕾的乙酸乙酯萃取物中分离单体化合物, 运用现代光谱分析技术 (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, ROESY), 并结合文献数据鉴定化合物的化学结构。结果表明: 从毛药忍冬干燥花蕾 75% 乙醇提取物中共分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为 4 个酚酸类化合物: 绿原酸 (1)、绿原酸甲酯 (2)、绿原酸乙酯 (3)、咖啡酸 (4); 4 个黄酮类化合物: 木犀草素 (5)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 (6)、槲皮素 (7)、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷 (8); 1 个甾醇类化合物: β-谷甾醇 (9)。所有化合物均为从毛药忍冬花蕾中首次分离得到。研究结果可为抗氧化类相关产品的开发提供科学依据。

关键词: 毛药忍冬花蕾; DPPH 自由基清除法; 抗氧化活性; 绿原酸; 黄酮

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)04-0586-04

Chemical constituents with antioxidative activity from the flower buds of *Lonicera serreana*

LI Shu-Li^{1*}, LIU Yu-Heng²

(1. College of Biology Science and Engineering, Hebei Economy and Trade University, Shijiazhuang 050061, China; 2. Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: *Lonicera serreana* is the endemic species in China from the genus *Lonicera*. The flowers and fruits of *L. serreana* were commonly used in the traditional Chinese medicine for the treatment of various diseases, but there was no study on the chemical constituents of *L. serreana*. To study the chemical constituents with antioxidative activity from the flower buds of *L. serreana*, DPPH radical scavenging assay was used for screening the active fractions of 75% ethanol extract. The highest antioxidant activity (89.45%) was observed in the ethyl acetate layer of the extract. Further chemical investigation led to the isolation of nine compounds by modern chromatographic method (chromatography on silica gel and Sephadex LH-20 columns). Their structures were elucidated by modern spectrum analysis (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, ROESY). As a result, four chlorogenic acids, four flavonoids and one sterol compound were identified from the ethyl acetate layer of the extract. All of these compounds were isolated from the flower buds of *L. serreana* for the first time. The chemical constituent of the flower buds of *L. serreana* was deeply studied under the active guidance of DPPH radical scavenging assay, therefore this study

收稿日期: 2014-10-02 修回日期: 2015-03-25

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(10237101D-9)

作者简介: 李树立(1963-), 河北石家庄人, 硕士, 副教授, 主要从事植物化学成分与抗氧化活性研究, (E-mail)lishuli6318@sina.com。

* 通讯作者

would accumulate the fundamental data for antioxidant related products development.

Key words: flower buds of *Lonicera serreana*; DPPH radical scavenging assay; antioxidant activity; chlorogenic acids; flavonoids

活性氧自由基 (Reactive Oxygen Species, ROS) 是生命体在各种生命活动过程中,在一系列生物化学反应中所产生的中间产物,它们是一些处于激发态的含氧基团。当机体处于正常的生理情况下时,体内自由基的产生和消除处于一个动态平衡之中。但是活性氧自由基如果在体内过量存在,就可以伤害生物大分子,如造成蛋白质损伤、DNA 损伤、脂质过氧化反应等,而这些是引起生物体衰老和某些机体病变发生的重要因素(田云等,2005)。

天然植物活性成分中的酚酸类化合物和黄酮类化合物具有良好的抗氧化活性 (Kandaswami *et al.*, 2008)。忍冬属植物中含有多种酚酸和黄酮成分(翁裕馨等, 2011)。毛药忍冬 (*Lonicera serreana*) 为我国特有植物,属于忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 (*Lonicera*)。主要分布于中国河北、山西、陕西、甘肃、宁夏、四川等省区(中国植物志编辑编委会, 1988)。毛药忍冬的花和果实均可入药,具有清热解毒的功效,可以治疗炎症、感冒、发热等症(谷志云等, 2008)。关于毛药忍冬的化学成分及药理作用研究未见相关报道,为寻找毛药忍冬干燥花蕾中天然抗氧化活性成分,进一步开发利用忍冬属药用植物资源,本实验首次以毛药忍冬的干燥花蕾为材料,采用 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 的测试方法,对其 75%乙醇提取物的各极性萃取层进行抗氧化活性测试。发现毛药忍冬花蕾提取物乙酸乙酯萃取层抗氧化活性最好。进一步运用硅胶、凝胶等色谱分离技术,从中分离得到 9 个化合物,通过波谱数据并结合文献分别鉴定为酚酸类化合物 (1-4)、黄酮类化合物 (5-8) 及甾醇 (9)。这些化合物均属于首次从毛药忍冬中分离得到。

1 材料与仪器

Bruker AV III 600 MHz 超导核磁共振波谱仪; BT224S 电子天平; KQ5200E 超声波清洗器; X-6 显微熔点仪; Agilent-1100-LC/MSD-Trap; SHB-B95 型循环水式多用真空泵; 薄层色谱用硅胶板 GF₂₅₄ 和柱层析色谱用硅胶(中国青岛海洋化工公司生产); Sephadex LH-20; 其余试剂均为国产分析纯

试剂。DPPH 为美国 Sigma 公司产; 维生素 C 标准对照品为中国医药上海化学试剂公司产。毛药忍冬花蕾于 2012 年 7 月采自河北省平山县,经鉴定为毛药忍冬 (*Lonicera serreana*) 的花蕾。

2 提取与分离

毛药忍冬干燥花蕾 1.7 kg, 75%乙醇室温提取 3 次,每次浸泡 1 周。减压回收溶剂并得到浸膏 136.0 g。浸膏分散于水中,用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次进行萃取,并分别减压回收溶剂,得到 4 种萃取浸膏,质量分别为 22.0、23.0、27.0、24.8 g。因石油醚萃取物中含有大量植物色素,影响 DPPH 抗氧化实验 517 nm 波长检测,所以实验样品选用其余 3 种极性萃取物,阳性对照为维生素 C。以上 3 种萃取物配置不同质量浓度的乙醇溶液,分别加入一定浓度的 DPPH 溶液,517 nm 波长处检测最大吸收 (Brand *et al.*, 1995),每份样品平行操作 3 次。DPPH 活性实验结果显示,同其他萃取部位相比,乙酸乙酯萃取物 DPPH 自由基平均清除率 (89.45%) 最接近阳性对照物维生素 C (91.47%),显示最强抗氧化活性,因此实验开展乙酸乙酯萃取层浸膏的化学成分分离。

将乙酸乙酯萃取物 27.0 g 进行硅胶柱层析,以氯仿-甲醇溶剂系统为洗脱液,梯度由 20:1 至 1:1,洗脱共得到 6 个馏分 (F1~F6)。F1 部分首先经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,以氯仿-甲醇 (1:1) 为洗脱液,接着利用硅胶柱层析,洗脱液为石油醚-乙酸乙酯 (3:1),得到化合物 9 (10.6 mg)。F2 部分首先以 Sephadex LH-20 凝胶柱层析,洗脱剂为氯仿-甲醇 (1:1) 溶剂,得到化合物 5 (5.3 mg) 和化合物 7 (6.7 mg)。F3 部分经过硅胶柱层析,以氯仿-甲醇 (5:1) 为洗脱剂,得到化合物 2 (5.8 mg) 和化合物 3 (4.4 mg)。F4 部分经凝胶柱层析,得到化合物 4 (2.7 mg)。F5 经硅胶柱层析,以氯仿-甲醇 (3:1) 为洗脱剂,得到化合物 1 (13.1 mg)。F6 硅胶柱层析,氯仿-甲醇 (1:1) 作为洗脱剂,并进一步用凝胶柱层析,以甲醇为洗脱剂,得到化合物 6 (7.6 mg) 和化合物 8 (4.7 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色粉末, 365 nm 紫外灯下显蓝色荧光, 与绿原酸标准品比较, Rf 值及斑点颜色一致。与绿原酸标准品相互混合, 熔点不变, 将化合物 **1** 鉴定为绿原酸。

化合物 **2** 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 369 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 7.42 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.98 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.19 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 5.27 (1H, m, H-3), 4.85 (1H, m, H-5), 3.76 (1H, m, H-4), 3.65 (3H, s, -OMe); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 174.9 (C-7), 169.2 (C-9'), 149.8 (C-4'), 148.5 (C-7'), 144.9 (C-3'), 127.9 (C-1'), 123.3 (C-6'), 116.1 (C-8'), 115.2 (C-5'), 114.9 (C-2'), 75.4 (C-1), 71.7 (C-4), 71.4 (C-3), 69.3 (C-5), 52.1 (-OMe), 37.6 (C-2), 36.6 (C-6)。以上数据与翁裕馨等(2011)报道一致, 故鉴定为绿原酸甲酯。

化合物 **3** 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 383 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 7.42 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-3), 4.19 (1H, m, H-5), 3.76 (1H, m, H-4), 1.24 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 174.7 (C-7), 168.4 (C-9'), 148.5 (C-4'), 145.9 (C-7'), 145.3 (C-3'), 127.5 (C-1'), 123.9 (C-6'), 115.2 (C-5'), 115.1 (C-8'), 115.1 (C-2'), 75.6 (C-1), 71.6 (C-4), 70.7 (C-3), 69.3 (C-5), 61.3 (C-8), 37.9 (C-6), 37.0 (C-2), 13.9 (C-9)。以上数据与翁裕馨等(2011)报道一致, 故鉴定为绿原酸乙酯。

化合物 **4** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 181 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 7.48 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.22 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8)。数据与黄永林等(2014)报道一致, 故鉴定为咖啡酸。

化合物 **5** 黄色无定型粉末, ESI-MS m/z : 287 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 7.40 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 7.37 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.65 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 181.4 (C-4), 164.2 (C-2), 163.9 (C-7), 161.4 (C-5), 157.3 (C-9), 149.4 (C-4'), 145.6 (C-3'), 121.5 (C-1'), 118.9 (C-6'), 115.9 (C-5'), 113.0 (C-2'), 103.6 (C-10), 102.8 (C-3), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8)。以上数据与李洪娟(2007)报道一致, 故该化合物被鉴定为木犀草素。

化合物 **6** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 449 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 7.43 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.71 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 181.6 (C-4), 164.1 (C-2), 163.8 (C-7), 161.5 (C-5), 157.5 (C-9), 149.9 (C-4'), 145.9 (C-3'), 121.7 (C-1'), 119.3 (C-6'), 116.2 (C-5'), 113.6 (C-2'), 104.2 (C-10), 103.1 (C-3), 100.1 (C-1''), 99.6 (C-6), 94.2 (C-8), 76.9 (C-3''), 77.6 (C-5''), 74.1 (C-2''), 70.9 (C-4''), 61.1 (C-6'')。数据与李洪娟等(2007)报道一致, 确定该化合物为木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **7** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 303 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 7.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 175.8 (C-4), 163.9 (C-7), 160.9 (C-5), 156.4 (C-9), 147.5 (C-4'), 146.6 (C-2), 144.9 (C-3'), 135.7 (C-3), 121.9 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.5 (C-2'), 115.0 (C-5'), 103.1 (C-10), 98.3 (C-6), 93.7 (C-8)。以上数据与周荣光等(2012)报道一致, 故鉴定为槲皮素。

化合物 **8** 黄色无定形粉末, ESI-MS m/z : 465 $[M + H]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz)

δ : 12.47 (1H, s, 5-OH), 7.61 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.45 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 176.7 (C-4), 164.1 (C-7), 160.9 (C-5), 156.5 (C-9), 154.7 (C-2), 147.5 (C-4'), 144.9 (C-3'), 134.7 (C-3), 121.7 (C-1'), 120.4 (C-6'), 115.5 (C-2'), 115.0 (C-5'), 103.3 (C-10), 101.4 (C-1''), 98.6 (C-6), 93.9 (C-8), 78.0 (C-5''), 76.8 (C-3''), 74.5 (C-2''), 69.7 (C-4''), 61.6 (C-6''). 以上数据与安海洋等(2011)报道一致,故鉴定为槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **9** 白色针晶(氯仿), mp 140~142 $^{\circ}\text{C}$, 硫酸-乙醇显色为紫红色。薄层层析显示,化合物 **9** 与 β -谷甾醇标准品混合,点样后经多个展开系统展开,结果显示均为 1 个斑点。与 β -谷甾醇标准品混合后,熔点不变,化合物 **9** 鉴定为 β -谷甾醇。

4 讨论与结论

本研究结果表明,毛药忍冬干燥花蕾中最佳抗氧化活性部位为乙酸乙酯极性萃取部位,进一步对乙酸乙酯萃取部位进行化合物的提取分离和结构鉴定,从中分离得到 9 个化合物,主要为酚酸类化合物和黄酮类化合物,这些结果为抗氧化类相关产品开发提供了重要的科学依据。

酚酸类化合物和黄酮类化合物,都含有数目不一的酚羟基官能团,这些化合物均具有良好的抗氧化活性(段世廉等,2011;孙静等,2012)。刘慧琼等(2004)的研究表明, β -谷甾醇在植物中普遍存在,具有较强的抗氧化作用。因此,民间药用植物毛药忍冬花蕾在天然抗氧化剂方面具有一定的开发前景。

参考文献:

An HY (安海洋), Liu S (刘顺), Shan Q (单淇), *et al.* 2011. Study on chemical constituents of *Potentilla discolor* (翻白草的化学成分研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), **42**: 1 285—1 288

- Brand WW, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Sci Technol*, **28** (1): 25—29
- Compilation Committee of Flora Sinicae (中国植物志编辑委员会). 1988. Flora of China (中国植物志)[M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社): 166
- Duan SL (段世廉), Tang SA (唐生安), Qin N (秦楠), *et al.* 2012. Chemical constituents of *Phymatopteris hastate* and their antioxidant activity (金鸡脚化学成分及其抗氧化活性)[J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **37** (10): 1 402—1 407
- Gu ZY (谷志云), Zhu SX (朱世新), Guo ZF (郭振锋), *et al.* 2008. Research on medicinal plant resources of *Lonicera* Linn. in Henan (河南忍冬科药用资源研究)[J]. *J Henan Agric Univ* (河南农业大学学报), **42**: 419—422
- Huang YL (黄永林), Chen YY (陈月圆), Yan XJ (颜小捷), *et al.* 2014. Chemical constituents from the leaves of *Alchornea treviioides* (1)—Phenolic acids and related compounds (红背山麻杆叶的化学成分研究(I)酚酸类及相关化合物)[J]. *Guihaia* (广西植物), **34** (1): 126—129
- Kandaswami C, Middleton E. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids[J]. *Adv Exp Med Biol*, **366**: 351—356
- Li HJ (李洪娟), Luo YG (罗应刚), He ZH (何志恒), *et al.* 2007. Chemical constituents from *Lonicera saccata* (袋花忍冬的化学成分研究)[J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **13**: 188—191
- Liu HQ (刘慧琼), Guo SH (郭书好), Shen YS (沈英森), *et al.* 2004. Study in antioxidative effect of β -sitosterol (半夏中 β -谷甾醇的抗氧化作用研究)[J]. *J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), **20**(3): 281—283
- Sun J (孙静), Huang Y (黄芸), Sun GB (孙桂波), *et al.* 2012. Study on in *vitro* antioxidant activity of flavonoids contained in Hebei balmy chrysanthemum and structure-activity relationship (河北香菊中黄酮类成分体外抗氧化活性研究及构效关系探讨)[J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **37**(13): 1 958—1 962
- Tian Y (田云), Lu XY (卢向阳), He XJ (何小解), *et al.* 2005. Scavenging capacities on oxygen radicals of natural plant antioxidants (天然植物抗氧化剂清除氧自由基特性研究)[J]. *Food Sci* (食品科学), **26** (6): 123—125
- Weng YX (翁裕馨), Chen XH (陈湘宏), Liu ZH (刘占厚), *et al.* 2011. Chemical constituents of chlorogenic acids from the dried leaves of *Lonicera similis* Hemsl (细毡毛忍冬叶绿原酸类化学成分研究)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), **39**: 16 566—16 568
- Zhou RG (周荣光), Yang ZX (杨兆祥), Wang J (王金), *et al.* 2012. Chemical constituents from leaves of *Mangifera persiciformis* (扁桃叶的化学成分研究)[J]. *Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), **24**: 1 217—1 219