

小花清风藤醇提物的化学成分及体外抗氧化活性研究^Δ

周永强*,赵春丽,殷鑫,周涛#,韩伟,张永萍(贵州中医药大学药学院,贵阳 550025)

中图分类号 R917;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0530-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.04



摘要 目的 分离、鉴定小花清风藤70%乙醇提取物的化学成分,并初步评价其体外抗氧化活性。方法 采用硅胶、ODS反相硅胶、Sephadex-LH20柱色谱法及制备型高效液相色谱法等对小花清风藤70%乙醇提取物中化学成分进行分离和纯化,并结合核磁共振氢谱(¹H-NMR)、核磁共振碳谱(¹³C-NMR)及电喷雾-质谱(ESI-MS)等波谱方法鉴定所分离出的化合物结构。分别采用2,2-联苯基-1-苦基胍基自由基(DPPH·)、2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基(ABST⁺)和羟基自由基(OH·)清除法考察各化合物的体外抗氧化活性。结果 从小花清风藤70%乙醇提取物中共分离得到9个化合物,分别鉴定为芦丁(1)、邻苯二甲酸二异壬酯(2)、邻苯二甲酸二丁酯(3)、吐叶醇(4)、杜鹃醇(5)、槲皮素-3-O-龙胆双糖苷(6)、水仙苷(7)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(8)、bonaroside(9)。体外抗氧化结果显示,化合物1~9均表现出一定的体外抗氧化活性,其中化合物1、6、7、8对DPPH·、ABST⁺、OH·的半数清除浓度均低于70 μg/mL。结论 首次从清风藤属植物中分离得到吐叶醇、杜鹃醇、bonaroside;芦丁、槲皮素-3-O-龙胆双糖苷、水仙苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷表现出较好的体外抗氧化活性。

关键词 小花清风藤;化学成分;70%乙醇提取物;抗氧化活性

Study on chemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of ethanol extract of *Sabia parviflora*

ZHOU Yongqiang, ZHAO Chunli, YIN Xin, ZHOU Tao, HAN Wei, ZHANG Yongping (College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To separate and identify the chemical constituents in 70% ethanol extract of *Sabia parviflora*, and to preliminarily evaluate their *in vitro* antioxidant activity. **METHODS** The chemical constituents were separated and purified by silica gel, ODS reversed-phase silica gel, Sephadex-LH20 column and preparative high performance liquid chromatography. The structures of the isolated compounds were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and ESI-MS. The *in vitro* antioxidant activities of the compounds were investigated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·), 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium radical (ABST⁺) and hydroxyl radical (OH·). **RESULTS** A total of 9 compounds were isolated from the 70% ethanol extracts of *S. parviflora*. They were identified as rutin (1), diiononyl phthalate (2), dibutyl phthalate (3), vomifoliol (4), rhododendrol (5), quercetin-3-O-gentiobioside (6), narcissoside (7), kaempferol-3-O-rutinoside (8) and bonaroside (9). The *in vitro* antioxidant results showed that compound 1-9 showed certain *in vitro* antioxidant activity, and the half scavenging concentrations of compound 1, 6, 7 and 8 to DPPH·, ABST⁺, OH· were lower than 70 μg/mL. **CONCLUSIONS** Vomifoliol, rhododendrol and bonaroside are isolated from *S. parviflora* for the first time, and rutin, quercetin-3-O-gentiobioside, narcissoside and kaempferol-3-O-rutinoside show good *in vitro* antioxidant activity.

KEYWORDS *Sabia parviflora*; chemical constituent; 70% ethanol extract; antioxidant activity

小花清风藤 *Sabia parviflora* Wall. ex Roxb. 为清风藤科清风藤属的藤本植物,主要分布在贵州、广西、云南等地区^[1]。研究发现,小花清风藤水提物能够降低流感

模型小鼠的肺指数和肺组织中的病毒滴度,从而发挥抗流感病毒的作用^[2];另有研究表明,小花清风藤胶囊具有护肝、解肝毒的活性,从而达到治疗肝炎的作用^[3-4]。由此表明,小花清风藤具有较大的药用价值。小花清风藤所含化合物的类型主要有黄酮类、生物碱类、脂肪酸类、烷烃类和苯衍生物,其中黄酮类化合物是小花清风藤的主要化学成分^[5-6]。本课题组前期开展了小花清风藤不同溶剂提取物的体外抗氧化、抑菌及抗炎的药效学评价研究,发现小花清风藤70%乙醇提取物具有较好的抗氧化和抗炎活性;同时,本课题组前期通过薄层色谱实验发现,该提取物中含有黄酮类成分。因此,本研究对小

^Δ 基金项目:国家自然科学基金-贵州喀斯特中心项目(No. U1812403);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础-ZK[2021]—般518);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No.黔教合KY字[2018]206);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No. QZYY-2020-040)

* 讲师,博士。研究方向:中药民族药药效物质基础及活性评价。E-mail:zhouxiaoliang1988@126.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药民族药资源开发。E-mail:taozhou88@163.com

花清风藤70%乙醇提取物的化学成分开展深入研究,并对从中分离、鉴定出的化合物进行体外抗氧化活性评价,以期为进一步深入开展小花清风藤化学成分及药理活性研究,以及扩大其药用活性部位提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括Bruker-400型超导核磁共振(NMR)光谱仪(德国Bruker公司)、V-5000型可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)、LC-16P制备型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司)、API 3200型质谱(MS)仪(美国Sciex公司)、Agilent-1260型HPLC仪(美国Agilent公司)、N-1300型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)、FA2104N型电子天平(上海菁海仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

小花清风藤于2018年8月采自云南省富宁县,由贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为清风藤科清风藤属小花清风藤 *S. parviflora* Wall. ex Roxb. 的叶片。维生素C购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司(批号5210421,规格100 mg);2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)购自上海麦克林生化科技有限公司;2,2'-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、葡聚糖凝胶LH-20均购自北京索莱宝科技有限公司;柱层析硅胶购自青岛海洋化工厂分厂;C₁₈反相柱填料ODS-A-HG购自日本YMC公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 小花清风藤化学成分的提取分离

取干燥的小花清风藤16.3 kg,粉碎,以70%乙醇(130.4 L/次)加热回流提取3次,每次2 h。回收乙醇,将所得乙醇提取物加水分散后,依次采用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取,回收溶剂后,分别得到石油醚萃取部位(100.2 g)、乙酸乙酯萃取部位(220.42 g)和正丁醇萃取部位(530.68 g)。取正丁醇萃取部位(280 g)进行硅胶柱(200~300目)色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(30:1、20:1、10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1, V/V)进行梯度洗脱,结合薄层色谱分析及合并相同组分后,得到Fr.1~Fr.35共35个组分,并对Fr.3、Fr.8、Fr.15、Fr.16这4个组分进行进一步分离纯化。其中,组分Fr.3进一步用Sephadex-LH20柱色谱纯化得到化合物2(16.1 mg)和化合物3(13.3 mg);组分Fr.8进一步用ODS反相柱色谱[甲醇(20%~100%)-水]纯化得到化合物4(15.2 mg)和化合物5(14.5 mg);组分Fr.15进一步用ODS反相柱色谱[甲醇(20%~100%)-水]纯化得到组分Fr.15-A~Fr.15-G,其中Fr.15-E经制备型HPLC仪(58%甲醇-水)纯化得到化合物8(13.6 mg)和化合物9(12.4 mg);组分Fr.16进一步用ODS反相柱色谱[甲醇(20%~100%)-

水]纯化得到组分Fr.16-A~Fr.16-H,其中组分Fr.16-C经制备型HPLC仪(55%甲醇-水)纯化得到化合物1(21.2 mg)、化合物6(11.8 mg)和化合物7(12.6 mg)。

2.2 小花清风藤化学成分的结构鉴定

2.2.1 化合物1 化合物1的分子式为C₂₇H₃₀O₁₆,为黄色无定形粉末;盐酸-镁粉反应呈阳性,Molish反应呈阳性;电喷雾-质谱(ESI-MS) *m/z* [M+H]⁺ 611.1; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H: 12.59(1H, brs, 5-OH), 7.55(2H, overlapped, H-2', H-6'), 6.84(1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.38(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.18(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.33(1H, d, *J*=7.4 Hz, H_{Glu-1}), 4.38(1H, d, *J*=1.0 Hz, H_{Rha-1}), 0.98(3H, d, *J*=6.1 Hz, H_{Rha-6})。 ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ_C: 156.4(C-2), 133.2(C-3), 177.3(C-4), 161.2(C-5), 98.7(C-6), 164.2(C-7), 93.6(C-8), 156.5(C-9), 103.9(C-10), 121.1(C-1'), 115.2(C-2'), 144.7(C-3'), 148.4(C-4'), 116.2(C-5'), 121.5(C-6'), 101.2(C_{Glu-1}), 74.0(C_{Glu-2}), 76.4(C_{Glu-3}), 70.5(C_{Glu-4}), 75.9(C_{Glu-5}), 66.9(C_{Glu-6}), 100.7(C_{Rha-1}), 70.3(C_{Rha-2}), 69.9(C_{Rha-3}), 71.8(C_{Rha-4}), 68.2(C_{Rha-5}), 17.7(C_{Rha-6})。以上数据与文献[7]报道的基本一致,故鉴定化合物1为芦丁,其结构见图1。

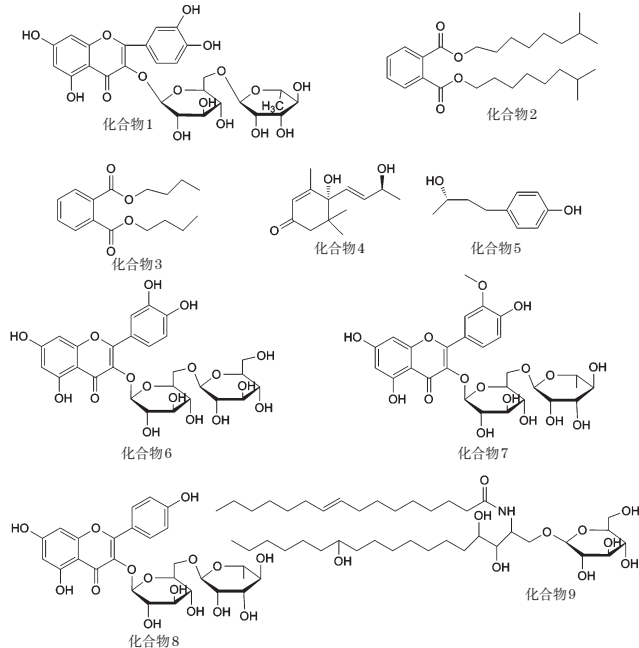


图1 化合物1~9的结构示意图

2.2.2 化合物2 化合物2的分子式为C₂₆H₄₂O₄,为淡黄色油状物;ESI-MS *m/z* [M+H]⁺ 419.3。 ¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N) δ_H: 0.89(9H, m), 1.26(13H, m), 1.69(2H, dd, *J*=12.2、6.1 Hz), 4.11(2H, m), 7.52(1H, dd, *J*=5.7、3.3 Hz), 7.91(1H, dd, *J*=5.7、3.3 Hz)。 ¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N) δ_C: 11.1(C-17, C-26), 14.3(C-16, C-25), 23.1(C-11, C-20), 24.1(C-13, C-22), 29.3(C-15, C-24), 30.1(C-12, C-21), 32.1(C-10, C-19), 39.1(C-14, C-23),

68.2 (C-9, C-18), 129.3 (C-3, C-6), 131.5 (C-1, C-2), 133.2 (C-4, C-5), 168.0 (C-7, C-8)。以上数据与文献[8]报道的基本一致,故鉴定化合物2为邻苯二甲酸二异壬酯,其结构见图1。

2.2.3 化合物3 化合物3的分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$,为无色油状物;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 279.1。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.73 (2H, dd, $J=5.3$ 、3.4 Hz, H-3, H-6), 7.68 (2H, dd, $J=5.7$ 、3.8 Hz, H-4, H-5), 4.22 (4H, t, $J=6.5$ Hz, H-1', H-1''), 1.68 (4H, m, H-2', H-2''), 1.42 (4H, sextet, $J=7.5$ Hz, H-3', H-3''), 0.92 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-4', H-4'')。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 166.9 (COO-), 166.9 (COO-), 131.6 (C-1, C-2), 131.5 (C-4, C-5), 128.6 (C-3, C-6), 65.0 (C-1', C-1''), 29.9 (C-2', C-2''), 18.6 (C-3', C-3''), 13.5 (C-4', C-4'')。以上数据与文献[9]报道的基本一致,故鉴定化合物3为邻苯二甲酸二丁酯,其结构见图1。

2.2.4 化合物4 化合物4的分子式为 $C_{13}H_{20}O_3$,为白色针晶;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 225.1。 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_H : 5.87 (1H, s, H-4), 5.80 (1H, m, H-7), 5.79 (1H, m, H-8), 4.32 (1H, m, H-9), 2.46 (1H, d, $J=16.9$ Hz, H-2a), 2.18 (1H, d, $J=16.9$ Hz, H-2b), 1.91 (3H, s, H-11), 1.23 (3H, s, H-10), 1.04 (3H, s, H-12), 1.01 (3H, s, H-13)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_C : 42.4 (C-1), 50.8 (C-2), 201.2 (C-3), 127.1 (C-4), 167.4 (C-5), 80.0 (C-6), 130.0 (C-7), 137.0 (C-8), 68.6 (C-9), 23.8 (C-10), 19.6 (C-11), 23.5 (C-12), 24.5 (C-13)。以上数据与文献[10]报道的基本一致,故鉴定化合物4为吐叶醇,其结构见图1。

2.2.5 化合物5 化合物5的分子式为 $C_{11}H_{17}O_2$,为白色粉末;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 182.1。 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_H : 1.17 (3H, d, $J=6.2$ Hz), 1.67 (2H, m), 2.53 (2H, m), 3.73 (1H, m), 6.68 (2H, d, $J=8.5$ Hz), 7.01 (2H, d, $J=8.5$ Hz)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_C : 23.5 (C-1), 67.9 (C-2), 42.4 (C-3), 32.3 (C-4), 134.5 (C-1'), 130.2 (C-2', C-6'), 116.1 (C-3', C-5'), 156.3 (C-4')。以上数据与文献[11]报道的基本一致,故鉴定化合物5为杜鹃醇,其结构见图1。

2.2.6 化合物6 化合物6的分子式为 $C_{27}H_{30}O_{17}$,为黄色无定形粉末;盐酸-镁粉反应呈阳性, Molish反应呈阳性;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 627.1。 1H -NMR ($N_5D_5-d_6$, 400 MHz) δ_H : 8.40 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 8.12 (1H, dd, $J=2.2$ 、8.4 Hz, H-6'), 7.32 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.65 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.63 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.03 (1H, d, $J=7.4$ Hz, $H_{Glu-1'}$), 4.96 (1H, d, $J=7.8$ Hz, $H_{Glu-1''}$)。 ^{13}C -NMR ($N_5D_5-d_6$, 100 MHz) δ_C : 157.7 (C-2), 135.3 (C-3), 178.6 (C-4), 162.7 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.6 (C-8), 158.3 (C-9), 105.4 (C-10), 123.0 (C-1'), 116.3

(C-2'), 146.7 (C-3'), 150.7 (C-4'), 118.0 (C-5'), 122.5 (C-6'), 105.2 ($C_{Glu-1'}$), 75.9 ($C_{Glu-2'}$), 78.6 ($C_{Glu-3'}$), 71.4 ($C_{Glu-4'}$), 78.3 ($C_{Glu-5'}$), 70.1 ($C_{Glu-6'}$), 104.2 ($C_{Glu-1''}$), 75.2 ($C_{Glu-2''}$), 78.2 ($C_{Glu-3''}$), 71.3 ($C_{Glu-4''}$), 77.8 ($C_{Glu-5''}$), 62.5 ($C_{Glu-6''}$)。以上数据与文献[12]报道的基本一致,故鉴定化合物6为槲皮素-3-*O*-龙胆双糖苷,其结构见图1。

2.2.7 化合物7 化合物7的分子式为 $C_{28}H_{32}O_{16}$,为黄色无定形粉末;盐酸-镁粉反应呈阳性, Molish反应呈阳性;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 625.2。 1H -NMR ($N_5D_5-d_6$, 400 MHz) δ_H : 8.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.91 (1H, dd, $J=2.0$ 、8.4 Hz, H-6'), 7.29 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.72 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 3.89 (1H, s, 3'- OCH_3), 6.27 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H_{Glu-1}), 4.38 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H_{Rha-1}), 1.48 (3H, d, $J=5.6$ Hz, H_{Rha-6})。 ^{13}C -NMR ($N_5D_5-d_6$, 100 MHz) δ_C : 158.1 (C-2), 135.4 (C-3), 179.1 (C-4), 163.2 (C-5), 100.3 (C-6), 166.4 (C-7), 95.1 (C-8), 158.2 (C-9), 105.8 (C-10), 123.4 (C-1'), 114.8 (C-2'), 148.5 (C-3'), 151.7 (C-4'), 116.8 (C-5'), 122.5 (C-6'), 56.5 (3'- OCH_3), 104.5 (C_{Glu-1}), 76.6 (C_{Glu-2}), 79.0 (C_{Glu-3}), 73.1 (C_{Glu-4}), 78.1 (C_{Glu-5}), 68.7 (C_{Glu-6}), 103.1 (C_{Rha-1}), 72.6 (C_{Rha-2}), 72.1 (C_{Rha-3}), 74.3 (C_{Rha-4}), 70.1 (C_{Rha-5}), 18.9 (C_{Rha-6})。以上数据与文献[13]报道的基本一致,故鉴定化合物7为水仙苷,其结构见图1。

2.2.8 化合物8 化合物8的分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$,为黄色无定形粉末;盐酸-镁粉反应呈阳性, Molish反应呈阳性;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 595.2。 1H -NMR ($N_5D_5-d_6$, 400 MHz) δ_H : 8.45 (2H, dd, $J=1.9$ 、6.9 Hz, H-2', H-6'), 7.29 (1H, d, $J=1.9$ 、6.9 Hz, H-3', H-5'), 6.70 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.68 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.06 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H_{Glu-1}), 5.29 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H_{Rha-1}), 1.49 (3H, d, $J=5.6$ Hz, H_{Rha-6})。 ^{13}C -NMR ($N_5D_5-d_6$, 100 MHz) δ_C : 158.2 (C-2), 132.4 (C-3), 179.1 (C-4), 162.2 (C-5), 100.3 (C-6), 166.4 (C-7), 95.1 (C-8), 163.2 (C-9), 105.7 (C-10), 122.4 (C-1'), 132.4 (C-2'), 116.6 (C-3'), 158.5 (C-4'), 116.6 (C-5'), 132.4 (C-6'), 105.1 (C_{Glu-1}), 76.5 (C_{Glu-2}), 79.1 (C_{Glu-3}), 73.1 (C_{Glu-4}), 77.9 (C_{Glu-5}), 68.9 (C_{Glu-6}), 103.0 (C_{Rha-1}), 71.9 (C_{Rha-2}), 72.6 (C_{Rha-3}), 74.4 (C_{Rha-4}), 70.1 (C_{Rha-5}), 18.9 (C_{Rha-6})。以上数据与文献[14]报道的基本一致,故鉴定化合物8为山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,其结构见图1。

2.2.9 化合物9 化合物9的分子式为 $C_{40}H_{77}NO_{10}$,为白色粉末;ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 732.5。 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ_H : 4.05 (1H, dd, $J=10.5$ 、6.3 Hz), 3.78 (1H, dd, $J=10.5$ 、3.4 Hz), 4.26 (1H, ddd, $J=5.8$ 、4.0、3.5 Hz), 3.57 (1H, dd, $J=6.4$ 、6.0 Hz), 4.28 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 5.35 (1H, m), 5.42 (1H, m), 0.87 (1H, t, $J=7.0$ Hz), 0.87 (1H, t, $J=7.0$ Hz)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ_C :

69.9(C-1), 51.6(C-2), 75.6(C-3), 72.8(C-4), 32.8(C-5), 30.5(C-6), 30.8(C-7), 30.8(C-8), 30.8(C-9), 30.5(C-10), 30.6(C-11), 73.0(C-12), 30.7(C-13), 30.3(C-14), 30.7(C-15), 33.1(C-16), 23.7(C-17), 14.4(C-18), 104.7(C_{Glu}-1), 75.0(C_{Glu}-2), 77.9(C_{Glu}-3), 71.6(C_{Glu}-4), 78.0(C_{Glu}-5), 62.6(C_{Glu}-6), 177.1(C-1''), 35.7(C-2''), 26.1(C-3''), 30.8(C-4''), 30.8(C-5''), 30.8(C-6''), 30.8(C-7''), 27.2(C-8''), 131.4(C-9''), 131.6(C-10''), 26.1(C-11''), 30.7(C-12''), 30.7(C-13''), 33.1(C-14''), 23.7(C-15''), 14.4(C-16'')。以上数据与文献[15]报道的基本一致,故鉴定化合物9为 bonaroside,其结构见图1。

2.3 化合物1~9的抗氧化活性初步评价

2.3.1 溶液的制备 (1)样品溶液:分别精密称取受试化合物5.0 mg,以无水乙醇溶解并定容至5 mL量瓶中,得到各受试化合物质量浓度均为1.0 mg/mL的贮备液;取上述贮备液,分别用无水乙醇稀释,制备成各化合物质量浓度分别为160、80、40、20、10、5 μg/mL的样品溶液,备用。(2)阳性对照品溶液:精密称取维生素C粉末25 mg,用无水乙醇制备成质量浓度为1 mg/mL的阳性对照品贮备液;取上述贮备液,用无水乙醇稀释并制成质量浓度分别为0.5、0.25、0.1、0.05、0.025、0.01 mg/mL的阳性对照品溶液,备用。

2.3.2 抗氧化活性评价 (1)DPPH自由基(DPPH·)清除能力测定:参考文献[16]方法并加以改进后进行测定。在试管中依次加入0.2 mL样品溶液(或阳性对照品溶液)和0.2 mmol/L的DPPH工作液(以无水乙醇制备)4 mL,常温避光反应30 min,作为样品管;对照管以水代替样品溶液,同法操作。以0.2 mL水与4 mL无水乙醇混合作为空白对照进行调零,在517 nm波长下测定各溶液的吸光度(A),并计算DPPH·清除率: $DPPH\cdot\text{清除率}(\%) = (1 - \text{样品管}A/\text{对照管}A) \times 100\%$ 。(2)ABTS自由基(ABTS⁺)清除能力测定:参考文献[17]方法并加以改进后进行测定。在试管中依次加入0.1 mL样品溶液(或阳性对照品溶液)和6 mL ABTS⁺工作液,常温避光反应10 min,作为样品管;对照管以水代替样品溶液,同法操作。以0.1 mL水与6 mL无水乙醇混合作为空白对照进行调零,在734 nm波长处测定各溶液的A,并计算ABTS⁺清除率: $ABTS^+\text{清除率}(\%) = (1 - \text{样品管}A/\text{对照管}A) \times 100\%$ 。(3)OH自由基(OH·)清除能力测定:参考文献[18]方法并加以改进后进行测定。在试管中依次加入9 mmol/L硫酸亚铁0.5 mL、9 mmol/L水杨酸0.5 mL、样品溶液(或阳性对照品溶液)2 mL、水4 mL以及8.8 mmol/L过氧化氢溶液0.5 mL,摇匀,在37 °C水浴加热15 min后取出,作为样品管;对照管以水代替过氧化氢溶液,同法操作;空白对照管以2 mL无水乙醇替代样品溶液,同法操作。在510 nm波长下测定各溶液的A,并

计算OH·清除率: $OH\cdot\text{清除率}(\%) = 1 - [(\text{样品管}A - \text{空白对照管}A)/\text{对照管}A] \times 100\%$ 。采用GraphPad Prism 5软件计算各化合物对以上3种自由基的半数清除浓度(IC₅₀),结果见表1。

表1 各化合物对3种自由基的IC₅₀测定结果(μg/mL)

样品	DPPH·	ABTS ⁺	OH·
维生素C	20.26	17.63	15.32
化合物1	47.37	50.65	48.52
化合物2	120.45	127.83	118.21
化合物3	125.32	131.56	123.18
化合物4	86.13	89.41	83.57
化合物5	69.36	67.24	63.58
化合物6	40.13	43.72	41.45
化合物7	58.62	55.36	52.51
化合物8	60.17	56.85	54.17
化合物9	77.32	81.76	79.78

由表1可知,小花青风藤70%乙醇提取物中分离、鉴定出的9个单体化合物对DPPH·、ABTS⁺和OH·均表现出一定的清除能力。其中,化合物2、3的抗氧化活性较弱,对3种自由基的IC₅₀均大于100 μg/mL;化合物1、6、7、8的抗氧化活性相对较强,对3种自由基的IC₅₀均小于70 μg/mL。

3 讨论

从中药次生代谢产物中探寻天然抗氧化活性成分已成为人工合成新的抗氧化试剂的重要途径^[19]。目前,已从小花清风藤中分离、鉴定出的化学成分有生物碱类、黄酮类及萜类等。其中,生物碱成分种类较多,包括吡咯类生物碱、苜基四氢异喹啉类生物碱、苯酞类四氢异喹啉类生物碱、阿朴菲碱类生物碱、普罗托品类生物碱及其他类生物碱,这些成分多具有抗肿瘤、抗病毒及抗炎等生物活性^[20-21]。最新研究报道了小花清风藤药材的指纹图谱与其抗氧化活性的谱效关系,证实了小花清风藤中含有丰富的黄酮类成分,且具有自由基清除活性^[22]。为进一步确定小花清风藤中抗氧化活性成分,本研究系统地提取、分离了小花清风藤中化学成分,并进行了体外抗氧化活性研究。

从黄酮类、酚类及挥发油等次生代谢产物中筛选出较强的抗氧化活性成分,从而获得天然抗氧化试剂已成为研究热点^[23-25]。本研究从小花清风藤的70%乙醇提取物中分离、鉴定出9个化合物,包括4个黄酮类化合物、1个萜类化合物、1个酚类化合物、1个酰胺类化合物和2个苯甲酸酯类化合物。根据已有研究,本研究所得到的黄酮类化合物具有抑菌、清除自由基、抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移等活性^[26-28],萜类化合物具有免疫抑制活性^[29],酰胺类化合物具有黄嘌呤氧化酶抑制活性^[15]。体外抗氧化实验结果显示,化合物1~9均具有一定的体外抗氧化活性。其中,黄酮类化合物1、6、7、8的体外抗氧化活性优于其他几个化合物,对DPPH·、ABTS⁺和OH·的IC₅₀均小于70 μg/mL;特别是化合物6,

其对上述3种自由基的IC₅₀均小于45 μg/mL,具有一定的研究意义。

综上所述,本研究从小花清风藤70%乙醇提取物中共分离、鉴定出9个化合物,主要以黄酮类化合物为主。其中,化合物4、5、9首次从清风藤属植物中分离得到,化合物1、6、7、8表现出较好的体外抗氧化活性。本课题组后期将以抗氧化活性为导向,进一步对小花清风藤的化学成分进行分离、鉴定,并对黄酮类化合物进行富集、分离,然后结合细胞实验,筛选抗氧化作用强的有效成分,并进一步研究小花清风藤的抗氧化作用机制。

参考文献

- [1] 唐继方,邓朝义,卢永成.黔西南州小花清风藤资源分布及利用状况调查[J].贵州林业科技,2002,30(3):8-10,18.
- [2] 曲新艳,张会敏,张晓娟,等.小花清风藤水提物体内抗流感病毒的研究[J].生物技术通讯,2015,26(6):802-804.
- [3] 刘易蓉,邱晓春,陈惠.小花清风藤保肝作用实验研究[J].中国药房,2008,19(30):2341-2342.
- [4] 杨莹,张永萍,梁光义.小花清风藤胶囊的保肝作用研究及其急毒实验[J].中国现代应用药学,2013,30(11):1166-1170.
- [5] 林佳,郝小江,梁光义,等.小花清风藤化学成分的研究[J].中草药,1999,30(5):334-335.
- [6] 杜伟东,吴蓓,李志峰,等.小花清风藤化学成分的分离与鉴定: II [J].中草药,2019,50(18):4277-4280.
- [7] 程永现,周俊,谭宁华.云南拟单性木兰的化学成分[J].云南植物研究,2001,23(3):352-356.
- [8] 赵杏利,牛永春,邓晖,等.狗尾草平脐蠕孢NY1菌株的次级代谢产物分析[J].菌物学报,2013,32(2):286-291.
- [9] LI J T, YIN B L, LIU Y, et al. Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu*[J]. Chem Nat Compd, 2009, 45(2):234-236.
- [10] 彭冰,何春年,许利嘉,等.三白草的化学成分研究[J].中草药,2010,41(12):1950-1952.
- [11] LI H Z, SONG H J, LI H M, et al. Characterization of phenolic compounds from *Rhododendron alutaceum*[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(11):1887-1893.
- [12] LIU J X, DI D L, SHI Y P. Diversity of chemical constituents from *Saxifraga montana*[J]. Jnl Chin Chemical Soc, 2008, 55(4):863-870.
- [13] SLOWING K, SÖLLHUBER M, CARRETERO E, et al. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*[J]. Phytochemistry, 1994, 37(1):255-258.
- [14] DE SIMONE F, DINI A, PIZZA C, et al. Two flavonoid glycosides from *Chenopodium quinoa*[J]. Phytochemistry, 1990, 29(11):3690-3692.
- [15] KONG L D, ABLIZ Z, ZHOU C X, et al. Glycosides and xanthine oxidase inhibitors from *Conyza bonariensis*[J]. Phytochemistry, 2001, 58(4):645-651.
- [16] LI H Y, HAO Z B, WANG X L, et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance[J]. Bioresour Technol, 2009, 100(2):970-974.
- [17] 贾芳,夏厚林,宁梓君,等.叠鞘石斛中联苳类化合物的体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2014,35(7):62-66.
- [18] 舒旭晨,杜万根,姜东,等.混菌发酵石斛醇素及其抗氧化活性研究[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2019,34(2):63-70.
- [19] 王欣,徐宝成,罗登林,等.植物源天然抗氧化物质基本特征及其在食用油中的应用研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(4):1-10.
- [20] 陈艳,黄滔,苑春茂,等.小花清风藤化学成分的研究[J].中草药,2015,46(21):3146-3150.
- [21] 刘言娟,柳军玺,邸多隆.阿朴菲类生物碱抗癌活性研究进展[J].中草药,2012,43(4):806-814.
- [22] CHEN Y R, PAN G J, XU W F, et al. Spectrum-effect relationship study between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Sabia parviflora*[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1140:121970.
- [23] 王有娣,姚小丽,肖青林,等.迷迭香精油和马郁兰精油化学成分及抗氧化活性研究[J].中国调味品,2021,46(1):135-141.
- [24] 胡倩,李静,刘大会,等.艾叶总黄酮提取物体内外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2021,42(6):304-309.
- [25] 张汇慧,吴彩娥,范龚健,等.刺梨黄酮的精制及其抗氧化活性比较[J].南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(3):101-105.
- [26] RANI N, VIJAYAKUMAR S, THANGA VELAN L P, et al. Quercetin 3-O-rutinoside mediated inhibition of PBP2a: computational and experimental evidence to its anti-MRSA activity[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(12):3229-3237.
- [27] 金越,吕勇,韩国柱,等.槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究[J].中草药,2007,38(3):408-412.
- [28] 张文通,李俊,吴玉婷,等.山柰酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及TGFB1信号通路活化的影响[J].中国病理生理杂志,2018,34(5):832-838.
- [29] ZHANG X X, LI G, DENG Q, et al. Vomifoliol isolated from mangrove plant *Ceriops tagal* inhibits the NFAT signaling pathway with CN as the target enzyme *in vitro*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2021, 48:128235.

(收稿日期:2021-10-05 修回日期:2022-01-13)

(编辑:林 静)