

耳叶牛皮消中水解产物化学成分及抗氧化活性研究

樊一敏^{1,2,3}, 金 军^{1,2},
蹇军友^{1,2}, 何平素^{1,2,3}, 郝小江^{1,2*}, 黄烈军^{1,2*}

¹贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室;

²贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;

³贵州医科大学药学院, 贵阳 550025

摘要:采用多种分离技术和波谱方法研究耳叶牛皮消中化学成分, 从中分离鉴定 13 个化合物, 包括 C₂₁-甾体类化合物 5 个: 告达亭(1)、青阳参苷元(2)、萝藦苷元(3)、加加米宁(4)和开德昔元(5), 苯乙酮类化合物 6 个: 3-羟基苯乙酮(6)、4-羟基苯乙酮(7)、2,4-二羟基苯乙酮(8)、2,5-二羟基苯乙酮(9)、3,4-二羟基苯乙酮(10)和白首乌二苯酮(11), 木脂素类化合物 2 个: (+)-松脂醇(12)和(-)-表丁香脂素(13)。化合物 12 和 13 在耳叶牛皮消中为首次报道。清除 DPPH 和 ABTS 自由基活性研究表明, 化合物 10 具有显著清除 DPPH 和 ABTS 自由基活性, 其 IC₅₀ 分别为 0.58 和 1.82 μg/mL。

关键词:耳叶牛皮消; 化学成分; 抗氧化活性; DPPH; ABTS

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0035-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.005

Chemical constituents of hydrolyzates from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and their antioxidant activities

FAN Yi-min^{1,2,3}, JIN Jun^{1,2}, JIAN Jun-you^{1,2}, HE Ping-su^{1,2,3}, HAO Xiao-jiang^{1,2*}, HUANG Lie-jun^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University;

²The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China;

³Pharmacy of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Thirteen compounds isolated from the roots of *Cynanchum auriculatum*, which structures were determined as caudatin (1), qingyangshengenin (2), metaplexigenin (3), gagamine (4), kidjoranin (5), 3-hydroxyacetophenone (6), 4-hydroxyacetophenone (7), 2,4-dihydroxyacetophenone (8), 2,5-dihydroxyacetophenone (9), 4-acetocatechol (10), baishou-wubenzophenone (11), (+)-pinoresinol (12) and (-)-episingaresinol (13) by comparison their NMR and ESI-MS data with the literature reported data. Among them, compounds 12 and 13 were isolated from this plant for the first time. All isolates were evaluated the scavenging activities on DPPH and ABTS. The results indicated that compound 10 had significant scavenging activities on DPPH and ABTS (IC₅₀ = 0.58 and 1.82 μg/mL, respectively).

Key words: *Cynanchum auriculatum*; chemical constituents; antioxidant activity; DPPH; ABTS

萝藦科 (Asclepiadaceae) 鹅绒藤属 (*Cynanchum* Linn.) 植物耳叶牛皮消 (*C. auriculatum* Royle ex Wight.)、隔山牛皮消 (*C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl.) 和戟叶牛皮消 (*C. bungei* Decne.), 在民间

对三种植物的块根均称之为隔山消, 传统中药中对三种植物的块根均称之为白首乌^[1-6]。近年来耳叶牛皮消已经作为普通食品 (国卫办食品函[2014]427号), 应用范围不断扩大; 其遍布我国 18 个省区, 山东和江苏有悠久栽培史; 具有养血滋肝、固肾益精、强健筋骨、乌须黑发、解毒疗疮等功效^[7]; 多用于治疗痢疾、食积饱胀、胃气痛、多年老胃病、小儿疳积和食疔等肠胃病。耳叶牛皮消主要含有 C₂₁-甾体和苯乙酮类化合物, 现代药理研究表明, 其各个有效部位

收稿日期: 2022-03-11 接受日期: 2022-07-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31760529, U1812403); 贵州省科技计划 (黔科合支撑[2019] 2754 号); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教合 KY 字[2018]202)

* 通信作者 E-mail: haoxj@mail.kib.ac.cn, huangliejun@126.com

和成分具有清除自由基、提高特异性和非特异性免疫、抑制肿瘤、降低胆固醇、降低心肌耗氧量等活性^[8]。

Wang 等^[4]从 C_{21} 甾体总苷中分离得到的告达庭 3-*O*- β -*D*-夹竹桃吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-磁麻吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-磁麻吡喃糖苷对大鼠大脑皮层神经元有一定毒性作用; Tang 等^[9]以 C_{21} 甾体苷元告达亭按质量比为 5 和 10 mg/kg 对 SPF 级雄性 KM 小鼠腹腔注射, 发现注射告达亭小鼠体质量无明显变化, 血液学指标检测正常, 肺、睾丸、肾脏、心脏和肝脏组织中均未发现病灶情况, 说明糖苷水解后变成苷元毒性明显降低; 并且 Zhao 等^[10]通过比较耳叶牛皮消总苷及总苷醋酸水解后的总苷元的急性毒性, 发现醋酸水解后总苷元的急性毒性明显降低。因此, 我们以耳叶牛皮消乙酸乙酯部位为原料, 采用温和水解法^[11], 以期从耳叶牛皮消的水解产物中寻找高效的抗氧化活性成分, 为耳叶牛皮消的进一步开发和应用提供一定的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

LCQ Advantage 型离子阱质谱仪(美国 Thermo Finnigan 公司); Epoch 超微量微孔板分光光度计(美国博腾仪器有限公司); Bruker Avance NEO 600 MHz 型超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

2,2'-连氮-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS, J&K Scientific Ltd); 二苯代苦味酰基自由基(DPPH, 梯希爱化成工业发展有限公司); 维生素 C(纯度 \geq 99%, 北京索莱宝科技有限公司); 维生素 E(纯度 \geq 99%, 西安拉维亚生物科技有限公司); 过硫酸钾(天津希恩思生化科技有限公司); 色谱甲醇(云南新蓝景化学工业有限公司); 氘代试剂(美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司); 有机溶剂(石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、丙酮)均由贵州省中科院天然产物化学重点实验室统一采购工业级溶液, 重蒸后使用。

耳叶牛皮消块根购自成都药材市场, 经贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室黄烈军副研究员鉴定, 为萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight.), 标本(No. 20180516)存放于贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室。

1.2 方法

1.2.1 化合物的提取与分离

称取耳叶牛皮消干燥块根 100 kg, 粉碎, 加 65% 乙醇加热回流提取 3 次(5, 3, 2 h), 将提取液浓缩至无醇味, 其中一部分浓缩蒸干得 1.245 kg 浸膏(留样), 剩余部分按体积比 1:1 加入甲醇, 滴加 10% 硫酸水溶液, 加热回流 3 h, 冷却后用 10% NaOH 溶液调节 pH=7, 减压蒸出甲醇, 用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩得浸膏 2.770 kg; 乙酸乙酯浸膏(2.060 kg)经正相硅胶(200~300 目)柱层析, 以(石油醚/丙酮=100:1 \rightarrow 0:1)梯度洗脱, 得到 9 段样品 Fr. 1~Fr. 9。

Fr. 4 经 MCI(甲醇/水=10% \rightarrow 100%)分离得到 5 段(Fr. 4.1~Fr. 4.5), Fr. 4.3 经正相硅胶(300~400 目)柱层析(石油醚/丙酮=1:1)得到纯化合物 **1**(37.56 g); Fr. 4.2 经正相硅胶(300~400 目)柱层析(石油醚/乙酸乙酯=1:1), 得到 Fr. 4.2.1~Fr. 4.2.5, Fr. 4.2.3 经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇), 得到纯品 **9**(1.015 g); Fr. 4.4 经正相硅胶(300~400 目)柱层析(石油醚/乙酸乙酯=1:1), 得到纯化合物 **3**(31.683 g)与 **10**(0.235 g)。

Fr. 6 经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇), 得到 4 段样品 Fr. 6.1~Fr. 6.4。Fr. 6.3 重结晶(石油醚/乙酸乙酯), 得到化合物 **11**(8.689 g); Fr. 6.2 经正相硅胶(300~400 目)柱层析(石油醚/乙酸乙酯=1:1), 得到化合物 **6**(0.311 g), 剩余部分经 MCI、正相硅胶进一步分离, 得到纯化合物 **4**(3.688 g)和 **5**(36.169 g)。

Fr. 8 经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)得到 Fr. 8.1~Fr. 8.5; Fr. 8.3 经正相硅胶柱(300~400 目)层析(石油醚/丙酮=1:1), 得到 Fr. 8.3.1~Fr. 8.3.11; Fr. 8.3.5 和 Fr. 8.3.6 合并经正相硅胶柱(300~400 目)层析(石油醚/乙酸乙酯=1:1)得到纯化合物 **8**(0.784 g)和 **7**(0.365 g); Fr. 8.3.9 和 Fr. 8.3.10 合并经 RP-18、凝胶 Sephadex LH-20 及 MCI GEL 层析后, 得到化合物 **2**(4.186 g); Fr. 8.4 经 RP-18、正相硅胶柱(300~400 目)层析(石油醚/乙酸乙酯=1:1)层析后, 得到化合物 **12**(16.1 mg); Fr. 8.5 经 RP-18、正相硅胶(300~400 目)柱层析(氯仿/甲醇=300:1)层析后, 得到化合物 **13**(20.2 mg)。

1.2.2 抗氧化活性测试

1.2.2.1 DPPH 自由基清除活性测试

按照 Huang 等^[12,13]报道的 DPPH 自由基清除

活性的方法并做适当改进,以甲醇为溶剂,①配制浓度 0.15 mmol/L 的 DPPH 溶液,避光保存,备用;②配制最大浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液和阳性对照药 V_c 溶液,并按浓度梯度稀释 6 个浓度(初筛时浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);③体系总体积为 200.0 μL ,设置阴性对照组 a(160 μL 无水甲醇和 40 μL DPPH)、样品组 b(160 μL 样品和 40 μL DPPH)、样品背景对照 c(160 μL 样品 + 40 μL 无水甲醇),避光充分反应 30 min 后于 517 nm 处测定吸光度。每个样品平行三次,按公式($\text{DPPH 自由基清除率} = (A_a - A_b + A_c) / A_a \times 100\%$)计算自由基清除率,并用 SPSS 软件计算 IC_{50} 值。

1.2.2.2 ABTS 自由基清除活性测试

按照 Lee 等^[14,15]报道的 ABTS 自由基清除活性的方法并做适当改进,①配制 ABTS 自由基工作液(0.2 mL ABTS(7.4 mmol/L)与 0.2 mL $K_2S_2O_8$ (2.6 mmol/L))于室温黑暗中静置 12 h 后,用甲醇稀释 40~50 倍,常温下 734 nm 的吸光度值为 0.70 ± 0.02 ;②以甲醇为溶剂,配制最大浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液和阳性对照药 VE 溶液,并按浓度梯度稀释 6 个浓度;③体系总体积为 200.0 μL ,设置阴性对照组 a(40 μL 无水甲醇和 160 μL ABTS 自由基)、样品组 b(40 μL 样品和 160 μL ABTS 自由基)、样品背景对照 c(160 μL 无水甲醇 + 40 μL 样品),避光充分反应 6 min 后于 734 nm 处测定吸光度。每个样品平行三次,按公式($\text{ABTS 自由基清除率} = (A_a - A_b + A_c) / A_a \times 100\%$)计算其自由基清除率,并用 SPSS 软件计算 IC_{50} 值。

2 结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} + 18.80$ (c 0.22, MeOH); ESI-MS: m/z 513 $[M + Na]^+$, 分子式为 $C_{28}H_{42}O_7$; 1H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 5.52(1H, s, H-2'), 5.35(1H, br s, H-6), 4.55(1H, dd, $J = 11.2, 4.0$ Hz, H-12), 3.14(1H, m, H-3), 2.93(1H, m, H-4'), 2.17(3H, s, H-7'), 2.13(3H, s, H-21), 1.47(3H, s, H-18), 1.14(3H, s, H-19), 1.08(6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-5', H-6'); ^{13}C NMR (150 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 38.6(C-1), 30.6(C-2), 71.4(C-3), 41.8(C-4), 140.4(C-5), 117.6(C-6), 34.1(C-7), 74.1(C-8), 43.5(C-9), 36.8(C-10), 24.1(C-11), 71.6(C-12), 57.7(C-13), 88.0(C-14),

32.9(C-15), 31.8(C-16), 91.5(C-17), 9.4(C-18), 18.4(C-19), 209.0(C-20), 27.1(C-21), 166.8(C-1'), 112.8(C-2'), 165.9(C-3'), 38.1(C-4'), 20.7(C-5'), 20.8(C-6'), 16.4(C-7')。以上数据与文献^[16]报道一致,确定该化合物为告达亭。

化合物 2 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} - 28.57$ (c 0.14, MeOH); ESI-MS: m/z 523 $[M + Na]^+$, 分子式为 $C_{28}H_{36}O_8$; 1H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 7.72(2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-4', 6'), 6.74(2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 7'), 5.26(1H, br s, H-6), 4.68(1H, dd, $J = 11.6, 4.2$ Hz, H-12), 3.41(1H, m, H-3), 2.00(3H, s, H-21), 1.49(3H, s, H-18), 1.05(3H, s, H-19), 1.08(6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-5', H-6'); ^{13}C NMR (150 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ : 38.6(C-1), 30.4(C-2), 71.4(C-3), 41.6(C-4), 140.1(C-5), 117.9(C-6), 34.1(C-7), 74.0(C-8), 43.6(C-9), 36.8(C-10), 24.2(C-11), 72.5(C-12), 57.9(C-13), 88.4(C-14), 33.1(C-15), 31.9(C-16), 91.7(C-17), 9.7(C-18), 18.2(C-19), 210.4(C-20), 27.2(C-21), 165.5(C-1'), 121.1(C-2'), 131.7(C-3', 7'), 115.2(C-4', 6'), 161.7(C-5')。以上数据与文献^[17]报道一致,确定该化合物为青阳参昔元。

化合物 3 白色针状结晶(乙酸乙酯); $[\alpha]_D^{25} - 21.05$ (c 0.19, MeOH); ESI-MS: m/z 445 $[M + Na]^+$, 分子式为 $C_{23}H_{34}O_7$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.22(1H, br s, H-6), 4.39(1H, m, H-12), 3.35(1H, m, H-3), 2.15(3H, s, 2'- CH_3), 1.82(3H, s, H-21), 1.40(3H, s, H-18), 1.05(3H, s, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.5(C-1), 28.9(C-2), 72.0(C-3), 39.0(C-4), 139.1(C-5), 119.4(C-6), 34.5(C-7), 74.5(C-8), 44.7(C-9), 35.2(C-10), 25.6(C-11), 74.3(C-12), 58.1(C-13), 89.3(C-14), 32.5(C-15), 29.0(C-16), 92.6(C-17), 10.0(C-18), 18.4(C-19), 209.5(C-20), 27.5(C-21), 169.7(C-1'), 21.2(C-2')。以上数据与文献^[18]报道一致,确定该化合物为萝摩昔元。

化合物 4 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} + 162.50$ (c 0.16, MeOH); ESI-MS: m/z 640 $[M + Na]^+$, 分子式为 $C_{36}H_{43}NO_8$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.17(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2''), 8.71(1H, dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, H-6''), 8.10(1H, dt, $J = 7.9, 1.9$ Hz, H-4''), 7.38(1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3'), 6.08(1H, d,

$J = 16.0$ Hz, H-2'), 5.37 (1H, br s, H-6), 4.89 (1H, q, $J = 6.2$ Hz, H-20), 4.83 (1H, dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz, H-12), 3.55 (1H, m, H-3), 2.17 (3H, s, H-7'), 1.69 (3H, s, H-18), 1.37 (3H, s, H-21), 1.12 (3H, s, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.7 (C-1), 30.8 (C-2), 71.8 (C-3), 42.0 (C-4), 140.2 (C-5), 117.9 (C-6), 34.3 (C-7), 74.3 (C-8), 43.3 (C-9), 36.9 (C-10), 24.9 (C-11), 73.4 (C-12), 56.5 (C-13), 87.4 (C-14), 32.9 (C-15), 32.7 (C-16), 87.9 (C-17), 10.5 (C-18), 18.4 (C-19), 75.8 (C-20), 15.0 (C-21), 166.4 (C-1'), 118.7 (C-2'), 144.3 (C-3'), 134.1 (C-4'), 128.1 (C-5', 9'), 130.3 (C-7'), 128.8 (C-6', 8'), 153.3 (C-1''), 150.8 (C-2''), 126.3 (C-3''), 137.4 (C-4''), 123.3 (C-5''), 153.3 (C-6''), 163.8 (C-7''). 以上数据与文献^[19]报道基本一致,确定该化合物为加加米宁。

化合物 5 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 36.36$ (c 0.22, MeOH); ESI-MS: m/z 533 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_7$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.62 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-3'), 7.52 (2H, m, H-5', 9'), 7.39 (3H, m, H-6', 7', 8'), 6.31 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 5.38 (1H, br s, H-6), 4.70 (1H, dd, $J = 10.9, 4.9$ Hz, H-12), 3.57 (1H, m, H-3), 2.20 (3H, s, H-21), 1.48 (3H, s, H-18), 1.15 (3H, s, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.7 (C-1), 30.8 (C-2), 71.9 (C-3), 42.0 (C-4), 140.6 (C-5), 117.6 (C-6), 34.3 (C-7), 74.3 (C-8), 43.6 (C-9), 37.0 (C-10), 24.2 (C-11), 72.8 (C-12), 58.1 (C-13), 88.0 (C-14), 33.2 (C-15), 31.9 (C-16), 91.5 (C-17), 9.4 (C-18), 18.7 (C-19), 209.2 (C-20), 27.4 (C-21), 165.8 (C-1'), 117.7 (C-2'), 145.5 (C-3'), 134.3 (C-4'), 128.9 (C-5', 9'), 130.5 (C-7'), 128.2 (C-6', 8')。以上数据与文献^[20]报道一致,确定该化合物为开德昔元。

化合物 6 白色粉末; ESI-MS: m/z 135 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 7.29 (1H, td, $J = 7.7, 2.1$ Hz, H-5), 7.0 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2), 2.54 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 138.3 (C-1), 114.2 (C-2), 157.6 (C-3), 119.6 (C-4), 129.4 (C-5), 120.2 (C-6), 199.4 (C-7), 25.4 (C-8)。以上数据与文

献^[21]报道一致,确定该化合物为 3-羟基苯乙酮。

化合物 7 白色粉末; ESI-MS: m/z 135 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.91 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, 5), 6.87 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 2.55 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 128.8 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 114.9 (C-3, 5), 162.5 (C-4), 198.3 (C-7), 24.9 (C-8)。以上数据与文献^[21,22]报道一致,确定该化合物为 4-羟基苯乙酮。

化合物 8 白色粉末; ESI-MS: m/z 151 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.69 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.34 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, H-5), 6.23 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-3), 2.50 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 113.0 (C-1), 165.1 (C-2), 102.2 (C-3), 164.8 (C-4), 107.8 (C-5), 133.1 (C-6), 203.0 (C-7), 24.8 (C-8)。以上数据与文献^[21,22]报道一致,确定该化合物为 2,4-二羟基苯乙酮。

化合物 9 黄色粉末; ESI-MS: m/z 151 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 11.33 (1H, s, 2-OH), 9.21 (1H, s, 5-OH), 7.20 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.99 (1H, dd, $J = 7.0, 2.2$ Hz, H-4), 6.77 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3), 2.57 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 120.2 (C-1), 153.8 (C-2), 118.3 (C-3), 115.4 (C-4), 149.4 (C-5), 124.5 (C-6), 204.0 (C-7), 27.7 (C-8)。以上数据与文献^[22,23]报道一致,确定该化合物为 2,5-二羟基苯乙酮。

化合物 10 黄色粉末; ESI-MS: m/z 151 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.42 (1H, dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, H-6), 7.39 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 2.48 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 130.6 (C-1), 116.1 (C-2), 146.4 (C-3), 152.3 (C-4), 115.8 (C-5), 123.6 (C-6), 200.0 (C-7), 26.2 (C-8)。以上数据与文献^[24]报道一致,确定该化合物为 3,4-二羟基苯乙酮。

化合物 11 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 325.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$; ^1H NMR (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 13.11 (1H, s, 1-OH), 7.87-7.85 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4), 7.08 ~ 7.06 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4'), 6.85 ~ 6.83 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-

3'), 6.61 ~ 6.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 2.59 (3H, s, 10-CH₃), 2.06 (3H, s, 9-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 113.0 (C-1), 163.7 (C-2), 114.4 (C-3), 133.9 (C-4), 108.7 (C-5), 162.9 (C-6), 205.9 (C-7), 204.0 (C-8), 30.6 (C-9), 26.3 (C-10), 118.8 (C-1'), 148.8 (C-2'), 120.0 (C-3'), 123.4 (C-4'), 154.7 (C-5'), 124.6 (C-6'). 以上图谱数据与文献^[25]报道一致,确定该化合物为白首乌二苯酮。

化合物 12 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} + 20.00$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 357 [M - H]⁻, 分子式为 C₂₀H₂₂O₆; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.89 (4H, m, H-2, 2'), 6.82 (2H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, H-6, 6'), 5.65 (2H, s, H-4, 4'), 4.74 (2H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7, 7'), 4.25 (2H, dd, $J = 9.1, 6.9$ Hz, H-9a, 9a'), 3.90 (6H, s, 3, 3'-OCH₃), 3.88 (2H, dd, $J = 9.2, 3.6$ Hz, H-9b, 9b'), 3.10 (2H, m, H-88'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 132.93 (C-1, 1'), 108.6 (C-2, 2'), 146.7 (C-3, 3'), 145.3 (C-4, 4'), 114.3 (C-5, 5'),

119.0 (C-6, 6'), 85.9 (C-7, 7'), 56.0 (3, 3'-OCH₃), 54.2 (C-8, 8'), 71.7 (C-9, 9')。以上数据与文献^[26]报道一致,确定该化合物为 (+)-松脂醇。

化合物 13 白色无定形粉末; $[\alpha]_D^{25} - 100.00$ (c 0.4, MeOH); ESI-MS: m/z 417 [M - H]⁻, 分子式为 C₂₂H₂₆O₈; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 6.60 (2H, s, H-2, 6), 6.58 (2H, s, H-2', 6'), 4.85 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-7), 4.42 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-7'), 4.14 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-9'a), 3.90 (12H, s, 3, 3', 5, 5'-OCH₃), 3.86 (2H, m, H-9b, 9b'), 3.33 (1H, m, H-9a), 3.32 (1H, m, H-8), 2.91 (1H, m, H-8'); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 129.5 (C-1), 102.3 (C-2, 6), 147.0 (C-3, 5), 133.7 (C-4), 82.2 (C-7), 50.1 (C-8), 69.7 (C-9), 132.2 (C-1'), 102.8 (C-2', 6'), 147.2 (C-3', 5'), 134.4 (C-4'), 88.0 (C-7'), 54.6 (C-8'), 71.0 (C-9'), 56.4 (3, 3', 5, 5'-OCH₃)。以上数据与文献^[27]报道一致,确定该化合物为 (-)-表丁香脂素。

化合物 1~13 的化学结构见图 1。

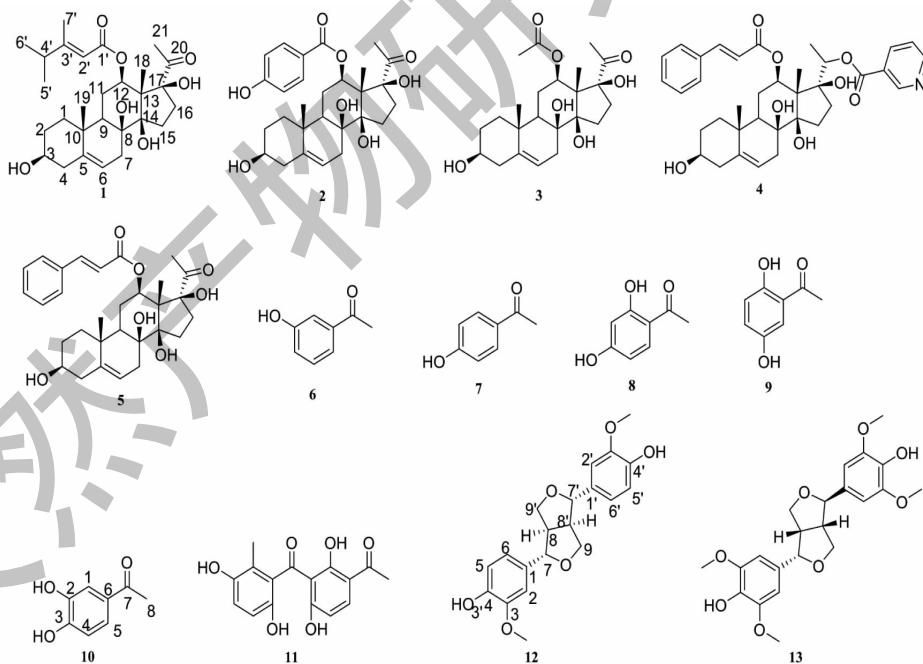


图 1 化合物 1~13 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-13

2.2 抗氧化活性筛选结果

用 DPPH 法研究化合物的抗氧化活性,从表 1 可知,化合物 9、10、11、12 和 13,在 100 μ g/mL 浓度下清除率在 80% 以上,对 DPPH 自由基清除能力很

强。由化合物 9、10、11、12 和 13 对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力 IC₅₀ (见表 2) 可知,化合物 10 的抗氧化能力最强;在 DPPH 方法中,化合物 10 的 IC₅₀ 是维生素 C 的 2.48 倍,在 ABTS 方法中,化合物 10

表1 DPPH 自由基清除能力筛选(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)Table 1 Screening of DPPH radical scavenging activity (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

化合物 Compound	清除率 Scavenging rate (%)	化合物 Compound	清除率 Scavenging rate (%)
1	19.33	8	38.39
2	37.38	9	96.49
3	21.41	10	97.45
4	25.88	11	99.88
5	17.57	12	85.84
6	36.79	13	95.88
7	42.86	V _C *	99.70

注: * 阳性对照。

Note: * Positive control.

的 IC₅₀ 是维生素 E 的 5.4 倍。

不同浓度化合物对 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性如图 2、3 所示,随着浓度的增大,化合物 9、10、

表2 化合物 9~13 对 DPPH 和 ABTS 的自由基清除能力 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Free radical scavenging ability of compound 9-13 against DPPH and ABTS ($\bar{x} \pm s, n=5$)

化合物 Compound	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ABTS IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
9	0.98 \pm 0.02	2.34 \pm 0.06
10	0.58 \pm 0.06	1.82 \pm 0.03
11	3.56 \pm 0.09	9.78 \pm 0.26
12	5.12 \pm 0.47	5.18 \pm 0.11
13	3.12 \pm 0.22	4.11 \pm 0.67
V _C *	1.44 \pm 0.09	-
V _E *	-	9.90 \pm 0.13

注: * 阳性对照。

Note: * Positive control.

11、12 和 13 对自由基的清除能力逐渐增强,具有一定剂量依赖性。

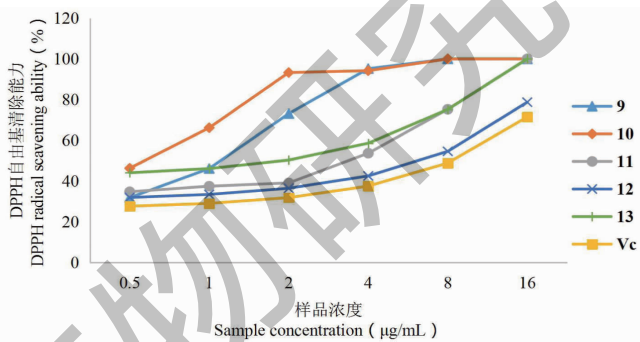


图2 化合物 9~13 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 2 Radical scavenging effects of compounds 9-13 on DPPH free radical

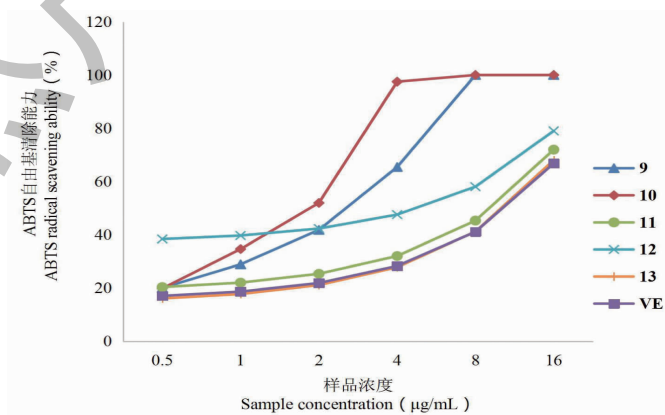


图3 化合物 9~13 对 ABTS 自由基的清除作用

Fig. 3 Radical scavenging effects of compounds 9-13 on ABTS free radical

3 讨论与结论

本文运用多种分离技术和波谱手段,从耳叶牛

皮消中分离鉴定 13 个化合物,包括 C₂₁-甾体类苷元、苯乙酮和木脂素类化合物,其中木脂素类化合物

12 和 **13** 在该植物中为首次报道, C_{21} -甾体类苷元化合物 **1**~**5** 和苯乙酮类化合物 **9**、**11** 在该植物中含量较高(已分离 1 g 以上)。在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时,所有化合物均具有清除 DPPH 自由基活性,且苯乙酮和木脂素类化合物清除活性明显强于 C_{21} -甾体类化合物。构效关系分析可知, C_{21} -甾体化合物没有酚羟基或酚羟基个数较少,苯乙酮类及木脂素类化合物均含酚羟基,所以我们推测酚羟基可能是其抗氧化活性的关键,并且酚羟基个数及位置均会影响化合物的抗氧化活性^[21]。综上所述,化合物 **9**、**10**、**11**、**12** 和 **13** 均具有开发成抗氧化剂的潜力,但其作用机理有待进一步研究。本文系统研究了耳叶牛皮消中抗氧化活性成分,为耳叶牛皮消的进一步开发利用提供了理论依据和技术支撑。

参考文献

- Xie KQ, Yuan CM, Jian JJ, et al. Comparison of contents of four C_{21} -steroidals from *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Cynanchum bungei* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30:261-267.
- Chen W, Zhang Z, Ban Y, et al. *Cynanchum bungei* Decne and its two related species for "Baishouwu": a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 243:112110.
- Xie KQ. Study on the chemical constituents and biological activities of *Cynanchum wilfordii* [D]. Guiyang: Guizhou University (贵州大学), 2017.
- Wang YQ, Li GQ, Zhang RS. Toxicity evaluation of antitumor cytotoxic components of *Cynanchum auriculatum* glycosides on neurons [J]. J Toxicol (毒理学杂志), 2009, 23:127-129.
- Wu CD, He MT, Wang J, et al. High-yield cultivation and management of Baishouwu [J]. Moden Agric (现代农业), 2013, 12:3.
- Zhao X. Studies on C_{21} steroidal glycosides degradation of *Cynanchum auriculatum* and antitumor activity of degradation products [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2011.
- Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Dictionary of Traditional Chinese Medicine; Vol I (中医药典:第一部) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006:1007-1009.
- Dan L, Zhang WD, Li TZ. Advances in research of chemical constituents and pharmacology of *Cynanchum auriculatum* [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2004, 22:260-263.
- Tang HY, Hu SY, Zhang JW, et al. Study on the early toxicity

- and mechanism for antitumor compound caudatin [J]. J Nat Sci Hunan Normal Univ (湖南师范大学自然科学学报), 2017, 40:32-36.
- Zhao X, Shen S, Huang HC, et al. Study on the acute toxicity of C_{21} steroidal glycoside and the degradation products from acetic acid solution of *Cynanchum auriculatum* [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2011, 23:28-29.
- Huang LJ, Wang B, Zhang J, et al. Studies on cytotoxic pregnane saponin from *Cynanchum wilfordii* [J]. Fitoterapia, 2015, 101:107-116.
- Huang LL, Chen CC, Wang JB, et al. The antioxidant activity of chalcones analogues in scavenging DPPH free radical and protecting against H_2O_2 -induced PC12 cell injury [J]. J Wenzhou Med Univ (温州医科大学学报), 2021, 51:542-547.
- Liu JK, Hu L, Dong ZJ, et al. DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China [J]. Chem Biodivers, 2004, 1:601-605.
- Lee IK, Yun BS. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16:2376-2379.
- Chun SS, Vatter DA, Lin YT, et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* [J]. Process Biochem, 2005, 40:809-816.
- Xiang JJ, Li QJ, Yang Y, et al. Immunological activity and chemical constituents of fermentation product in *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2020, 55:498-503.
- Mu Q, Zhou Q. The constituents of Qing Yang Shen (*Cynanchum Otophllum* Schneid.) [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1983, 18:356-362.
- Zhang JF, Li YB, Qian SH, et al. Study on the chemical constituents of *Cynanchum auriculatum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31:814-816.
- Lee DU, Kang SI, Yoon SH, et al. A new steroidal alkaloid from the roots of *Cynanchum caudatum* [J]. Planta Med, 2000, 66:480-482.
- Li XP, Guo N, Xu D, et al. Isolation and identification of chemical constituents of *Cynanchum caudatum* [J]. Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2015, 32:347-352.
- Sun DF. Studies on chemical constituents and biological effect of *Cynanchum bungei* Decne [D]. Jinan: University of Jinan (济南大学), 2015.