臭灵丹中黄酮类化合物的鉴定及抗氧化活性的研究

李书华[1]，赵琦[2]，刘芳[1]，雷开菊[3]
（1.乐山师范学院化学与生命科学学院，四川乐山 614004）
（2.成都大学生物产业学院，四川成都 610106）（3.富顺县农业局，四川富顺 643200）

摘要：采用乙醇室温浸泡臭灵丹粉，60 ℃减压浓缩后，用石油醚除脂，然后用乙酸乙酯萃取，得到臭灵丹的乙酸乙酯萃取物；利用硅胶柱层析法对乙酸乙酯萃取物进行分离，得到两个单体化合物；利用核磁共振技术鉴定单体化合物为黄酮类化合物；采用高效液相色谱法检测单体化合物的纯度均大于 95%；以维生素 C 为对照，采用清除 DPPH 自由基试验方法研究单体化合物的抗氧化活性。结果显示臭灵丹中含有的黄酮类化合物为洋艾素和金腰乙素，它们均有明显的抗氧化作用，其体系终浓度 IC_{50} 分别为 9.88 μg/mL 和 10.28 μg/mL，但其抗氧化活性均弱于维生素 C。

关键词：臭灵丹；洋艾素；金腰乙素；抗氧化
文章篇号：1673-9078(2013)6-1213-1216

Structural Identification and Antioxidant Activity of the Flavones from *Laggera pterodonta*

LI Shu-hua[1], ZHAO Qi[2], LIU Fang[1], LEI Kai-ju[3]
(1.Department of Chemistry and Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan 614004, China)
(2.Institute of Biological Industry ChengDu University, Chengdu 61010, China)
(3.ZiGong County Bureau of Agriculture, Zigong 643200)

Abstract: The plant of *Laggera pterodonta* was powered, extracted with ethanol and purified by silica gel column chromatography. The purity of the compounds from the plant was investigated by HPLC and their structures were identified on the basis of spectral analysis. Then the antioxidant activity of the compounds was evaluated by DPPH radical scavenging assay. Artemitin and chrysosptertin B were separated from *Laggera pterodonta*, which showed antioxidant activity lower than vitamin C.

Keyword: *Laggera pterodonta* (DC.) Benth; artemitin; chrysosptertin B; antioxidant activity

人体细胞在新陈代谢的过程中会形成自由基；同时一些外在的化学物质、污染的空气、香烟的烟雾、辐射、光化学空气污染物等也会产生自由基[1]。目前报道由自由基引起的疾病已超过 100 余种，氧化是导致这些疾病的主要起因之一[2]，因而抗氧化的研究成为当前的热点之一[3]。除了人体内在的酶系统之外，外源性的一些食物、中药材等具有抗氧化作用，可有效清除自由基，从而起到保护细胞、组织免受自由基伤害。传统中药臭灵丹为菊科植物翼齿六棱菊（*Laggera pterodonta* (DC.) Benth）的干燥地上部分，主产于云南。民间多用于感冒，流行性感冒，以及多种炎症[4]。现代药理表明臭灵丹具有抗病原微生物[5~6]、抗炎[7]、祛痰[8]抗肿瘤[9~10]、对幽门螺杆菌有抑制作用[11]和镇痛等作用[12]。药典里以臭灵丹中含有的洋艾素为特征性成分。洋艾素是黄酮类化合物，目前研究表明黄酮类化合物具有不同程度的抗氧化活性[13~14]。我们对臭灵丹进行了乙醇提取，回收乙醇后，用石油醚除脂，然后乙酸乙酯萃取，发现其乙酸乙酯萃取物具有一定的抗氧化活性。然后我们对乙酸乙酯萃取物进行了化学成分分离，分离鉴定出了洋艾素和金腰乙素，并对它们进行了抗氧化性能研究，根据它们的化学结构与抗氧化性能的差异进行了初步的构效研究和抗氧化机理推测。

收稿日期：2013-01-23
基金项目：四川省教育厅资助科研项目（13ZA0105）；四川省旅游发展研究中心资助项目（LYM12-36）
作者简介：李书华（1970-），女，副教授，研究方向为功能性化学成分的研究

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

臭灵丹，2010 年 9 月年采自四川省峨眉山市，由乐山师范学院成英博士鉴定。维生素 C，购自上海源叶生物科技有限公司。DPPH（1,1-二苯基-2-三硝基苯

肼）购自北京中生瑞泰科技有限公司。

7200 型可见光分光光度计，YL9100 HPLC 高效液相色谱仪，Varian INOVA 400 超导高分辨核磁共振谱仪。

1.2 试验方法

1.2.1 单体化合物的的制备

称取 1000 g 臭灵丹粉末，用 4000 mL 95%乙醇室温浸泡 2 d，重复浸泡两次，合并乙醇浸泡液，减压浓缩得到臭灵丹的乙醇流浸膏。将该流浸膏分散于 200 mL 水中，先用 200 mL 石油醚萃取两次，除去强脂溶性成分，然后用 200 mL 乙酸乙酯萃取两次，减压浓缩乙酸乙酯萃取液，得到臭灵丹的乙酸乙酯萃取物。将乙酸乙酯萃取物通过多次硅胶柱层析分离来制备单体化合物。

1.2.2 单体化合物的结构鉴定

以氘代氯仿为溶剂，用 Varian INOVA 400 超导高分辨核磁共振谱仪进行核磁测试，通过得到的谱图解析化合物的结构。

1.2.3 单体化合物的纯度检测

用 YL9100 HPLC 高效液相色谱仪测定，色谱柱为迪马 C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：甲醇-水（60:40），流速：1.0 mL/min，检测波长：257 nm，柱温：32.2 ℃，进样量：20 μL，采用峰面积归一法计算化合物的纯度。

1.2.4 抗氧化性能的测定

根据文献[15]，采用 DPPH 自由基清除率检测法，与 Vc 抗氧化活性比较，研究单体化合物的抗氧化性能。

反应体系：用移液枪分别精确取 50 μL 不同浓度的单体化合物溶液或维生素 C 溶液，2 mL 76 μmol/L DPPH 溶液，然后加入 2.95 mL 甲醇，混匀后暗处反应 30 min 后倒入比色皿中，在 517 nm 处测定吸光值 A_0，同时测定 50 μL 样品溶液+4.95 mL 甲醇的吸光值 A_1 以及 2 mL 76 μmol/L DPPH溶液+2.95 mL 甲醇的吸光值 A_2。按下式计算其对 DPPH 自由基的清除率。

清除率（%）=[1-(A_0-A_1)/A_2]×100%

注：A_0=50 μL 样品液+2 mL DPPH 溶液+2.95 mL 甲醇的吸光值；A_1=50 μL 样品液+4.95 mL 甲醇的吸光值；A_2=2 mL DPPH 溶液+3 mL 甲醇的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 单体化合物的制备

将臭灵丹的乙酸乙酯萃取物 32 g 溶解于丙酮中，然后将该丙酮溶液滴加于装有 60 g 300~400 目柱层析硅胶的蒸发皿中，水浴挥干溶剂，这样乙酸乙酯萃取物被硅胶充分吸附。然后称取 600 g 300~400 目柱层析硅胶装填于玻璃层析柱中，然后将吸附了乙酸乙酯萃取物的硅胶小心的装填于硅胶柱的表层，以石油醚:丙酮（6:1→1:1，*V*:*V*）的混合溶剂梯度洗脱，每 300 mL 收集一瓶，浓缩后转入小瓶中，然后通过薄层层析点板检测（以硫酸-乙醇为显色剂，高温烘烤显色），在石油醚：丙酮为 3:1 洗脱液中，得到两个斑点单一的化合物。

2.2 单体化合物的鉴定

通过核磁测试得到两个化合物的氢谱。

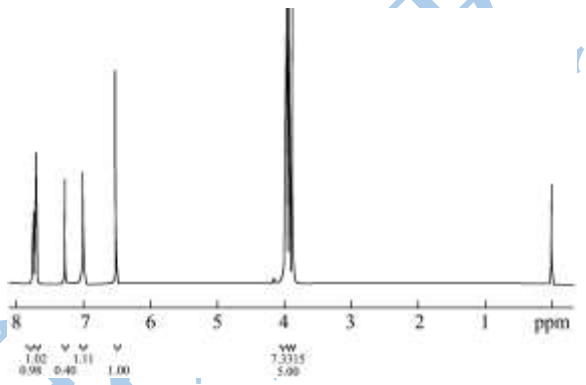


图 1 洋艾素的核磁共振氢谱

Fig.1 The ^{1}H-NMR of artemitin

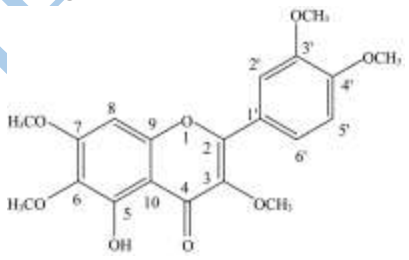


图 2 洋艾素的结构

Fig.2 The structure of artemitin

洋艾素的结构鉴定：通过核磁氢谱（图 1）可以看出该化合物具有黄酮类化合物的典型特征。在仔细归属了该化合物的氢谱数据：(1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6′), (1H, s, H-2′), (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5′), (1H, s, H-8′), (9H, s, 3×OCH_3), (3H, s, OCH_3), (3H, s, OCH_3)。发现其数据与文献[16]报道的洋艾素的氢谱数据基本一致，故该化合物鉴定为洋艾素，其结构式见图 2。

金腰乙素的结构鉴定：通过核磁氢谱（图 3）可以看出该化合物具有黄酮类化合物的典型特征。在仔细归属了该化合物的氢谱数据： 7.71(1H, s, H-2′), 7.67(1H, d, J=8.4 Hz，H-6′), 7.06(1H, d, J=8.4 Hz, H-5′), 6.50(1H, s, H-8), 3.99(3H, s OCH_3), 3.96(3H, s, OCH_3), 3.92(3H, s, OCH_3), 3.86(3H, s, OCH_3)。发现其数据与金腰乙素的文献数据[16]一致，故该化合物鉴定为金腰乙素（chrysosplenetin B），其结构式见图 4。

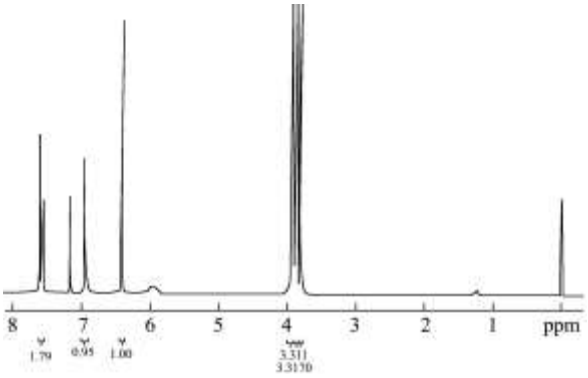


图 3 金腰乙素的核磁共振氢谱

Fig.3 The 1H-NMR of chrysosplenetin B

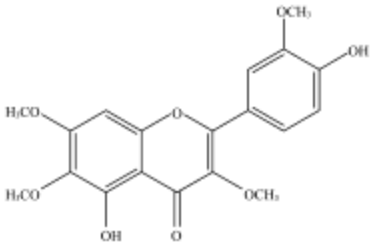


图 4 金腰素乙（chrysosplenetin B）的结构

Fig.4 The structure of chrysosplenetin B

2.3 洋艾素、金腰乙素纯度的检测

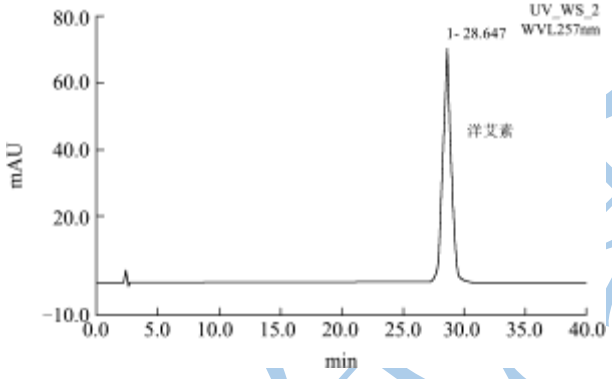


图 5 洋艾素的高效液相色谱测试图

Fig.5 HPLC chromatogram of artemitin

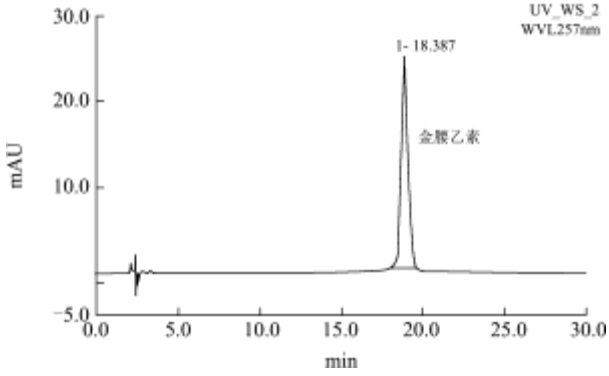


图 6 金腰乙素的高效液相色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of chrysosplenetin B

采用 1.2.3 的方法得到高效液相色谱图。其中图 5 为洋艾素高效液相色谱图，图 4 金腰乙素高效液相色谱图。采用峰面积归一法计算纯度，结果显示纯度均大于 95%。

2.4 DPPH 自由基清除试验结果

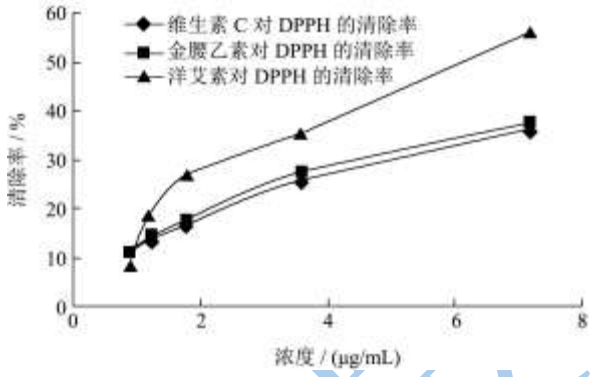


图 7 样品对 DPPH 的清除曲线

Fig.7 DPPH free radical scavenging abilities of compounds

洋艾素、金腰乙素和维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率见图 7。结果表明，从总趋势来看，它们均具有一定的抗氧化能力，并且表现出抗氧化能力随着样品浓度的增加而逐渐增强，在较小浓度时，如 0.9 μg/mL 时，三者对 DPPH 自由基的清除率差别不大，但随着浓度的增加，维生素 C 的抗氧化能力显著增强，而洋艾素和金腰乙素则随着浓度的增加，抗氧化能力增长缓慢。洋艾素、金腰乙素和维生素 C 的体系终浓度 IC_{50} 分别为 6.13 μg/mL、10.28 μg/mL 和 9.88 μg/mL，洋艾素和金腰乙素的抗氧化能力均明显弱于维生素 C，而洋艾素和金腰乙素对 DPPH 自由基的清除率几乎相似，金腰乙素的清除率仅比洋艾素略微高一点，显示这两个结构类似的化合物的抗氧化能力几乎相同，这也暗示了洋艾素和金腰乙素的抗氧化机理可能具有相似之处。

2.5 黄酮类化合物的抗氧化活性分析

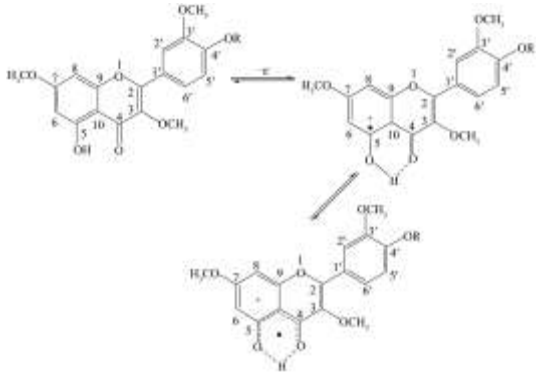


图 8 洋艾素、金腰乙素的抗氧化机理

Fig.8 The mechanism of antioxidant of artemitin and chrysosplenetin B

黄酮类化合物的抗氧化活性强弱主要与其含有的酚羟基有关。洋艾素与金腰乙素的酚羟基几乎都变成了甲氧基，导致其抗氧化性能降低：它们没有邻二

酚羟基，3 位的羟基已经甲基化，不能与 4 位的羰基协同作用来稳定、清除自由基，仅仅剩下 5 位的羟基与 4 位的羰基协同作用，形成一个六元环系来稳定和清除自由基。这可能就是它们抗氧化活性不强，且两者的抗氧化性能相差不大的原因。可能的抗氧化机理如图 8。

3 结论

臭灵丹中的两个活性指标化合物鉴定为洋艾素和金腰乙素，它们均具有一定的抗氧化活性，但均弱于维生素 C，其体系终浓度 IC_{50} 分别为 9.88 μg/mL 和 10.28 μg/mL，金腰乙素的抗氧化性能略微强于洋艾素，但抗氧化性能差别不大。而这两个化合物的结构区别仅在 4′位，洋艾素为甲氧基，而金腰乙素为羟基，但在这个环均不能形成邻二酚羟基，故其抗氧化能力主要来源于 5 位的酚羟基，从而可以合理的解释其几乎相同的抗氧化能力来源于 5 位的相同的结构。

参考文献

[1] 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004

[2] 崔剑,李兆陇,洪啸吟.自由基生物抗氧化与疾病[J].清华大学学报,2000,40(6):9-12

[3] 郑荣梁.自由基生命科学进展第八集[M].北京:原子能出版社,2001

[4] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977

[5] 豆涛.不同产地的臭灵丹体外抑菌作用比较[J].中国药业,1998,7(5):45-46

[6] 杨光忠,李芸芳,喻昕,等.臭灵丹萜类和黄酮化合物[J].药学学报,2007,42(5):511-515

[7] 周长新,吴迪遥,李湘萍,等.六棱菊属植物研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(4):1133-1140

[8] 邓士贤,王德成,王懋德,等.臭灵丹的祛痰及退热作用[J].云南医药,1999,52(1):491-493

[9] 李顺林,丁靖垲.臭灵丹中黄酮醇成分[J].云南植物研究,1994,16(4):434-436

[10] 李顺林,丁靖垲.臭灵丹中三个新的倍半萜醇[J].云南植物研究,1993,15(3):303-305

[11] 胡伟,张玉琼,张磊,等.臭灵丹对幽门螺杆菌的体外抑菌实验研究[J].中外健康文摘(医药月刊),2006,3(11):39-41

[12] 赵永娜,Reanmongkol Wantana, Bouking Pisit,等.臭灵丹水提取物的急性毒性及镇痛作用的实验研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(4):457-459

[13] 梅之南,李芸芳,喻昕.四棱峰属植物化学成分及其药理活性研究进展[J].中南民族大学学报,2005, 24(3):32-36

[14] 陈丛瑾,王琪,李欣.黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J].中国药房,2011,22(35):3346-3348

[15] Lee Y L, Yang J H M, Mau J L. Antioxidant properties of water extracts from Monaseus fermented soybeans [J]. Food Chem., 2008, 106: 1127-1130

[16] 刘百联,张婷,张晓琦,等.臭灵丹化学成分的研究[J].中国中药杂志,2010,35(5):602-606

现代食品科技