

[成分分析]

六神曲化学成分及抗氧化活性研究

李虹霞¹, 朱月健², 尹磊², 崔微¹, 张希¹, 许枬^{1*}
(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 安徽普仁中药饮片有限公司, 安徽 亳州 236800)

摘要: **目的** 研究六神曲 *Massa Medicata Fermentata* 的化学成分及其抗氧化活性。**方法** 六神曲乙醇提取物采用硅胶、MCI 色谱柱、HPLC 方法进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用清除 DPPH、ABTS 与超氧阴离子自由基能力评价六神曲总酚的抗氧化活性。**结果** 从中分离得到 21 个化合物。六神曲中总酚含量约为 1.68 mg/g, 其对 DPPH、ABTS 与超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 分别为 37.30、116.39 μg/mL、1.17 mg/mL。**结论** 除化合物 **6**、**9** 外, 其余均为首次从该植物中分离得到。六神曲总酚具有良好的抗氧化活性。
关键词: 六神曲; 总酚; 抗氧化活性; 素苳草素; 化学成分; 分离鉴定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2023)03-0788-07
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.017

Chemical constituents from *Massa Medicata Fermentata* and their antioxidant activities

LI Hong-xia¹, ZHU Yue-jian², YIN Lei², CUI Wei¹, ZHANG Xi¹, XU Nan^{1*}
(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Anhui Puren Prepared Slices of Chinese Crude Drugs Co., Ltd., Bozhou 236800, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the chemical constituents and antioxidant activities from the *Massa Medicata Fermentata*. **METHODS** The ethanol extract from *Massa Medicata Fermentata* was isolated and purified by Sephadex LH-20, silica Gel column chromatography and HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. Their antioxidant activity was tested by DPPH free radical, hydroxyl free radical scavenging test and ABTS assay. **RESULTS** Twenty-one compounds were isolated and identified. The content of total phenols in *Massa Medicata Fermentata* was 1.68 mg/g and whose rate of IC₅₀ to DPPH, ABTS and superoxide anion radicals was 37.30, 116.39 μg/mL and 1.17 mg/mL. **CONCLUSION** All compounds are isolated from this plant for the first time, except compounds **6**, **9**. The total phenol of *Massa Medicata Fermentata* has good antioxidant activity.
KEY WORDS: *Massa Medicata Fermentata*; total phenols; antioxidant activity; orientin; chemical constituents; isolation and identification

六神曲的活性物质基础一直是掣肘其质量控制与发酵工艺规范的关键难题^[1]。氧化应激与炎症反应在六神曲治疗消化不良、腹泻等胃肠道疾病中起重要作用^[2], 故酚类成分被视为消化道疾病治疗的有益因子^[3-4]。本研究采用大孔吸附树脂、凝胶等色谱技术对六神曲总酚进行富集, 利用清除

DPPH、ABTS 与超氧阴离子自由基能力评价其抗氧化活性, 并对其成分进行分离与鉴定, 以期揭示六神曲的活性物质提供依据。
1 材料
AVANCE-600 型核磁共振谱仪 (德国 Bruker 公司); 6550iFunnel Q-TOF LC/MS 质谱仪 (美国

收稿日期: 2022-10-31
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074013)
作者简介: 李虹霞 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药活性物质的分离与提取。Tel: (0411) 85890191, E-mail: 1527786636@qq.com
* 通信作者: 许枬 (1968—), 女, 教授, 研究方向为中药活性物质及质量评价。Tel: (0411) 8589019, E-mail: xudanbs@163.com

安捷伦公司); Sephadex LH-20 凝胶 (瑞士法玛西亚公司); MCI 凝胶、HP20 型大孔吸附树脂 (日本三菱公司); 柱层析硅胶、硅胶薄层板 (青岛海洋化工有限公司)。乙腈 (美国天地公司); 二氯甲烷 (天津科密欧试剂有限公司); 纯净水。Folin-酚试剂 (北京索莱宝科技有限公司); DPPH 自由基清除能力测定试剂盒、超氧阴离子自由基测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); ABTS 自由基清除能力检测试剂盒 (北京盒子生工科技有限公司)。

六神曲由安徽普仁中药饮片有限公司提供, 经辽宁中医药大学贾天柱教授鉴定为六神曲 *Massa Medicata Fermentata*, 标本存放于辽宁中医药大学中药化学教研室。

2 提取与分离

取六神曲 5 kg, 加 10 倍量乙醇回流提取 3 次, 减压浓缩得流浸膏, 加水混悬, 用石油醚萃取, 分取下层, 离心, 上清液经大孔吸附树脂柱分离, 依次用水、30%、50%、70% 乙醇洗脱, 合并 30%、50% 乙醇洗脱部分, 减压回收溶剂后, 加甲醇溶解, 经 Sephadex LH-20 色谱柱纯化, 以甲醇洗脱, 富集三氯化铁反应阳性的酚性部分 (PF-1)。上述离心后的沉淀加甲醇溶解, 经 Sephadex LH-20 色谱柱纯化, 以甲醇洗脱, 富集三氯化铁反应呈阳性的酚性部分 (PF-2)。合并上述 PF-1 与 PF-2, 减压除去溶剂, 加水混悬, 冷冻干燥得六神曲总酚。

取上述六神曲总酚提取物, 加甲醇制成质量浓度为 8.4 mg/mL 的溶液。精密吸取上述溶液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入 Folin-酚试剂 1.0 mL, 振摇混匀后加入 12% Na_2CO_3 溶液 1.0 mL, 再用蒸馏水定容到 10 mL, 摇匀, 35 °C 避光反应 40 min 后于 770 nm 波长处测定吸光度, 以没食子酸为对照品, 计算总酚含量^[4]。经 Folin-酚法测定, 六神曲总酚含量为 1.68 mg/g。

取上述 PF-2 (37.5 g), 进行硅胶柱层析, 用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (100 : 1、50 : 1、25 : 1、10 : 1、5 : 1、1 : 1、0 : 1), 经 TLC 分析, 合并接收液, 得 Fr. 1 ~ Fr. 6。其中, Fr. 1 (2.1 g) 经硅胶柱层析, 以二氯甲烷-乙酸乙酯 (20 : 1 ~ 2 : 1) 洗脱, 依据 TLC 合并相同斑点的流分, 得到 Fr. 1-1 ~ Fr. 1-6。Fr. 1-3 经凝胶纯化和重结晶得到化合物 **1** (45.0 mg)、**2** (15.2 mg)。Fr. 2 (5.2 g) 经硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇 (20 : 1) 洗脱, 经 TLC 检查, 合并, 经 Sephadex LH-20

凝胶柱纯化, 再经重结晶得到化合物 **3** (6.0 mg)、**4** (5.5 mg)。Fr. 3 (4.3 g) 经硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇 (50 : 1 ~ 1 : 1) 梯度洗脱, TLC 分析, 合并, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化, 再经 HPLC 制备, 以乙腈-水洗脱 (80 : 20), 检测波长 220 nm, 收集保留时间分别为 20.8、35.5、40.2、46.6 min 色谱峰, 得到化合物 **5** (11.5 mg)、**6** (12.0 mg)、**7** (7.8 mg)、**8** (6.6 mg)。Fr. 4 (5.3 g) 经硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇 (50 : 1、25 : 1) 梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化, 得到化合物 **9** (13.0 mg)、**10** (5.6 mg)、**11** (6.7 mg)。Fr. 5 (8.4 g) 经 Sephadex LH-20 柱纯化, TLC 检识, 合并, 经 HPLC 制备, 以乙腈-水 (35 : 65) 洗脱, 检测波长 220 nm, 收集保留时间 19.8、23.5、40.2 min 色谱峰, 得到化合物 **13** (14.6 mg)、**12** (25.4 mg)、**14** (28.3 mg)。Fr. 6 (4.1 g) 经硅胶柱层析, 二氯甲烷-甲醇 (20 : 1、10 : 1) 洗脱, 再经 HPLC 制备, 以乙腈-水 (45 : 55) 洗脱, 检测波长 250 nm, 收集保留时间为 22.5、26.6、29.2、45.3 min 色谱峰, 得到化合物 **16** (7.6 mg)、**17** (5.6 mg)、**18** (25.3 mg)、**15** (8.5 mg)。取上述 PF-1 (2.1 g) 上 MCI 树脂柱, 水-甲醇梯度洗脱, 其中 30% 甲醇洗脱部分再经 HPLC 制备, 以乙腈-0.1% 甲酸 (17 : 83) 洗脱, 检测波长 250 nm, 保留时间 28.4 min 处制得化合物 **21** (15.7 mg), 用甲醇洗脱, 洗脱液回收溶剂后, 再经二次 HPLC 制备, 以乙腈-0.1% 甲酸 (40 : 60) 为洗脱剂, 检测波长 250 nm, 收集保留时间分别为 25.1、21.9 min 色谱峰, 得化合物 **20** (16.2 mg)、**19** (33.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 447.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.41 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.26 (1H, $J = 2.4$ Hz, H-6'), 5.96 (2H, s, -OCH₂O-), 4.00 (3H, s, 7-OCH₃), 3.89 (3H, s, 8-OCH₃), 3.87 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.82 (3H, s, 5-OCH₃), 3.81 (3H, s, 6-OCH₃), 3.72 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 153.6 (C-2), 140.8 (C-3), 174.2 (C-4), 147.8 (C-5), 144.0 (C-6), 151.9 (C-7), 138.0 (C-8), 146.7 (C-9), 114.4 (C-10), 124.4 (C-1'), 109.1 (C-2'), 143.8 (C-3'), 137.8 (C-4'), 149.5 (C-5'), 102.1 (C-6'), 102.0 (-O-CH₂-O-), 61.3 (5-OCH₃), 61.2

(8-OCH₃), 60.8 (6-OCH₃), 60.7 (7-OCH₃), 58.9 (3-OCH₃), 56.9 (3'-OCH₃)。以上数据与文献[5]报道基本一致,故鉴定为3,3',5,6,7,8-六甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮。

化合物 2: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 375.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.68 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.64 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.90 (1H, s, H-8), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.74 (3H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.2 (C-2), 138.2 (C-3), 178.7 (C-4), 152.2 (C-5), 132.1 (C-6), 159.1 (C-7), 91.8 (C-8), 152.1 (C-9), 106.0 (C-10), 121.2 (C-1'), 112.6 (C-2'), 148.0 (C-3'), 150.4 (C-4'), 116.1 (C-5'), 122.7 (C-6'), 60.5 (3-OCH₃), 60.1 (6-OCH₃), 56.9 (7-OCH₃), 56.3 (4'-OCH₃)。以上数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定为猫眼草黄素。

化合物 3: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 375.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.59 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.11 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.87 (1H, s, H-8), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s, -OCH₃), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 3.74 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 152.2 (C-2), 138.5 (C-3), 178.7 (C-4), 152.1 (C-5), 132.7 (C-6), 159.1 (C-7), 91.8 (C-8), 156.2 (C-9), 106.0 (C-10), 122.7 (C-1'), 115.6 (C-2'), 146.8 (C-3'), 150.4 (C-4'), 112.3 (C-5'), 120.9 (C-6'), 60.5 (3-OCH₃), 60.1 (6-OCH₃), 56.9 (7-OCH₃), 56.3 (4'-OCH₃)。以上数据与文献[7]报道基本一致,故鉴定为紫花牡荆素。

化合物 4: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 361.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 9.56 (2H, 3', 4'-OH), 7.45 (1H, dd, J = 7.6, 3.2 Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.60 (1H, brs, H-2'), 6.74 (1H, s, H-8), 3.72, 3.79, 3.88 (3, 6, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 152.1 (C-5, C-2), 138.0 (C-3), 178.6 (C-4), 132.0 (C-6), 159.0 (C-7), 91.5 (C-8), 156.4 (C-9), 105.9 (C-10), 121.1 (C-1'), 116.0 (C-2'),

145.7 (C-3'), 149.2 (C-4'), 116.1 (C-5'), 121.3 (C-6'), 60.5 (7-OCH₃), 60.1 (3-OCH₃), 56.9 (6-OCH₃)。以上数据与文献[8]报道基本一致,故鉴定为金圣草醇D。

化合物 5: 无色粉末, ESI-MS m/z : 192.1 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, acetone-*d*₆) δ : 8.76 (1H, s, -OH), 7.85 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4), 7.21 (1H, s, H-8), 6.80 (1H, s, H-5), 6.18 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 3.91 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, acetone-*d*₆) δ : 160.4 (C-2), 102.8 (C-3), 143.7 (C-4), 111.2 (C-5), 150.2 (C-6), 150.9 (C-7), 112.4 (C-8), 145.0 (C-9), 109.0 (C-10), 55.8 (-OCH₃)。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定为东莨菪素。

化合物 6: 白色粉末, ESI-MS m/z : 405.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 6.12 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-4, 6), 6.08 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-2), 2.43 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-1'), 1.56 (1H, m, H-2'), 1.29 (36H, m, H-3' ~ 20'), 0.90 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-21'); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 160.7 (C-1), 102.0 (C-2), 160.7 (C-3), 108.2 (C-4), 146.2 (C-5), 108.2 (C-6), 36.9 (C-1'), 32.1 (C-2'), 30.9 (C-3' ~ C-18'), 33.2 (C-19'), 23.9 (C-20'), 14.6 (C-21')。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定为二十一烷基间苯二酚。

化合物 7: ESI-MS m/z : 405.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 6.12 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-4, 6), 6.08 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-2), 2.43 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-1'), 1.56 (1H, m, H-2'), 1.29 (32H, m, H-3' ~ 18'), 0.90 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-19'); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 160.7 (C-1), 102.0 (C-2), 160.7 (C-3), 108.2 (C-4), 146.2 (C-5), 108.2 (C-6), 36.9 (C-1'), 32.1 (C-2'), 30.9 (C-3' ~ C-16'), 33.2 (C-17'), 23.9 (C-18'), 14.6 (C-19')。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定为十九烷基间苯二酚。

化合物 8: ESI-MS m/z : 405.3 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 6.88 (1H, t, J = 2.2 Hz, H-2), 6.74 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-4, 6), 5.49 (2H, m, H-14, 15), 2.11 (4H, m, H-13, 15), 2.62 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-1'),

1.69 (1H, m, H-2'), 1.36 (2H m, H-17), 1.29 (36H, m, H-3' ~ 18'), 0.90 (3H, t, $J = 6.9$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 160.7 (C-1), 102.0 (C-2), 160.7 (C-3), 108.2 (C-4), 146.2 (C-5), 108.2 (C-6), 36.9 (C-1'), 32.1 (C-2'), 30.3 (C-3' ~ C-12'), 27.8 (C-13'), 130.5 (C-14'), 130.5 (C-15'), 27.8 (C-16'), 32.5 (C-17'), 22.9 (C-18'), 14.6 (C-19')。以上数据与文献 [10] 报道基本一致, 故鉴定为 5- (14-十一碳烯基) 间苯二酚。

化合物 9: 白色粉末, 三氯化铁显锈红色, ESI-MS m/z : 166.8 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.53 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6), 6.81 (1H, $J = 8.4$ Hz, H-5), 3.88 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 122.1 (C-1), 114.4 (C-2), 147.2 (C-3), 151.1 (C-4), 112.4 (C-5), 123.8 (C-6), 168.9 (C-7), 55.0 ($-\text{OCH}_3$)。以上数据与文献 [11] 报道基本一致, 故鉴定为香草酸。

化合物 10: 白色粉末, 三氯化铁显锈红色, ESI-MS m/z : 136.8 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.51 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.49 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 6.19 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 127.3 (C-1), 131.1 (C-2, 6), 116.8 (C-3, 5), 161.2 (C-4), 146.7 (C-7), 115.7 (C-8), 171.1 (C-9)。以上数据与文献 [12] 报道基本一致, 故鉴定为对羟基桂皮酸。

化合物 11: 白色粉末, 三氯化铁显锈红色, ESI-MS m/z : 137.0 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.89 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 122.6 (C-1), 133.1 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 163.4 (C-4), 170.4 ($-\text{COOH}$)。以上数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定为对羟基苯甲酸。

化合物 12: 无色粉末, 溴甲酚蓝显黄色, ESI-MS m/z : 193.1 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.17 (1H, brs), 7.05 (1H, br. d, $J = 8.0$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 3.88 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150

MHz, CD_3CD) δ : 126.4 (C-1), 122.6 (C-2), 149.1 (C-3), 148.0 (C-4), 110.3 (C-5), 115.0 (C-6), 145.5 (C-7), 114.5 (C-8), 169.6 (C-9), 55.0 ($-\text{OCH}_3$)。以上数据与文献 [13] 报道基本一致, 故鉴定为阿魏酸。

化合物 13: 无色粉末, 溴甲酚蓝显黄色, ESI-MS m/z : 179.1 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.05 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.23 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3CD) δ : 126.5 (C-1), 113.7 (C-2), 145.4 (C-3), 148.0 (C-4), 110.3 (C-5), 121.6 (C-6), 145.5 (C-7), 114.3 (C-8), 169.8 (C-9)。以上数据与文献 [14] 报道基本一致, 故鉴定为咖啡酸。

化合物 14: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 315.2 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.60 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.34 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.16 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 3.76 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 157.9 (C-2), 139.5 (C-3), 179.9 (C-4), 163.0 (C-5), 99.7 (C-6), 165.8 (C-7), 94.7 (C-8), 158.3 (C-9), 105.8 (C-10), 122.9 (C-1'), 116.5 (C-2'), 146.4 (C-3'), 149.9 (C-4'), 116.4 (C-5'), 122.3 (C-6'), 60.5 ($-\text{OCH}_3$)。以上数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定为 3-甲氧基槲皮素。

化合物 15: 橙色粉末, ESI-MS m/z : 299.2 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 13.93 (1H, s, 2'-OH), 7.84 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H- β), 7.69 (2H, dd, $J = 1.9, 8.1$ Hz, H-2, 6), 7.68 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H- α), 7.42 (3H, m, H-3, 4, 5), 6.08 (1H, s, H-5'), 3.84 (3H, s, 6'- OCH_3), 3.67 (3H, s, 4'- OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 192.3 (C=O), 127.6 (C- α), 142.1 (C- β), 135.1 (C-1), 129.2 (C-2), 128.6 (C-3), 130.5 (C-4), 128.6 (C-5), 129.2 (C-6), 105.5 (C-1'), 157.7 (C-2'), 129.2 (C-3'), 159.1 (C-4'), 91.7 (C-5'), 158.2 (C-6'), 60.1 (4'- OCH_3), 56.2 (6'- OCH_3)。以上数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定为 2', 3'-二羟基-4', 6'-二甲氧基查耳酮。

化合物 **16**: 黄色粉末, 盐酸镁粉反应阳性, ESI-MS m/z : 301.1 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 10.76 (1H, brs, 7-OH), 9.57 (1H, brs, 3-OH), 9.34 (2 H, brs, 3'-OH, 4'-OH), 7.67 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J=2.2$, 8.5 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.9 (C-2), 135.9 (C-3), 176.0 (C-4), 160.9 (C-5), 98.4 (C-6), 164.1 (C-7), 93.6 (C-8), 156.3 (C-9), 103.2 (C-10), 122.2 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.3 (C-3'), 147.0 (C-4'), 115.3 (C-5'), 120.2 (C-6')。以上数据与文献 [15] 报道基本一致, 故鉴定为槲皮素。

化合物 **17**: 无色粉末, 盐酸镁粉反应阳性, ESI-MS m/z : 285.2 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 10.81 (1H, s, 7-OH), 10.13 (1H, s, 4'-OH), 9.43 (1H, s, 3'-OH), 8.06 (2H, dd, $J=7.9$, 2.1 Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, dd, $J=7.9$, 2.1 Hz, H-3', 5'), 6.45 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 146.9 (C-2), 135.8 (C-3), 176.0 (C-4), 156.3 (C-5), 98.3 (C-6), 164.0 (C-7), 93.6 (C-8), 160.8 (C-9), 103.1 (C-10), 121.8 (C-1'), 129.6 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', 5'), 159.3 (C-4')。以上数据与文献 [16] 报道基本一致, 故鉴定为山柰酚。

化合物 **18**: 黄色粉末, 盐酸镁粉反应阳性, ESI-MS m/z : 269.1 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.89 (2H, dd, $J=8.0$ Hz), 6.88 (2H, dd, $J=8.0$ Hz), 6.72 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 6.12 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.4 (C-2), 103.4 (C-3), 182.3 (C-4), 158.5 (C-5), 99.7 (C-6), 166.2 (C-7), 94.8 (C-8), 162.3 (C-9), 104.3 (C-10), 122.3 (C-1'), 129.4 (C-2', 6'), 116.8 (C-3', 5'), 162.2 (C-4')。以上数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定为芹菜素。

化合物 **19**: 黄色粉末, 盐酸镁粉反应阳性, ESI-MS m/z : 447.1 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.32 (1H, brs, H-2'), 7.31 (1H,

dd, $J=8.4$, 2.0 Hz, H-6'), 6.82 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.49 (1H, s, H-8), 6.44 (1H, s, H-3), 4.90 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-1''), 4.08 (1H, t, $J=9.1$ Hz, H-2''), 3.95 (1H, dd, $J=2.4$, 12.1 Hz, H-6a''), 3.85 (1H, dd, $J=5.2$, 11.9 Hz, H-6b''), 3.67 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4''), 3.58 (1H, t, $J=8.9$ Hz, H-3''), 3.54 (1H, m, H-5''); ^{13}C -NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 164.8 (C-2), 102.5 (C-3), 182.5 (C-4), 160.5 (C-5), 107.7 (C-6), 163.4 (C-7), 93.9 (C-8), 157.2 (C-9), 103.8 (C-10), 122.1 (C-1'), 112.8 (C-2'), 145.6 (C-3'), 149.6 (C-4'), 115.4 (C-5'), 118.9 (C-6'), 73.9 (C-1''), 71.2 (C-2''), 78.7 (C-3''), 70.4 (C-4''), 81.1 (C-5''), 61.5 (C-6'')。以上数据与文献 [17] 报道基本一致, 故鉴定为异荭草素。

化合物 **20**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 447.1 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.44 (1H, br s, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J=8.4$, 2.0 Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.42 (1H, s, H-3), 6.16 (1H, s, H-6), 5.06 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-1''), 4.08 (1H, t, $J=9.1$ Hz, H-2''), 3.95 (1H, dd, $J=2.4$, 12.1 Hz, H-6a''), 3.85 (1H, dd, $J=5.2$, 11.9 Hz, H-6b''), 3.67 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4''), 3.58 (1H, t, $J=8.9$ Hz, H-3''), 3.54 (1H, m, H-5''); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 165.3 (C-2), 102.3 (C-3), 182.7 (C-4), 161.2 (C-5), 98.0 (C-6), 163.3 (C-7), 103.7 (C-8), 156.7 (C-9), 104.4 (C-10), 122.6 (C-1'), 113.6 (C-2'), 145.6 (C-3'), 149.5 (C-4'), 115.3 (C-5'), 119.5 (C-6'), 74.0 (C-1''), 71.5 (C-2''), 78.9 (C-3''), 70.9 (C-4''), 81.5 (C-5''), 61.9 (C-6'')。以上数据与文献 [18] 报道基本一致, 故鉴定为荭草素。

化合物 **21**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 565.1 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.70 (1H, s, 5-OH), 7.94 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, s, H-3), 4.77 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-1''), 4.75 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-1'''), 3.20 ~ 3.91 (sugar part); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C-2), 103.1 (C-3), 182.6 (C-4), 159.4 (C-5), 108.4 (C-6), 161.7 (C-7), 105.2 (C-

8), 155.3 (C-9), 103.9 (C-10), 121.9 (C-1'), 129.1 (C-2', 6'), 115.8 (C-3', 5'), 161.7 (C-4'), 74.4 (C-1''), 71.0 (C-2''), 79.1 (C-3''), 70.5 (C-4''), 81.6 (C-5''), 60.6 (C-6''), 75.2 (C-1'''), 72.0 (C-2'''), 78.5 (C-3'''), 71.6 (C-4'''), 69.8 (C-5'''). 以上数据与文献 [19] 报道基本一致, 故鉴定为维采宁-3。

4 抗氧化活性研究

DPPH 自由基清除率测定, 将六神曲总酚制成质量浓度分别为 0.010 5、0.021、0.028、0.042、0.084、0.168 mg/mL 的溶液, 各取 400 μ L, 加入 DPPH 工作液 600 μ L, 充分摇匀后置于 25 $^{\circ}$ C 恒温箱中避光静置 30 min, 离心 5 min, 于 517 nm 波长处测得吸光度值, 以维生素 E 为阳性对照, 平行测定 3 次, 计算 IC₅₀。

ABTS 自由基清除率测定, 将六神曲总酚制成质量浓度分别为 0.016 8、0.021、0.028、0.042、0.084、0.168 mg/mL 的溶液, 按照试剂盒的说明制备 ABTS 工作液与应用液。实验设定空白对照和自身对照。测定管中加入被测溶液 50 μ L、应用液 100 μ L 及 ABTS 工作液 850 μ L, 室温避光反应 6 min, 于 405 nm 波长处测定各管吸光度。对照管中只加入对照试剂 950 μ L, 蒸馏水作为空白对照, 以维生素 C 作为阳性对照, 计算被测物的抑制率。

超氧阴离子自由基清除率测定, 将六神曲总酚制成质量浓度分别为 0.016 8、0.021、0.028、0.042、0.084、0.168 mg/mL 的溶液, 按照试剂盒的说明配制工作液与显色剂, 并进行显色。以维生素 C 为对照, 双蒸水调零, 于 550 nm 波长处测定吸光度, 计算 IC₅₀。

由表 1~3 可知, 六神曲总酚具有良好的抗氧化活性, 其清除 DPPH、ABST、超氧阴离子自由基呈现剂量依赖关系。

表 1 六神曲总酚清除 DPPH 自由基能力

样品	回归方程	IC ₅₀ /(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	R ²
六神曲总酚	Y=211.64X+42.106	37.30	0.992 0
维生素 E	Y=3.488 6X+1.642 9	13.86	0.998 4

表 2 六神曲总酚清除 ABTS 自由基能力

样品	回归方程	IC ₅₀ /(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	R ²
六神曲总酚	Y=317.27X+13.073	116.39	0.995 0
维生素 C	Y=0.455 7X+5.822 8	91.46	0.995 5

表 3 六神曲总酚清除超氧阴离子自由基能力

样品	回归方程	IC ₅₀ /(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	R ²
六神曲总酚	Y=19.271X+27.409	1.17	0.994 8
维生素 C	Y=397.55X+3.412 5	0.12	0.997 7

5 讨论

将六神曲乙醇提取物通过溶剂萃取、Sephadex LH-20 及大孔吸附树脂纯化, 富集不同极性的酚类成分。从六神曲总酚中分离的 21 个化合物除香草酸与二十一烷基间苯二酚外, 其余均为首次从六神曲中分离得到。DPPH、ABTS 与超氧阴离子自由基清除能力测定均显示六神曲总酚有良好的抗氧化活性, 且呈量效依赖关系。这可能与六神曲总酚中的槲皮素、荭草素、异荭草素等单体成分具有良好的抗氧化活性有关。除抗氧化活性外, 这些成分还具有抗炎等其他活性^[20]。其中, 槲皮素、芹菜素、东莨菪素、荭草素、异荭草素、猫眼儿草黄素可以通过 PI13K、NF- κ B、AMPK 等通路抑制炎症因子分泌, 从而具有免疫调节作用^[10,17-20], 荭草素与维采宁-3 可显著抑制 PLS 诱导巨噬细胞释放 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 、PGE2 和 NO^[18], 紫花牡荆素可以有效抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠的 TLR4 蛋白表达增加^[7]。

本研究所分离的成分多数与六神曲原料相同。据此推测, 猫眼草黄素、紫花牡荆素、金圣草醇 D、东莨菪素、咖啡酸可能来源于青蒿, 山柰酚、槲皮素、3-甲氧基-槲皮素、2', 3'-二羟基-4', 6'-二甲氧基查耳酮、荭草素与异荭草素可能来源于辣蓼。3 个间苯二酚类成分与维采宁-3 可能来自麦麸^[10]。但香草酸与阿魏酸未见从原料中分离的报道, 根据原料成分的微生物代谢推测两者可能为槲皮素的微生物代谢产物^[20]。本研究通过抗氧化活性评价和成分分离鉴定, 首次发现六神曲中含有黄酮、苯丙素酸、香豆素等多种酚类成分, 为探索六神曲的发酵机理和揭示其活性物质提供了良好的科学基础, 后续还需要深入研究六神曲总酚的其他活性以及单体成分在发酵过程中的含量变化, 从而更好地揭示六神曲总酚的作用和组成。

参考文献:

[1] 陈彦琳, 王云庭, 关凯乐, 等. 六神曲发酵过程中微生物群落结构研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (21): 5219-5225.

[2] 内藤裕二. 氧化应激与肠道疾病 [J]. 日本医学介绍, 2006, 27 (12): 553-556.

[3] Zhao J, Lin Y, Zhao Y B, *et al.* Polyphenol-rich blue honeysuckle extract alleviates silica particle-induced inflammatory responses and macrophage apoptosis *via* NRF2/HO-1 and MAPK signaling [J]. *Funct Foods*, 2018, 46: 463-474.

[4] Liu X C, Martin D, Valdez J, *et al.* Berry polyphenols have matrix-dependent effects on the gut microbiota [J]. *Food Chem*,

2021, 359(15): 129831.

[5] Shajib M S, Datta B K, Sohrab M H, *et al.* Highly oxygenated flavonoids from the leaves of *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae) [J]. *Recs Nat Prod*, 2017, 11(6): 568-572.

[6] Hell T Y, Rutz A, Dürre L, *et al.* Combining activity profiling with advanced annotation to accelerate the discovery of natural products targeting oncogenic signaling in melanoma [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(6): 1540-1554.

[7] 陈怀远, 涂林锋, 肖春荣, 等. 单叶蔓荆子的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3694-3700.

[8] Awad B M, Habib E S, Ibrahim A K, *et al.* Cytotoxic activity evaluation and molecular docking study of phenolic derivatives from *Achillea fragrantissima* (Forssk.) growing in Egypt [J]. *Med Chem Res*, 2017, 26(9): 2065-2073.

[9] 汪 蕾, 邹 坤, 张清清, 等. 耳叶杜鹃化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1818-1820.

[10] Liu L, Winter K M, Stevenson L, *et al.* Wheat bran lipophilic compounds with *in vitro* anticancer effects [J]. *Food Chem*, 2012, 130: 156-164.

[11] 邢建永, 杜冰翌, 冯 晓, 等. 岗梅茎中的酚类成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4627-4673.

[12] 林启凤, 张 娜, 叶廷秀, 等. 天胡荽化学成分的研究 [J]. 中成药, 2020, 42(1): 120-123.

[13] 赵 凡, 戴 湾, 李翎熙, 等. 血三七正丁醇部位化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2346-2350.

[14] Lee S Y, Kim K H, Lee I K, *et al.* A new flavonol glycoside from *Hylomecon vernalis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(3): 415-421.

[15] 陶 鑫, 潘 多, 许 枏, 等. 酸模叶蓼化学成分的研究 [J]. 中成药, 2018, 40(4): 866-870.

[16] 陈优生, 张 焜, 赵肃清, 等. 仙鹤草降糖活性成分研究 (II) [J]. 中药材, 2010, 30(5): 724-726.

[17] 韩旭阳, 曾祖平, 何秀娟, 等. 香鳞毛蕨中 1 个新的间苯三酚苷类化合物[J]. 中草药, 2022, 5(1): 14-17.

[18] Hao B, Caulfield J C, Hamilton M L, *et al.* Biosynthesis of natural and novel C-glycosyl flavones utilizing recombinant *Oryza sativa* C-glycosyltransferase (OsCGT) and *Desmodium incanum* root proteins [J]. *Phytochemistry*, 2016, 125(2): 73-87.

[19] 屈 晶, 陈 霞, 牛长山, 等. 南烛化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 684-688.

[20] Luca S V, Macovei I, Bujor A, *et al.* Bioactivity of dietary polyphenols: the role of metabolites [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(4): 626-659.

美丽芍药单萜苷类成分及其生物活性研究

梁文娟¹, 万 黎¹, 李秀芬¹, 刘良燕^{2*}
(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: **目的** 研究美丽芍药 *Paeonia mairai* Levl. 的化学成分和生物活性研究。**方法** 美丽芍药 70% 乙醇提取物采用柱色谱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。对其中成分进行体外激动褪黑素受体 1 活性、抗炎和细胞毒性、抑制黄嘌呤氧化酶活性研究。**结果** 从中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为芍药苷 (**1**)、氧化芍药苷 (**2**)、没食子酰芍药苷 (**3**)、芍药内酯苷 (**4**)、6-*O*-benzoyl paeoniflorin (**5**)、benzoyl oxypaeoniflorin (**6**)、mudanpioside C (**7**)、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖 (**8**)、邻苯三酚 (**9**)、蔗糖 (**10**)、paeonidanin E (**11**)。化合物 **1~8** 在 100 μmol/L 浓度下对褪黑素受体 1 均无活性, 在 5~100 μmol/L 浓度范围内无细胞毒作用和抗炎活性。在 200 μmol/L 浓度作用下, 五没食子酰葡萄糖和没食子酰芍药苷有一定的黄嘌呤氧化酶抑制活性, 该酶活率分别为 (65. 98±3. 46)%、(74. 17±2. 13)%。**结论** 化合物 **2~11** 为首次从该植物中分离得到。

关键词: 美丽芍药; 单萜苷类成分; 化学成分; 分离鉴定; 褪黑素受体; 黄嘌呤氧化酶; 抗炎

中图分类号: R284. 1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2023)03-0794-06

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2023. 03. 018

收稿日期: 2022-09-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31600279); 云南省应用基础研究计划面上项目 (2017FB029)

作者简介: 梁文娟 (1985—), 女, 博士, 副教授, 从事天然产物化学成分和活性研究。E-mail: liangwenjuan2007@ 163.com

* 通信作者: 刘良燕 (1986—), 女, 博士, 副教授, 从事天然产物化学成分研究。Tel: (0871) 6527843, E-mail: liliy213@ 126.com