

# 红树无瓣海桑果实中抗氧化活性成分研究\*

## Antioxidant Compounds from the Fruit of the Mangrove Plant *Sonneratia Apetala*

易湘茜<sup>1</sup>, 高程海<sup>2\*\*</sup>, 易蔚<sup>1</sup>  
YI Xiang-xi<sup>1</sup>, GAO Cheng-hai<sup>2</sup>, YI Wei<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001; 2. 广西科学院广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007)

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:** 从红树无瓣海桑果实中分离出 6 个化合物, 运用波谱学确定了化合物结构, 分别鉴定为异鼠李素 (1), 胡萝卜苷 (2), 木栓酮 (3), 熊果酸 (4), 3,4-二羟基苯甲酸 (5), 对-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (6)。化合物 (1), (3), (4) 对 HepG2 显示出抗氧化活性, 其  $EC_{50}$  值分别为 (25.8 ± 1.3) mM, (62.1 ± 3.5) mM, (45.2 ± 2.8) mM。化合物 (1)~(6) 均首次从该植物果实中分离得到。

**关键词:** 红树 无瓣海桑 化学成分 抗氧化活性

中图分类号: R914.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2013)04-0217-03

**Abstract:** The chemical constituents, from the fruit of *Sonneratia Apetala*, and their antioxidant activity were studied. Six compounds were isolated by the EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 1) extract of air-dried fruit and identified by CC, PTLC and HPLC. These compounds were characterized by comparison of their physical and spectral data (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS). Antioxidant activity bioassay indicated that compounds 1, 3 and 4 had moderate cytotoxicity toward human cancer cell line HepG2. In addition, it is also the first time that all these compounds were isolated from the fruit of this plant.

**Key words:** mangrove, *Sonneratia Apetala*, compound, antioxidant activity

从天然食物源中筛选高效抗氧化活性成分一直是营养保健领域研究的重点课题。红树生长在海陆临界处, 其生存环境具有高盐、强光照度, 其根部长长期缺氧的特异性, 使得其单体化合物具有结构新颖、环境友好和抗氧化活性显著等特点。目前, 红树已

成为发现与研制新型抗氧化剂的重要来源之一。红树果实作为红树主要组成部分, 不仅可以作为抗氧化食品, 而且还可以为新型抗氧化剂的结构模式提供有用的化学信息。北部湾位于我国南海的西北部, 属于亚热带海湾, 蕴藏着丰富的红树资源。红树无瓣海桑 (*Sonneratia apetala*) 果实在广西民间都属于时令食品<sup>[1]</sup>。无瓣海桑果实中含有 16 种氨基酸, 其中人体必需氨基酸 7 种<sup>[2]</sup>。无瓣海桑的化学成分研究仅见从其茎中获得了 8 个已知化合物<sup>[3]</sup>, 未见关于果实中抗氧化活性成分报道。本研究共从红树无瓣海桑果实中分离出 6 个化合物, 分别鉴定为异鼠李素 (1)、胡萝卜苷 (2)、木栓酮 (3)、熊果酸 (4)、3,4-二羟基苯甲酸 (5)、对-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (6), 并采用 CAA 法<sup>[4]</sup>测试了其抗氧化活性。

收稿日期: 2013-07-18

修回日期: 2013-08-05

作者简介: 易湘茜 (1981-), 女, 讲师, 博士, 主要从事海洋生物活性成分提取与开发研究。

\* 广西高等学校特色专业及课程一体化项目 (GXTSZY214); 广西中医药大学科研项目 (P12041); 广西自然科学基金项目 (2011GXNSFB018035, 2011GXNSFE018002, 2012GXNSFAA-053160, 2012GXNSFEA053001) 资助。

\*\* 通讯作者: 高程海 (1979-), 男, 副研究员, 主要从事海洋生物活性成分提取与开发研究。E-mail: gaochenghai@yahoo.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

Brucker Avance 600 型核磁共振波谱仪(瑞典 BRUCK 公司), TMS 为内标; 高效液相色谱仪为半制备型 Waters 2695 (二极管阵列检测器, 10mm×250mm, 5μm, Phenomenex); ESI-MS 质谱仪(Agilent 1200 LC-MS), 薄层色谱硅胶与柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司生产), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Sweden)。高效液相色谱用试剂为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

无瓣海桑果实 2012 年 10 月采集于广西北仑河口, 由广西红树林研究中心王新助理研究员鉴定为 *Sonneratia apetala*。

### 1.2 提取与分离

无瓣海桑果实(湿重约 7.80 kg)切碎, 用乙醇-二氯甲烷混合溶剂(2:1, V:V)浸泡 3 次, 每次约一周, 将所得粗提物加水混悬, 依次用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 减压回收溶剂, 得乙酸乙酯萃取物 32.53 g。将乙酸乙酯萃取物装入正相硅胶湿柱, 用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 得到 107 个流份。根据薄层色谱法检测结果, 将成分近似流份合并, 共得到 8 个分离部位(A-H)。组分 C 用高效制备薄层色谱(PTLC)展开(Pet.: Me<sub>2</sub>CO=2:1/V:V), 分离得到化合物 1(3.4mg), 2(4.2mg)。组分 E 用硅胶柱色谱(200~300 目)进行分离, 以 Pet.: Me<sub>2</sub>CO(10:0~6:4/V:V)进行梯度洗脱, 合并流份。然后用半制备 HPLC(流动相 MeOH:H<sub>2</sub>O=15:85/V:V)进行分离, 得化合物 3(8.7mg), 4(5.1mg), 5(3.2mg)。组分 H 经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离后, 再经过分析型 HPLC 分析后, 用半制备 HPLC 进行分离(MeOH:H<sub>2</sub>O=20:80/V:V), 得 6(5.2 mg)。

### 1.3 化合物 1~6 的结构鉴定

运用<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS 等分析方法及与文献报道对比方法, 对获得的单体化合物 1~6 进行结构鉴定。

### 1.4 化合物 1~6 的抗氧化活性测试(CAA 法)

试验材料: 化合物 1~6。

试验癌细胞株: 人宫颈癌细胞 HepG2。

将 HepG2 细胞接种在高糖 DMEM 细胞培养基(含 2mM L-谷氨酰胺, 10 mM HEPES, 10% FBS, 1% 非必需氨基酸, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素)中, 放置在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 培养温度为

37℃。实验所用的细胞在第 10~40 代。

将 100μL HepG2 细胞的单细胞悬浮液, 按 5×10<sup>4</sup> 个/孔细胞浓度接种至黑色 96 孔细胞培养板中, 放置在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱(培养温度为 37℃)中培养 24h, 建立 HepG2 细胞的单层模型。移去生长培养基, 并用 200 μL 1×PBS 浸洗 1 次, 再用 100μL 15μM DCFH-DA 溶液与在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中的细胞共同孵育 90 min, 移去抗氧化剂处理培养基, 用 200 μL 1×PBS 浸洗 1 次, 用移液器将 100μL 500μM AAPH 加入到各孔中, 立即将 96 微孔板置于荧光检测仪测定其荧光强度, 测定条件为 37℃, 激发波长 485nm, 发射波长 538nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末(乙醇)。ESI-MS(m/z): 316 (M<sup>+</sup>), 301, 287, 153, 151。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7.75 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.69 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz H-6'), 6.90 (1H, d, J = 8.5 Hz H-5'), 6.50 (1H, d, J = 1.6 Hz H-8), 6.20 (1H, d, J = 1.6 Hz H-6), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 12.46, 10.77, 9.74, 9.44 (s, 5, 7, 4', 3-OH)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 156.9 (s, C-2), 133.5 (s, C-3), 177.8 (s, C-4), 161.9 (s, C-5), 99.2 (d, C-6), 164.6 (s, C-7), 94.3 (d, C-8), 156.9 (s, C-9), 104.5 (s, C-10), 121.5 (s, C-1'), 113.8 (d, C-2'), 149.9 (s, C-3'), 147.4 (s, C-4'), 115.7 (d, C-5'), 122.8 (d, C-6')。上述数据与文献[5]报道数据基本一致, 故鉴定化合物 1 为异鼠李素。

化合物 2: 白色无定形粉末(甲醇); ESI-MS(m/z): 414 (M<sup>+</sup>), 396, 382, 231, 187, 147。

<sup>1</sup>H NMR(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 600MHz) δ: 0.68 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-26), 0.86 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-21), 1.04 (3H, s, H-19), 3.52 (1H, m, H-3α), 4.58 (H, d, J = 8.0 Hz, H-1'), 5.36 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz) δ: 37.3 (t, C-1), 31.8 (t, C-2), 76.9 (s, C-3), 42.4 (t, C-4), 141.0 (s, C-5), 122.0 (d, C-6), 32.0 (t, C-7), 32.0 (d, C-8), 50.2 (d, C-9), 36.2 (s, C-10), 21.1 (t, C-11), 39.8 (t, C-12), 42.4 (s, C-13), 56.8 (d, C-14), 24.3 (t, C-15), 28.3 (t, C-16), 56.1 (d, C-17), 11.9 (q, C-18), 19.5 (q, C-19), 36.2 (d, C-20), 18.8 (q, C-21), 34.0 (t, C-

-22), 26.2 (t, C-23), 45.9 (d, C-24), 29.2 (d, C-25), 19.8 (q, C-26), 19.2 (q, C-27), 23.1 (t, C-28), 12.0 (q, C-29), 103.2 (d, C-1'), 75.2 (d, C-2'), 78.7 (d, C-3'), 71.8 (d, C-4'), 78.5 (d, C-5'), 62.9 (t, C-6')。以上波谱数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定化合物2为胡萝卜苷。

化合物3:无色晶体(石油醚-乙酸乙酯)。ESI-MS ( $m/z$ ): 426( $M^+$ ), 411, 273, 205, 163, 137。

$^1H$  NMR( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 0.72 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.95 (3H, s), 1.00 (3H, s), 1.05 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.25 (3H, s), 1.25-2.61 (26 H, m);  $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 22.3 (t, C-1), 41.4 (t, C-2), 212.9 (s, C-3), 58.3 (d, C-4), 42.2 (s, C-5), 41.4 (t, C-6), 18.2 (t, C-7), 53.2 (d, C-8), 37.6 (s, C-9), 59.6 (d, C-10), 30.6 (t, C-11), 39.8 (s, C-12), 38.4 (s, C-13), 32.5 (t, C-14), 36.1 (t, C-15), 30.1 (s, C-16), 42.9 (d, C-17), 35.3 (t, C-18), 28.2 (s, C-19), 32.9 (t, C-20), 39.3 (t, C-21), 6.8 (q, C-22), 14.7 (q, C-23), 17.9 (q, C-24), 17.9 (q, C-25), 20.2 (q, C-26), 18.7 (q, C-27), 32.1 (q, C-28), 35.0 (q, C-29), 31.8 (q, C-30)。以上波谱数据与文献[7]报道完全一致,故鉴定化合物3为木栓酮。

化合物4:无色片状晶体(石油醚-乙酸乙酯)。ESI-MS ( $m/z$ ): 456 ( $M^+$ ), 439, 424, 411, 248, 203, 189, 133。 $^1H$  NMR ( $C_5D_5N$ , 600 MHz)  $\delta$ : 0.91 (3H, s), 0.98 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.25 (3H, s), 2.66 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz), 3.46 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.0$  Hz), 5.52 (1H, brs);  $^{13}C$  NMR ( $C_5D_5N$ , 150 MHz)  $\delta$ : 39.1 (t, C-1), 28.1 (t, C-2), 78.2 (d, C-3), 39.5 (s, C-4), 55.8 (d, C-5), 18.8 (t, C-6), 33.6 (t, C-7), 40.0 (t, C-8), 48.1 (t, C-9), 37.4 (t, C-10), 23.6 (t, C-11), 125.7 (d, C-12), 139.3 (s, C-13), 42.5 (d, C-14), 28.1 (t, C-15), 24.9 (t, C-16), 48.1 (d, C-17), 53.6 (s, C-18), 39.4 (t, C-19), 39.3 (t, C-20), 31.1 (t, C-21), 37.3 (t, C-22), 28.8 (t, C-23), 17.5 (q, C-24), 16.0 (q, C-25), 18.0 (q, C-26), 23.9 (q, C-27), 179.6 (s, C-28), 16.8 (q, C-29), 21.4 (q, C-30)。以上波谱数据与文献[8]报道一致,故鉴定化合物4为熊果酸。

化合物5:无色针状晶体(甲醇)。ESI-MS ( $m/z$ ): 154 ( $M^+$ ), 137, 109, 89, 81, 63。 $^1H$  NMR

( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.79 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 7.41 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-6), 7.45 (H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 170.2 (s, -COOH), 123.2 (s, C-1), 115.2 (d, C-2), 145.2 (s, C-3), 150.6 (s, C-4), 117.6 (s, C-5), 123.4 (d, C-6)。以上波谱数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定化合物5为3,4-二羟基苯甲酸。

化合物6:无色针状晶体(甲醇);ESI-MS ( $m/z$ ): 168 ( $M^+$ ), 153, 125, 108, 97, 79, 69, 63, 55;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 3.91 (3H, s,  $OCH_3$ ), 6.93 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 7.58 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 7.61 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-6);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 123.2 (s, C-1), 114.1 (d, C-2), 152.0 (s, C-3), 148.5 (s, C-4), 116.0 (s, C-5), 124.8 (d, C-6), 167.8 (s, C-7), 56.8 (q,  $OCH_3$ )。以上波谱数据与文献[10]基本一致,故鉴定化合物6为对-羟基-3-甲氧基苯甲酸。

## 2.2 抗氧化活性测试

抗氧化活性评价方法主要有化学法、动物实验法和人体试食试验法。绝大多数抗氧化活性检测采用化学法,由于该方法生物相关性差,不能准确反映化合物在体内抗氧化能力<sup>[11]</sup>。

肝癌细胞 HepG2 与人体肝细胞具有基本相同生物学功能,是人体物质代谢的主要场所。Wolf 等在 2007 年建立了基于 HepG2 模型的抗氧化活性细胞学定量分析方法(CAA)<sup>[4]</sup>。与其他体外抗氧化活性分析方法相比,CAA 法测定结果的生物相关性更高。随后,CAA 法成功应用到多种水果和蔬菜的抗氧化活性测试中<sup>[12-13]</sup>。样品 1, 3, 4 对细胞株 HepG2 的显示抗氧化活性,其  $EC_{50}$  值分别为 (25.8 $\pm$ 1.3) mM、(62.1 $\pm$ 3.5) mM、(45.2 $\pm$ 2.8) mM。样品 2, 5, 6 对细胞株 HepG2 没有显示出抗氧化活性。

## 3 结论

通过各种分离技术和结构鉴定方法,从无瓣海桑果实中分离鉴定了 6 个化合物。化合物 1, 3 和 4 对细胞株 HepG2 显示出抗氧化活性。化合物 1~6 均首次无瓣海桑果实中分离得到。该研究为深入了解无瓣海桑果实的保健功能提供科学支持。

(下转第 223 页)

留率为 5.4%; 添加剂淀粉在浓度为 6% ( $m/V$ ) 时, 酶活保留率为 14.3%; 添加剂甘氨酸在浓度为 3% ( $m/V$ ) 时, 酶活保留率为 19.6%; 而不外加任何添加剂的酶液, 经处理后完全失活。可见, 甘氨酸稳定剂对降靛酶具有最强的保护作用, 可能是甘氨酸使酶的结构稳定化, 也可能是与氨基酸是组成所产酶的活性结构域的主要氨基酸有关。因此, 对复合稳定剂综合效应以及稳定剂的长效试验还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹治云. 黑曲霉产酸性蛋白酶催化机制和稳定剂研究 [D]. 福建: 福建师范大学生命科学学院, 2005.
- [2] 陈惠, 王红宁. 糖及硫酸铵对植酸酶热稳定性的影响 [J]. 中国饲料, 2004, 18: 22-23.
- [3] 李群, 袁勤生, 李永丰. 海藻糖对酶热稳定性保护作用

的研究 [J]. 药物生物技术, 1997, 4(1): 28-31.

- [4] 王普, 虞炳钧, 曹一岚, 等. 液体碱性蛋白酶稳定性的研究 [J]. 食品与发酵工业, 1995, 5: 1-7.
- [5] Toyama H, Nishibayash E, Saekis M. Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinone [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(1): 290-295.
- [6] Beg Q K, Bhushan B, Kapoor M. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2000, 16: 211-213.
- [7] 张晓鸣, 林萍, 黄玲, 等. 甘氨酸螯合铁理化性质的研究 [J]. 中国粮油学报, 2006, 20(5): 1-5.
- [8] 蔡海军, 吕立新. 甘氨酸锌类螯合物 GZC 的合成和用作 PVC 热稳定剂的研究 [J]. 中国塑料, 1990, 1: 1-5.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 219 页)

#### 参考文献:

- [1] 韩维栋, 高秀梅. 无瓣海桑人工林的生物量与能量研究 [J]. 广西科学, 2004(3): 83-88.
- [2] 林海生, 宋文东. 无瓣海桑叶子和果实中氨基酸成分的检测分析 [J]. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(2): 76-78.
- [3] 纪卿飞, 林文翰, 李军, 等. 中国红树林植物——无瓣海桑的化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志, 2005(16): 1258-1260.
- [4] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [5] Shi T X, Li Y G, Jiang Y, et al. Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd and their antioxidant activities [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical, 2013, 22(1): 36-39.
- [6] Hisashi K, Noriko S, Akiko H, et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* [J]. Phytochemistry, 1990, 29(7): 2351-2355.
- [7] 田艳, 吴军, 漆淑华, 等. 银叶树的三萜成分研究 [J]. 中

草药, 2006, 37(1): 35-36.

- [8] 于德泉, 杨俊山. 核磁共振波谱分析 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1999: 796.
- [9] 席芳. 板栗壳化学成分的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [10] 周惠燕, 章辉, 李士敏. 竹叶化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志, 2005(24): 1933-1934.
- [11] Frankel E N, Meyer A S. The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80(13): 1925-1941.
- [12] Wolfe K L, Kang X M, Dong M, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426.
- [13] Song W, Derito C M, Liu M K, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(11): 6621-6629.

(责任编辑: 尹 闯)