

白骨壤果实中抗氧化活性成分研究*

Antioxidative Chemical Constituents from the Fruits of *Avicennia marina*易湘茜¹, 谢文佩^{1,2}, 颜栋美², 余 炼², 范丽丽¹, 唐云丽¹YI Xiang-xi¹, XIE Wen-pei^{1,2}, YAN Dong-mei², YU Lian², FAN Li-li¹, TANG Yun-li¹

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】为获得高效的抗氧化先导化合物,对红树白骨壤(*Avicennia marina*)果实中化学成分进行研究。【方法】采用柱色谱和高效液相色谱及细胞定量分析方法,对白骨壤果实中抗氧化活性成分进行研究,并运用色谱分析和文献对照方法,鉴定其化学结构。【结果】从白骨壤果实中分离鉴定了4个具有抗氧化活性的单体化合物,分别为 tamarixetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**)、3,4-dihydroxyphenethylalcohol-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucoside (**2**)、类叶升麻苷(**3**)、焦地黄苯乙醇苷 C(**4**)。化合物**1**~**4**的 EC₅₀ 值分别为(16.0±0.98) μ M, (18.5±1.47) μ M, (9.5±1.09) μ M 和(12.0±0.89) μ M。【结论】红树白骨壤果实中存在着具有强抗氧化活性成分(**1**~**4**),且上述活性成份均为首次从该物种中分离获得。

关键词:红树 白骨壤 黄酮苷 苯乙基苷 抗氧化活性**中图分类号:**R914.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2014)04-0253-04

Abstract:【Objective】In order to obtain strong antioxidant compounds, the fruits of mangrove *Avicennia marina* were investigated. 【Methods】The antioxidative constituents were isolated and analyzed by column chromatograph, HPLC and cell quantitative analysis. The structure of the constituents was identified by chromatograph analysis results and previous paper. 【Results】The fruits of mangrove *Avicennia marina* contains one flavonoid glycoside, tamarixetin-3- β -D-glucopyranoside (**1**), and three known phenylethyl glycosides, 3,4-dihydroxyphenethylalcohol-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucoside (**2**), acteoside (**3**) and jionoside C (**4**). The EC₅₀ values of compounds **1**~**4** were (16.0±0.98) μ M, (18.5±1.47) μ M, (9.5±1.09) μ M, and (12.0±0.89) μ M, respectively. 【Conclusion】The strong antioxidant compounds were obtained from the fruits of *Avicennia marina*, and these compounds were obtained from the fruits of this species for the first time.

Key words: mangrove, *Avicennia marina*, flavonoid glycoside, phenylethyl glycoside, antioxidant**收稿日期:**2014-06-10**作者简介:**易湘茜(1981-),女,副教授,主要从事海洋天然产物化学研究。

* 广西近海海洋环境科学重点实验室开放基金项目(GXKLHY13-06),广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118048, 2012GXNSFAA053160),广西科技兴海专项项目(GXZC2014G30578KLZBC),广西中医药大学中药学博士点建设工程开放课题(201410-02),2013年广西高校重点学科和重点实验室建设项目(桂教科研2013-8-2-16)资助。

【研究意义】临床试验和流行病学的研究结果表

明,过剩自由基会诱导氧化应激现象,从而引起生物大分子(如DNA、脂类和蛋白质)的氧化损伤,导致癌症、衰老、心血管病和老年痴呆症等慢性退行性疾病发生。饮食摄入和补充外源性抗氧化剂是预防这些疾病的有效途径。【前人研究进展】从红海缆茎(*Rhizophora stylosa*)的乙醇提取物中获得的 cinchonain Ib、proanthocyanidin B2 和 glabraoside A-B 对 DPPH 自由基的 EC_{50} 值分别为 17.3 μ M、7.4 μ M、4.6 μ M 和 8.6 μ M^[1,2]。从泰国木榄(*B. gymnorhiza*)的花中分离获得 Bruguierin A,对佛波醇酯诱导 NF- κ B 荧光酶素活性起抑制作用, IC_{50} 为 1.4 μ M^[3]。从泰国木榄的花中获得的 Brugirol, isobrugirol 和 brugiolsulfurool 能使抗氧化原件(ARE)荧光酶素活化,其 EC_{50} 为 56.3 μ M、3.7 μ M 和 1.8 μ M^[4]。【本研究切入点】白骨壤(*Avicennia marina*)为爵床科海榄雌属红树植物,在广西沿海地区都属于时令食品。白骨壤果实富含黄酮类化合物,其7种不同溶剂的粗提物对 DPPH 自由基、羟基自由基及超氧阴离子自由基均有清除作用^[5]。本文拟在此研究基础上,进一步探讨白骨壤果实中抗氧化成分,以获得高效的抗氧化先导化合物。【拟解决的关键问题】采用色谱分离技术和波谱分析方法,对白骨壤果实中抗氧化化学成分进行分离鉴定,丰富海洋来源抗氧化次生代谢产物的研究成果。

1 材料及方法

1.1 实验仪器

Brucker Avance 600 型核磁共振波谱仪(瑞典 BRUCK 公司),TMS 为内标;分析半制备型 Waters 2695 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,10mm \times 250mm,5 μ m,Phenomenex)(美国 WATERS 公司);Agilent 1200 ESI-MS 质谱仪(美国安捷伦公司),Perkin-Elmer Lambda 35 紫外-可见光谱仪(美国 PE 公司),薄层色谱硅胶与柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司),Sephadex LH-20(瑞典 Pharmacia Biotech 公司)。高效液相色谱用试剂为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 生物材料

白骨壤果实于 2011 年 10 月在广西北海白虎头采集,并由广西红树林研究中心王新助理研究员鉴定为白骨壤(*Avicennia marina*)果实。标本保藏于广西北部湾海洋研究中心(标本编号:2011-GX-AS-008)。

1.3 提取与分离

先切碎白骨壤果实(湿重约 20.0kg),并使用 95% 的工业酒精在室温下浸泡提取 3 次,每次浸泡 1 周时间,减压浓缩得浸膏状总提取物,再合并提取物。使用乙酸乙酯对浸膏进行萃取,减压回收试剂,得到乙酸乙酯萃取物(干重 165g)。对乙酸乙酯萃取物采用硅胶柱层析和高效液相色谱分离,获得化合物 1~4。

1.4 化合物结构鉴定

运用 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、MS 等分析方法,对分离得到的单体化合物 1~4 进行结构鉴定。

1.5 化合物抗氧化活性测试(CAA 法)

采用细胞定量分析方法(CAA 法)对实验材料:tamarixetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (1)、3,4-dihydroxyphenethylalcohol-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucoside (2)、类叶升麻苷(3)和焦地黄苯乙醇甙 C(4)进行抗氧化活性测试,癌细胞株:肝癌细胞 HepG2,具体细节参考文献[6]。

2 结果

2.1 分离纯化

依次用氯仿-丙酮系统(100:0~0:100)和氯仿-甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱乙酸乙酯萃取物,经薄层层析分析后,合并为 A~M 等 10 个分离部位。组分 L 经硅胶柱层析(CHCl_3 :MeOH=100:0~30:70/V:V)洗脱后,得到了 10 个子分离部位(L1~L10)。子部位 L4 经过半制备高效液相色谱(MeOH:H₂O=5:95~60:40/V:V)纯化获得化合物 1(5.6mg)和 2(3.4mg)。子部位 L10 经过半制备高效液相色谱(MeOH:H₂O=5:95/V:V)纯化获得化合物 3(3.6mg)和 4(4.4mg)。

2.2 结构鉴定

化合物 1:黄色粉末,mp 296~298 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -32.3 $^{\circ}$ (c 1.3, MeOH);FDMS m/z 501, 478, 316;UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ):215(4.25), 248(4.00), 291(4.13), 332(4.16);IR (KBr) ν_{max} :3380(OH), 1690(CO), 1622 (C=C), 1605 (C=C); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} :7.60(1H, d, J = 16.0 Hz, 7'-H), 6.20(1H, d, J = 16.0 Hz, 8'-H), 4.20(1H, d, J = 7.5 Hz, glc-1-H), 2.70 (2H, t, J = 8.0 Hz, 7-H); $^{13}\text{C NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6):166.4(C-9', s), 148.4(C-4', s), 145.5(C-7', s), 145.1(C-3', s), 144.9(C-3, s), 143.4(C-4, s), 129.3(C-1, d), 125.4(C-1', d), 121.3(C-

-6', d), 119.6 (C-6, d), 116.2 (C-2, d), 115.4 (C-5, d), 114.7 (C-2', d), 113.7 (C-8', d), 102.9 (glc-1, d), 76.4 (glc-3, d), 73.4 (glc-5, d), 73.2 (glc-2, d), 70.1 (glc-4, d), 63.5 (glc-6, t), 35.1 (glc-7, q)。以上数据与文献[7]对照基本一致,因此化合物**1**被鉴定为 tamarixetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside。

化合物**2**: 浅黄色粉末, ESIMS m/z 477 [M-H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ _H: 7.52 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7''), 7.17 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), 6.95 (1H, dd, J = 9.5, 2.5 Hz, H-5''), 6.79 (1H, dd, J = 9.5, 2.5 Hz, H-6''), 6.73 (1H, dd, J = 9.5, 2.5 Hz, H-2), 6.58 (1H, dd, J = 9.5, 2.5 Hz, H-3), 6.31 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8''), 5.07 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.34 (1H, t, J = 9.8 Hz, H-4'), 3.71 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-8''), 2.71 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-8''). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ _C: 168.2 (C-9''', s), 146.5 (C-4''', s), 145.9 (C-5''', s), 145.4 (C-5, s), 145.1 (C-7''', d), 144.1 (C-4, s), 131.5 (C-1, s), 128.0 (C-1''', s), 123.2 (C-2''', d), 122.9 (C-2, d), 117.2 (C-3''', d), 116.7 (C-6, d), 116.2 (C-8''', d), 115.7 (C-3, d), 115.2 (C-6''', d), 104.6 (C-1', d), 75.8 (C-2', d), 75.7 (C-3', d), 74.0 (C-5', d), 72.6 (C-4', d), 70.8 (C-8, t), 62.4 (C-6', t), 35.9 (C-7, t)。以上数据与文献[8]对照基本一致,因此化合物**2**被鉴定为 3,4-dihydroxyphenethylalcohol-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucoside。

化合物**3**: 白色无定型粉末, $[\alpha]_D^{20}$ - 97.4° (MeOH, c 0.91); IR (KBr) ν_{\max} : 3407 (OH), 1698 (C=O); FABMS m/z 625 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ _H: 7.48 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'''), 7.25 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 7.07 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-6'''), 6.95 (1H, dd, J = 8.3, 1.7 Hz, H-2'''), 6.79 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-3'''), 6.31 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'''), 5.12 (1H, br s, H-1''), 5.09 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.34 (1H, t, J = 9.8 Hz, H-4'), 2.72 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-7), 1.10 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-6)。 ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ _C: 168.2 (C-9''', s), 149.6 (C-5''', s), 148.1 (C-7''', d), 146.6 (C-4''', s), 145.6 (C-5, s), 144.5 (C-4, s), 131.1 (C-1, s), 127.7 (C-1''', s), 123.3 (C-

2''', d), 122.8 (C-2, d), 116.6 (C-3''', d), 116.4 (C-6, d), 115.9 (C-3, d), 115.2 (C-8''', d), 114.8 (C-6''', d), 104.6 (C-1', d), 103.2 (C-1'', d), 81.4 (C-3', d), 76.2 (C-2', d), 76.1 (C-5', d), 73.9 (C-4'', d), 72.4 (C-3'', d), 72.2 (C-2'', d), 70.8 (C-8, t), 70.6 (C-4', d), 70.5 (C-5'', d), 62.5 (C-6', t), 36.2 (C-7, t), 18.8 (C-6'', q)。以上数据与文献[9]对照基本一致,因此化合物**3**被鉴定为类叶升麻苷。

化合物**4**: 白色无定型粉末, $[\alpha]_D^{20}$ - 86.9° (MeOH; c 0.72). IR (KBr) ν_{\max} : 3408 (OH), 1694 (C=O), 1604 (arom); FABMS m/z 593 [M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ _H: 7.60 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'''), 7.25 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 7.07 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-6'''), 6.95 (1H, dd, J = 8.3, 1.7 Hz, H-2'''), 6.79 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-3'''), 6.28 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'''), 5.20 (1H, br s, H-1''), 4.92 (1H, t, J = 9.8 Hz, H-4'), 4.39 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 2.94 (2H, t, J = 7.3 Hz, H-7), 1.10 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-6)。 ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ _C: 168.3 (C-9''', s), 149.7 (C-5''', s), 148.0 (C-7''', d), 146.7 (C-4''', s), 139.9 (C-1, s), 139.9 (C-6, d), 130.0 (C-2, d), 130.0 (C-5, d), 129.3 (C-3, d), 127.6 (C-1''', s), 127.2 (C-4, d), 123.2 (C-2''', d), 116.5 (C-3''', d), 115.3 (C-8''', d), 114.7 (C-6''', d), 104.2 (C-1', d), 103.0 (C-1'', d), 81.6 (C-3', d), 76.1 (C-2', d), 76.0 (C-5', d), 73.8 (C-4'', d), 72.3 (C-3'', d), 72.1 (C-2'', d), 71.8 (C-8, t), 70.6 (C-5'', d), 70.4 (C-4', d), 62.4 (C-6', t), 37.2 (C-7, t), 18.6 (C-6'', q)。以上数据与文献[10]对照基本一致,因此化合物**4**被鉴定为焦地黄苯乙醇甙C。

2.3 抗氧化活性

化合物样品**1**~**4**对细胞株 HepG2 显示出抗氧化活性,其 EC₅₀分别为(16 ± 0.98) μ M、(18.5 ± 1.47) μ M、(9.5 ± 1.09) μ M、(12.0 ± 0.89) μ M。阳性对照槲皮素的 EC₅₀为(11 ± 0.18) μ M。

3 结论

本文通过各种分离技术和结构鉴定方法,从白骨壤果实中分离并鉴定了4个化合物,分别为 tamarixetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**)、3,4-dihydroxyphenethylalcohol-6-*O*-caffeoyl- β -D-gluco-

side (2)、类叶升麻苷(3)、焦地黄苯乙醇甙 C (4)。再通过细胞定量分析方法(CAA),发现化合物1~4都具有抗氧化活性。化合物1~4均首次从白骨壤果实中分离得到,其抗氧化活性也为首次报道,该研究为深入了解白骨壤果实的抗氧化功能提供科学依据。

参考文献:

- [1] Li D L, Li X M, Peng Z Y, et al. Flavanol derivatives from *Rhizophora stylosa* and their DPPH radical scavenging activity [J]. *Molecules*, 2007, 12 (5): 1163-1169.
- [2] Takara K, Kuniyoshi A, Wada K, et al. Antioxidative flavan-3-ol glycosides from stems of *Rhizophora stylosa* [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2008, 72(8): 2191-2194.
- [3] Homhual S, Bunyapraphatsara N, Kondratyuk T, et al. Bioactive dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(3): 421-424.
- [4] Homhual S, Zhang H J, Bunyapraphatsara N, et al. Bruguiesulfurol, a new sulfur compound from *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. *Planta Medica*, 2006, 72 (3): 255.
- [5] 孙国强, 赵丰丽, 刘哲瑜, 等. 白骨壤叶黄酮提取及抗氧化活性研究[J]. *中国酿造*, 2010(11): 95-99.
- Sun G Q, Zhao F L, Liu Z Y, et al. Extraction and antioxidant activity of Flavonoids from *Avicennia marina* leaves [J]. *China Brewing*, 2010(11): 95-99.
- [6] 易湘西, 高程海, 易蔚. 红树无瓣海桑果实中抗氧化活性成分研究[J]. *广西科学院学报*, 2013, 29(4): 1-4.
- Yi X X, Gao C H, Yi W. Antioxidant compounds from the fruit of the mangrove plant *Sonneratia apetala* [J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2013, 29 (4): 1-4.
- [7] Umbetova A K, Choudhary M I, Sultanova N A, et al. Flavonoids of plants from the genus *Tamarix* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2005, 41: 728-729.
- [8] Matsumoto M, Koga S, Shoyama Y, et al. Phenolic glycoside composition of leaves and callus-cultures of *Digitalis purpurea* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26: 3225-3227.
- [9] Sasaki H, Nishimura H, Chin M, et al. Chemical and biological studies on *Rehmanniae radix*. 2. Hydroxycinnamic acid-esters of phenethylalcohol glycosides from *Rehmannia glutinosa* Var *Purpurea* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 875-879.
- [10] Sticher O, Lahloub M F. Phenolic glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark [J]. *Planta Medica*, 1982, 46: 145-148.

(责任编辑:尹 闯)