



山楂叶悬钩子根抗氧化活性成分研究

魏忠宝¹, 孙佳明², 李鹏飞², 王帅³, 张辉^{2*}, 林喆^{4*}

1. 吉林省现代中药及生物制药基地建设办公室, 吉林 长春 130041;
2. 长春中医药大学 中医药与生物工程研发中心, 吉林 长春 130117;
3. 长春中医药大学 第一附属医院, 吉林 长春 130021;
4. 长春中医药大学 科技处, 吉林 长春 130117)

[摘要] 目的:研究山楂叶悬钩子根抗氧化活性成分。方法:综合利用硅胶减压柱色谱、凝胶柱色谱分离方法分离纯化山楂叶悬钩子根中化学成分,运用多种波谱技术(UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS)鉴定化合物结构,进一步通过 DPPH 法评价各化合物的抗氧化活性。结果:从山楂叶悬钩子根中分离得到 9 个化合物,分别为蔷薇酸(1),山柰酚-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷(2),吐曼酸(3),2α,19α,24-三羟基乌苏-12-烯-3-氧-28-酸(4),2α-羟基齐墩果酸(5),乌苏酸(6),胡萝卜苷(7),β-谷甾醇(8),白藜芦醇苷(9)。抗氧化实验结果表明化合物 2 和 9 在 50 mg · L⁻¹ 时对 DPPH 自由基清除能力分别为 95.60%, 75.23%。结论:化合物 1~8 为首次从该植物中分离得到,化合物 2 和 9 具有明显的抗氧化活性。

[关键词] 悬钩子属;山楂叶悬钩子;化学成分;抗氧化活性

山楂叶悬钩子 *Rubus crataegifolius* 蔷薇科 Rosaceae 悬钩子属植物,又名牛迭肚,托盘。其根及果实部分一直作为传统中药。根部具有祛风利湿等功用,用于治疗慢性肝炎、风湿性关节炎等。在我国主要分布于黑龙江、辽宁、吉林。现代研究表明,山楂叶悬钩子具有抗菌、消炎、抗癌、抗氧化等作用,其抗氧化作用尤为显著。但是近年来对其抗氧化活性成分的研究还没有更深入的报道。对山楂叶悬钩子根进行抗氧化活性成分研究,从中得到 9 个化合物,其中化合物 1~8 为首次从该植物中分离得到,化合物 2 和 9 具有明显的抗氧化活性。

1 材料

Fisher-Johns 型显微熔点仪(温度未校正);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Unify 400 NMR(美国 Varian 公司);Agilent 1100 型 LC-MSD Trap SL 型 ESI-MS 质谱仪(美国 Agilent 公司)。柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶板为青岛海洋化

工厂产品;Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司产品;其余试剂均为分析纯。

山楂叶悬钩子根采于吉林省蛟河市郊区,经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物山楂叶悬钩子 *R. crataegifolius* 的根。

2 提取与分离

称取干燥后的山楂叶悬钩子根 2.0 kg,将其粉碎成粗粉,分别用 18 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并,回收乙醇,蒸干,共得到浸膏 0.396 kg,将浸膏溶解于水中,依次应用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚膏 23 g,氯仿膏 45 g,乙酸乙酯膏 152 g,正丁醇膏 56 g,水膏 91 g。

乙酸乙酯提取物经硅胶分离,氯仿-甲醇(0:1~1:0)梯度洗脱得到 5 个组分(Fr. 1~5)。其中 Fr. 1(0.9 g)经减压硅胶柱色谱柱色谱分离,氯仿-甲醇(95:5)洗脱得到化合物 8(15.0 mg)。Fr. 2(2.3 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,甲醇洗脱得到化合物 2(22.8 mg)。Fr. 3(3.2 g)经减压硅胶柱色谱柱色谱分离,氯仿-甲醇(9:1)洗脱得到化合物 4(15.8 mg),5(38.5 mg),6(27.5 mg),7(19.8 mg)。Fr. 4(3.2 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化,甲醇洗脱得到化合物 1(22.8 mg),3(22.3 mg),9(25.5 mg)。

[稿件编号] 20121021003

[基金项目] 吉林省中医药管理局中医药科技项目(08gzs-03)

[通信作者] * 张辉,教授,主要从事中药化学研究,Tel:(0431)

86172080,E-mail:zhanghui_8080@163.com;* 林喆,主要从事中药药

理学研究,Tel:(0431)86172988,E-mail:linzhe333@yahoo.com.cn

[作者简介] 魏忠宝,助理研究员,主要从事中药有效成分研究,

Tel:(0431)88935899,E-mail:jlszyb@163.com



3 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末, ESI-MS m/z 489 [M + H]⁺。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 1.14(3H, d, $J=6.2$ Hz, 30-CH₃), 0.87(3H, s, H-24), 0.94(3H, s, H-25), 0.98(3H, s, H-26), 0.99(3H, s, H-23), 1.27(3H, s, H-29), 1.43(18H, s, H-27), 1.75(1H, t, 11.0 Hz, H-1 α), 1.79(1H, dd, $J=12.5, 4.3$ Hz, H-1 β), 2.33(1H, td, $J=13.0, 4.5$ Hz, H-15 β), 3.09(1H, td, $J=13.0, 4.0$ Hz, H-16 α), 3.68(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3 β), 2.98(1H, m, H-18), 3.63(1H, dt, $J=10.5, 3.3$ Hz, H-2), 4.02(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3), 5.45(1H, br s, H-12); ¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 42.4(C-1), 66.2(C-2), 79.4(C-3), 38.7(C-4), 48.8(C-5), 18.6(C-6), 33.5(C-7), 39.8(C-8), 47.7(C-9), 38.5(C-10), 24.2(C-11), 128.1(C-12), 140.0(C-13), 43.0(C-14), 29.5(C-15), 26.5(C-16), 48.4(C-17), 54.7(C-18), 72.2(C-19), 42.2(C-20), 27.0(C-21), 38.5(C-22), 29.3(C-23), 22.4(C-24), 16.8(C-25), 17.3(C-26), 24.7(C-27), 180.7(C-28), 27.2(C-29), 16.7(C-30)。以上数据与文献[1-3]报道的蔷薇酸基本一致, 鉴定化合物 **1** 为蔷薇酸。

化合物 **2** 黄色粉末, ESI-MS m/z 447 [M - H]⁻。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 6.20(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.43(1H, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.87(1H, dd, $J=8.9$ Hz, 2.7 Hz, H-3', 5'), 8.08(1H, dd, $J=8.9$ Hz, 2.7 Hz, H-2', 6'), 5.41(1H, d, $J=7.1$ Hz, H-1''); ¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 127.5(C-2), 133.1(C-3), 177.5(C-4), 161.1(C-5), 98.7(C-6), 164.2(C-7), 93.7(C-8), 156.3(C-9), 103.9(C-10), 120.9(C-1'), 131.0(C-2'), 115.1(C-3'), 159.9(C-4'), 115.0(C-5'), 131.0(C-6'), 101.5(C-1''), 71.3(C-2''), 73.2(C-3''), 67.9(C-4''), 75.7(C-5''), 60.1(C-6'')。以上数据与文献[4]报道的山柰酚-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖苷基本一致, 鉴定化合物 **2** 为山柰酚-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖苷。

化合物 **3** 白色无定形粉末, ESI-MS m/z 489 [M + H]⁺。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.99, 1.26, 1.42, 1.70, 1.07, 1.07(18H, s, -CH₃ \times 6), 1.10(3H, d, $J=4.5$ Hz), 3.37(1H, d, $J=8.6$ Hz, H-3), 3.05(1H, s, H-18), 5.57(1H, br s, H-12); ¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 55.9(C-1), 68.5

(C-2), 40.4(C-3), 38.5(C-4), 48.2(C-5), 24.1(C-6), 33.6(C-7), 83.8(C-8), 47.8(C-9), 18.9(C-10), 39.6(C-11), 127.9(C-12), 139.9(C-13), 29.2(C-14), 42.3(C-15), 47.8(C-16), 26.3(C-17), 42.1(C-18), 72.6(C-19), 38.4(C-20), 54.5(C-21), 27.0(C-22), 29.3(C-23), 16.7(C-24), 16.8(C-25), 17.6(C-26), 24.6(C-27), 180.6(C-28), 17.2(C-29), 26.9(C-30)。以上数据与文献[5]报道的吐曼酸基本一致, 鉴定化合物 **3** 为吐曼酸。

化合物 **4** 白色粉末, ESI-MS m/z 503 [M + H]⁺。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 1.63, 1.59, 1.41, 1.21, 1.07(15H, s, -CH₃ \times 5), 1.10(3H, d, $J=6.0$ MHz, 30-CH₃), 2.48(2H, m, H-1), 4.90(1H, m, H-2), 1.84(1H, t, $J=9.1, 7.5$ Hz, H-9), 5.54(1H, br s, H-12); ¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 50.9(C-1), 75.5(C-2), 215.1(C-3), 55.8(C-4), 58.9(C-5), 20.0(C-6), 33.6(C-7), 40.5(C-8), 47.6(C-9), 37.9(C-10), 24.3(C-11), 127.4(C-12), 140.0(C-13), 42.3(C-14), 29.6(C-15), 26.2(C-16), 48.1(C-17), 54.5(C-18), 72.6(C-19), 42.0(C-20), 26.9(C-21), 38.4(C-22), 29.2(C-23), 65.3(C-24), 17.3(C-25), 16.8(C-26), 24.6(C-27), 180.6(C-28), 27.1(C-29), 16.7(C-30)。以上数据与文献[6]报道的2 α , 19 α , 24-三羟基乌苏-12-烯-3-氧-28-酸基本一致, 鉴定化合物 **4** 为2 α , 19 α , 24-三羟基乌苏-12-烯-3-氧-28-酸。

化合物 **5** 白色粉末, ESI-MS m/z 457 [M + H]⁺。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.94, 0.99, 0.97, 1.01, 1.04, 1.28, 1.26(21H, s, -CH₃ \times 7), 3.24(1H, dd, $J=13.5, 4.5$ Hz, H-18), 3.42(1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 4.01(1H, td, $J=10.0, 4.0$ Hz, H-2), 5.35(1H, t, $J=3.5$ Hz, H-12); ¹³C-NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 47.7(C-1), 68.5(C-2), 83.8(C-3), 40.0(C-4), 55.8(C-5), 18.8(C-6), 33.1(C-7), 29.6(C-8), 17.4(C-9), 16.9(C-10), 23.9(C-11), 122.4(C-12), 144.9(C-13), 42.2(C-14), 29.2(C-15), 23.7(C-16), 46.6(C-17), 41.9(C-18), 46.3(C-19), 31.0(C-20), 34.1(C-21), 33.1(C-22), 39.7(C-23), 48.1(C-24), 38.6(C-25), 17.4(C-26), 26.1(C-27), 180.1(C-28), 33.4(C-29), 23.7(C-30)。以上数据与文献[7-8]报道的2 α -羟基齐墩果酸基



本一致, 鉴定化合物 **5** 为 2 α -羟基齐墩果酸。

化合物 **6** 白色无定形粉末, ESI-MS m/z 457 [M + H]⁺。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 0.89, 0.96, 1.07, 1.21, 1.34 (15H, s, -CH₃ \times 5), 1.11 (3H, d, J = 6.5 Hz, 29-CH₃), 0.95 (3H, d, J = 6.5 Hz, 30-CH₃), 5.21 (1H, br s, H-12); ¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 39.8 (C-1), 27.8 (C-2), 79.6 (C-3), 40.4 (C-4), 56.7 (C-5), 19.4 (C-6), 34.3 (C-7), 40.7 (C-8), 48.1 (C-9), 38.1 (C-10), 23.5 (C-11), 126.9 (C-12), 139.6 (C-13), 42.2 (C-14), 28.2 (C-15), 24.3 (C-16), 48.1 (C-17), 54.3 (C-18), 39.9 (C-19), 40.4 (C-20), 31.7 (C-21), 38.1 (C-22), 28.7 (C-23), 17.7 (C-24), 16.0 (C-25), 17.6 (C-26), 24.1 (C-27), 181.6 (C-28), 16.3 (C-29), 21.5 (C-30)。以上数据与文献[9]报道的乌苏酸基本一致, 鉴定化合物 **6** 为乌苏酸。

化合物 **7** 白色粉末, Molish 反应呈阳性, 提示为糖苷类化合物, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 提示其可能为甾体类化合物, 其与胡萝卜苷对照品共薄层, 经多种展开剂展开 R_f 及斑点一致, 且两者混合熔点不下降, 故鉴定为胡萝卜苷。

化合物 **8** 无色针状结晶, mp 140 ~ 142 °C, 10% 硫酸-乙醇溶液加热显紫红色, TLC 检视与 β -谷甾醇对照品 R_f 相同, 混合熔点不下降, 故鉴定为 β -谷甾醇。

化合物 **9** 白色针晶, ESI-MS m/z 391 [M + H]⁺。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 9.50 (1H, s, 4'-OH), 9.36 (1H, s, 3-OH), 6.84 (1H, t, J = 3.4 Hz, H-2), 6.45 (1H, t, J = 4.3 Hz, H-4), 6.68 (1H, t, J = 3.4 Hz, H-6), 7.40 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-3'), 4.92 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 3.10 ~ 3.86 (6H, Glc-H-2'' ~ 6''); ¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 140.8 (C-1), 106.8 (C-2), 160.3 (C-3), 104.0 (C-4), 159.2 (C-5), 108.1 (C-6), 126.7 (C-a), 129.8 (C-b), 129.9 (C-1'), 129.0 (C-2'), 116.5 (C-3'), 158.3 (C-4'), 116.5 (C-5'), 128.9 (C-6'), 102.2 (C-1''), 74.6 (C-2''), 78.7 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.8 (C-5''), 63.1 (C-6'')。以上数据与文献[10]报道的白藜芦醇苷基本一致, 鉴定化合物为白藜芦醇苷。

4 化合物清除 DPPH 自由基的能力

运用 DPPH 法^[11-14], 对分离得到的化合物 **1** ~ **9**

进行体外抗氧化活性评价。精密量取质量浓度为 26.4 mg · L⁻¹ 的 DPPH 甲醇溶液 2 mL, 再分别加入 2 mL 以甲醇为溶剂已配制好的不同浓度的样品液中, 充分混匀, 避光条件下反应 30 ~ 40 min, 在 517 nm 测定其吸光度。同时以 2 mL 甲醇溶液代替样品溶液作为空白对照 A₀, 以样品溶液 2 mL 与 2 mL 甲醇溶剂混合作为样品对照 A_i, 并以 Vit E 作为阳性对照, 以样品液对 DPPH 溶液清除率 Y 可由下公式计算: $Y = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$ 。式中 A_i 为 DPPH 溶液与待测溶剂混合后的吸光度; A_j 为溶剂和 DPPH 溶液混合后的吸光度; A₀ = 溶剂和 DPPH 溶液混合后的吸光度。各样品的 DPPH 清除率见表 1。

表 1 化合物 **1** ~ **9** 的 DPPH 自由基清除率

化合物	质量浓度 / mg · L ⁻¹	
	10	50
1	3.00	21.70
2	48.05	95.60
3	3.95	30.60
4	2.35	21.95
5	2.25	20.16
6	2.40	20.05
7	-	-
8	-	-
9	36.24	75.23
Vit E	44.90	88.50

5 讨论

DPPH 自由基 (1,1-二苯基-2-苦基苯肼) 是一种稳定的以氮为中心的自由基, 其稳定性主要来自共振作用及 3 个苯环的空间位阻效应, 通过使夹在其中的氮原子上的不成对电子不能发挥其应有的电子成对作用而发挥作用。DPPH 在 517 nm 处有最大吸收, 加入抗氧化剂后, 以紫外分光光度计测定其在 517 nm 处吸光度, 即可看出抗氧化剂对 DPPH 的清除能力^[13-14]。

从山楂叶悬钩子根中提取分离得到 9 个化合物, 化合物 **1** ~ **8** 为首次从该植物中分离得到。抗氧化实验结果表明: 与 Vit E 对比, 化合物 **2** 和 **9** 显示了明显的抗氧化活性, 且化合物 **2** 优于 Vit E。由此, 可以看出, 含有酚羟基的黄酮类化合物具有很好的抗氧化活性, 而且明显优于萜类化合物。



[参考文献]

- [1] Liang G Y, Alexander I G, Peter G W. Pentacyclic triterpenes from the fruits of *Rosa sterilis*[J]. *J Nat Prod*,1989,52(1):162.
- [2] 彭江南,陆蕴如,陈德昌. 蛇莓化学成分的研究[J]. *中草药*,1995,26(7):339.
- [3] 陶正明,丁立生,彭树林,等. 乌泡子根的三萜成分[J]. *中草药*,2002,33(2):99.
- [4] 郭洪祝,李家实. 南方菟丝子黄酮类成分的研究[J]. *中国中药杂志*,1997,22(1):38.
- [5] 甘露,赵玉英,张俊华,等. 粗叶悬钩子三萜类化合物的分离鉴定[J]. *中国中药杂志*,1998,23(6):361.
- [6] 柴伟. 覆盆子化学成分及质量标准研究[D]. 北京:中国中医科学院,2005.
- [7] 鞠建华,周亮,林耕,等. 枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J]. *中国中药杂志*,2003,38(10):752.
- [8] Kojima H, Ogura H. Configurational studies on hydroxyl groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursine-type triterpenes by NMR spectroscopy[J]. *Phytochemistry*,1989,28(6):1703.
- [9] 郭启雷,杨俊山. 掌叶覆盆子的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*,2005,30(3):198.
- [10] 梁永峰,陇东虎杖化学成分研究[J]. *安徽农业科学*,2008,36(29):12736.
- [11] 郑德勇,安鑫南. 竹叶提取物清除 DPPH 自由基的测定方法[J]. *福建农业大学学报:自然科学版*,2006,34(1):59.
- [12] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. 香椿叶提取物清除 DPPH 自由基能力的测定方法[J]. *林产化学与工业*,2006,26(3):69.
- [13] Blois M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. *Nature*, 1958, 181:1199.
- [14] 谢学明,李熙灿,钟远声,等. 龟板体外抗氧化活性研究[J]. *中国药房*,2006,17(18):1368.

Antioxidant activity constituents from root of *Rubus crataegifolius*

WEI Zhong-bao¹, SUN Jia-ming², LI Peng-fei², WANG Shuai³, ZHANG Hui^{2*}, LIN Zhe^{4*}

(1. *Jilin Modern Medical and Biopharmaceutical Base Office, Changchun 130041, China;*

2. *Development Center of Traditional Chinese Medicine and Bioengineering, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;*

3. *Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Medicine, Changchun 130021, China;*

4. *Department of Science and Technology, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)*

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant constituents from the root of *Rubus crataegifolius*. **Method:** The constituents isolation and purification from the root of *R. crataegifolius* was carried by reported column chromatography including silica gel, toyopearl, and their structures were elucidated on the basis of spectral compounds. DPPH method was used to evaluate the free radical scavenging activity of the isolated compounds. **Result:** Nine compounds were isolated from the root of *R. crataegifolius*, and their structures were identified as follow: euscaphic acid (1), kaempferol-3-O- β -D-galactopyranoside (2), tormentic acid (3), 2 α , 19 α , 24-trihydroxyurs-12-ene-3-oxo-28-acid (4), 2 α -hydroxy-oleanolic acid (5), ursolic acid (6), daucosterol (7), β -sitosterol (8) and polydatin (9). By experiment of antioxidant activity, the result showed compounds 2 and 9 revealed DPPH free radical scavenging rates were 95.60% and 75.23% at the concentration of 50 mg · L⁻¹. **Conclusion:** Compounds 1-8 were isolated from this plant for the first time, and compounds 2 and 9 showed the significant antioxidant activity.

[Key words] *Rubus*; *Rubus crataegifolius*; constituents; antioxidant

doi:10.4268/cjcm20122318

[责任编辑 吕冬梅]