

千金子中6,7-二羟基香豆素的分离鉴定及抗氧化活性研究

封家福¹, 赵琦², 卫秀敏¹, 勾秋芬¹, 陈封政²

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000;

2. 成都大学生物产业学院, 四川 成都 610106)

摘要:为进一步研究中药千金子的活性物质,将千金子粉末用乙醇室温浸泡提取,经浓缩、除脂、乙酸乙酯萃取后得到千金子乙酸乙酯萃取物,再经洗涤、重结晶得到单体化合物。通过质谱和核磁共振技术鉴定单体化合物的结构为6,7-二羟基香豆素。以V_C为阳性对照,采用清除DPPH自由基实验法和对猪油的抗氧化实验,研究6,7-二羟基香豆素的抗氧化活性。结果表明,6,7-二羟基香豆素清除DPPH自由基的体系终浓度IC₅₀为0.058 μg/mL,远低于V_C的体系终浓度(IC₅₀为0.542 μg/mL);油脂过氧化值实验显示,6,7-二羟基香豆素的抗氧化活性强于V_C。千金子的活性物质6,7-二羟基香豆素具有较强的抗氧化活性。

关键词:千金子;6,7-二羟基香豆素;化学成分;抗氧化活性;抗氧化机理

中图分类号:R 284 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)03-0032-04

Study on antioxidant activity and structural identification of 6,7-dihydroxycoumarin from the seeds of *euphorbia lathyris*

FENG Jia-fu¹, ZHAO Qi², WEI Xiu-min¹, GOU Qiu-fen¹, CHEN Feng-zheng²

(1. Leshan Vocational & Technical College, Leshan Sichuan 614000;

2. College of Biological Industry, Chengdu University, Chengdu Sichuan 610106)

Abstract: To investigate the active substances in the seeds of *euphorbia lathyris*, its ethyl acetate extract was obtained after the seeds were powdered, ethanol immersion extracted, condensed, degreased and extracted with ethyl acetate. The monomer compound was obtained after the ethyl acetate extract was washed and recrystallized. The compound was identified as 6,7-dihydroxycoumarin by mass-spectrometry and nuclear magnetic resonance, whose antioxidant activity was evaluated by DPPH radical scavenging assay and antioxidant experiment on lard. The result showed that the IC₅₀ values of 6,7-dihydroxycoumarin was 0.058 μg/mL, much lower than that of Vitamine C, 0.542 μg/mL. The result of lipid peroxide value test showed that the antioxidant activity of 6,7-dihydroxycoumarin was stronger than Vitamine C.

Key words: *euphorbia lathyris*; 6,7-dihydroxycoumarin; chemical composition; antioxidant activity; antioxidant mechanism

大戟属(*Euphorbia*)是大戟科植物中最大的一个属,我国原产66种,另有规范化栽培14种,共计80种。续随子(*Euphorbia lathyris*)是大戟属的一个种,分布于我国10余个省市,其果实为我国传统药材,称为千金子。《本草纲目》等记载该植物的果实

具有“逐水消肿,破淤杀虫”等功效。文献报道千金子含有丰富的油脂,是理想的生物质能源物质。千金子中的活性成分主要是二萜类化合物、香豆素类化合物及甾醇类化合物,其含有的大环二萜类化合物引起了天然药物化学家的广泛研究兴趣。我国著名植物化学家郝小江等和国外学者从该类植物果实中得到了许多结构新颖且颇具活性的新化合物^[1-3]。目前的药理实验结果表明,该植物果实中含有的二萜类化合物具有多种生理活性^[4-6],如抗肿瘤、抗溃疡、抗病毒、抗结核、杀虫抑菌及松弛血管

收稿日期:2014-10-16

基金项目:药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室项目(14YWHX-001);成都市科技局资助项目(12DXYYB155JH-002)

作者简介:封家福,1977年出生,男,四川邛崃人,副教授。

通讯作者:陈封政,1972年出生,男,四川达州人,教授,博士。

等活性,尤其是其含有的续随子醇(lathyrol)、大戟因子L1、大戟因子L2和大戟因子L3对肝癌SMMC-7221、肺腺癌L₃₄₂和胃腺癌MCc80-3具有很强的抑制作用,它们的抗肿瘤活性强于长春碱(vinblastine, VLB)。本实验室已对千金子中的大戟因子L1等进行了研究,并申请了国家发明专利^[7-8]。为了进一步探索千金子的其它活性成分,本文对其粉末进行了室温乙醇浸提,提取液减压挥去乙醇后,得到浸膏,浸膏用石油醚除去油脂,然后用乙酸乙酯萃取,得到乙酸乙酯萃取物,研究发现该萃取物具有一定的抗氧化活性,之后对该萃取物进行了成分分析,分离鉴定出6,7-二羟基香豆素(Esculetin),并进行抗氧化性能研究,探讨其抗氧化机理。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

千金子:成都市国际商贸城荷花池中药材专业市场;维生素C:上海源叶生物科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼):北京中生瑞泰科技有限公司;无水乙醇、甲醇、石油醚、乙酸乙酯、丙酮、硫代硫酸钠(均为分析纯):成都市长征化学试剂公司生产;氘代二甲亚砜(氘代率为99.8%):百灵威科技有限公司生产;水为普通蒸馏水,自制;油脂为新鲜炼制的猪油,自制。

三用紫外线分析仪:上海闵行虹浦仪器厂;DF-101C恒温搅拌器:河南巩义市英峪高科仪器厂;RE-2000A旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;岛津LCMS-8030液质联用仪;Varian INOVA 400核磁共振谱仪;多功能粉碎机(XL-600B):永康市小宝电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 6,7-二羟基香豆素的提取与纯化

将1.00 kg干燥的千金子粉碎,用3 L无水乙醇室温浸泡提取24 h,过滤;滤渣再次用3 L无水乙醇室温浸泡提取24 h,过滤,合并滤液。在60 °C条件下减压浓缩滤液至流浸膏状;然后用300 mL蒸馏水将浸膏稀释,先用300 mL石油醚萃取两次,除去油脂等强脂溶性成分;剩余水液再用300 mL乙酸乙酯萃取两次,减压浓缩,得到乙酸乙酯萃取物。将乙酸乙酯萃取物用丙酮慢慢洗涤,得到淡黄色的不溶物。将黄色不溶物用甲醇加热溶解,室温挥发溶剂,得到小颗粒的黄色晶体。

1.2.2 6,7-二羟基香豆素的结构鉴定

以甲醇为溶剂,用LCMS-8030液质联用仪确定该化合物的分子量;以氘代二甲亚砜为溶剂,用

Varian INOVA 400核磁共振谱仪进行核磁测试;通过质谱图、核磁共振氢谱图、碳谱图解析化合物的结构。

1.2.3 抗氧化性能的测定

采用DPPH清除率法^[9],V_c为阳性对照,研究化合物6,7-二羟基香豆素的抗氧化活性。

1.2.4 6,7-二羟基香豆素对油脂的抗氧化性研究

按照GB/T5009.37-2003的方法,每隔4 d测定一次,比较6,7-二羟基香豆素和V_c的抗氧化性。过氧化值(POV)计算公式如下:

$$POV = \{ [(V_1 - V_2) \times c \times 0.1269] / m \} \times 100 \quad (1)$$

式中,POV表示试样的过氧化值,g/100 g;V₁表示试样消耗硫代硫酸钠标准滴定液的体积,mL;V₂表示试剂空白消耗硫代硫酸钠标准滴定液的体积,mL;c表示硫代硫酸钠标准滴定溶液的浓度,mol/L;m表示试样质量,g;0.1269表示与1.00 mL硫代硫酸钠滴定溶液[c(Na₂S₂O₃) = 1.000 mol/L]相当的碘的质量,单位为g。

1.2.5 数据分析

抗氧化性能测定和POV值测定均同时做三组重复,结果以三组实验的平均值表示。

2 结果与分析

2.1 6,7-二羟基香豆素的制备

将26.35 g千金子乙酸乙酯萃取物置于三角瓶中,加入150 mL丙酮,在磁力搅拌器上搅拌30 min,抽滤,得到沉淀,然后再用150 mL丙酮慢慢洗涤,得到2.16 g淡黄色固体粉末状沉淀。将2.16 g粉末状沉淀溶于100 mL热甲醇中,在室温条件下放置48 h,待甲醇挥发减少后,瓶壁和瓶底析出大量小颗粒的黄色晶体,过滤,得到淡黄色晶体,干燥后称重为1.26 g。然后通过高效硅胶薄层板检测(硅胶薄层层析条件:二氯甲烷:甲醇=8:1),紫外灯下显示单一强荧光斑点。

2.2 6,7-二羟基香豆素的鉴定

将得到的黄色晶体溶液氘代二甲亚砜,进行核磁测试,得到核磁共振氢谱图(图1)。通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)可以看出δ 6.93(1H, s)和δ 6.76(1H, s)是两个无裂分的芳氢信号;δ 6.18(1H, d, 9.6 Hz)和δ 7.76(1H, d, 9.6 Hz)是一组相互裂分的烯氢信号。将该化合物的氢谱数据与6,7-二羟基香豆素相关文献^[10]中的数据进行对照,发现其数据基本一致。通过核磁测试得到核磁共振碳谱图,见图2。通过核磁共振碳谱(¹³C-

NMR)可以看出该化合物只有 9 个碳,其化学位移分别为 δ 164.3、152.0、150.5、146.1、144.6、113.0、112.8、112.5 和 103.6,其中 δ 164.3 为羰基碳的信号。这些数据与文献^[11]中报道的 6,7-二羟基香豆素的碳谱数据完全一致。故该化合物鉴定为 6,7-二羟基香豆素(6,7-dihydroxycoumarin),其结构式如图 3 所示,其氢谱和碳谱数据归属见表 1。

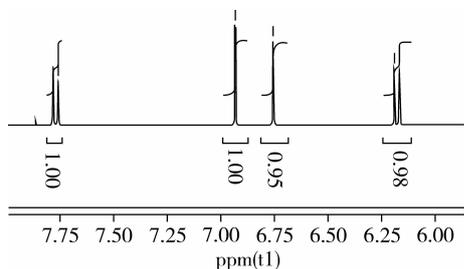


图 1 6,7-二羟基香豆素的核磁共振氢谱图

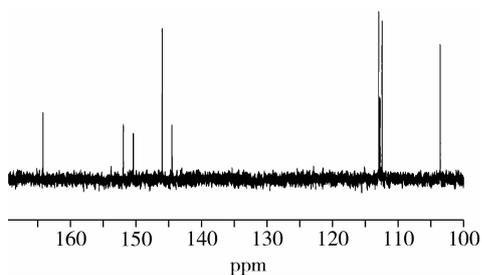


图 2 6,7-二羟基香豆素的核磁共振碳谱图

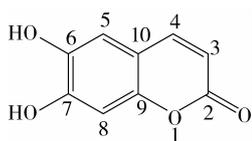


图 3 6,7-二羟基香豆素的结构

编号	氢谱数据	碳谱数据
1	-	-
2	-	164.3
3	6.18(1H, d, J=9.6 Hz)	112.5
4	7.76(1H, d, J=9.6 Hz)	146.1
5	6.93(1H, s)	113.0
6	-	144.6
7	-	152.0
8	6.76(1H, s)	103.6
9	-	150.5
10	-	112.8

质谱测试(图 4)显示该化合物的分子离子峰为 179,即 $[M+H]^+$,预示该化合物的分子量为 178。碎片峰 m/z 151 及 m/z 122 是化合物丢失 1 个 CO 和 2 个 CO 中性分子形成的碎片分子离子峰。其碎片离子峰的形成过程可能如图 5 所示。

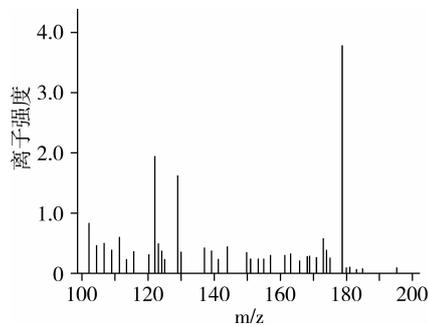


图 4 6,7-二羟基香豆素的质谱图

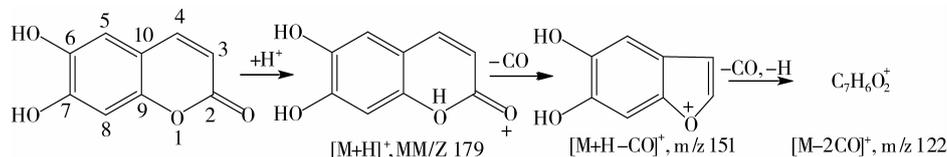


图 5 碎片离子峰的可能形成过程

2.3 6,7-二羟基香豆素的 DPPH 自由基清除能力

6,7-二羟基香豆素和 V_c 对 DPPH 自由基的清除率见图 6。

从图中可以看出 6,7-二羟基香豆素和 V_c 对 DPPH 均有很强的清除作用,并且其清除率随化合物浓度的增大而增大,且 6,7-二羟基香豆素的抗氧化能力远强于阳性对照 V_c 。6,7-二羟基香豆素的体系终浓度 IC_{50} 为 0.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 V_c 的体系

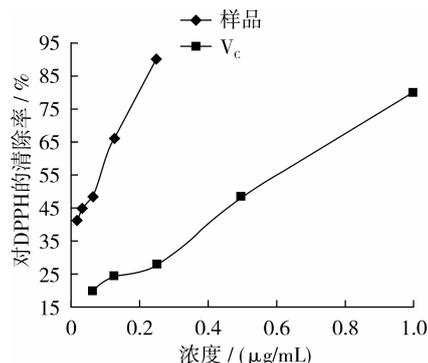


图 6 不同浓度的 6,7-二羟基香豆素及 V_c 对 DPPH 自由基的清除率

终浓度 IC_{50} 为 $0.542 \mu\text{g/mL}$, 从其 IC_{50} 来看, 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化活性比 V_c 强 10 倍。

香豆素类化合物的抗氧化活性强弱与酚羟基的数量和位置有关, 尤其是具有邻二酚羟基结构的香豆素, 其可能的抗氧化机理如图 7 所示。

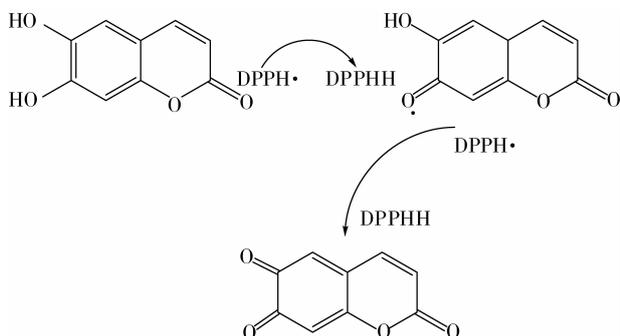


图 7 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化机理

2.4 6, 7-二羟基香豆素对油脂的抗氧化性研究

研究不同浓度的样品及 V_c 对猪油的抗氧化性, 得到其 POV 值, 结果如图 8 所示。

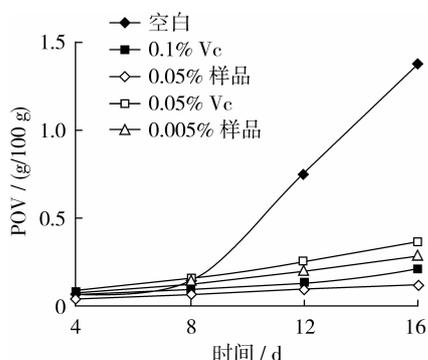


图 8 6, 7-二羟基香豆素及 V_c 对猪油的抗氧化活性

由图 8 可以看出 6, 7-二羟基香豆素和 V_c 的 POV 值远低于空白组, 且 6, 7-二羟基香豆素浓度增加, 则其 POV 值减小, 6, 7-二羟基香豆素对油脂的抗氧化活性增大。从图中可以看出 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化活性远高于 V_c , 0.005% 的 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化活性略强于 0.05% 的 V_c 的抗氧化活性, 略弱于 0.1% 的 V_c 的抗氧化活性。

3 结论

据报道, 千金子的生理活性较多, 其主要活性物质为大环二萜类化合物。本研究表明, 千金子中 6, 7-二羟基香豆素含量较高, 该化合物具有很强的抗

氧化活性, 其清除 DPPH 自由基的体系终浓度 IC_{50} 为 $0.058 \mu\text{g/mL}$, 远低于 V_c 的体系终浓度 (IC_{50} $0.542 \mu\text{g/mL}$); 对猪油的抗氧化实验显示, 0.005% 的 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化活性略强于 0.05% 的 V_c , 略弱于 0.1% 的 V_c , 表明化合物 6, 7-二羟基香豆素的抗氧化活性远高于 V_c , 揭示了富含 6, 7-二羟基香豆素的千金子具有抗氧化活性, 同时 6, 7-二羟基香豆素的强抗氧化活性表明其在医药保健行业和食品天然抗氧化剂领域具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Appendino G, Porta C D, Conseil G, et al. A New P-Glycoprotein Inhibitor from the Caper Spurge [J]. Journal of Natural Product, 2003, 66(1): 140-143.

[2] LI Shu-hua, Chen Ying, Hu Jian-ping. A New Macrocyclic Diterpene Derived from the Seed of Euphorbia lathyris [J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(6): 2331-2332.

[3] Witacenis A, Seito L N, Stasi L C D. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Esculetin and 4-methylesculetin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis [J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 186(2): 211-218.

[4] Chu C, Tsai Y Y, Wang C J, et al. Induction of apoptosis by Esculetin in Human Leukemia Cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 416(1): 25-32.

[5] Anand J, Rijhwani H, Malapati K, et al. Anticancer Activity of Esculetin via modulation of Bcl-2 and NF- κ B Expression in benzo[a]pyrene Induced Lung Carcinogenesis in Mice [J]. Biomedicine and Preventive Nutrition, 2013, 3(2): 107-112.

[6] Chen Zheng, Bertin R, Frolidi G. EC_{50} estimation of Antioxidant Activity in DPPH Assay using several Statistical Programs [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 414-420.

[7] 熊俊如, 陈封政, 李书华. 一种从续随子果实中提取高纯度秦皮乙素的方法: 中国, CN201310369569 [P]. 2013-11-27.

[8] 陈封政, 颜军, 苟小军, 等. 一种从续随子果实中快速制取大戟因子 LI 的方法: 中国, CN201310058791 [P]. 2013-06-05.

[9] 李书华, 赵琦, 刘芳, 等. 臭灵丹中黄酮类化合物的分离鉴定及抗氧化性能的研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1213-1216.

[10] 郑飞龙, 罗跃华, 魏孝义, 等. 千金子中非萜类化学成分的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(3): 298-301.

[11] 刘丽梅, 陈琳, 王瑞海, 等. 秦皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1073-1074.