

升振山姜茎的黄酮类成分

刘友花, 林立东, 叶育石, 徐良雄*, 魏孝义

(中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650)

摘要: 为了解升振山姜(*Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’)的化学成分, 采用柱色谱技术从其茎中分离得到 10 个黄酮类化合物。经波谱分析, 分别鉴定为(-)-乔松素 (1)、(±)-山姜素 (2)、(±)-7,4'-二羟基-5-甲氧基二氢黄酮 (3)、4',6'-二羟基-2'-甲氧基二氢查尔酮 (4)、小豆蔻明 (5)、蜡菊亭 (6)、(+)-儿茶素 (7)、(-)-表儿茶素 (8)、原花青素 A1 (9)、原花青素 A6 (10)。体外活性测试表明, 化合物 1、3、5、7~10 具有显著的 ABTS 自由基清除活性, 化合物 7~10 具有显著的 DPPH 自由基清除活性。

关键词: 升振山姜; 茎; 黄酮类化合物; 抗氧化活性

doi: 10.11926/jtsb.3736

Flavonoids from the Stems of *Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’

LIU You-hua, LIN Li-dong, YE Yu-shi, XU Liang-xiong*, WEI Xiao-yi

(Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: To understand the chemical constituents of *Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’, ten flavonoids were isolated from its stems by chromatographic techniques. On the basis of spectral data, they were identified as (-)-pinocembrin (1), (±)-alpinetin (2), (±)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-dihydroflavonol (3), uvangoletin (4), cardamonin (5), helichrysetin (6), (+)-catechin (7), (-)-epicatechin (8), proanthocyanidin A1 (9), and proanthocyanidin A6 (10). The compounds 1, 3, 5, 7–10 exhibited remarkable ABTS radical scavenging activities and compounds 7–10 displayed significant DPPH radical scavenging activities.

Key words: *Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’; Stem; Flavonoids; Antioxidant activity

升振山姜(*Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’)是由中国科学院已故高级工程师陈升振先生于 20 世纪 80 年代利用姜科药食两用山姜属植物草豆蔻(*Alpinia katsumadai* Hayata.)和小草蔻(*A. henryi* K. Schumann)杂交所得, 为了纪念他的突出贡献, 将其命名为升振山姜^[1]。目前, 仅在中国科学院华南植物园有栽培。升振山姜的植株高、花序长、花期长, 因此具有很高的观赏价值^[1-2]。至今尚无该植

物的化学成分报道, 前人研究多集中在亲本草豆蔻的化学成分及药用价值方面, 亲本草豆蔻的主要化学成分为黄酮和二苯基庚烷等^[3], 其药用作用研究主要包括抗氧化、抗菌、抗炎以及抗肿瘤等^[4-5]。为深入了解升振山姜茎的主要化学成分, 挖掘其资源利用潜力, 我们对其茎化学成分进行了研究, 从中分离鉴定了 10 个黄酮化合物, 并采用体外 ABTS、DPPH 自由基清除法测试了这些化合物的抗氧化活

收稿日期: 2017-03-02 接受日期: 2017-04-18

基金项目: 广州市产学研协同创新重大专项(201604020048); 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室基金项目(201217ZS); 广东省省级科技计划项目(2013B091500076)资助

This work was supported by the Guangzhou Science Technology and Innovation Commission (Grant No. 201604020048), and the Foundation of Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (Grant No. 201217ZS), and the Plan Projects for Science and Technology of Guangdong Province (Grant No. 2013B091500076).

作者简介: 刘友花(1989~), 女, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究工作。E-mail: lyh13839@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xlx048@scbg.ac.cn

性。本文报道这些黄酮化合物的提取分离方法、结构鉴定以及体外抗氧化活性。

1 材料和方法

1.1 材料

升振山姜(*Alpinia hainanensis* ‘Shengzhen’)茎于 2015 年 5 月采自中国科学院华南植物园姜园, 由本园叶育石鉴定, 切片晾干后粉碎备用。

1.2 仪器和试剂

柱色谱正相硅胶(100~200 目)为青岛海洋化工厂生产; 柱层析凝胶(Sephadex LH-20)为瑞士 Amersham Biosciences 公司生产; 薄层层析硅胶板(HSGF₂₅₄, 0.2 mm)为烟台黄务硅胶开发试验厂生产。

分析用 HPLC 仪器为日本岛津公司 LC-20A 型液相色谱仪; MPLC 采用上海利穗科技有限公司的 Dr Flash-S 分离纯化系统, 色谱柱为 Chromatosex[®] ODS(C₁₈, MB 100 40~75 μm, Fuji, 日本); ESIMS 采用美国应用生物系统公司 MDS SCIEX APCI 2000 LS-MS-MS, 以甲醇为溶剂, 直接进样测定; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱采用 Bruker Avance III 核磁共振仪, 以 TMS 为内标; 比旋光度用 Perkin-Elmer 341 旋光仪测定。

抗氧化活性测试所用阳性对照 L-抗坏血酸(L-Ascorbic acid)为上海伯奥生物科技有限公司产品, DPPH (1,1-二苯基-2-硝基苯肼)和 ABTS [2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)]购自 Sigma 公司; PBS (pH=7.4)购自上海立菲生物技术有限公司; 分析纯过硫酸钾、DMSO 和 MeOH 购自天津富宇精细化工有限公司。酶标仪(Tecan infinite M200 PRO)为瑞士生产。

1.3 提取和分离

升振山姜茎干粉 10.0 kg, 用 95% 乙醇室温浸泡提取 3 次, 每次 24 h。乙醇提取液经过减压浓缩后依次用石油醚、氯仿和乙酸乙酯萃取 3~4 次, 合并浓缩得到各部分萃取物。

石油醚部分(89.98 g)经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇 [100:0~50:50, (V/V, 下同)]梯度洗脱, 收集各流份后以 TLC 检查合并, 得到 Fr.P1~Fr.P22。Fr.P10 经过正相硅胶柱氯仿-甲醇(100:0~80:20)梯度洗脱

得到 Fr.P10-1~Fr.P10-7, 其中 Fr.P10-2 经 HPLC 纯化(55% 乙腈-水为流动相, 流速为 5 mL min⁻¹), 得到化合物 **4** (8 mg, *t_R*=120 min)。Fr.P12 经过 MPLC 分离, 用甲醇-水(40:60~80:20), 梯度洗脱得到 Fr.P12-1~Fr.P12-40, 其中 Fr.P12-19 和 Fr. P12-30 析出沉淀, 用甲醇洗涤得到化合物 **2** (500 mg)和 **5** (400 mg), Fr.P12-23 经过 HPLC 纯化(55% 甲醇-水为流动相, 流速为 5 mL min⁻¹), 得到化合物 **1** (400 mg, *t_R*=60 min)。

氯仿可溶部分(82.26 g)经正相硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(100:0~50:50)梯度洗脱, 每份收集 1 L, 经 TLC 检查合并得到 Fr.C1~Fr.C8。其中 Fr.C1 经过 MPLC 分离, 用甲醇-水(40:60~80:20)梯度洗脱, 经 TLC 检查合并得到 Fr.C1-1~Fr.C1-21。Fr.C1-11 经 HPLC 纯化(33% 乙腈-水为流动相, 流速为 5 mL min⁻¹), 得到化合物 **6** (5 mg, *t_R*=90 min)。Fr.C3 用甲醇清洗沉淀得到化合物 **3** (150 mg)。

取乙酸乙酯部分(56.76 g)粗样 10 g, 经过 MPLC 分离, 甲醇-水(20:80~40:60)梯度洗脱, 经 TLC 检查合并得到 Fr.E1~Fr.E18。Fr.E3 经 HPLC 纯化(13% 乙腈-水, 流速为 5 mL min⁻¹), 得到化合物 **7** (35 mg, *t_R*=35 min)。Fr.E8 经 HPLC 纯化(14% 乙腈-水为流动相, 流速为 5 mL min⁻¹), 分别得到化合物 **8** (3 mg, *t_R*=40 min)、**9** (5 mg, *t_R*=76 min)和 **10** (4 mg, *t_R*=86 min)。

1.4 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶, 分子式 C₁₅H₁₂O₄; [α]_D²⁰-166 (c 0.90, MeOH); ESIMS *m/z*: 257 [M + H]⁺, 279 [M + Na]⁺, 295 [M + K]⁺, 535 [2M + Na]⁺, 551 [2M + K]⁺, 255 [M - H]⁻, 511 [2M - H]⁻。 ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 5.59 (1H, dd, *J* = 12.6, 3.1 Hz, H-2), 2.78 (1H, dd, *J* = 12.6, 3.1 Hz, H-3α), 3.25 (1H, dd, *J* = 17.1, 12.6 Hz, H-3β), 5.89 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.92 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.36~7.56 (5H, m, ArH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 78.8 (C-2), 42.6 (C-3), 196.2 (C-4), 164.0 (C-5), 95.6 (C-6), 167.7 (C-7), 96.5 (C-8), 102.1 (C-4a), 163.2 (C-8a), 139.2 (C-1'), 127.1 (C-2', 6'), 129.0 (C-3', 5'), 129.0 (C-4')。以上数据与文献[6]报道的平面结构一致, 测得的旋光值为负, 鉴定该化合物为 (-)-乔松素。

化合物 2 无色针状结晶, 分子式 C₁₆H₁₄O₅;

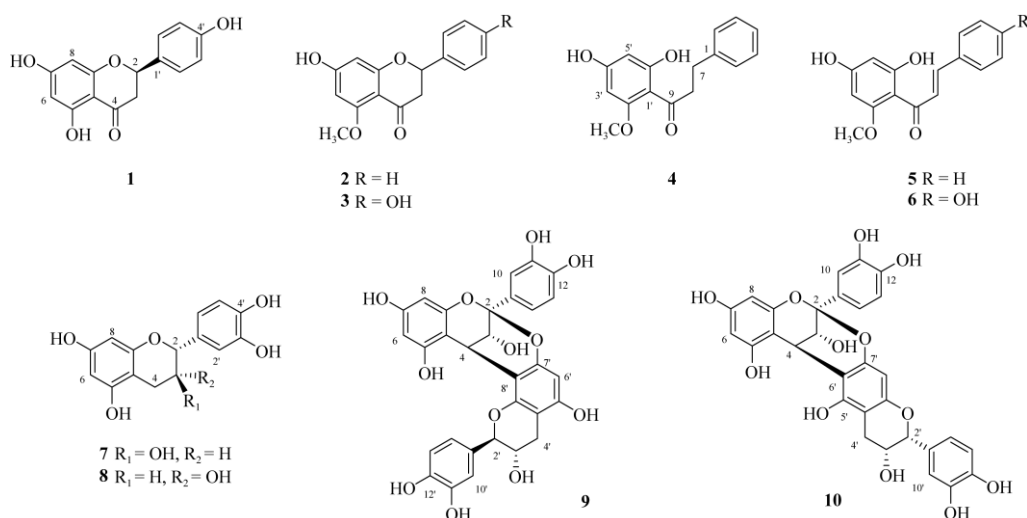


图1 化合物1-10的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-10

$[\alpha]_D^{20} \pm 0$ (*c* 0.18, MeOH); ESIMS *m/z*: 270 $[M + H]^+$, 293 $[M + Na]^+$, 541 $[2M + H]^+$, 563 $[2M + Na]^+$, 269 $[M - H]^-$, 539 $[2M - H]^-$. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 5.48 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.1 Hz, H-2), 2.63 (1H, dd, *J* = 16.4, 3.1 Hz, H-3 α), 2.98 (1H, dd, *J* = 16.4, 12.4 Hz, H-3 β), 6.02 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.08 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.33~7.56 (5H, m, ArH), 3.74 (3H, s, H-5-OMe); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 78.5 (C-2), 45.3 (C-3), 187.9 (C-4), 164.5 (C-5), 96.1 (C-6), 164.8 (C-7), 93.8 (C-8), 105.0 (C-4a), 162.7 (C-8a), 139.6 (C-1'), 126.9 (C-2', 6'), 129.0 (C-3', 5'), 128.8 (C-4'), 56.1 (C-5-OMe)。以上数据与文献[6]报道一致, 其旋光值为 0, 说明其为一对对映异构体, 鉴定该化合物为(±)-山姜素。

化合物 3 黄色针状结晶, 分子式 C₁₆H₁₄O₅; $[\alpha]_D^{20} \pm 0$ (*c* 0.28, MeOH); ESIMS *m/z*: 287 $[M + H]^+$, 309 $[M + Na]^+$, 325 $[M + K]^+$, 595 $[2M + Na]^+$, 611 $[2M + K]^+$, 285 $[M - H]^-$, 571 $[2M - H]^-$. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 5.34 (1H, dd, *J* = 12.6, 2.9 Hz, H-2), 2.54 (1H, dd, *J* = 16.4, 2.9 Hz, H-3 α), 2.99 (1H, dd, *J* = 16.4, 12.6 Hz, H-3 β), 5.95 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.06 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.29 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2', 6'), 6.78 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3', 5'), 3.74 (3H, s, H-5-OMe); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 78.5 (C-2), 45.2 (C-3), 188.2 (C-4), 164.1 (C-5), 93.7 (C-6), 164.8 (C-7), 96.1 (C-8), 104.9 (C-4a), 162.7 (C-8a), 129.8 (C-1'), 128.5 (C-2', 6'),

115.6 (C-3', 5'), 158.0 (C-4'), 56.1 (C-5-OMe)。以上数据与文献[7]报道一致, 由于旋光值为 0, 鉴定该化合物为(±)-7,4'-二羟基-5-甲氧基二氢黄酮。

化合物 4 黄色针状结晶, 分子式 C₁₆H₁₆O₄; ESIMS *m/z*: 273 $[M + H]^+$, 295 $[M + Na]^+$, 311 $[M + K]^+$, 567 $[2M + Na]^+$, 583 $[2M + K]^+$, 271 $[M - H]^-$, 543 $[2M - H]^-$. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 7.16~7.30 (5H, m, ArH), 2.88 (2H, m, H-7), 3.23 (2H, d, *J* = 8.4, 7.0 Hz, H-8), 5.96 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 5.88 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 3.81 (3H, s, H-2'-OMe); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 141.7 (C-1), 128.4 (C-2, 6), 128.5 (C-3, 5), 126.0 (C-4), 30.7 (C-7), 45.7 (C-8), 205.6 (C-9), 105.8 (C-1'), 163.5 (C-2'), 96.6 (C-3'), 167.3 (C-4'), 90.8 (C-5'), 162.6 (C-6'), 55.7 (C-2'-OMe)。以上数据与文献[8]报道一致, 鉴定该化合物为 4',6'-二羟基-2'-甲氧基二氢查尔酮。

化合物 5 黄色针状结晶, 分子式 C₁₆H₁₄O₄; ESIMS *m/z*: 271 $[M + H]^+$, 293 $[M + Na]^+$, 309 $[M + K]^+$, 563 $[2M + Na]^+$, 579 $[2M + K]^+$, 269 $[M - H]^-$, 539 $[2M - H]^-$. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 7.42~7.70 (5H, m, ArH), 7.83 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-7), 7.66 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-8), 5.94 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.03 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 3.89 (3H, s, H-2'-OMe); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 135.4 (C-1), 128.9 (C-2, 6), 119.5 (C-3, 5), 130.8 (C-4), 128.8 (C-7), 142.3 (C-8), 192.2 (C-9), 105.6 (C-1'), 163.2 (C-2'), 96.3 (C-3'), 165.5 (C-4'), 92.2 (C-5'),

166.7 (C-6'), 56.5 (C-2'-OMe)。以上数据与文献[7]报道一致, 鉴定该化合物为小豆蔻明。

化合物 6 黄色针状结晶, 分子式 $C_{16}H_{14}O_5$; ESIMS m/z : 287 [M + H]⁺, 309 [M + Na]⁺, 325 [M + K]⁺, 595 [2M + Na]⁺, 611 [2M + K]⁺, 285 [M - H]⁻, 571 [2M - H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 7.49 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3, 5), 7.76 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.66 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 5.99 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 5.92 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 3.89 (3H, s, H-2'-OMe); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 128.4 (C-1), 131.3 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 161.1 (C-4), 143.8 (C-7), 125.6 (C-8), 194.1 (C-9), 105.8 (C-1'), 164.6 (C-2'), 97.1 (C-3'), 168.6 (C-4'), 92.5 (C-5'), 166.4 (C-6'), 56.4 (C-2'-OMe)。以上数据与文献[6]报道一致, 鉴定该化合物为蜡菊亭。

化合物 7 白色无定型粉末, 分子式 $C_{15}H_{14}O_6$; ESIMS m/z : 291 [M + H]⁺, 313 [M + Na]⁺, 329 [M + K]⁺, 603 [2M + Na]⁺, 619 [2M + K]⁺, 289 [M - H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 4.61 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-2), 4.02 (1H, td, $J = 7.4, 5.4$ Hz, H-3), 2.87 (1H, dd, $J = 16.1, 5.4$ Hz, H-4 α), 2.55 (1H, dd, $J = 16.1, 8.0$ Hz, H-4 β), 5.91 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.97 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.87 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 81.4 (C-2), 67.4 (C-3), 27.0 (C-4), 144.8 (C-5), 94.3 (C-6), 156.3 (C-7), 95.0 (C-8), 99.5 (C-4a), 156.1 (C-8a), 130.8 (C-1'), 113.9 (C-2'), 144.8 (C-3'), 155.5 (C-4'), 118.8 (C-5'), 114.8 (C-6')。以上数据与文献[9]报道一致, 鉴定该化合物为(+)-儿茶素。

化合物 8 白色无定型粉末, 分子式 $C_{15}H_{14}O_6$; ESIMS m/z : 291 [M + H]⁺, 313 [M + Na]⁺, 329 [M + K]⁺, 603 [2M + Na]⁺, 619 [2M + K]⁺, 289 [M - H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 4.84 (1H, s, H-2), 4.20 (1H, m, H-3), 2.88 (1H, dd, $J = 16.8, 4.7$ Hz, H-4 α), 2.76 (1H, dd, $J = 16.8, 3.0$ Hz, H-4 β), 5.94 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.96 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.99 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4), 146.0 (C-5), 95.9 (C-6), 157.7 (C-7), 96.5 (C-8), 100.1 (C-4a), 158.0 (C-8a), 132.3 (C-1'), 115.4

(C-2'), 145.8 (C-3'), 157.4 (C-4'), 119.4 (C-5'), 115.9 (C-6')。以上数据与文献[10]报道的一致, 确定该化合物为(-)-表儿茶素。

化合物 9 无色针状, 分子式 $C_{30}H_{24}O_{12}$; ESIMS m/z : 599 [M + Na]⁺, 615 [M + K]⁺, 575 [M - H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 4.09 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-3), 4.25 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-4), 5.98 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.09 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 7.15 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 7.04 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-14), 4.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2'), 4.17 (1H, td, $J = 7.8, 5.6$ Hz, H-3'), 2.96 (1H, dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, H-4' α), 2.60 (1H, dd, $J = 16.4, 8.3$ Hz, H-4' β), 6.11 (1H, s, H-6'), 6.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10'), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13'), 6.85 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-14'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 100.4 (C-2), 67.8 (C-3), 29.3 (C-4), 156.8 (C-5), 98.2 (C-6), 158.2 (C-7), 96.6 (C-8), 104.1 (C-4a), 154.3 (C-8a), 132.3 (C-9), 115.6 (C-10), 146.8 (C-11), 145.7 (C-12), 116.4 (C-13), 119.9 (C-14), 84.6 (C-2'), 68.1 (C-3'), 29.1 (C-4'), 156.2 (C-5'), 96.6 (C-6'), 152.2 (C-7'), 106.8 (C-8'), 103.2 (C-4'a), 151.4 (C-8'a), 130.6 (C-9'), 115.8 (C-10'), 146.8 (C-11'), 146.4 (C-12'), 115.7 (C-13'), 120.7 (C-14')。以上数据与文献[11]报道的一致, 确定该化合物为原花青素 A1。

化合物 10 无色针状, 分子式 $C_{30}H_{24}O_{12}$; ESIMS m/z : 599 [M + Na]⁺, 615 [M + K]⁺, 575 [M - H]⁻。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 4.15 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-3), 4.25 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-4), 5.95 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.08 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 7.17 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 7.05 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-14), 4.76 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 4.08 (1H, td, $J = 8.6, 5.6$ Hz, H-3'), 2.98 (1H, dd, $J = 16.3, 5.6$ Hz, H-4' α), 2.58 (1H, dd, $J = 16.3, 8.6$ Hz, H-4' β), 6.10 (1H, s, H-6'), 6.87 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10'), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13'), 6.84 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-14'); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 100.5 (C-2), 67.7 (C-3), 29.3 (C-4), 156.7 (C-5), 98.2 (C-6), 158.2 (C-7), 96.6 (C-8), 104.1 (C-4a), 154.2 (C-8a), 132.3 (C-9), 115.7 (C-10), 146.8 (C-11), 145.7 (C-12), 116.4 (C-13), 119.9 (C-14), 83.9 (C-2'), 68.4 (C-3'), 29.0 (C-4'), 154.1 (C-5'), 96.6 (C-6'), 152.2 (C-7'), 106.6 (C-8'),

102.9 (C-4'a), 150.1 (C-8'a), 131.0 (C-9'), 115.8 (C-10'), 146.8 (C-11'), 146.5 (C-12'), 115.5 (C-13'), 120.4 (C-14')。以上数据与文献[12]报道的一致, 确定该化合物为原花青素 A6。

1.5 抗氧化活性测定

ABTS 自由基清除活性 按 Yang 等^[13]的方法稍作改动。首先用 10 mmol L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (PBS, pH=7.4) 配制 7 mmol L⁻¹ 的 ABTS 溶液、140 mmol L⁻¹ 过硫酸钾溶液, 然后取 5 mL 的 ABTS 液与 88 μL 过硫酸钾溶液混合, 在室温、避光条件下静置过夜(12~16 h), 形成 ABTS 自由基储备液, 使用前用 PBS (pH=7.4) 稀释成工作液, 室温在波长 734 nm 下的 OD 值为 0.70±0.02。然后将初始浓度为 10 mmol L⁻¹ 的待测化合物以及阳性对照(L-抗坏血酸)用 DMSO 倍比稀释为 6~8 个浓度。取 5 μL 样品(或阳性对照)溶液加入 96 孔板, 再加入 195 μL ABTS 试剂液, 阴性对照为 5 μL DMSO+195 μL ABTS 液; 空白组为 200 μL PBS; 25℃下遮光反应 6 min 后, 用酶标仪测定 415 nm 处的 OD 值; 每个样品独立重复 3 次, 计算 ABTS 自由基清除率(%)=[1-(OD_{样品}-OD_{空白})/(OD_{阴性}-OD_{空白})]×100%。

DPPH 自由基清除活性 按 Ma 等^[14]的方法稍作改动。DPPH 用甲醇稀释成 0.1 mmol L⁻¹ (当天新鲜配置)。将初始浓度为 10 mmol L⁻¹ 的待测化合物和阳性对照分别用 DMSO 倍比稀释为 6~8 个浓度。取 5 μL 样品(或阳性对照)溶液加入 96 孔板, 再加入 195 μL DPPH 试剂液, 阴性对照为 5 μL DMSO+195 μL DPPH 试剂液, 空白组为 200 μL 甲醇; 25℃下遮光反应 30 min 后, 用酶标仪测定 517 nm 处的 OD 值; 每个样品独立重复 3 次, 计算 DPPH 自由基清除率(%)=[1-(OD_{样品}-OD_{空白})/(OD_{阴性}-OD_{空白})]×100%。

2 结果和讨论

本研究采用有机溶剂萃取分部、正相硅胶和凝胶柱层析以及 HPLC 等分离技术, 首次对升振山姜茎乙醇提取物的化学成分进行了研究, 分别从石油醚、氯仿和乙酸乙酯部位分离得到 10 个黄酮化合物。通过光谱分析和文献数据比较, 分别鉴定为(-)-乔松素 (1)、(±)-山姜素 (2)、(±)-7,4'-二羟基-5-甲氧基二氢黄酮 (3)、4',6'-二羟基-2'-甲氧基二氢查

尔酮 (4)、小豆蔻明 (5)、蜡菊亭 (6)、(+)-儿茶素 (7)、(-)-表儿茶素 (8)、原花青素 A1 (9)和原花青素 A6 (10)。体外自由基清除活性测试结果表明(表 1), (+)-儿茶素 (7)、原花青素 A1 (9)和原花青素 A6 (10)对 ABTS 和 DPPH 自由基均有显著的清除活性 (IC₅₀<10 μmol L⁻¹), 均强于阳性对照 L-抗坏血酸。此外, 化合物 1、3 和 5 也表现出显著的 ABTS 自由基清除活性, 其 IC₅₀ 值分别为 7.9、10.7 和 7.5 μmol L⁻¹, 强于阳性对照 L-抗坏血酸(IC₅₀=17.7 μmol L⁻¹), 但三者没有表现出 DPPH 自由基清除活性(IC₅₀>250 μmol L⁻¹)。

表 1 化合物 1~10 和 L-抗坏血酸的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of compounds 1-10 and L-ascorbic acid

化合物 Compound	ABTS (IC ₅₀ , μmol L ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀ , μmol L ⁻¹)
1	7.9±0.2	>250
2	27.8±0.1	>250
3	10.7±0.1	>250
4	>250	>250
5	7.5±0.5	>250
6	21.0±0.1	90.4±0.3
7	5.8±0.2	7.4±0.3
8	13.6±0.1	16.9±0.3
9	4.8±0.2	6.3±0.3
10	3.1±0.1	3.8±0.2
L-抗坏血酸 L-Ascorbic acid	17.7±0.4	36.2±0.2

结果表明, 不同方法所得的抗氧化活性差异明显, 除化合物 6 对 ABTS 和 DPPH 均具有中等或较弱的活性外, 仅有具备邻位酚羟基的儿茶素类和原花青素类黄酮化合物(化合物 7~10)才同时具备显著的 ABTS 和 DPPH 自由基清除活性, 关于它们的抗氧化活性和用途有过不少报道^[15-18], 是功能食品、化妆品等领域重要的天然抗氧化剂。此外, 乔松素 (1)、山姜素 (2)和小豆蔻明 (5)作为升振山姜亲本草豆蔻药材(种子团)的主要特征性成分, 是草豆蔻发挥降血糖、抗炎、抗肿瘤以及止吐暖胃等功效的主要成分^[19-21]。

山姜属植物地上部位发达, 尤其是升振山姜植株高达 1.5~2.2 m, 茎生物量大。本研究表明升振山姜茎中含有丰富的黄酮类功效成分, 其中包括较高含量的草豆蔻药材药效成分乔松素 (1)、山姜素 (2)和小豆蔻明 (5)以及抗氧化活性显著的儿茶素 (7)和花青素类黄酮, 为杂交新品种升振山姜的资源综合利用提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] HU J Z, YE Y S, ZOU P, et al. Studies on the hybrid breeding and biological characteristics of zingiberaceous plant (*Alpinia hainanensis* 'Shengzhen') [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2011, 19(3): 279–282. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.03.014.
胡建竹, 叶育石, 邹璞, 等. 升振山姜的选育和生物学特性研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(3): 279–282. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.03.014.
- [2] WEN Q, PANG Y X, YANG Q, et al. Progress on the resources and exploitation of medicinal edible plants in Hainan Island [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2015, 31(1): 126–131. doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2015.01.028.
闻庆, 庞玉新, 杨全, 等. 海南岛药食同源植物资源及其开发利用现状 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(1): 126–131. doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2015.01.028.
- [3] NGO K S, BROWN G D. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(6): 1117–1123. doi: 10.1016/S0031-9422(98)80083-6.
- [4] CHOI J K, KIM K M, KIM D K, et al. Topical anti-inflammatory and antipruritic effects of *Alpinia katsumadai* extracts [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 53(1): 81–84. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.07.008.
- [5] LI Y Y, YANG L, WANG C H, et al. Chemical constituents from seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata and their anti-tumor activity [J]. *Acta Univ Trad Med Sin Pharmacol Shanghai*, 2010, 24(1): 72–75.
李元圆, 杨莉, 王长虹, 等. 草豆蔻化学成分及体外抗肿瘤作用研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2010, 24(1): 72–75.
- [6] WANG X B, YANG C S, HUA S Z, et al. Chemical constituents from the seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(6): 419–421.
- [7] WANG X Q, YANG X J, LI J S. Studies on chemical constituents of *Alpinia katsumadai* [J]. *J Chin Med Mat*, 2008, 31(6): 853–855. doi: 10.3321/j.issn:1001-4454.2008.06.019.
王秀芹, 杨孝江, 李教社. 草豆蔻化学成分研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(6): 853–855. doi: 10.3321/j.issn:1001-4454.2008.06.019.
- [8] HUFFORD C D, OGUNTMEIN B O. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis* [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(9): 2036–2038. doi: 10.1016/0031-9422(80)83036-6.
- [9] NGUYEN P H, ZHAO B T, LEE J H, et al. Antithrombotic phenolics from the stems of *parthenocissus tricuspidata* possess anti-inflammatory effect [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2014, 35(6): 1763–1768. doi: 10.5012/bkcs.2014.35.6.1763.
- [10] SETO R, NAKAMURA H, NANJO F, et al. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(9): 1434–1439. doi: 10.1271/bbb.61.1434.
- [11] LOU H X, YAMAZAKI Y, SASAKI T, et al. A-type proanthocyanidins from peanut skins [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 297–308. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00736-5.
- [12] KAMIYA K, WATANABE C, ENDANG H, et al. Studies on the constituents of bark of *Parameria laevigata* Moldenke [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(5): 551–557. doi: 10.1248/cpb.49.551.
- [13] YANG D, XIE H H, JIANG Y M, et al. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities [J]. *Food Chem*, 2016, 194: 857–863. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.091.
- [14] MA Q, XIE H H, LI S, et al. Flavonoids from the pericarps of *Litchi chinensis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(5): 1073–1078. doi: 10.1021/jf405750p.
- [15] XU X Y, XIE H H, WANG Y F, et al. A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(22): 11667–11672. doi: 10.1021/jf1033202.
- [16] MALDONADO P D, RIVERO-CRUZ I, MATA R, et al. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6): 1996–2001. doi: 10.1021/jf0483725.
- [17] YILMAZ Y, TOLEDO R T. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(2): 255–260. doi: 10.1021/jf030117h.
- [18] KUMAZAWA S, TANIGUCHI M, SUZUKI Y, et al. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(2): 373–377. doi: 10.1021/jf010938r.
- [19] PROMSAN S, JAIKUMKAO K, PONGCHAIDECHA A, et al. Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(8): 808–818. doi: 10.1139/cjpp-2015-0468.
- [20] HU K, YANG Y, TU Q Y, et al. Alpinetin inhibits LPS-induced inflammatory mediator response by activating PPAR- γ in THP-1-derived macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 721(1/2/3): 96–102. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.049.
- [21] MOREIRA G L, MARIA V I, ANTÓNIO R J. An overview on cardamonin [J]. *J Med Food*, 2014, 17(6): 633–640. doi: 10.1089/jmf.2013.0061.