

本文引用: 付 港, 肖时雨, 姚清颖, 张在其, 江星明, 李 斌. 三叶委陵菜化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 460-466.

三叶委陵菜化学成分及其抗氧化活性研究

付 港^{1,2}, 肖时雨^{1,2}, 姚清颖^{1,2}, 张在其³, 江星明^{1,2*}, 李 斌^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南省中医药民族医药国际联合实验室, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南省天然药物资源与功能实验室, 湖南 长沙 410208; 3. 湖南医药学院医药研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000

[摘要] **目的** 研究三叶委陵菜(*Potentilla freyniana* Bormm.)根二氯甲烷部位和乙酸乙酯部位的化学成分, 并筛选其抗氧化活性成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、半制备高效液相等色谱技术分离纯化其醇提物的二氯甲烷和乙酸乙酯萃取部位, 利用核磁共振波谱、质谱等技术对所得化合物的结构进行鉴定。通过羟自由基清除实验、DPPH 自由基清除实验以及 ABTS 自由基清除实验, 对黄酮类化合物 **7** 和 **9** 的抗氧化活性展开测定。**结果** 从三叶委陵菜中分离得到 17 个化合物, 鉴定为胡萝卜苷(**1**)、 β -谷甾醇(**2**)、7-酮- β -谷甾醇(**3**)、柚皮素(**4**)、红花素(**5**)、香橙素(**6**)、圣草酚(**7**)、槲皮素(**8**)、儿茶素(**9**)、thunberginol C(**10**)、杜鹃醇(**11**)、4-(4-carboxy-2-methoxyphenoxy)-3,5-dimethoxybenzoic acid(**12**)、邻苯二甲酸丁二酯(**13**)、香草酸(**14**)、原儿茶酸(**15**)、对羟基苯甲酸(**16**)、莲花掌苷(**17**)。其中, 化合物 **4** 为首次从该植物中分离得到, 化合物 **3**、**10**、**12**、**13**、**14** 为首次从该属植物中分离得到。化合物 **7** (浓度大于 5 mmol/L) 和化合物 **9** (浓度大于 2 mmol/L) 两个化合物对羟自由基的清除率均超过 90%、对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率均超过 95%, 抗氧化水平与维生素 C 相近。**结论** 化合物 **7** 和 **9** 在抗氧化和抗炎潜力方面表现了一定活性潜力, 为三叶委陵菜的化学成分和生物活性提供了一些实验依据和科学参考, 推动了其活性成分的进一步开发与利用。

[关键词] 委陵菜属; 三叶委陵菜; 化学成分; 甾体; 黄酮; 抗氧化

[中图分类号] R284.2

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.03.010

Chemical constituents and antioxidant activity of *Potentilla freyniana* Bormm.

FU Gang^{1,2}, XIAO Shiyu^{1,2}, YAO Qingying^{1,2}, ZHANG Zaiqi³, JIANG Xingming^{1,2*}, LI Bin^{1,2*}

1. TCM and Ethnomedicine Innovation & Development International Laboratory, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Province Laboratory of Natural Medicinal Resources and Functions, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Dong Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents of the dichloromethane and ethyl acetate fractions of the roots of *Potentilla freyniana* Bormm. and to screen for their antioxidant active components. **Methods** The dichloromethane and ethyl acetate fractions of the ethanol extract were separated and purified using silica gel chromatography, gel chromatography, and semi-preparative HPLC. The structures of the isolated compounds were identified by NMR and MS. The antioxidant activities of the flavonoids **7** and **9** were evaluated through hydroxyl radical scavenging assay, DPPH radical scavenging assay, and ABTS radical scavenging assay. **Results** Seventeen compounds were isolated from *P. freyniana* and identified as daucosterol (**1**), β -sitosterol (**2**), 7-keto- β -sitosterol (**3**), naringenin (**4**), carthamidin (**5**), dihydrokaempferol (**6**), eriodictyol (**7**), quercetin (**8**), catechin (**9**),

[收稿日期] 2024-12-27

[基金项目] 湖南医药学院医药研究湖南省重点实验室(2017CT5025); 湖南中医药大学研究生创新项目(2022CX71)。

[通信作者] * 李 斌, 女, 教授, 博士研究生导师, E-mail: libin@hnuem.edu.cn; 江星明, 男, 高级实验师, E-mail: jxm519@qq.com。

thunberginol C (10), rhododenol (11), 4-(4-carboxy-2-methoxyphenoxy)-3,5-dimethoxybenzoic acid (12), butylene phthalate (13), vanillic acid (14), protocatechuic acid (15), phydroxybenzoic acid (16), and lindleyin (17). Among them, compound 4 was identified from this plant for the first time, and compounds 3, 10, 12, 13, and 14 were separated from this genus for the first time. When the concentration of compound 7 exceeds 5 mmol/L and the concentration of compound 9 exceeds 2 mmol/L, the scavenging rate of hydroxyl radicals exceeds 90%, and the scavenging rates of DPPH radicals and ABTS radicals exceed 95%. The antioxidant level is similar to that of VC, indicating significant antioxidant performance. **Conclusion** Compounds 7 and 9 exhibited certain potential in antioxidant and anti-inflammatory activities. This study provides some experimental basis and scientific references for the chemical composition and biological activity of *Potentilla freyniana* Bornm., promoting the further development and utilization of its active components.

[**Keywords**] *Potentilla L*; *Potentilla freyniana* Bornm.; chemical constituents; steroid; flavone; antioxidation

三叶委陵菜(*Potentilla freyniana* Bornm.)是蔷薇科委陵菜属的多年生草本植物^[1],分布于我国湖南、湖北、广西等地,生长于海拔300~2100 m的山坡草地、溪边及林下阴湿处,别名有地蜂子、蜂子芪、软梗蛇扭、毛猴子、独脚伞、独脚委陵菜、三爪金、地蜘蛛、铁枕头、三叶翻白草等^[2]。三叶委陵菜使用范围广泛,在《浙江民间常用草药》《湖南药物志》《秦岭巴山天然药物志》等均有收录^[3],其以根或全草入药,夏秋采收,鲜用或晒干,味苦微辛,性微寒,归胃、肾、大肠经,功效清热解毒、止痛止血。其常用于肠炎、痢疾;牙痛、胃痛、腰痛;月经过多、产后或流产后出血过多;骨髓炎、骨结核;跌打损伤、创伤出血、胃肠出血;烧烫伤、虫蛇咬伤^[1-2]。目前研究显示,三叶委陵菜的主要次生代谢产物为三萜类和黄酮类,具有抗菌、镇痛、抗炎、抗氧化及抗病毒等活性^[4]。本实验对三叶委陵菜根部醇提物的二氯甲烷和乙酸乙酯萃取部位的化学成分开展了研究,利用多种色谱分离技术与波谱分析方法对化合物进行分离和结构鉴定,结果从三叶委陵菜中分离得到17个化合物。分别为胡萝卜苷(1)、 β -谷甾醇(2)、7-酮- β -谷甾醇(3)、柚皮素(4)、红花素(5)、香橙素(6)、圣草酚(7)、槲皮素(8)、儿茶素(9)、香豆素(10)、杜鹃醇(11)、4-(4-carboxy-2-methoxyphenoxy)-3,5-dimethoxybenzoic acid(12)、邻苯二甲酸丁二酯(13)、香草酸(14)、原儿茶酸(15)、对羟基苯甲酸(16)、莲花掌苷(17)。并对二氯甲烷和乙酸乙酯萃取部位中的化合物7和9进行抗氧化活性评估。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

N-1300 旋转蒸发器(日本理化器械株式会社);6200 TOF/6500 型质谱仪、Agilent 1206 半制备HPLC 仪(美国 Agilent 公司);AV-600 核磁共振仪(德国

Bruker 公司);SB-5200DT 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技);ME204e 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 有限公司);WFH-203B 暗箱式紫外分析仪(杭州齐威仪器公司);多功能酶标仪(美国热电公司);无水甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);Sephadex LH-20 凝胶(通用电气医疗系统有限公司);薄层色谱硅胶板(GF254 5 cm*10 cm,烟台江友硅胶开发有限公司);柱层析硅胶填料(80-100目、200-300目、300-400目,青岛海洋化工有限公司);浓硫酸-香草醛显色剂(1%硫酸-香草素,自制);Elabscience 羟自由基清除能力比色法测试盒(批号:FU04FNX89641,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);DHHP 自由基清除能力检测试剂盒(批号:2407004)、ABTS 自由基清除能力检测试剂盒(批号:2404003)均购自北京索莱宝科技有限公司。FeCl₃·6H₂O(20 mmol/L)50 mL;0.3 mol/L 醋酸缓冲液(pH 3.6)500 mL。

1.2 药材来源

三叶委陵菜药材来源于湖南省怀化市,经湖南中医药大学药学院王智副教授鉴定为蔷薇科委陵菜属植物三叶委陵菜(*Potentilla freyniana* Bornm)的根。其标本(HTGPYY-1041)存放于湖南中医药大学湖南省中医药民族医药国际联合实验室。

1.3 提取与分离

三叶委陵菜根(10 kg)粉碎后,用95%乙醇于常温下浸渍,每次15 d,重复3次。合并提取液并减压浓缩,得到总浸膏600 g。总浸膏用水悬浊后,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取,减压浓缩得到石油醚部位浸膏2.5 g、二氯甲烷部位浸膏41.5 g、乙酸乙酯部位浸膏96.3 g和正丁醇部位浸膏325.2 g,选择二氯甲烷部位和乙酸乙酯部位进行进一步研究。

二氯甲烷部位浸膏(40 g)与硅胶(80-100 目)拌样,干法上样,经硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯,1:0-0:1)梯度洗脱,TLC 分析后合并流分,得到 14 个组分(C1~C14)。二氯甲烷部位浸膏(40 g)与硅胶(80-100 目)拌样,干法上样,经硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯,1:0-0:1)梯度洗脱,TLC 分析后合并流分,得到 14 个组分(C1~C14)。C10 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(氯仿-甲醇,1:1)和硅胶柱色谱分离,最终通过半制备 HPLC(0~20 min,98%甲醇,3 mL·min⁻¹)得到化合物 **3**(4.8 mg)。C11 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离后,采用半制备 HPLC(0~20 min,80%~100%甲醇,3 mL·min⁻¹)分离纯化,得到化合物 **11**(2.6 mg)和化合物 **4**(5.2 mg)。C12 经过多次硅胶柱色谱二氯甲烷-甲醇(50:1)及半制备 HPLC(0~20 min,40%~50%乙腈,3 mL·min⁻¹)分离后,得到化合物 **10**(1.7 mg)。

乙酸乙酯部位浸膏(96.3 g)与硅胶拌样,干法上样,经硅胶柱色谱二氯甲烷:甲醇(100:0-85:15),二氯甲烷:甲醇:水(15:2:0.25-8:2:0.25),乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇:水(6:4:4:1)梯度洗脱,得到 5 个组分(F1~F5)。F2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及半制备 HPLC 分离,得到化合物 **14**(2.5 mg)、化合物 **5**(24 mg)、化合物 **2**(4.2 mg)和化合物 **1**(2.7 mg)。F3 经过硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,最终通过 HPLC(0~20 min,30%~90%甲醇,3 mL·min⁻¹)分离得到化合物 **6**(4.1 mg)、化合物 **7**(6.8 mg)、化合物 **8**(9.6 mg)、化合物 **12**(13.7 mg)和化合物 **15**(2.1 mg)。F4 通过 ODS 反相硅胶柱色谱及 HPLC 分离,得到化合物 **9**(26.9 mg)、化合物 **13**(13.5 mg)、化合物 **17**(5.7 mg)和化合物 **16**(2.5 mg)。通过 TLC、HPLC 和光谱分析等手段对分离化合物进行结构鉴定,最终得到 17 个化合物。

1.4 抗氧化活性检测

1.4.1 羟自由基清除能力测定 按照参考文献[5]描述的方法使用 Solarbio 试剂盒进行羟自由基清除实验,依次吸取 0.15 mL 的缓冲液,0.3 mL 的 FeSO₄ 溶液和 H₂O₂ 溶液,测定管吸取浓度梯度的 0.15 mL 的待测定化合物,充分反应后加入水杨酸溶液,维生素 C 为阳性对照,37 °C 温度下避光反应 60 min,10 000 r/min,离心半径 15 cm、常温离心 10 min,除去沉淀,取上清液测定 536 nm 处测吸光度值。

计算清除率: $D\% = \frac{A_1 - A_3}{A_1 - A_2} \times 100\%$ 。其中, A₁: 对照

孔 OD 值(蒸馏水代替样品溶液); A₂: 空白孔 OD 值(蒸馏水和水杨酸溶液); A₃: 测定孔 OD 值(样品溶液和羟自由基清除能力测定溶液)。

1.4.2 2,2-二苯基-1-苦基肼自由基 (DPPH 自由基)清除能力测定 按照参考文献[6]描述的方法使用 Solarbio 试剂盒进行 DPPH 自由基清除实验,按照浓度梯度吸取待测化合物 10 μL,加入 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 190 μL,维生素 C 为阳性对照,避光反应 30 min,515 nm 处测吸光值,计算清除率。

DPPH 自由基清除率 $D\% = \frac{A_2 - (A_3 - A_1)}{A_2} \times 100\%$ 。其中, A₁—对照孔 OD 值(75%的乙醇和样品溶液); A₂—空白孔 OD 值(样品溶液和 DPPH); A₃—测定孔 OD 值(样品溶液和 DPPH)。

1.4.3 2,2'-氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基 (ABTS 阳离子自由基)清除能力测定 参考文献[7]描述的方法使用 Solarbio 试剂盒进行 ABTS 自由基清除实验,按照浓度梯度吸取待测化合物 50 μL,加入 850 μL ABTS 工作液,室温避光静置 6 min,测定 405 nm 处的吸光度,维生素 C 为阳性对照,计算清除率。

ABTS 自由基清除率 $D\% = \frac{A_2 - (A_3 - A_1)}{A_1} \times 100\%$ 。其中, A₁—对照孔 OD 值(磷酸盐缓冲液和 ABTS); A₂—空白孔 OD 值(蒸馏水和 ABTS); A₃—测定孔 OD 值(样品溶液和 ABTS)。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1** 无色粉末(甲醇)。香草醛-浓硫酸薄层色谱显色为蓝紫色,通过电喷雾离子化质谱(ESI-MS)对化合物 **1** 进行分子量检测,从而确定该化合物的分子量为 576.40,分子式 C₃₅H₆₀O₆,不饱和度 6。经 3 种不同的展开剂(氯仿:甲醇:水=7:2:1;二氯甲烷:甲醇=7:3;正丁醇:醋酸:水=4:1:5) TLC 检测与已知胡萝卜苷的对照品对比一致,故鉴定化合物 **1** 为胡萝卜苷。

化合物 **2** 无色针状晶体(甲醇)。香草醛-浓硫酸薄层色谱显色为蓝紫色,通过 ESI-MS 对化合物 **2** 进行分子量检测,从而确定该化合物的分子量为 414.40,分子式 C₂₉H₅₀O,不饱和度为 5。经 3 种不同剂(石油醚:乙酸乙酯=8:2;氯仿:丙酮=10:1;正己

烷:乙酸乙酯=7:3)TLC 检测与已知 β -谷甾醇的对照品对比一致,故鉴定化合物**2**为 β -谷甾醇。

化合物**3**无色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 430.40 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 3.58(1H, m, H-3), 5.66(1H, brs, H-6), 1.25(3H, s, H_3 -19), 0.74(3H, s, H_3 -18), 0.98(1H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.87(1H, d, $J=6.9$ Hz, H-26), 0.85(1H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.88(1H, t, $J=7.4$ Hz, H-29); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 37.6(C-1), 31.9(C-2), 71.2(C-3), 42.7(C-4), 169.1(C-5), 126.3(C-6), 204.7(C-7), 46.6(C-8), 51.5(C-9), 39.7(C-10), 22.3(C-11), 40.1(C-12), 44.3(C-13), 51.5(C-14), 27.2(C-15), 29.6(C-16), 56.1(C-17), 12.0(C-18), 17.7(C-19), 37.4(C-20), 19.4(C-21), 35.1(C-22), 27.4(C-23), 47.3(C-24), 30.4(C-25), 19.5(C-26), 20.2(C-27), 24.2(C-28), 12.4(C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[8],故鉴定化合物**3**为7-酮- β -谷甾醇。

化合物**4**浅黄色固体(甲醇)。ESI-MS m/z : 274.10 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.31(1H, dd, $J=12.9, 2.9$ Hz, H-2), 3.11(1H, dd, $J=17.1, 12.9$ Hz, H-3a), 2.70(1H, d, $J=17.1, 2.9$ Hz, H-3b), 5.88(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.89(1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 7.31(2H, d, $J=8.1$ Hz, H-2' \prime 6'), 6.82(2H, d, $J=8.2$ Hz, H-3' \prime 5'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 80.5(C-2), 44.1(C-3), 197.8(C-4), 165.5(C-5), 97.1(C-6), 168.5(C-7), 96.2(C-8), 164.9(C-9), 103.3(C-10), 131.1(C-1'), 129.0(C-2' \prime 6'), 116.3(C-3' \prime 5'), 159.0(C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[9],故鉴定化合物**4**为柚皮素。

化合物**5**浅黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 289.20 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.89(1H, m, H-8), 7.31(2H, d, $J=8.2$ Hz, H-2' \prime 6'), 6.82(2H, d, $J=8.1$ Hz, H-3' \prime 5'), 2.70(2H, dd, $J=17.1, 13.0$ Hz, H-3), 5.34(1H, dd, $J=13.0, 3.1$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 80.5(C-2), 44.1(C-3), 197.8(C-4), 165.9(C-5), 128.0(C-6), 159.0(C-7), 96.2(C-8), 165.4(C-9), 103.3(C-10), 131.1(C-1'), 129.0(C-2' \prime 6'), 116.3(C-3' \prime 5'), 168.4(C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[10],故鉴定化合物**5**为红花素。

化合物**6**浅黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 289.30 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.78(1H, brs, H-6), 5.78(1H, brs, H-8), 7.31(2H, d, $J=8.6$ Hz,

H-2' \prime 6'), 6.79(2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3' \prime 5'), 4.91(1H, d, $J=11.6$ Hz, H-2), 4.48(1H, d, $J=11.5$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 80.5(C-2), 73.6(C-3), 197.7(C-4), 164.5(C-5), 97.0(C-6), 164.5(C-7), 97.0(C-8), 164.5(C-9), 101.2(C-10), 129.5(C-1'), 130.4(C-2' \prime 6'), 116.1(C-3' \prime 5'), 159.2(C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[11],故鉴定化合物**6**为香橙素。

化合物**7**浅黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 289.30 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.84(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.86(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.88(1H, d, $J=1.7$ Hz, H-2'), 6.70-6.78(2H, m, H-5' \prime 6'), 2.66(1H, dd, $J=17.1, 3.1$ Hz, H-3), 3.03(1H, dd, $J=17.1, 12.8$ Hz, H-3), 5.24(1H, dd, $J=12.8, 3.0$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 80.5(C-2), 44.1(C-3), 197.8(C-4), 165.5(C-5), 97.0(C-6), 168.4(C-7), 96.2(C-8), 164.9(C-9), 103.3(C-10), 131.8(C-1'), 114.7(C-2'), 146.5(C-3'), 146.9(C-4'), 116.2(C-5'), 119.2(C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[12],故鉴定化合物**7**为圣草酚。

化合物**8**浅黄色固体(甲醇)。ESI-MS m/z : 301.20 $[M-H]^+$; 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 600 MHz) δ_H : 6.39(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.16(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 7.65(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.86(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.51(1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz, H-6'); ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 150 MHz) δ_C : 146.8(C-2), 135.8(C-3), 1176.0(C-4), 156.1(C-5), 98.2(C-6), 160.7(C-7), 93.4(C-8), 163.9(C-9), 103.1(C-10), 122.0(C-1'), 115.6(C-2'), 145.1(C-3'), 147.7(C-4'), 115.1(C-5'), 120.0(C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[13],故鉴定化合物**8**为槲皮素。

化合物**9**白色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 290.55 $[M+H]^+$; 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.91(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 5.83(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.88(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.74(1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.69(1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 2.82(1H, dd, $J=16.1, 5.4$ Hz, H-4), 2.48(1H, dd, $J=16.1, 8.1$ Hz, H-4), 4.54(1H, d, $J=7.5$ Hz, H-2), 3.99-3.91(1H, m, H-3); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 82.8(C-2), 68.8(C-3), 28.5(C-4), 157.7(C-5), 96.3(C-6), 167.5(C-7), 95.5(C-8), 100.9(C-9), 156.9(C-10), 132.2(C-1'), 115.3(C-2'), 146.2(C-3'), 146.2(C-4'), 116.1

(C-5'), 120.1(C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[14],故鉴定化合物 **9** 为儿茶素。

化合物 **10** 黄色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 274.30 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 5.49(1H, dd, $J=12.1, 3.2$ Hz, H-3), 3.27(1H, dd, $J=16.6, 12.3$ Hz, H-4a), 3.02(1H, dd, $J=16.5, 3.2$ Hz, H-4b), 6.27(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-5), 6.23(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-7), 7.32(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2'/6'), 6.82(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3'/5'); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 171.8(C-1), 82.1(C-3), 35.9(C-4), 107.9(C-5), 166.4(C-6), 102.3(C-7), 165.7(C-8), 143.7(C-4a), 101.7(C-8a), 130.7(C-1'), 129.0(C-2'/6'), 116.3(C-3'/5'), 159.1(C-4')。以上数据与已知化合物^[15]报道数据一致,故鉴定化合物 **10** 为香豆素类化合物 thunberginol C。

化合物 **11** 棕红色油状物(甲醇)。ESI-MS m/z : 168.10 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 1.18(3H, d, $J=6.2$ Hz, H-1), 3.72(1H, m, H-2), 1.68(1H, m, H-3a), 1.68(1H, m, H-3b), 2.63(1H, m, H-4a), 2.55(1H, m, H-4b), 7.01(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2'/6'), 6.69(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'/5'); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 23.5(C-1), 67.9(C-2), 42.4(C-3), 32.3(C-4), 134.4(C-1'), 130.2(C-2'/6'), 116.1(C-3'/5'), 156.3(C-4'), 其旋光度为 -15.0° 。以上数据与文献报道基本一致^[16],故鉴定化合物 **11** 为杜鹃醇。

化合物 **12** 白色粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 384.50 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 7.42-7.38(2H, s, H-2, 6), 7.18(2H, m, H-2', 6'), 6.69(1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5'), 3.74(3H, s, 5-OCH₃), 3.74(3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 56.7(5-OCH₃), 56.4(3'-OCH₃), 170.0(C-7), 170.0(C-7'), 121.9(C-1), 108.2(C-2/6), 148.8(C-3/5), 123.0(C-1'), 113.7(C-2'), 152.7(C-3'), 148.6(C-4'), 115.8(C-5'), 125.3(C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[17],故鉴定化合物 **12** 为 4-(4-carboxy-2-methoxyphenoxy)-3,5-dimethoxybenzoic acid。

化合物 **13** 白色无定型粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 225.30 $[M+H]^+$; 1H -NMR($DMSO-d_6$, 600 MHz) δ_H : 7.67(2H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz, H-3/6), 7.73(2H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz, H-4/5), 4.23(4H, t, $J=6.6$ Hz, H-1'/1''), 1.71-1.59(4H, m, H-2'/2''), 1.45-1.31(4H, m, H-3'/3''), 0.92(6H, t, $J=7.4$ Hz, H-4'/4''); ^{13}C -NMR(DM-

SO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 131.7(C-1/2), 128.7(C-3/6), 131.5(C-4/5), 65.0(C-1'/1''), 30.0(C-2'/2''), 18.7(C-3'/3''), 13.6(C-4'/4''), 167.0(-COO-)。以上数据与文献报道基本一致^[18],故鉴定化合物 **13** 为邻苯二甲酸丁二酯。

化合物 **14** 白色无定型粉末(甲醇)。ESI-MS m/z : 169.20 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 7.47-7.58(2H, m, H-2/6), 6.82(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 3.88(3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 123.4(C-1), 115.8(C-2), 148.6(C-3), 152.6(C-4), 113.8(C-5), 125.2(C-6), 170.3(C-7), 56.4(3-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[19],故鉴定化合物 **14** 为香草酸。

化合物 **15** 无定形粉末(甲醇)。ESI-MS: m/z : 156.70 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 7.38(1H, brs, H-2), 6.73(1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5), 7.36(1H, brs, H-6); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 123.7(C-1), 115.6(C-2), 145.9(C-3), 151.1(C-4), 117.7(C-5), 123.7(C-6), 171.6(C-7)。以上数据与文献报道基本一致^[20],故鉴定化合物 **15** 为原儿茶酸。

化合物 **16** 无色粉末(甲醇)。香草醛-浓硫酸薄层色谱荧光下显示暗斑,过电喷雾离子化质谱(ESI-MS)对化合物 **16** 进行分子量检测,从而确定该化合物分子量为 135.10,分子式 $C_7H_6O_3$,不饱和度 5。经 3 种不同的展开剂[氯仿:甲醇:水=85:15:2;二氯甲烷:甲醇=8:2;正丁醇:醋酸:水=4:1:5(需饱和)]TLC 检测与已知对羟基苯甲酸的对照品对比一致,故鉴定化合物 **16** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **17** 无色晶体(甲醇)。ESI-MS m/z : 495.60 $[M+H]^+$; 1H -NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ_H : 6.89(2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2'/6'), 6.93(2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3'/5'), 7.06(2H, s, H-2''/6''), 2.73-2.54(2H, m, H-3), 2.73-2.54(2H, m, H-4), 2.08(1H, s, H-1), 4.77(1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ_C : 30.4(C-1), 29.9(C-3), 45.8(C-4), 136.3(C-1'), 130.2(C-2'/6'), 117.8(C-3'/5'), 121.3(C-1''), 110.3(C-2''/6''), 146.6(C-3''/5''), 140.1(C-4''), 211.5(C-2), 168.2(C-7''), 102.5(C-1''), 75.6(C-2''), 78.0(C-3''), 72.1(C-4''), 74.9(C-5''), 65.0(C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[21],故鉴定化合物 **17** 为莲花掌苷。

2.2 抗氧化结果

随着样品浓度的增加,化合物7和9的自由基清除能力逐渐增强,且清除率呈上升趋势。以对照品维生素C为标准,所有浓度下的清除率均为100%。在5 mmol/L浓度下,化合物7的羟自由基清除率为90.49%,而化合物9在2.5 mmol/L浓度时达到最高值93.24%。在DPPH自由基清除率方面,化合物7在浓度大于4 mmol/L时清除率可超过95%,化合物9在浓度大于0.75 mmol/L时也能达到95%以上。在ABTS自由基清除率方面,化合物7在浓度大于5 mmol/L时清除率超过95%,而化合物9在浓度大于1.5 mmol/L时亦可达到95%以上。不同浓度下化合物7和化合物9的羟自由基、DPPH自由基和ABTS自由基清除率见表1。

3 讨论

本实验对三叶委陵菜的二氯甲烷部位和乙酸乙酯部位的化学成分进行了系统研究,采用多种分离纯化方法,共分离得到17个化合物,并对其化学结构进行了鉴定。结果表明,其中化合物1~3为甾体类,4~10为黄酮类,11~17为苯环衍生物。值得注意的是,化合物4为首次从该植物中分离得到,而化合物3、10、12、13、14则是首次从该属植物中分离得到。

在生物活性研究方面,抗氧化能力是一项重要

的评估指标,能够间接反映化合物的抗炎、抗衰老等潜在作用^[22]。本研究选择了羟自由基、DPPH自由基和ABTS自由基3种常用的抗氧化测定方法,以全面评估化合物的抗氧化活性,自由基清除率越高,抗氧化能力越强。其中,羟自由基是导致氧化应激的重要因子,DPPH自由基可直接反映化合物的自由基清除能力,而ABTS自由基测定方法适用于亲水性和疏水性化合物的抗氧化评价^[23-24]。

在抗氧化活性筛选过程中,重点评估了化合物7和化合物9。选择这两种化合物的主要原因如下:首先,它们均为多酚类化合物,已有文献表明多酚类化合物具有显著的抗氧化特性;其次,化合物9在提取部位中的相对含量较高,具有代表性;此外,它们的结构特征,如酚羟基和双键,使其具备优异的自由基清除能力;同时,这两种化合物稳定性良好,实验操作简便,适合用于活性筛选研究^[25-26]。因此,对其抗氧化能力的深入研究,有助于进一步挖掘三叶委陵菜的潜在生物活性。

抗氧化活性与抗炎活性之间存在紧密的关联。研究表明,氧化应激可诱发炎症反应,而自由基的过度产生会激活炎症信号通路,进而导致组织损伤和疾病发生^[27]。因此,抗氧化能力的评估不仅有助于预测化合物的抗炎潜力,同时,抗氧化测定方法具有操作简便、灵敏度高的优势,可快速筛选出具有较好抗

表1 化合物7和9的羟自由基、DPPH和ABTS的清除率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Hydroxyl radical, DPPH, and ABTS scavenging rates of compounds 7 and 9 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物7 浓度/(mmol/L)	清除率/%	化合物9 浓度/(mmol/L)	清除率/%
羟自由基			
1	47.80±3.35	0.5	51.14±1.13
2	68.12±2.16	1	66.81±0.41
3	79.68±2.10	1.5	82.30±0.53
4	89.16±2.06	2	91.15±1.01
5	90.05±2.10	2.5	92.93±0.58
DPPH			
0.5	29.23±2.72	0.25	71.40±0.94
1	53.49±0.51	0.325	89.90±0.77
4	96.31±0.21	0.5	91.02±0.38
6	97.24±0.27	0.75	96.66±0.76
8	96.22±0.28	1.5	96.12±0.93
ABTS			
0.1	28.91±2.05	0.375	73.22±2.99
0.25	60.75±3.41	0.5	77.35±4.64
0.5	73.94±3.87	0.75	90.04±0.23
1	88.28±0.49	1.5	97.96±0.04
5	97.69±0.06	2	96.55±0.13

炎潜力的候选化合物,为进一步研究提供科学依据。实验结果显示,化合物 7 和化合物 9 对羟自由基、DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率均随浓度增加而显著提高,且在高浓度条件下,清除率均超过 95%,表现出较强的抗氧化效果。这一结果验证了两种化合物在抗氧化方面的应用潜力。

综上所述,本研究不仅丰富了三叶委陵菜的化学成分,为其物质基础研究提供了实验依据,同时,通过抗氧化活性评估,为该植物活性成分的进一步开发和利用提供了科学参考。

参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志: 第 37 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 328.
- [2] 黄费炳, 吴嘉, 盛文兵, 等. 三叶委陵菜的化学成分和药理作用研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(8): 1039-1044.
- [3] 浙江省卫生局. 浙江民间常用草药: 第 3 集[M]. 杭州: 浙江人民出版社, 1979: 123-126.
- [4] 吴嘉, 张在其, 余黄合, 等. 委陵菜属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1509-1538.
- [5] DU S, ZHOU N Y, XIE G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. Nano Energy, 2021, 85: 106004.
- [6] WU X Y, ZHU H F, SONG C H, et al. Breadmaking-inspired antioxidant porous yeast microcarriers for stem cell delivery in diabetic wound treatment[J]. Advanced Materials, 2024, 36(2): e2309719.
- [7] CUI C Y, MEI L, WANG D Y, et al. A self-stabilized and water-responsive deliverable coenzyme-based polymer binary elastomer adhesive patch for treating oral ulcer[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 7707.
- [8] DELLA GRECA M, MONACO P, PREVITERA L. Stigmasterols from *Typha latifolia*[J]. Journal of Natural Products, 1990, 53(6): 1430-1435.
- [9] LIN W M, LIANG H Y, LIANG N, et al. Isolation and identification of the flavonoids constituents from *Dryopteris championii*[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32: 778.
- [10] 陆杰浪, 吴梅芳, 黄明月, 等. 篱蓼地下部分的化学成分研究[J]. 中草药, 2023, 54(2): 473-483.
- [11] LU C L, ZHU W, WANG D M, et al. Inhibitory effects of chemical compounds isolated from the rhizome of *Smilax glabra* on nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cell[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 2015: 602425.
- [12] JUNIOR G M V, SOUSA C M D, CAVALHEIRO A L, et al. Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities[J]. Helvetica Chimica Acta, 2008, 91(11): 2159-2167.
- [13] 付茂, 杜彩霞, 陈俊磊, 等. 扁刺峨眉蔷薇化学成分及其酪氨酸酶抑制活性研究[J]. 中草药, 2024, 55(3): 720-729.
- [14] KHALID S A, YAGI S M, KHRISTOVA P, et al. (+)-catechin-5-galloyl ester as a novel natural polyphenol from the bark of *Acacia nilotica* of sudanese origin 1[J]. Planta Medica, 1989, 55(6): 556-558.
- [15] PARK S, KIM Y N, KWAK H J, et al. Estrogenic activity of constituents from the rhizomes of *Rheum undulatum* Linné[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2018, 28(4): 552-557.
- [16] PAN H F, LUNDGREN L N. Rhododendrol glycosides and phenyl glucoside esters from inner bark of *Betula pubescens*[J]. Phytochemistry, 1994, 36(1): 79-83.
- [17] WU Y B, GU Y, OUYANG M G. Water-soluble constituents from the bark of *Elaeagnus pungens* and their cytotoxic activities[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2010, 12(4): 278-285.
- [18] LI J T, YIN B L, LIU Y, et al. Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2009, 45(2): 234-236.
- [19] 曾妮, 苏维, 张琼丹, 等. 异型南五味子根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1549-1557.
- [20] YEON K N, SOOJI K, JIN L H, et al. Sesquiterpenes from *Artemisia princeps* regulate inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages[J]. Natural Product Research, 2022, 37(5): 1-6.
- [21] FAN W, TEZUKA Y, KADOTA S. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of fourteen Kampo formulas and inhibitory constituents of Tokaku-joki-to[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2000, 48(7): 1055-1061.
- [22] ARUOMA O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998, 75(2): 199-212.
- [23] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview[J]. Methods in Enzymology, 1990, 186: 1-85.
- [24] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25-30.
- [25] ISLAM A, ISLAM M S, RAHMAN M K, et al. The pharmacological and biological roles of eriodictyol[J]. Archives of Pharmacological Research, 2020, 43(6): 582-592.
- [26] 童观珍, 付晓萍, 杨艳, 等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(2): 343-349.
- [27] SADIQ I Z. Free radicals and oxidative stress: Signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation[J]. Current Molecular Medicine, 2023, 23(1): 13-35.