

黄皮种子中香豆素类化合物的分离、鉴定及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性研究[△]

许书慧^{1*}, 陈惠琴^{2,3}, 范玉娇^{2,3}, 陈朋伟^{2,3}, 梅文莉^{2,3}, 戴好富^{2,3#}(1.中南大学湘雅医学院附属海口医院药学部,海口 570208;2.中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室,海口 571101;3.海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室,海口 571101)

中图分类号 R975⁺.3;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0518-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.17

摘要 目的:分离、鉴定黄皮种子中香豆素类化合物,并研究其 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性。方法:采用柱层析、反相硅胶柱色谱及高效液相色谱技术对黄皮种子的香豆素类化合物进行分离、纯化,并根据理化性质和氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)数据进行结构鉴定。分别以阿卡波糖、阿维菌素为阳性对照,采用对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)法和贝曼漏斗法分别对上述化合物进行体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性考察。结果:从黄皮种子中共分离鉴定出7个香豆素类化合物,分别为7-羟基香豆素(I)、黄皮呋喃香豆精(II)、Lansiumarin-C(III)、Claucoumarin A(IV)、Clausenalansimin A(V)、(E,E)-8-(7-羟基-3,7-二甲氧基-2,5-二烯基)补骨脂(VI)、Dihydroindicolactone(VII)。在质量浓度为0.25 mg/mL时,化合物I、III、V的 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为(32.4 \pm 1.9)%、(37.1 \pm 6.0)%、(39.5 \pm 1.1)%;在质量浓度为2.5 mg/mL时,化合物I、IV的线虫校正死亡率分别为50.5%、47.9%。结论:香豆素类化合物I、III、V具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,化合物I、IV具有全齿复活线虫致死活性。其中,化合物III、V的 α -葡萄糖苷酶抑制活性、化合物IV的全齿复活线虫致死活性均为首次发现。

关键词 黄皮;种子;香豆素类化合物;分离;鉴定; α -葡萄糖苷酶;全齿复活线虫

Isolation and Identification of the Coumarins from the Seeds of *Clausena lansium* and Study on Their Inhibitory Activity of α -glucosidase and Nematicidal Activity against *Panagrellus redivivus*

XU Shuhui¹, CHEN Huiqin^{2,3}, FAN Yujiao^{2,3}, CHEN Pengwei^{2,3}, MEI Wenli^{2,3}, DAI Haofu^{2,3}(1.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Haikou Hospital of Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China; 2. Key Lab of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture/Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Hainan Key Lab for Research and Utilization of Li Medicine Natural Products, Haikou 571101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To isolate and identify the coumarins from the seeds of *Clausena lansium*, and to study their inhibitory activity of α -glucosidase and nematicidal activity against *Panagrellus redivivus*. METHODS: Column chromatography, reversed phase silica gel column chromatography and HPLC method were used to separate and purify the coumarins from the seeds of *C. lansium*. The structures of compounds were identified according to physicochemical properties, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data. Using acarbose and avermectin as positive control, PNPG and Berman funnel methods were used to investigate the α -glucosidase inhibitory activity and nematicidal activity against *P. redivivus*, respectively. RESULTS: Seven coumarins compounds were isolated from the seeds of *C. lansium*, and were identified as 7-hydroxy-1-benzopyran-2-one (I), Wampetin (II), Lansiumarin-C (III), Claucoumarin A (IV), Clausenalansimin A (V), (E,E)-8-(7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyloxy) psoralen (VI), Dihydroindicolactone (VII). Under 0.25 mg/mL, the α -glucosidase inhibitory rates of compounds I, III, V were (32.4 \pm 1.9)%, (37.1 \pm 6.0)%, (39.5 \pm 1.1)%, respectively. Under 2.5 mg/mL, corrected mortality of compounds I, IV were 50.5% and 47.9%. CONCLUSIONS: Compounds I, III, V show α -glucosidase inhibitory activity, and compounds I, IV

[△] 基金项目:海南省卫生计生行业科研项目(No.16A200125);海南自然科学基金创新研究团队项目(No.2017CXTD020)

* 副主任药师。研究方向:医院药学、天然产物化学。电话:0898-66151045。E-mail:xush135@sina.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:天然产物化学。电话:0898-66961869。E-mail:daihaofu@itbb.org.cn

display nematicidal activity against *P. redivivus*. α -Glucosidase inhibitory activity of compounds III, V, and nematicidal activity of compound IV are found for the first time.

KEYWORDS *Clausena lansium*; Seeds; Coumarins; Isolation; Identification; α -glucosidase; *Panagrellus redivivus*

黄皮[*Clausena lansium*(Lour.) Skeels]为瑞香科(*Rutaceae*)黄皮属植物,具有很高的药用价值,其果实民间主要用于治疗食积胀满、脘腹疼痛、疝痛、痰饮、咳喘等病症,叶可用于防治感冒,根则可用于治气痛^[1];黄皮中含有丰富的生物碱类、香豆素类和挥发油类化合物,具有保肝解毒、降糖、抑菌、抗肿瘤和促智等生物活性^[1-3]。迄今,国内外对黄皮的根、茎、叶等的化学成分研究已有较多报道^[4-6],但对种子部位的研究则相对较少。中国热带农业科学院热带生物技术研究所戴好富研究员课题组前期对黄皮的果皮和种子分别进行研究,发现黄皮果皮中含有丰富的香豆素类^[7]和唑啉类生物碱^[8],而种子中则富含酰胺类生物碱^[9-10],并且种子粗提取物具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性。本研究在戴好富研究员课题组前期研究的基础上对黄皮种子中的化学成分进行研究,并初步探讨了其中香豆素类化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和全齿复活线虫致死活性,以期为其开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Avance AV-500型核磁共振波谱仪[瑞士Brucker公司,四甲基硅烷(TMS)为内标]; amaZon SL型离子阱电喷雾质谱仪(德国Bruker公司); 1260型高效液相色谱仪,包括G1311C四元梯度泵、G1329B自动进样器、Agilent OenLAB工作站、G1316A紫外检测器(美国Agilent公司); SUMMIT P680A半制备高效液相色谱仪,包括P680四元梯度泵、7725 I手动进样器、Chromeleon工作站、UVP170U紫外检测器(美国Dionex公司); ELx800型全自动酶标仪(美国BioTek公司); SW-40型超净工作台(上海博讯实业有限公司); IMF-2型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,批号:N0877)、阿卡波糖(批号:Y0000500)、磷酸盐粉末(PBS,批号:P3813-10PAK)均购自美国Sigma公司;阿维菌素(北京索莱宝科技有限公司,批号:A9000);柱层析硅胶(200~300目、60~80目)(青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20、RP-18反相色谱柱填料(德国Merck公司); D101型大孔吸附树脂(山东鲁抗医药股份有限公司); 氯仿(氘代试剂,德国Merck公司); 甲醇为色谱纯,乙醇、石油醚、乙酸乙酯、二甲基亚砜(DMSO)、碳酸氢钠(Na_2CO_3)、正丁醇、丙酮、甲醇、氯仿等试剂均为分析纯,其余试剂均为工业重蒸试剂,水为超纯水。

1.3 药材

黄皮果实于2011年5月购自海南省儋州市中国热带农业科学院农贸市场,经中国热带农业科学院热带生物技术研究所王军博士鉴定为黄皮[*Clausena lansium*(Lour.) Skeels],黄皮果实标本(编号:CL20110501)现存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

2 方法与结果

2.1 黄皮种子中香豆素类化合物的提取与分离

取黄皮种子8.0 kg,晒干粉碎后,于室温下用95%乙醇浸提3次,每次7 d。所得浸提液过滤后经减压浓缩得乙醇粗浸膏(500.0 g);随后将其分散于水中制成悬浊液,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别减压浓缩得到石油醚萃取物(200.0 g)、乙酸乙酯萃取物(84.6 g)、正丁醇萃取物(120.5 g)和水相(80.0 g)4个部分。

取乙酸乙酯萃取物84.6 g,甲醇重结晶除去大量黄色结晶后,剩余样品经D101大孔吸附树脂以甲醇-水(40:60~100:0, *V/V*)和丙酮为流动相先后进行洗脱,按每个梯度分段收集,通过薄层色谱(TLC)检测,合并TLC显色相同的部分,得到13个流份Fr.1~Fr.13。Fr.5(3.2 g)经RP-18反相色谱柱,以甲醇-水(30:70~100:0, *V/V*)为流动相进行梯度洗脱得到10个流份Fr.5.1~Fr.5.10。Fr.5.3经凝胶柱色谱,以甲醇为流动相进行洗脱得到Fr.5.3.4,后经半制备高效液相色谱,以20%乙腈-水(20:80, *V/V*)为流动相,分离得到化合物I(1.8 mg)。Fr.5.6经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(0:100~100:0, *V/V*)为流动相进行梯度洗脱得到7个流份Fr.5.6.1~Fr.5.6.7。Fr.5.6.4经凝胶柱色谱,以甲醇为流动相,分离得到化合物VI(50.8 mg)和流份Fr.5.6.4.4。Fr.5.6.4.4经半制备高效液相色谱,以20%乙腈-水(20:80, *V/V*)为流动相,分离得到化合物V(8.3 mg)。Fr.5.6.5反复经硅胶柱色谱分离得到化合物III(13.8 mg)。

Fr.6(7.2 g)经RP-18反相色谱柱,以甲醇-水(40:60~100:0, *V/V*)为流动相进行梯度洗脱得到8个流份Fr.6.1~Fr.6.8。Fr.6.6经凝胶柱色谱,以氯仿-甲醇(0:100~100:0, *V/V*)为流动相进行梯度洗脱得到6个流份Fr.6.6.1~Fr.6.6.6。Fr.6.6.3再次经硅胶柱色谱分离后,经凝胶柱色谱,以甲醇为流动相纯化得到化合物II(20.5 mg)。Fr.6.6.4经半制备高效液相色谱,以20%乙腈-水(20:80, *V/V*)为流动相,分离得到化合物IV(1.9 mg)和化合物VII(1.7 mg)。

2.2 结构鉴定

采用氢谱($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)方法对化合物I~VII的结构进行鉴定,其结构式见图1。

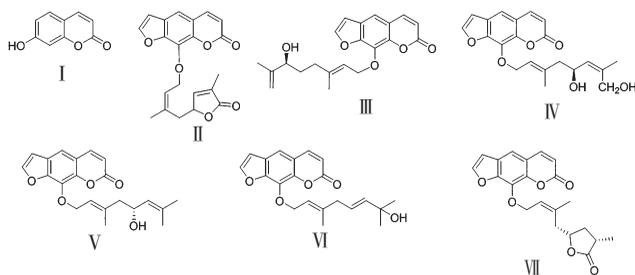


图1 化合物 I ~ VII 的结构式

Fig 1 Structures of compounds I - VII

化合物 I :淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_9H_6O_3$,分子量为 162.0。电喷雾质谱(ESI-MS): m/z 161.0 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.85(1H, d, $J=9.4$ Hz, H-4), 7.46(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 6.79(1H, dd, $J=8.5, 2.3$ Hz, H-6), 6.71(1H, d, $J=2.3$, H-8), 6.18(1H, d, $J=9.4$ Hz, H-3)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 163.7 (C-2), 112.3 (C-3), 146.1 (C-4), 113.1 (C-4a), 130.7 (C-5), 114.6 (C-6), 163.4 (C-7), 103.4 (C-8), 157.3 (C-8a)。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[11]基本一致,故确定化合物 I 为 7-羟基香豆素。

化合物 II :淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{18}O_6$,分子量为 366.1。ESI-MS: m/z 389.2 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.77(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.70(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.38(1H, s, H-5), 6.92(1H, m, H-6''), 6.82(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.36(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.71(1H, t, $J=6.9$ Hz, H-2''), 5.05(1H, dd, $J=12.0, 6.9$ Hz, H-1''a), 5.01(1H, dd, $J=12.0, 6.9$ Hz, H-1''b), 4.91(1H, m, H-5''), 2.40(1H, dd, $J=14.0, 7.0$ Hz, H-4''a), 2.30(1H, dd, $J=14.0, 7.0$ Hz, H-4''b), 1.87(3H, s, 9''-CH₃), 1.78(3H, s, 10''-CH₃)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 160.6 (C-2), 114.8 (C-3), 144.5 (C-4), 116.6 (C-4a), 113.7 (C-5), 126.0 (C-6), 148.7 (C-7), 131.5 (C-8), 143.9 (C-8a), 146.9 (C-2'), 106.9 (C-3'), 69.7 (C-1''), 124.0 (C-2''), 137.2 (C-3''), 143.4 (C-4''), 79.7 (C-5''), 148.5 (C-6''), 130.2 (C-7''), 174.1 (C-8''), 10.7 (C-9''), 17.3 (C-10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[12]基本一致,故确定化合物 II 为黄皮呋喃香豆精。

化合物 III :黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{22}O_5$,分子量为 354.1。ESI-MS: m/z 377.2 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.76(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.68(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.36(1H, s, H-5), 6.81(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.35(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.62(1H, t, $J=7.1$ Hz, H-2''), 5.02(2H, m, H-1''), 4.86(1H, brs, H-8''a), 4.80(1H, brs, H-8''b), 3.92(1H, t, $J=6.4$ Hz,

H-6''), 2.04(2H, m, H-4''), 1.68(3H, s, 9''-CH₃), 1.67(3H, s, 10''-CH₃), 1.56(2H, m, H-5'')。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 160.7 (C-2), 114.8 (C-3), 144.6 (C-4), 116.6 (C-4a), 113.5 (C-5), 126.0 (C-6), 148.8 (C-7), 131.6 (C-8), 144.0 (C-8a), 146.8 (C-2'), 106.9 (C-3'), 70.1 (C-1''), 120.0 (C-2''), 142.9 (C-3''), 32.7 (C-4''), 35.5 (C-5''), 75.3 (C-6''), 111.2 (C-7''), 147.4 (C-8''), 17.7 (C-9''), 16.6 (C-10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[13]基本一致,故确定化合物 III 为 Lansiumarin-C。

化合物 IV :淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{22}O_6$,分子量为 370.1。ESI-MS: m/z 393.2 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.78(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.69(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.38(1H, s, H-5), 6.82(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.38(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.70(1H, t, $J=6.7$ Hz, H-2''), 5.29(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-6''), 5.03(2H, m, H-1''), 4.55(1H, m, H-5''), 4.22(1H, d, $J=12.6$ Hz, H-8''a), 4.10(1H, d, $J=12.6$ Hz, H-8''b), 2.29(1H, dd, $J=13.4, 8.0$ Hz, H-4''a), 2.20(1H, dd, $J=13.4, 5.5$ Hz, H-4''b), 1.81(3H, s, 9''-CH₃), 1.65(3H, s, 10''-CH₃)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 160.9 (C-2), 114.9 (C-3), 144.6 (C-4), 116.7 (C-4a), 113.5 (C-5), 126.1 (C-6), 148.7 (C-7), 131.5 (C-8), 143.7 (C-8a), 146.7 (C-2'), 107.0 (C-3'), 69.9 (C-1''), 123.3 (C-2''), 139.7 (C-3''), 47.9 (C-4''), 66.0 (C-5''), 129.7 (C-6''), 139.2 (C-7''), 62.3 (C-8''), 17.3 (C-9''), 21.8 (C-10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[14]基本一致,故确定化合物 IV 为 Claucoumarin A。

化合物 V :淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{22}O_5$,分子量为 354.2。ESI-MS: m/z 377.2 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 7.76(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.69(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.37(1H, s, H-5), 6.81(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.36(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.69(1H, d, $J=7.1$ Hz, H-2''), 5.11(1H, m, H-6''), 5.04(2H, m, H-1''), 4.41(1H, td, $J=8.4, 4.8$ Hz, H-5''), 2.20(1H, dd, $J=13.6, 8.5$ Hz, H-4''a), 2.15(1H, dd, $J=13.6, 4.7$ Hz, H-4''b), 1.76(3H, s, 9''-CH₃), 1.68(3H, d, $J=1.2$ Hz, 8''-CH₃), 1.65(3H, d, $J=1.2$ Hz, 10''-CH₃)。 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 160.6 (C-2), 114.8 (C-3), 144.5 (C-4), 116.6 (C-4a), 113.6 (C-5), 126.0 (C-6), 148.7 (C-7), 131.5 (C-8), 144.0 (C-8a), 146.8 (C-2'), 106.9 (C-3'), 69.9 (C-1''), 123.1 (C-2''), 139.7 (C-3''), 48.0 (C-4''), 66.3 (C-5''), 127.4 (C-6''), 135.3 (C-7''), 17.0

(C-8''), 25.8(C-9''), 18.3(C-10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[13]基本一致,故确定化合物V为 Clausenalansimin A。

化合物VI:淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{22}O_5$, 分子量为354.2。ESI-MS: m/z 377.3[M+Na]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 7.93(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.82(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.46(1H, s, H-5), 6.87(1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.30(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.52(1H, m, H-2''), 5.48(1H, d, $J=15.6$ Hz, H-6''), 5.38(1H, dt, $J=15.6, 6.7$ Hz, H-5''), 4.93(2H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 2.61(2H, d, $J=6.7$ Hz, H-4''), 1.57(3H, s, 8''-CH₃), 1.17(6H, s, 9''-CH₃, 10''-CH₃)。 ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 162.7(C-2), 115.1(C-3), 146.7(C-4), 117.8(C-4a), 114.9(C-5), 127.6(C-6), 150.0(C-7), 132.2(C-8), 145.0(C-8a), 148.4(C-2'), 107.9(C-3'), 70.7(C-1''), 121.3(C-2''), 143.3(C-3''), 43.1(C-4''), 124.9(C-5''), 141.3(C-6''), 71.0(C-7''), 16.5(C-8''), 29.9(C-9'', 10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[14]基本一致,故确定化合物VI为(*E,E*)-8-(7-羟基-3,7-二甲基-2,5-二烯基)补骨脂。

化合物VII:淡黄色油状物(甲醇),分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$, 分子量为368.4。ESI-MS: m/z 391.2[M+Na]⁺。 ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 7.78(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.70(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.39(1H, s, H-5), 6.83(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3'), 6.37(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 5.69(1H, t, $J=6.9$ Hz, H-2''), 5.06(1H, dd, $J=11.9, 6.8$ Hz, H-1''a), 5.01(1H, dd, $J=11.9, 6.8$ Hz, H-1''b), 4.58(1H, m, H-5''), 2.63(1H, m, H-7''), 2.44(1H, dd, $J=14.0, 6.8$ Hz, H-4''a), 2.25(1H, dd, $J=14.0, 6.8$ Hz, H-4''b), 2.04(1H, ddd, $J=13.0, 9.8, 5.3$ Hz, H-6''a), 1.87(1H, dt, $J=13.0, 7.6$ Hz, H-6''b), 1.75(3H, s, 9''-CH₃), 1.25(3H, d, $J=7.3$ Hz, 10''-CH₃)。 ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 160.6(C-2), 114.9(C-3), 144.5(C-4), 116.7(C-4a), 113.7(C-5), 126.0(C-6), 148.8(C-7), 131.5(C-8), 144.1(C-8a), 146.9(C-2'), 106.9(C-3'), 69.8(C-1''), 123.7(C-2''), 137.9(C-3''), 45.0(C-4''), 76.6(C-5''), 34.8(C-6''), 33.9(C-7''), 179.9(C-8''), 17.2(C-9''), 15.9(C-10'')。以上波谱数据及化合物的理化性质与文献[15]基本一致,故确定化合物VII为 Dihydroindicolactone。

2.3 化合物 I ~ VII 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

采用优化后的PNPG法^[16]进行考察。先配制好PBS溶液(pH 6.8, 0.2 mol/L)及待测化合物溶液(取化合物 I ~ VII各1 mg,以DMSO 20 μ L溶解;取5 μ L该溶液加入

PBS 45 μ L,混匀即得质量浓度为5 mg/mL的待测化合物溶液)。将以下各溶液在96孔板中混匀:待测化合物溶液10 μ L+PBS 70 μ L+以PBS为溶剂的2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液20 μ L(实验组A)、10% DMSO-PBS溶液10 μ L+PBS 70 μ L+以PBS为溶剂的2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液20 μ L(阴性对照B)、5 mg/mL阿卡波糖溶液10 μ L+PBS 70 μ L+以PBS为溶剂的2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液20 μ L(阳性对照)、待测化合物溶液10 μ L+PBS 90 μ L(背景对照A₀)、10% DMSO-PBS溶液10 μ L+PBS 90 μ L(空白对照B₀)。将96孔板置于37 $^{\circ}$ C下温育15 min,加入2.5 mmol/L PNPG溶液20 μ L;继续37 $^{\circ}$ C下温育30 min,加入0.2 mol/L Na₂CO₃终止液80 μ L。用酶标仪于405 nm波长处测定并记录每孔的吸光度,重复3次取平均值,并按以下公式计算酶抑制率:酶抑制率(%) = $[(B-B_0)-(A-A_0)]/(B-B_0) \times 100\%$ ^[16](式中,B表示阴性对照的吸光度,B₀表示空白对照的吸光度,A表示实验组的吸光度,A₀表示背景对照的吸光度)。结果,在质量浓度为0.25 mg/mL时,化合物 I、III、V对 α -葡萄糖苷酶的抑制率分别为(32.4 \pm 1.9)%、(37.1 \pm 6.0)%、(39.5 \pm 1.1)%,阳性对照阿卡波糖的抑制率为(54.2 \pm 4.7)%,表明化合物 I、III、V具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,其余化合物在相同浓度下的 α -葡萄糖苷酶的抑制率均小于10%。

2.4 化合物 I ~ VII 对全齿复活线虫的致死活性考察

参照马青云等^[17]相关文献进行考察。将全齿复活线虫接种于燕麦培养基上,于28 $^{\circ}$ C条件下培养7~10 d。按贝曼漏斗法,利用多层擦镜纸于无菌水中过滤线虫3次,获得线虫悬浮液。取化合物 I ~ VII各1 mg溶于DMSO 20 μ L中制成待测化合物溶液。将以下各溶液在96孔板中混匀:待测化合物溶液5 μ L(终浓度为2.5 mg/mL)+线虫悬浮液30 μ L(约200~300条线虫)+无菌水65 μ L(实验组)、DMSO 5 μ L+线虫悬浮液30 μ L(约200~300条线虫)+无菌水65 μ L(阴性对照组)、阿维菌素5 μ L(终浓度为2.5 mg/mL)+线虫悬浮液30 μ L(约200~300条线虫)+无菌水65 μ L(阳性对照组)。96孔板于室温条件下培养24 h,在解剖镜下观察并统计线虫死亡数,统计的线虫数量不少于100条,重复3次取平均值,并按以下公式分别计算线虫死亡率、线虫校正死亡率:线虫死亡率(%) = 死亡线虫数/线虫总数 $\times 100\%$ ^[17];线虫校正死亡率(%) = $[(\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}) / (1 - \text{对照线虫死亡率})] \times 100\%$ ^[17]。式中,处理线虫死亡率是指阳性对照药和各化合物处理的实验组;对照线虫死亡率是指阴性对照组。结果,在质量浓度为

2.5 mg/mL时,化合物 I、IV的线虫校正死亡率分别为50.5%、47.9%,阳性对照阿维菌素的线虫校正死亡率为80.6%,表明化合物 I、IV具有全齿复活线虫致死活性,其他化合物的线虫校正死亡率均小于10%。

3 讨论

黄皮的化学成分主要以香豆素和生物碱为主,戴好富研究员课题组前期研究发现,黄皮果皮中生物碱主要以咪唑类生物碱为主^[8],而种子中以酰胺类生物碱为主^[9-10]。本研究从黄皮种子中共分离得到了7个香豆素类化合物,其结构与果皮中发现的香豆素类化合物较为相似,其中化合物 I、II、VI为果皮和种子中均含有的化合物^[4],而化合物 III、V目前只在种子中分离得到。化学成分的异同意味着药理活性的差异,该发现为黄皮的综合利用提供了良好的理论基础。

α -葡萄糖苷酶抑制活性考察结果显示,化合物 I、III、V表现出一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,抑制率为30%以上,略弱于阳性对照药阿卡波糖。已有药理研究发现,黄皮具有降糖作用,而香豆素类化合物可能与黄皮的降糖作用有关^[18-19],但后续还需要相关研究深入探讨。

全齿复活线虫致死活性考察结果显示,化合物 I、IV的致死活性在相同浓度下虽弱于阳性对照药阿维菌素,但线虫校正死亡率约为50%,仍具有很好的开发价值。

综上,本研究从黄皮种子中发现了7个香豆素类化合物,分别为7-羟基香豆素(I)、黄皮咪喃香豆精(II)、Lansiumarin-C(III)、Claucoumarin A(IV)、Clausenansimin A(V)、(E,E)-8-(7-羟基-3,7-二甲基-2,5-二烯基)补骨脂(VI)、Dihydroindicolactone(VII)。化合物 I、III、V具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,化合物 I、IV具有全齿复活线虫致死活性。其中,化合物 III、V的 α -葡萄糖苷酶抑制活性、化合物IV的全齿复活线虫致死活性均为首次发现。

参考文献

[1] 任强,李芳,罗秀珍,等.黄皮属植物香豆素类成分研究进展[J].时珍国医国药,2009,20(5):1283-1285.
[2] 张瑞明,万树青,赵冬香.黄皮的化学成分及生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(1):118-123.
[3] 耿红梅,王云志,张嫡群.治疗阿尔茨海默症的自然药物[J].中国药房,2006,17(13):1019-1022.
[4] LI WS, MCCHESENEY JD, ELFERALY FS. Carbazole alkaloids from *Clausena lansium*[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(1):343-346.
[5] LIU GT, LI WX, CHEN YY, et al. Hepatoprotective action

of nine constituents isolated from the leaves of *Clausena lansium* in mice[J]. *Drug Dev Res*, 1996, 39:174-178.
[6] LIN JH. Cinnamamide derivatives from *Clausena lansium*[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(2):621-622.
[7] DENG HD, MEI WL, GUO ZK, et al. Monoterpenoid coumarins from the peels of *Clausena lansium*[J]. *Planta Med*, 2014, 80(11):955-958.
[8] DENG HD, MEI WL, WANG H, et al. Carbazole alkaloids from the peels of *Clausena lansium*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(10):1024-1028.
[9] 范玉娇,陈惠琴,梅文莉,等.黄皮种子中酰胺类生物碱及其杀线虫活性研究[J].热带亚热带植物学报,2018,26(1):85-91.
[10] FAN YJ, CHEN HQ, MEI WL, et al. Nematicidal amide alkaloids from the seeds of *Clausena lansium*[J]. *Fitoterapia*, 2018.DOI:10.1016/j.fitote.2018.04.023.
[11] DE SÁ DE SOUSA NOGUEIRA TB, DE SÁ DE SOUSA NOGUEIRA RB, E SILVA DA, et al. First chemical constituents from *Cordia exaltata* Lam and antimicrobial activity of two neolignans[J]. *Molecules*, 2013, 18(9):11086-11099.
[12] KHAN NU, NAQVI SWI, ISHRATULLAH K. Wampetin, a furocoumarin from *Clausena wampi*[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(11):2624-2625.
[13] LIU H, LI F, LI CJ, et al. Bioactive furanocoumarins from stems of *Clausena lansium*[J]. *Phytochemistry*, 2014.DOI:10.1016/j.phytochem.2014.08.002.
[14] RASHID MA, GRAY AI, WATERMAN PG, et al. Coumarins from *Phebalium tuberculatum* ssp. *megaphyllum* and *Phebalium filifolium*[J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(7):851-858.
[15] NAM VD, TERUHISA F, HIROFUMI T, et al. Chemical composition of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels leaves and antifungal activity[J]. *Natural Product Sciences*, 2016, 22(1):35-40.
[16] 张智圆.黄芪知母口服吸收有效成分分析鉴定及药理作用研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2010.
[17] 马青云,黄圣卓,李红芳,等.杠板归中化学成分生防活性研究[J].湖北农业科学,2013,52(21):5245-5247.
[18] 申竹芳,陈其明,刘海帆,等.黄皮香豆精的降血糖作用[J].药学学报,1989,24(5):391-392.
[19] 熊曼琪,张横柳,朱章志,等.黄皮叶、小叶山绿豆、广木香降血糖作用的实验研究[J].广州中医学院学报,1994,11(1):41-45.

(收稿日期:2018-09-05 修回日期:2018-12-19)

(编辑:余庆华)