

六月青一种木脂素苷的体外抗氧化活性

周先丽, 李映新, 温庆伟, 林兴, 黄仁彬*
(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究六月青一种木脂素苷(6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol 的抗氧化活性。方法: 采用酶标仪微量法和紫外-可见分光光度法, 以维生素 C 为阳性对照, 分别测定(6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol 对 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH \cdot)自由基、羟基自由基(\cdot OH)和超氧阴离子自由基(O $_2^{\cdot-}$)的清除能力。结果: (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol 对 DPPH \cdot (半数清除率 IC $_{50}$ 8.11 mg \cdot L $^{-1}$), \cdot OH (IC $_{50}$ 21.61 mg \cdot L $^{-1}$) 和 O $_2^{\cdot-}$ (IC $_{50}$ 10.30 mg \cdot L $^{-1}$) 均具有清除作用, 且呈明显的量效关系。结论: (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol 在体外有明显的抗氧化作用。

[关键词] 六月青; 自由基; 抗氧化活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0200-03

[doi] 10.11653/zgsyfyjzz2013070200

Antioxidative Effect of a Lignan Glycoside from *Tarphochlamys affinis*

ZHOU Xian-li, LI Ying-xin, WEN Qing-wei, LIN Xing, HUANG Ren-bin*
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol from *Tarphochlamys affinis*. **Method:** With microtitration assay and ultra-violet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, effect of (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol on clearance rate of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-diphenyl-1-(2, 4, 6 trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH \cdot), hydroxyl radical \cdot OH and superoxide anion O $_2^{\cdot-}$ were determined with Vitamin C (Vc) as positive control. **Result:** (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol had scavenging capability against DPPH \cdot (half clearance rate concentration IC $_{50}$ 8.11 mg \cdot L $^{-1}$), \cdot OH (IC $_{50}$ 21.61 mg \cdot L $^{-1}$) and O $_2^{\cdot-}$ (IC $_{50}$ 10.30 mg \cdot L $^{-1}$) radicals and has a good dose-responses with the concentration. **Conclusion:** (6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol has the stronger antioxidant activity.

[Key words] *Tarphochlamys affinis*; free radicals; antioxidant activity

六月青系爵床科植物肖鸡笼或顶头马兰的干燥

地上部分^[1], 为广西民族特色草药。该药具有活血、凉血、疏肝利湿、消肿镇痛的功效, 用于治疗急慢性肝炎、黄疸、流行性腮腺炎及高血压等疾病^[2]。木脂素苷在化学结构上属于木脂素, 以糖苷的形式存在。木脂素类化合物是一类天然酚类化合物, 具有优良的生物学活性, 如抗艾滋病、保肝、抗氧化等。其广泛的药理作用, 独特的作用机制已引起人们的广泛关注^[3]。本文首次探讨了六月青一种木脂素苷单体(6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl) oxy] lyoniresinol 的抗氧化活性, 为六月青的进一步开发利用提供科学依据。

[收稿日期] 20121025(001)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻10124008-6, 桂科攻0992003A-2); 广西重点实验室基金(KFJJ2010-22); 广西科技基础条件平台建设(12-97-20)

[第一作者] 周先丽, 助理研究员, 博士研究生, 从事生化药理学及天然产物活性研究, Tel: 0773-2295133, E-mail: xlzhou2009@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 教授, 博士生导师, 从事药理学及天然产物活性物质研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

1 材料

1.1 药材 六月青 (*Tarphochlamys affinis*) 采自广西灵山,由广西中医学院第一附属医院黄权芳中药师鉴定。

1.2 试剂 邻二氮菲(上海国药集团化学试剂有限公司,批号 20111114);1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH,上海晶纯实业有限公司,批号 D1227007);邻苯三酚(焦性没食子酸,上海国药集团化学试剂有限公司,批号 20120731);Tris-HCl(上海生工生物工程股份有限公司,批号 1106376Z),其余均为国产分析纯。

1.3 仪器 Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);732N 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Bruker Av-600 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);PHS-3C pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备 六月青干燥后粉碎,以 60% 乙醇,80 °C 回流 2 h,共回流 3 次,合并提取液,用旋转蒸发仪浓缩至适当浓度,依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取,浓缩得到 2 个不同极性部位。乙酸乙酯部分用 MCI 脱色后,用硅胶柱层析以 $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (1:0, 9:1, 8:2, 2:1, 1:1, 0:1) 进行洗脱,得 6 个组分。第 4 组分用 RP-18 以 30% ~ 100% $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ 进行反相柱层析后,再以半制备 HPLC (10% $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$) 进行分离纯化得到一个化合物。通过 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据分析,与文献[4]对比,为木质素苷(6R, 7S, 8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol。

2.2 清除 DPPH 自由基 参照文献[5]并稍做修改,用无水乙醇配制浓度为 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液。取 100 μL 不同浓度的样品溶液及 100 μL 的 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液加入 96 孔酶标板中,混匀。20 min 后用无水乙醇作参比在 517 nm 下测定其吸光度(A),每个样品设 3 个复孔。以无水乙醇代替 DPPH 作为对照组,维生素 C(VC)为阳性对照。根据以下公式计算清除率:

$$Y = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 为未加样品组的吸光度; A_1 为样品组的吸光度; A_2 为空白组的吸光度。

2.3 清除羟自由基 参照文献[6]并稍做修改,取 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 20 mL,依次加 7.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲 1.0 mL,7.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚

铁 1.0 mL,再加入不同浓度的样品溶液 1.0 mL,最后加入 1 mL 0.1% H_2O_2 。37 °C 保温 60 min,无水乙醇代替邻二氮菲为空白,536 nm 处测定吸光度为 A_0 。每份样品平行操作 3 次,计算自由基清除率:

$$Y = (A_0 - A_1) / (A_2 - A_1) \times 100\%$$

式中: A_1 为无水乙醇代替待测液的吸光度; A_2 为无水乙醇代替 H_2O_2 的吸光度。

2.4 清除超氧阴离子实验 运用改进后的邻苯三酚自氧化法^[7],取 2.45 mL 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)于离心管中,分别加入 0.1 mL 不同浓度的样品,于 25 °C 恒温 20 min,再加入 0.05 mL 25 °C 预热的 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚,迅速摇匀后,每隔 30 s 于波长 420 nm 处测定 1 次吸光度,共测 3 min。每份样品平行操作 3 次,计算自由基清除率:

$$Y = (V_0 - V) / V_0 \times 100\%$$

式中 V_0 为邻苯三酚自氧化速率; V 为样品管的氧化速率。

3 结果

3.1 木脂素苷的结构鉴定 见图 1。

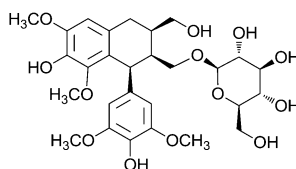


图 1 木脂素苷为化合物(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol

3.2 对 DPPH 自由基的清除作用 (6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 和 VC 对 DPPH 自由基的清除作用如图 2 所示。从图 2 中可以看出随着给药浓度的增加,药物对 DPPH 自由基的清除率也增加。(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 和 VC 对 DPPH 自由基的半数清除率(IC_{50})分别为 8.11, 5.59 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从数据上看,(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对 DPPH 自由基的清除作用比 VC 稍弱,仍具有较强的清除作用。

3.3 对羟自由基的清除作用 如图 3 所示(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 和 VC 对羟自由基的清除作用呈明显的量效关系,随着药物浓度的增大,清除作用不断增大。两者对羟自由基的 IC_{50} 分别为 21.61 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 13.74 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。虽然(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对羟自由基的清除作用比 VC 弱,但仍具有较强的清除作用。

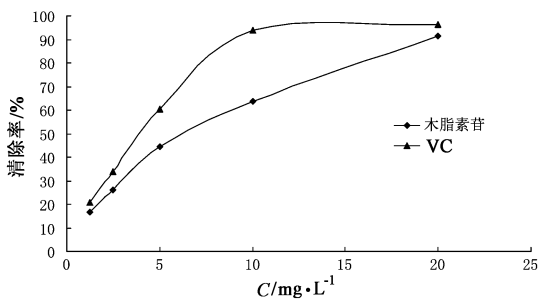


图 2 不同浓度的(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对 DPPH 自由基的清除作用

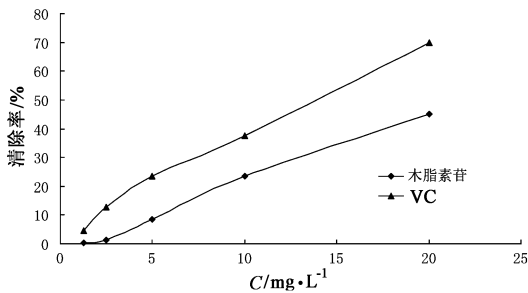


图 3 不同浓度的(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对羟自由基的清除作用

3.4 对超氧阴离子自由基的清除作用 由图 4 中可以看出,随着药物浓度的增加,(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 和 VC 对超氧阴离子自由基的清除能力也明显增强。其对超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 分别为 10.30, 13.58 mg·L⁻¹。VC 比 (6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对超氧阴离子自由基的半数清除率低,说明 (6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对超氧阴离子自由基具有较好的清除活性。

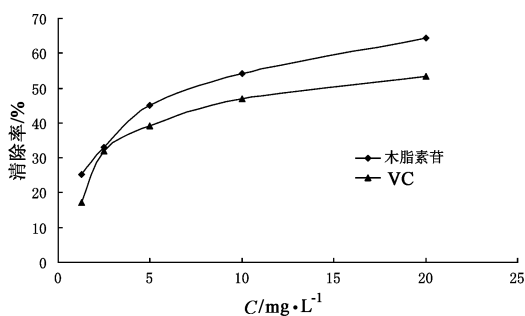


图 4 不同浓度的(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对超氧阴离子的清除作用

4 讨论

研究证明,(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对 DPPH 自由基,

羟自由基以及超氧阴离子自由基均具有较强的清除能力。该化合物对超氧阴离子自由基的清除能力最强,高于天然抗氧化剂 VC。另外,从结构上看,该化合物具有多个酚羟基结构,而酚羟基是清除自由基和活性氧的重要基团,因此(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 对自由基的清除能力与其结构是密切相关的。近来科学研究证明,自由基和人类多种疾病均有密切关系^[8-11]。因此,作为一种有效的自由基清除剂,(6R,7S,8S)-7 α -[(β -glucopyranosyl)oxy]lyoniresinol 具有潜在的药用价值。

[参考文献]

- [1] 陈兆霓,张士军,唐爱存,等. 六月青皂苷对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响[J]. 时珍国医国药, 2010,21(8): 1911.
- [2] 林兴,黄权芳,李江,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材,2005,28(7): 541.
- [3] 王丰玲,张英锋,赵琳,等. 木脂素的制备、用途和展望[J]. 渤海大学学报,2008,29(1): 8.
- [4] Wangteeraprasert R, Likhitwitayawuid K. Lignans and a sesquiterpene glucoside from *Carissa carandas* Stem[J]. Helv Chim Acta,2009,92(6): 1217.
- [5] 陈瀚,李进,李祥,等. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9): 184.
- [6] 薛梅,王立梅,吴建芳,等. 天山堇菜鞣质的提取及氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(2): 371.
- [7] 张凝,闫慧丽,张立新,等. 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10): 91.
- [8] 王君明,崔瑛,王峥涛,等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7): 265.
- [9] 张振明,蔡曦光,葛斌,等. 女贞子多糖和菟丝子多糖的协同抗衰老作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2005,21(5): 587.
- [10] 王君明,崔瑛,申玲玲,等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(5): 247.
- [11] 史亚军,施俊辉,陈世彬,等. 黄芩苷治疗缺血性脑损伤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7): 218.

[责任编辑 聂淑琴]