

耳叶牛皮消中的苯乙酮类化合物及其抗氧化活性研究

陈炳阳,岳荣彩,刘芳,李夏,李元元,吴国振,单磊(第二军医大学药学院,上海 200433)

[摘要] 目的 研究耳叶牛皮消(萝藦科)*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight(asclepiadaceae)块根的化学成分及其抗氧化活性。方法 药材提取物分部萃取后采用硅胶、Sephadex LH-20柱层析等进行分离纯化,通过理化性质和光谱分析鉴定结构。在H₂O₂刺激条件下,研究化合物对PC12细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的影响。结果 从耳叶牛皮消中分离得到了5个苯乙酮类化合物,分别鉴定为cynandione A (I)、cynandione B (II)、cynandione C (III)、cynanchone A (IV)、cynantetrone (V)。H₂O₂能降低SOD、CAT和GSH-Px三种抗氧化酶活性,而耳叶牛皮消中的苯乙酮类化合物可抑制H₂O₂引起的氧化损伤。结论 耳叶牛皮消中的苯乙酮类化合物具有抗氧化活性。

[关键词] 耳叶牛皮消;萝藦科;化学成分;苯乙酮类化合物

[中图分类号] R931.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0351-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.008

Acetophenones and antioxidant activity in *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

CHEN Bing-yang, YUE Rong-cai, LIU Fang, LI Xia, LI Yuan-yuan, WU Guo-zhen, SHAN Lei (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents and antioxidant activity of the root tubers of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight (asclepiadaceae). **Methods** The root tubers were extracted with 95% EtOH, and the ethanol extract was further separated and purified by repeated column chromatography of silica gel and Sephadex LH-20. Structures of the compounds were identified on the basis of spectral analysis (including NMR and MS) and chemical evidences. **Results** Five acetophenones were isolated from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. Their structures were characterized as cynandione A (I), cynandione B (II), cynandione C (III), cynanchone A (IV), cynantetrone (V). H₂O₂ decreases SOD, CAT and GSH-Px activities, while the acetophenones could inhibit H₂O₂-induced oxidative damage. **Conclusion** The acetophenones isolated from the root tubers of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight possessed potent antioxidant activities.

[Key words] *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; asclepiadaceae; chemical constituents; acetophenones

耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)系萝藦科(asclepiadaceae)马利筋亚科(asclepiodeae)鹅绒藤属(*Cynanchum linn*)植物。在我国资源丰富,分布于全国大部分省区;山东、江苏有人工栽培。药用其块根,为我国著名中药“白首乌”的正品之一,在我国已有1000余年的药用历史。具有补肝肾,强筋骨,益精血,健脾消食,解毒疗疮等功效。主治腰膝酸痛,阳痿遗精,头晕耳鸣,心悸失眠,食欲不振,小儿疳积,产后乳汁稀少,疮痍肿痛,毒蛇咬伤^[1]。现代药理研究证明,其有效部位和有效成分具有多种药理活性,而从分离得到的化合物cynantetrone以及C-21甙体

糖苷类化合物具有很强的细胞毒性^[2,3],另有文献报道其乙醇总提物和正丁醇部位具有抗多种肿瘤细胞的活性^[4],同时乙醇总提物和氯仿部位还具有胃保护的作用^[5],后期研究又证实从中分离得到的化合物cynandione A具有十分明显的抗氧化损伤作用^[6],而其总苷成分具有抗抑郁和免疫调节活性^[7]。本研究从滨海产耳叶牛皮消药材95%乙醇提取物的氯仿和乙酸乙酯部位中得到5个苯乙酮类化合物,并进一步研究了其抗氧化活性。现将研究方法和结果报告以下。

1 仪器和材料

耳叶牛皮消药材采自江苏省滨海县,经第二军医大学生药教研室郑汉臣教授鉴定为*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight。熔点用RY-2型电热熔点测定仪测定;红外光谱用Bruker Vector 22型红外

[作者简介] 陈炳阳(1988-),男,硕士研究生。Tel: (021) 81871248, E-mail: chenbingyang.025@163.com.

[通讯作者] 单磊。Tel: (021) 81871246, E-mail: shanleish@yahoo.com.cn.

分析仪测定;核磁共振用 Bruker DRX-500 型核磁共振仪测定(TMS 为内标);质谱用 Varian MAT-212 质谱仪测定;薄层层析及柱层析用硅胶均为中国青岛海洋化工集团公司生产;Sephadex LH-20 为安法玛西亚生物技术上海有限公司生产。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。PC12 细胞来自中科院上海细胞研究所。DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco。酶标仪为 Biotek synergy4, SA-1480-2 型超净无菌工作台来自上海上净净化设备有限公司,二氧化碳培养箱为 Heal Force HF90。其余化学试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 提取分离流程 耳叶牛皮消药材 17 kg,粉碎,95%乙醇回流提取 3 次,合并提取液。浸出液减压浓缩得到乙醇浸膏,超声下用水分散,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取。取氯仿萃取部位浸膏 260 g,经正相硅胶柱色谱,以不同比例的石油醚-乙酸乙酯洗脱得到不同部位,由石油醚-乙酸乙酯(8:1)洗脱流份,经反复重结晶得黄色针状结晶即化合物 I (260 mg),其它部位再经正相硅胶(氯仿-甲醇)和 Sephadex LH-20(甲醇)反复柱层析,得到化合物 II (20 mg)、III (15 mg)和 IV (20 mg)。取乙酸乙酯萃取部位浸膏 20 g,经正相硅胶(氯仿-甲醇)和 Sephadex LH-20(甲醇)反复柱层析,得到化合物 V (30 mg)。

2.2 抗氧化活性测定 PC12 细胞接种于培养皿中,培养基为 DMEM(含 10%胎牛血清、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 mg/L),置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养。经细胞毒测试,5 个苯乙酮化合物在 1 μM 浓度下对 PC12 细胞无任何影响。取对数期生长的 PC12 细胞以 2 × 10⁶ cells/ml 接种至 96 孔培养板,每孔加 1 μM 苯乙酮化合物预处理 12 h 后,再加 10 μl H₂O₂ 培养 24 h 后,胰酶消化收集细胞后用超声裂解细胞,获取细胞匀浆,按 SOD, GSH-Px 和 CAT 试剂盒测定说明书检测,DM-SO 做阴性对照^[8]。

2.3 统计学分析 所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较应用 one-way ANOVA 和 Tukey's HSD post hoc 检验。以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 化合物结构鉴定 化合物 I:黄色针状结晶(甲醇), C₁₆H₁₄O₆, mp 203 ~ 205 °C。[α]_D²⁵ 0° (0.11,

MeOH)。DIRu_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3 550 (OH), 3 395 (OH), 3 125 (OH), 1 675, 1 638 (缔和羰基)。¹H-NMR (DM-SO-d₆) δ: 6.66 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-4), 6.89 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 2.19 (3H, s, H-8), 7.67 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'), 6.39 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 2.46 (3H, s, H-8')。ESI-MS m/z : 302 [M]⁺, 284 [M-H₂O]⁺, 269, 245, 227, 213, 137, 115。¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道^[9]对照基本一致,故鉴定为 cynandione A(图 1)。

化合物 II:黄色不定形粉末, C₃₂H₂₄O₁₀, mp 301 ~ 303 °C。[α]_D²⁵ + 30° (0.11, MeOH)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 7.43 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4), 7.23 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.86 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 7.69 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'), 2.45 (3H, s, H-8'), 6.99 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''), 7.07 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4''), 2.00 (3H, s, H-8''), 7.67 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'''), 6.79 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'''), 2.50 (3H, s, H-8''')。ESI-MS m/z : 568 [M]⁺, 554, 553, 551, 535, 309, 286, 285。¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道^[10]对照基本一致,故鉴定为 cynandione B(图 1)。

化合物 III:黄色针状结晶(丙酮), C₃₂H₂₄O₁₀, mp 255 ~ 257 °C。[α]_D²⁵ -18.2° (0.11, MeOH)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 7.41 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4), 7.31 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.78 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 7.70 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'), 2.55 (3H, s, H-8'), 6.97 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''), 7.17 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4''), 2.30 (3H, s, H-8''), 7.29 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'''), 6.39 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'''), 2.43 (3H, s, H-8''')。ESI-MS m/z : 568 [M]⁺, 554, 553, 551, 535, 309, 286, 285。¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道^[10]对照基本一致,故鉴定为 cynandione C(图 1)。

化合物 IV:橙黄色结晶, C₁₇H₁₆O₆, mp 158 ~ 161 °C。[α]_D²⁵ + 20.0° (0.11, MeOH)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8.13 (1H, s, H-3, -OH), 7.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4), 6.88 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.38 (1H, s, H-8, -OH), 1.60 (3H, s, H-8), 15.6 (1H, s, H-2', -OH), 7.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4'), 6.67 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 2.74 (3H, s, H-8'), 3.49 (3H, s, -OCH₃)。ESI-MS m/z : 316 [M]⁺, 285 [M-OMe]⁺, 269, 251, 237, 213, 195, 181。¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道^[9]对照基本一致,故鉴定为 cynanchone A(图 1)。

化合物 V:橙色结晶, C₆₆H₄₄O₂₀, mp 325 ~ 327

℃。[α]_D²⁵-39.0°(0.18, CHCl₃)。IRν_{max}^{KBr}cm⁻¹: 3 260 (OH), 3 430 (OH), 1 720 (COOH), 3 560 (COOH), 1 580 (芳环吸收)。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR

谱数据见表 2。ESI-MS *m/z*: 1 156 [M]⁺, 1 137, 851, 568, 552, 284, 283, 260。以上数据与文献报道^[2]对照基本一致,故鉴定为 cynantetrone(图 1)。

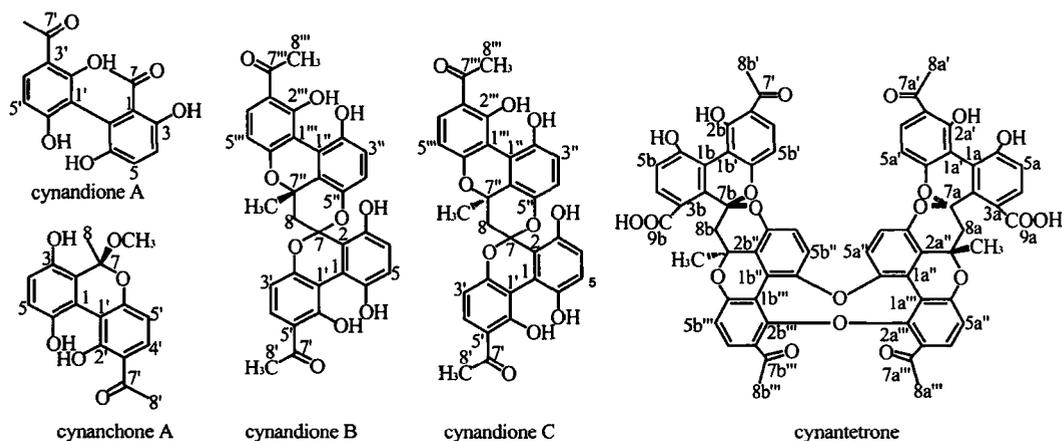


图 1 从耳叶牛皮消分离得到的五个苯乙酮类化合物结构

表 1 化合物 I~IV 的 ¹³C-NMR 谱数据(DMSO-d₆)

¹³ C	I	II	III	IV
1	125.2	122.0	122.1	118.3
2	118.6	117.5	117.3	116.1
3	154.3	149.1	148.3	147.1
4	119.8	122.1	122.2	118.9
5	122.0	147.0	119.1	117.9
6	146.5	119.9	147.6	146.2
7	207.7	101.5	100.8	106.0
8	31.5	41.1	46.9	24.0
1'	116.0	112.8	112.9	109.8
2'	165.9	158.1	158.0	159.0
3'	114.9	116.1	115.5	115.4
4'	131.6	133.3	133.2	130.8
5'	107.4	110.1	120.9	110.6
6'	164.0	160.6	161.1	158.5
7'	207.8	205.8	205.2	205.3
8'	26.9	26.8	26.3	26.1
1''		113.6	113.4	
2''		149.2	148.0	
3''		120.7	122.8	
4''		121.9	123.0	
5''		143.8	150.2	
6''		121.9	122.8	
7''		75.1	75.0	
8''		24.4	27.3	
1'''		114.1	115.9	
2'''		157.7	157.3	
3'''		115.8	116.6	
4'''		132.6	130.4	
5'''		111.6	111.6	
6'''		159.7	159.9	
7'''		205.1	203.8	
8'''		26.7	25.7	
OCH ₃				50.9

表 2 化合物 V 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱数据(DMSO-d₆)

¹³ C	δ(¹³ C)	δ(¹ H)	¹³ C	δ(¹³ C)	δ(¹ H)
1 a	122.9		1 b	122.9	
2 a	128.5		2 b	128.5	
3 a	110.2		3 b	111.4	
4 a	115.7	6.77(d, J=8.5)	4 b	115.4	6.98(d, J=8.5)
5 a	118.0	6.39(d, J=8.5)	5 b	117.8	6.72(d, J=8.5)
6 a	153.7	8.87(s)	6 b	154.3	8.64(s)
7 a	97.5		7 b	98.3	
8 a	42.9	2.89(d, J=15.2)	8 b	37.6	2.70(d, J=15.2)
		4.16(d, J=15.2)			3.95(d, J=15.2)
9 a	178.8	13.6(s)	9 b	180.5	13.4(s)
1 a'	115.8		1 b'	115.4	
2 a'	159.2	16.1(s)	2 b'	159.9	15.6(s)
3 a'	114.4		3 b'	115.7	
4 a'	136.7	7.88(d, J=8.5)	4 b'	135.8	7.81(d, J=8.5)
5 a'	108.9	6.65(d, J=8.5)	5 b'	105.4	6.52(d, J=8.5)
6 a'	162.2		6 b'	162.2	
7 a'	203.7		7 b'	203.5	
8 a'	24.9	2.67(s)	8 b'	24.6	2.63(s)
1 a''	108.0		1 b''	110.7	
2 a''	121.6		2 b''	121.6	
3 a''	160.5		3 b''	160.0	
4 a''	116.9	6.70(d, J=8.5)	4 b''	109.5	6.73(d, J=8.5)
5 a''	120.8	6.98(d, J=8.5)	5 b''	122.8	7.02(d, J=8.5)
6 a''	144.7		6 b''	142.9	
7 a''	74.5		7 b''	74.9	
8 a''	24.3	1.69(s)	8 b''	25.8	1.83(s)
1 a'''	115.8		1 b'''	115.3	
2 a'''	154.3		2 b'''	154.9	
3 a'''	113.9		3 b'''	113.5	
4 a'''	130.6	7.78(d, J=8.5)	4 b'''	130.5	7.68(d, J=8.5)
5 a'''	118.5	6.72(d, J=8.5)	5 b'''	111.2	6.24(d, J=8.5)
6 a'''	162.5		6 b'''	162.9	
7 a'''	208.4		7 b'''	206.4	
8 a'''	26.8	2.72(s)	8 b'''	26.7	2.65(s)

3.2 化合物抗氧化活性 H₂O₂ 处理 PC12 细胞 24 h 后,细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性减少。苯乙酮类化合物预处理 12 h 可以明显对抗 H₂O₂ 诱导的抗氧化损伤作用。结果见表 3。本研究分离得到的 6 个苯乙酮类化合物主要来自氯仿部位,显示出这一部位独特的药理活性。苯乙酮类化合物发挥作用主要

是由于它们的抗氧化活性,大量文献报道,苯乙酮类化合物的抗氧化活性主要是由它们能够清除活性氧并且能够抑制相应的酶或螯合微量元素产生的活性氧^[3, 11, 12]。因此,本研究表明苯乙酮类化合物对抗 H₂O₂ 诱导的抗氧化损伤作用主要是通过它们能增强抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性来实现的。

表 3 耳叶牛皮消中分离得到的苯乙酮类化合物对 PC12 细胞内抗氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	SOD (U/mg pro.)	GSH-Px (U/mg pro.)	CAT (U/mg pro.)
DMSO 对照组	19.21 ± 2.1	52.6 ± 4.2	8.94 ± 0.28
H ₂ O ₂ 模型组	8.65 ± 0.98 ¹⁾	21.09 ± 1.21 ¹⁾	4.41 ± 0.38 ¹⁾
H ₂ O ₂ + cynandione A (1 μM)	15.22 ± 0.28 ²⁾	42.44 ± 3.28 ²⁾	7.03 ± 0.39 ²⁾
H ₂ O ₂ + cynandione B (1 μM)	13.76 ± 0.89 ³⁾	34.2 ± 2.68 ³⁾	6.56 ± 1.08 ³⁾
H ₂ O ₂ + cynandione C (1 μM)	12.39 ± 1.25 ³⁾	31.43 ± 1.07 ³⁾	6.29 ± 0.68 ³⁾
H ₂ O ₂ + cynanchone A (1 μM)	15.71 ± 1.11 ²⁾	39.5 ± 1.68 ²⁾	7.91 ± 0.42 ²⁾
H ₂ O ₂ + cynanchone (1 μM)	12.21 ± 1.28 ³⁾	30.04 ± 2.26 ³⁾	6.86 ± 0.38 ³⁾

¹⁾ P < 0.01, 与正常对照组比较; ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.05, 与模型组比较。

4 结论

本研究采用 H₂O₂ 损伤的体外细胞培养模型研究了耳叶牛皮消中分离得到的 5 个苯乙酮类化合物的抗氧化作用。实验结果表明,苯乙酮类化合物能增强抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性。因此推测,耳叶牛皮消中分离得到的苯乙酮类化合物对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞的保护作用部分是通过提高细胞内抗氧化酶活性来实现的,从而对文献报道苯乙酮类化合物的抗氧化机制进行了补充。

【参考文献】

- [1] State administration of traditional Chinese medicine of the People's Republic of China [M]. 'Zhong Hua Ben Cao', Shanghai Sci & Tech Press, Shanghai, 1999, 17, 333.
- [2] Huang PL, Won SJ, Day SH, et al. A cytotoxic acetophenone with a novel skeleton, isolated from *Cynanchum taiwanianum* [J]. Helv Chim Acta, 1999, 82(10): 1716.
- [3] Peng Y, Li Y, Liu X, et al. Antitumor activity of C-21 steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. Phytomedicine, 2008, 15(11): 1016.
- [4] Shan L, Zhang WD, Zhang C, et al. Antitumor activity of crude extract and fractions from root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. Phytother Res, 2005, 19(3): 259.
- [5] Shan L, Liu RH, Shen YH, et al. Gastroprotective effect of a traditional Chinese herbal drug "Baishouwu" on experimental gastric

- lesions in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(3): 389.
- [6] Yue R, Yuan X, Liu X, et al. Cynandione A mitigates ischemic injuries in rats with cerebral ischemia [J]. J Neurochem, 2012, 121: 451.
- [7] Ji CX, Li XY, Jia SB, et al. The antidepressant effect of *Cynanchum auriculatum* in mice [J]. Pharm Biol, 2012, 50(9): 1067.
- [8] Liu CS, Chen NH, Zhang JT. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae* [J]. Phytomedicine, 2007, 14: 492.
- [9] Lin CN, Huang PL, Lu CM, et al. Revised structure for five acetophenones from *Cynanchum taiwanianum* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(7): 1359.
- [10] Lin YL, Wu YM, Kuo YH. Revised structures for four acetophenones from *Cynanchum taiwanianum* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(5): 1057.
- [11] Mathiesen L, Malterud KE, Sund RB. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones [J]. Free Radical Bio Med, 1997, 22: 307.
- [12] Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, et al. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 433: 225.

[收稿日期] 2012-12-04

[修回日期] 2013-04-08

欢迎订阅《药实践杂志》
全国各地邮局均可订阅, 邮发代号: 4-664
本刊网址: www.yxsjzz.cn; www.yxsj.smmu.edu.cn