

玉郎伞豆甾醇的体外抗氧化活性研究

黄建春,卿丽娟,禰霏霏,梁杏梅,黄仁彬*
(广西医科大学药学院,南宁 530021)

[摘要] 目的:研究玉郎伞一种甾醇类化合物豆甾醇(stigmaserol)的体外抗氧化活性。方法:配制含磷酸盐缓冲液(pH 8.3)50 mmol·L⁻¹、连苯三酚 0.2 mmol·L⁻¹的溶液,建立连苯三酚氧自由基产生氧自由基(O₂⁻·)发生体系;配制含邻二氮菲 0.75 mmol·L⁻¹,FeSO₄ 0.75 mmol·L⁻¹、磷酸盐缓冲液(pH 7.3)150 mmol·L⁻¹的溶液,建立由邻二氮菲-Fe²⁺/H₂O₂产生羟自由基(·OH)的发生体系,以维生素 C(Vit C)为阳性对照,采用紫外-可见分光光度法,测定豆甾醇对 O₂⁻·和·OH 的清除及抑制作用。结果:高、中浓度豆甾醇对·OH 有明显的清除作用,清除率分别为 39.3%、9.9%(P<0.01 或 P<0.05);对 O₂⁻·有明显的清除作用,清除率分别为 61.2%、30.4%(P<0.01),且能显著减小 O₂⁻·的生成速率,抑制率分别为 38.3%、47.8%(P<0.01)。结论:豆甾醇在体外具有较强的抗氧化活性。

[关键词] 玉郎伞; 豆甾醇; 抗氧化活性
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0154-03
[doi] 10.11653/syfy2014050154

Study on Antioxidant Activity of Stigmaserol from Yulangsan *in vitro*

HUANG Jian-chun, QING Li-juan, XUAN Fei-fei, LIANG Xing-mei, HUANG Ren-bin*
(Pharmaceutical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of stigmaserol from Yulangsan *in vitro*. **Method:** The superoxide anion free radical (O₂⁻·) and hydroxy free radical (·OH) were prepared through pyrogallol and o-phenanthroline-Fe²⁺/H₂O₂ system respectively, the ultraviolet-visible spectrophotometry was used to observe the scavenging and inhibiting effects of stigmaserol on O₂⁻· and ·OH with the vitamin C (Vit C) as positive control. **Result:** Stigmaserol separated from Yulangsan greatly scavenged O₂⁻· and ·OH (P<0.01 or P<0.05), and significantly reduced the production rate of O₂⁻·(P<0.01). **Conclusion:** Stigmaserol has strong antioxidant activity.

[Key words] Yulangsan; stigmaserol; oxidation activity

玉郎伞为蝶形花科植物疏叶崖豆的块根,生长于山坡、荒地阳光充足的地方,主要分布于广西、广东等地,是广西壮族习用药材,收载于广西省地方标

准中,具有补气、补血、提高免疫力、抗衰老、抗应激、改善大脑记忆等功能,用于治疗老年健忘、小儿智力低下、强身健体、消除疲劳、体弱多病及病后、产后虚弱等。迄今为止,国内外只有本课题组对玉郎伞进行了提取分离及相关药理、药效研究。前期研究结果表明,玉郎伞中等极性部位具有良好的抗氧化,抑制心肌缺血再灌注损伤,降血压,减轻化学性肝损伤等作用^[1-5]。本文首次从玉郎伞(YLS)中分离出一种甾醇类化合物豆甾醇并探讨其外抗氧化活性,为玉郎伞的进一步研究提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 玉郎伞[Millettia pulcha Kurz vur, Laxior (Dunn) Z. Wei]的块根,来自广西灵山县,经广西中

[收稿日期] 20131023(021)
[基金项目] 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金资助(FPRU2013-3);广西自然科学基金资助(2013GXNSFAA019175);2012 年优秀博士学位论文培育项目(YCBZ2012013)
[第一作者] 黄建春,博士研究生,讲师,从事抗肝炎药物及心脑血管药理学研究, Tel: 0771-5329140, E-mail: huangjianchun008@163.com
[通讯作者] * 黄仁彬,博士,教授,博士生导师,从事抗肝炎、抗肿瘤药物和心脑血管药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

医药研究院赖茂祥研究员鉴定。

1.2 试剂 石油醚(批号 20120401)、乙酸乙酯(批号 20120414)、二氯甲烷(批号 20111215)、甲醇(批号 20110415)、邻二氮菲(批号 20110917)均为分析纯,成都市科龙化工试剂厂产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 WA-812 型微波辅助萃取仪(上海精密仪器仪表有限公司);TU-1800SPC 紫外分光光度计(Lenghuang Tech 公司);柱层析硅胶 G(青岛海洋化工厂分厂,批号 0110308);羟丙基葡聚糖凝胶[北京慧德易科技有限责任公司,批号 10050426]。

2 方法

2.1 样品的制备 将 20 kg YLS 饮片粉碎,以料液比为 1:8 的 60% 乙醇作提取溶剂进行微波辅助提取(提取温度 <60 ℃,微波功率 240 W),提取 2 次,每次 30 min。合并提取液,用旋转蒸发仪浓缩至适当浓度,依次加入石油醚萃取除色素、酯类,再用乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯萃取液并旋转蒸发浓缩至约 40 mL 后吸附于 50 g 活化后的硅胶 G,然后上样,经硅胶 G 柱层析分离(采用 10 cm × 120 cm 玻璃层析柱,以 400 g 柱层析硅胶 G 做为固定相),二氯甲烷-甲醇(体积比 20/0 ~ 6/1)梯度洗脱,每 360 mL 为一流份,每个梯度的洗脱剂接 10 个流份,接完后用 TLC 法检识,将相同流份合并,合并成 11 个组分。第 4 个组分,经羟丙基葡聚糖凝胶柱色谱分离,用甲醇-二氯甲烷(4.5:1)洗脱,得到 3 个组分 Fr. D₁-D₃,Fr. D₂ (205 mg)用甲醇-二氯甲烷多次重结晶,得一白色粉末(194 mg),经¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据分析,与文献[6]对比,为豆甾醇(stigmaserol)。

2.2 ·OH 的清除率的测定 参考文献[7-8]建立体外·OH 发生体系,配制含邻二氮菲 0.75 mmol·L⁻¹,FeSO₄ 0.75 mmol·L⁻¹,磷酸盐缓冲液(pH 7.3)150 mmol·L⁻¹的溶液作为反应体系,加 0.01% H₂O₂ (损害)或不加 H₂O₂ (未损害),37 ℃保温 60 min 后,以磷酸盐缓冲液为参比,分别测 536 nm 时的吸光度(A),得 A_{损害}与 A_{未损害}。上述反应体系加入 0.01% H₂O₂ 和一定量的豆甾醇,以同浓度豆甾醇作参比,测 536 nm 时的 A,即得 A_样。重复 8 次。按下式计算·OH 清除率。

·OH 清除率 = (A_样 - A_{损害}) / (A_{未损害} - A_{损害}) × 100%

2.3 O₂⁻· 的清除率的测定 参考文献[7-8]建立体外 O₂⁻· 发生体系,配制含磷酸盐缓冲液(pH 8.3)50 mmol·L⁻¹、连苯三酚 0.2 mmol·L⁻¹的溶液作为反应体系,反应温度为 25 ℃,测定波长为 322 nm。此反应体系中加入一定量豆甾醇,以同浓度豆甾醇

作参比,反应启动后 100 s 时,立即滴加 0.5 mL 浓度为 8 mol·L⁻¹ HCl 终止反应,测定吸收值(A_样)。另取试剂同上,不加豆甾醇,作为空白对照,以 PBS 为参比,反应启动后 100 s 时,立即滴加 0.5 mL 浓度为 8 mol·L⁻¹ HCl 终止反应,测定吸收值(A_空)。重复 8 次。按下式计算清除率。

O₂⁻· 清除率 = (A_空 - A_样) / A_空 × 100%

2.4 O₂⁻· 生成的抑制率测定 反应体系同上。反应启动后分别于 30,60,90,120,150,180 s 测定相应吸收值。将所得吸收值与时间(min)进行回归分析,其斜率为 O₂⁻· 生成速度(V)。V_{空白} 为以磷酸盐缓冲液(pH 8.3)为参比,加入连苯三酚启动反应后测得的 O₂⁻· 生成速度;以 YLS 组分为参比,反应体系中加入一定量的豆甾醇,加入连苯三酚启动反应后测得的 O₂⁻· 生成速度为 V_样。重复 3 次。按下式计算抑制率:

O₂⁻· 抑制率 = (V_{空白} - V_样) / V_{空白} × 100%

3 结果

3.1 对·OH 的清除作用 在本试验条件下,豆甾醇高、中浓度组对·OH 有明显的清除作用(P < 0.01 或 P < 0.05),其清除率呈浓度依赖性,见表 1。

表 1 豆甾醇对·OH 的清除作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A	·OH 清除率/%
损害	-	0.242 ± 0.010	-
未损害	-	0.738 ± 0.027 ²⁾	-
豆甾醇	0.5	0.256 ± 0.030	4.6
	1.0	0.291 ± 0.046 ¹⁾	9.9
	2.0	0.437 ± 0.028 ²⁾	39.3
Vit C	0.12	0.453 ± 0.029 ²⁾	42.6

注:与损害组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01。

3.2 对 O₂⁻· 的清除作用 在本试验条件下,豆甾醇高、中浓度组对 O₂⁻· 有明显的清除作用(P < 0.01),其清除率呈浓度依赖性,见表 2。

表 2 豆甾醇对 O₂⁻· 的清除作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A	O ₂ ⁻ · 清除率/%
空白对照	-	0.264 ± 0.024	-
豆甾醇	0.15	0.239 ± 0.024	19.0
	0.3	0.199 ± 0.049 ²⁾	30.4
	0.6	0.143 ± 0.024 ²⁾	61.2
Vit C	0.12	0.131 ± 0.023 ²⁾	62.3

注:与空白对照组比较¹⁾P < 0.05,²⁾P < 0.01(表 3 同)。

3.3 对 O₂⁻· 生成的抑制作用 用动态方法测得反应的速度 V(A·min⁻¹),速率方程的相关系数 r 均在

0.998 3 ~ 0.999 3。反应体系中加入豆甾醇后,高、中浓度组 $O_2^- \cdot$ 生成速率 V 显著减小 ($P < 0.01$),表明豆甾醇能抑制 $O_2^- \cdot$ 的生成,见表 3。

表 3 豆甾醇对 $O_2^- \cdot$ 的生成抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	$V/A \cdot min^{-1}$	$O_2^- \cdot$ 的抑制率/%
空白对照	—	0.141 ± 0.010	—
豆甾醇	0.15	0.121 ± 0.008	14.5
	0.3	$0.087 \pm 0.006^{2)}$	38.3
	0.6	$0.074 \pm 0.004^{2)}$	47.8
VitC	0.12	$0.063 \pm 0.002^{2)}$	55.1

4 讨论

本实验样品的制备,没有按照传统的玉郎伞块有效成分提取的提取工艺,而是将玉郎伞块根用 60% 乙醇进行微波辅助提取,这种提取方法是可有效保护药材中的功能成分,对提取物具有较高的选择性,提取率高,而且提取速度快,省时,溶剂用量小^[9]。将乙酸乙酯萃取的部分,采用硅胶柱色谱、羟丙基葡聚糖凝胶柱色谱和重结晶等多种分离方法进行分离纯化,并根据 NMR 谱数据对分离得到的化合物进行结构鉴定。

本实验采用体外实验的方法研究玉郎伞中分离出豆甾醇对氧自由基的影响。通过 Fenton 反应, H_2O_2 产生 $\cdot OH$, 邻二氮菲- Fe^{2+} 被 $\cdot OH$ 氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} , 其 536 nm 处吸收峰消失,因此,测定此处吸收值的变化可以间接得知 $\cdot OH$ 的变化情况。连苯三酚自氧化过程中有 $O_2^- \cdot$ 和有色中间产物生成,而该有色中间产物在 322 nm 处有一特征吸收峰,本实验利用这一特点间接测得 $O_2^- \cdot$ 生成情况及药物对 $O_2^- \cdot$ 的清除率。同时,用动态方法测定 $O_2^- \cdot$ 生成反应的速度,即将所得吸收值与时间 (min) 进行回归分析,吸光度与反应时间呈线性关系,其斜率为 $O_2^- \cdot$ 生成速度,每组重复 3 次,求得平均生成速度 (V),通过公式计算出药物对 $O_2^- \cdot$ 生成的抑制情况。氧自由基 (OFR, 主要指 $O_2^- \cdot$ 和 $\cdot OH$) 由于其可引起细胞损伤和死亡,近来大量科学研究表明, OFR 与人类多种疾病如肝损伤、脑缺血损伤等均有密切关系^[10-12]。抗氧化剂或自由基捕捉剂能干扰 OFR 链锁反应的启动和蔓延过程,从而阻断自由基反应过程的物质,它们对上述疾病的治疗有一定意义。本

文首次从玉郎伞中分离出豆甾醇并探讨了其外抗氧化活性。研究证明,玉郎伞豆甾醇的中、高浓度均对 $O_2^- \cdot$ 和 $\cdot OH$ 具有明显清除作用,抑制 $O_2^- \cdot$ 的生成并呈浓度依赖性,显示它有较强的抗氧化活性。这为玉郎伞豆甾醇的进一步研究提供科学依据,为今后的开发和利用产生了一定的参考价值。

[参考文献]

[1] 简洁,李勇文,蒋伟哲,等. 玉郎伞黄酮单体对自由基清除作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29:2353.

[2] 简洁,林兴,张士军,等. 玉郎伞两种黄酮单体的抗氧化、耐缺氧和抗凝血作用研究[J]. 中国药理与临床, 2009, 25(3):22.

[3] 吕纪华,贺敏,黄建春,等. 玉郎伞黄酮对心肌缺血再灌注损伤心肌组织 ATP 酶和凋亡蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):162.

[4] 黄必义,黄仁彬,卢曦,等. 玉郎伞多糖对肝星状细胞氧应激脂质过氧化作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4):814.

[5] 付书婕,黄建春,王乃平,等. 玉郎伞多糖对小鼠急性酒精肝损伤保护作用的研究[J]. 中国药房, 2009, 20(6):406.

[6] Xiao-Hua Wei, Sheng-Jie Yang, Na Liang, et al. Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) alston[J]. Molecules, 2013, 18:1325.

[7] 焦杨,段小群,黄仁彬,等. 玉郎伞提取物对超氧阴离子自由基和羟自由基的抑制和清除作用[J]. 广西医科大学学报, 2004,21(1):22.

[8] 周先丽,李映新,温庆伟,等. 六月青一种木脂素苷的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7):200.

[9] 简洁,林兴,黄仁彬. 黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8):1998.

[10] 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):256.

[11] 杨玲,许速. 氧化应激与皮肤病相关性研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2011, 33(6):333.

[12] 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]