

- [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [3] Chen H Q, Chen Y Q, Chen W S, et al. The influence of hydrogen peroxide on the expression of cell adhesion molecules [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 2002, 33(3): 364-367.
- [4] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [5] Ahmed R S, Seth V, Banerjee B D. Influence of dietary ginger on antioxidant defense system in rat: comparison with ascorbic acid [J]. *Indian J Exp Biol*, 2000, 38(6): 604.
- [6] Wu C X, Cheng X M, Ding H, et al. Influence of active fraction of *Zingiber officinale* on NO and blood lipid in experimental hyperlipidemic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(1): 92-94.
- [7] Shen X, Ding H, Wu C X, et al. The antioxidative action of effective parts of *Zingiber officinale* on experimental hyperlipidemic rats [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2005, 6(26): 330-333.

单子山楂叶中多元酚类成分及其抗氧化活性研究

刘荣华^{1,2}, 陈兰英¹, 朱根华¹, 余伯阳^{2*}

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西南昌 330004; 2. 中国药科大学 中药复方研究室, 江苏南京 210038)

摘要:目的 提取分离单子山楂 *Crataegus monogyna* 叶中多元酚类成分, 并对其抗氧化活性进行比较。方法 从干燥的单子山楂叶粗粉中提取分离其中的多元酚类成分, 并比较它们体外对两种不同氧自由基(羟自由基·OH、过氧化氢 H₂O₂) 的清除活性。结果 从单子山楂叶中分离得到 10 种多元酚类成分, 分别为槲皮素(queretin, Qu), 金丝桃苷(hyperoside, HP), 槲皮素 3-O-β-D-葡萄糖苷(queretin 3-O-β-D-glucoside, QG), 芦丁(rutin, Rut), 牡荆素(vitexin, Vit), 6"-O-乙酰牡荆素(6"-O-acetyl-vitexin, AcV), 牡荆素 2"-O-鼠李糖苷(vitexin 2"-O-rhamnoside, VRh), 牡荆素 4"-O-乙酰-2"-O-鼠李糖苷(vitexin 4"-O-acetyl-2"-O-rhamnoside, VAR), 表儿茶素[(-)-epicatechin, EP]和绿原酸(chlorogenic acid, ChA)。结果表明, 所有样品对以上两种氧自由基的清除活性均呈明显的结构依赖性, 然而在这些样品中 Qu、HP、QG、Rut 和 EP 对这两种氧自由基均有很强的清除活性。结论 Qu、HP、QG、Rut 和 EP 可能是单子山楂叶中最主要的抗氧化活性成分。

关键词:多元酚; 黄酮; 单子山楂; 过氧化氢

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1541-04

Principal polyphenolic components from leaves of *Crataegus monogyna* and their antioxidation activities

LIU Rong-hua^{1,2}, CHEN Lan-ying¹, ZHU Gen-hua¹, YU Bo-yang²

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Department of Chinese Complex Recipe Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Key words: polyatomic phenol; flavone; *Crataegus monogyna* Jacq.; H₂O₂

山楂为蔷薇科苹果亚科山楂属植物^[1], 主要分布在北温带大约北纬 30°~50°的东亚、欧洲、北美等地^[2]。目前认为有 250 种^[3]。现代药理及毒理学研究表明, 山楂对心血管系统具有良好的活性而且副作用很小^[4]。据报道, 山楂叶提取物(WS 1442)能增强心脏功能, 对纽约心脏学会(New York Heart Association, NYHA)分类的 I、II、III 级心衰, 冠心病, 心律失常具有较好的疗效^[5]。山楂提取物的心

血管活性机制还不清楚, 但有报道认为山楂叶对心血管疾病的作用与其提取物具有抗氧化活性有关, 通过抑制氧自由基(oxygen free radical, OFR)的产生从而保护心脏免受伤害。生物体内的氧自由基包括超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(·OH)、一氧化氮(NO)以及衍生物如过氧化氢(H₂O₂)、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、单线态氧(¹O₂)、过氧化脂质(ROOH)等。这些氧自由基在许多疾病的发生与发

收稿日期: 2007-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472161); 江西省自然科学基金资助项目(0640163)

作者简介: 刘荣华(1964--), 男, 江西省永新县人, 江西中医学院副教授, 博士, 长期从事中药化学教学和中药活性物质基础及中药质量研究, 先后发表学术论文 15 篇, 参与编写专业著作 7 部, 主持国家自然科学基金和江西省自然科学基金项目各 1 项, 参与“973”和“十一五”科技支撑项目各 1 项, 研究方向为中药质量评价。

Tel: (0791) 7118657 Fax: (0791) 7118658 E-mail: rhlou@163.com

* 通讯作者 余伯阳 Tel: (025) 85391042 Fax: (025) 85391042 E-mail: Boyangyu@yahoo.com.cn

展中起着重要的作用^[6],尤其对心血管疾病^[7]。抗氧化剂可以降低氧自由基对心肌组织的损伤,并减少胆固醇在动脉中的沉积^[8]。现代研究表明,山楂的抗氧化主要活性物质为酚性成分^[9],包括黄酮类、黄烷醇类和酚酸类。山楂叶中富含大量的多元酚类成分^[10,11],其中总黄酮量约为1.5%,远远高于山楂中的量^[11],受到国内外的普遍重视。德国将山楂叶制剂与银杏叶制剂相提并论,统称为“两叶制剂”,广泛用于治疗心血管疾病。

目前对山楂叶抗氧化及心血管活性还缺乏系统的物质基础研究。因此,本实验首先提取分离单子山楂 *Crataegus monogyna* Jacq. 叶中的主要多元酚类成分并鉴定其结构,然后比较这些成分对 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 的清除作用,并进行构效关系分析,目的是比较这些成分的抗氧化活性,筛选出单子山楂叶的抗氧化主要活性成分。

1 材料与方法

1.1 样品、仪器与试剂:单子山楂 *C. monogyna* Jacq. 叶采自德国,由美国华盛顿大学邱声祥教授提供并鉴定;凭证标本存于中国药科大学生药标本室。

微弱光分析仪及 IC_{50} 计算软件由中国科学院北京生物物理研究所提供。

鲁米诺(Sigma公司);抗坏血酸(Vitamin C, 中国医药集团上海化学试剂公司,AR);1,10-菲罗啉(上海凌峰化学试剂有限公司,纯度>99%);其他试剂均为分析纯(购于上海化学试剂公司)。

1.2 多元酚类成分的提取分离:干燥的单子山楂叶粗粉3 kg用50%甲醇提取2次,第1次用45 L提取90 min,第2次用30 L提取60 min,合并两次提取液,减压浓缩到2 L左右。浓缩液先用石油醚萃取(1 L $\times$ 4),再用醋酸乙酯萃取(1 L $\times$ 4),最后用正丁醇萃取(1 L $\times$ 4)。3种溶剂提取液分别浓缩得石油醚部位30 g、醋酸乙酯部位25 g、正丁醇部位35 g。萃取后剩下的水部位除去有机溶剂后冷冻干燥得450 g。以上各提取部位分别用于抗 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 实验。结果显示,正丁醇部位抗氧化活性最强。因此对山楂叶的正丁醇部位进行较为系统的分离并用于抗氧化活性比较研究。

从以上山楂叶正丁醇部位分离得到槲皮素(quercetin, Qu) 10 mg、金丝桃苷(hyperoside, HP) 10 mg、槲皮素 3-O- β -D-葡萄糖苷(quercetin 3-O- β -D-glucoside, QG) 10 mg、芦丁(rutin, Rut) 30 mg、牡荆素(vitexin, Vit) 600 mg、6"-O-乙酰-牡荆素 6"-O-acetyl-vitexin (AcV) 10 mg、牡荆素 2"-

O-鼠李糖苷(vitexin 2"-O-rhamnoside, VRh) 1 000 mg、牡荆素 4"-O-乙酰-2"-O-鼠李糖苷(vitexin 4"-O-acetyl-2"-O-rhamnoside, VAR) 30 mg、表儿茶素[(-)-epicatechin (EP)] 10 mg和绿原酸(chlorogenic acid, ChA) 20 mg。以上化合物结构通过UV、IR、MS、 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR等光谱数据鉴定^[12],纯度经归一法测定均为98%以上。

1.3 抗氧化活性分析

1.3.1 样品溶液制备:以上各成分用二甲亚砜(DMSO)溶解成0.05 mol/L的初浓度,实验时再用DMSO配制成所需要的各种不同浓度。

1.3.2 抗过氧化氢(H_2O_2)实验:抗过氧化氢实验用过氧化氢—鲁米诺—碳酸缓冲溶液(pH 9.5)体系^[13]。发光杯中加入50 μL 样品溶液(空白对照用50 μL DMSO)和50 μL H_2O_2 (0.15%),再用900 μL 鲁米诺(1 mmol/L)-碳酸缓冲液(pH 9.5)(1:17)启动发光。记录0~240 s的发光曲线。发光强度(chemical luminescence, CL)以曲线下面积表示。计算自由基清除率。

$$\text{自由基清除率} = (\text{CL}_{\text{对照}} - \text{CL}_{\text{样品}}) / \text{CL}_{\text{对照}} \times 100\%$$

1.3.3 抗羟自由基($\cdot\text{OH}$)实验:抗羟自由基实验采用邻菲罗啉- Cu^{2+} -抗坏血酸- H_2O_2 体系^[13]。发光杯中加入50 μL CuSO_4 (1 mmol/L), 20 μL 抗坏血酸(1 mmol/L), 50 μL 样品溶液(空白对照用50 μL DMSO), 50 μL 邻菲罗啉(1 mmol/L), 50 μL H_2O_2 (0.15 mol/L),再用780 μL 硼酸缓冲溶液(pH 8.62)启动发光。CL以峰高表示。计算自由基清除率。

1.4 多元酚类成分抗氧化活性评价:用SPSS 11.0软件建立各成分对两种氧自由基清除活性的量-效关系数学模型。通过量-效关系数学模型算出清除50%自由基时的药物浓度(IC_{50})值。多元酚类成分对氧自由基的清除活性用 IC_{50} 值表示。

2 结果与讨论

2.1 山楂叶主要多元酚类成分抗氧自由基活性:见表1和表2。从两表中各成分对2种氧自由基的 IC_{50} 值来看, H_2O_2 的清除活性强弱为Rut>HP>QG>Qu>EP>ChA>VAR>Vit>VRh>AcV。而对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性强弱为Rut>QG>HP>Vit>Qu>EP>AcV>ChA>VRh>VAR。以上结果表明Rut、QG、HP、Qu、EP对这两种氧自由基均表现出较好的清除活性。

2.2 表1和2显示了山楂叶中不同结构多元酚类成分对 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性,结果表明其活性与结构之间具有显著的相关性。

表1 各样品清除 H_2O_2 的量效关系、检测范围和活性 (IC_{50}) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 1 Dose-effect relationship, test range, and antioxidant activity (IC_{50})of scavenging for H_2O_2 of all samples ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	量效关系	R^2	$IC_{50}/(mmol \cdot L^{-1})$	检测范围/($mmol \cdot L^{-1}$)
Qu	$y=15.815 \ln(x)+124.66$	0.986 1	$0.008\ 91 \pm 0.000\ 12$	$0.162\ 8 \sim 0.000\ 5$
HP	$y=18.682 \ln(x)+175.67$	0.996 8	$0.0012\ 0 \pm 0.000\ 07$	$0.010\ 49 \sim 0.000\ 21$
Rut	$y=13.924 \ln(x)+151.814$	0.982 8	$0.000\ 67 \pm 0.000\ 06$	$0.084 \sim 0.004$
QG	$y=16.064 \ln(x)+156.22$	0.962 2	$0.001\ 34 \pm 0.000\ 08$	$0.011\ 45 \sim 0.000\ 26$
Vit	$y=14.232 \ln(x)+101.29$	0.960 1	$0.027\ 2 \pm 0.002\ 3$	$1.158 \sim 0.006$
AcV	$y=17.560 \ln(x)+111.279$	0.969 9	$0.030\ 5 \pm 0.001\ 6$	$0.211\ 0 \sim 0.001\ 3$
VRh	$y=15.607 \ln(x)+105.25$	0.967 0	0.029 ± 0.004	$0.865 \sim 0.004$
VAR	$y=15.994 \ln(x)+108.428$	0.975 5	0.026 ± 0.003	$0.987 \sim 0.005$
EP	$y=11.781 \ln(x)+104.801$	0.991 5	$0.009\ 5 \pm 0.000\ 9$	$0.207 \sim 0.003$
ChA	$y=16.382 \ln(x)+117.02$	0.988 4	0.017 ± 0.005	$0.143\ 2 \sim 0.001\ 1$

表2 各样品清除 $\cdot OH$ 的量效关系、检测范围和活性 (IC_{50}) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Dose-effect relationship, test range, and antioxidant activity (IC_{50})of scavenging for $\cdot OH$ of all samples ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	量效关系	R^2	$IC_{50}/(mmol \cdot L^{-1})$	检测范围/($mmol \cdot L^{-1}$)
Qu	$y=19.529 \ln(x)+107.47$	0.980 3	$0.052\ 7 \pm 0.001\ 3$	$1.628 \sim 0.007$
HP	$y=40.575 \ln(x)+191.875$	0.992 8	$0.030\ 3 \pm 0.000\ 9$	$0.042 \sim 0.007$
Rut	$y=26.278 \ln(x)+144.44$	0.974 1	$0.027\ 5 \pm 0.002\ 4$	$0.169 \sim 0.006$
QG	$y=38.127 \ln(x)+184.17$	0.963 5	$0.029\ 63 \pm 0.000\ 27$	$0.052\ 7 \sim 0.000\ 4$
Vit	$y=38.958 \ln(x)+178.02$	0.977 8	$0.037\ 4 \pm 0.001\ 9$	$0.463 \sim 0.004$
AcV	$y=19.413 \ln(x)+97.825$	0.958 9	0.085 ± 0.005	$0.211 \sim 0.013$
VRh	$y=33.005 \ln(x)+102.385$	0.961 0	0.204 ± 0.012	$0.86 \sim 0.09$
VAR	$y=16.438 \ln(x)+74.454$	0.968 7	0.226 ± 0.009	$0.987 \sim 0.015$
EP	$y=27.948 \ln(x)+127.13$	0.987 8	$0.063\ 3 \pm 0.001\ 3$	$0.207 \sim 0.003$
ChA	$y=60.122 \ln(x)+176.26$	0.975 1	0.122 ± 0.008	$0.28 \sim 0.06$

槲皮素、绿原酸、表儿茶素、金丝桃苷、槲皮素 3- O - β -D-葡萄糖苷和芦丁比其他成分的抗氧化活性强。这表明具有邻二酚羟基结构的多元酚类化合物,有很强的抗氧化能力;邻二酚羟基是其抗氧化、清除氧自由基的主要活性部位。酚类化合物与氧自由基反应生成半醌式结构,由于邻二酚羟基的存在,其半醌式结构相对稳定,故表现出更强的抗氧化活性^[14]。

比较槲皮素及其苷类化合物金丝桃苷、槲皮素 3- O - β -D-葡萄糖苷和芦丁对这两种氧自由基的清除活性。结果表明,槲皮素的活性最弱。这个结果与本课题组已报道的抗超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$) 活性结果不同^[15]。对于槲皮素和其苷类来说,槲皮素抗超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$) 活性远比其苷类强,糖基的存在会降低其活性;而抗 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的活性则不然,糖基的存在增强了其活性,因此苷类活性比苷元强。

所以从实验结果推测,因为 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 氧化能力比 $O_2^{\cdot -}$ 强,可能 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 能氧化槲皮素苷类的糖基,而 $O_2^{\cdot -}$ 不能氧化槲皮素苷类的糖基。金丝桃苷、槲皮素 3- O - β -D-葡萄糖苷和芦丁都是槲皮素的 C_3 - O -糖苷,在此反应条件下容易水解成槲皮素和还原糖,如葡萄糖、鼠李糖和半乳糖等,这些还原

糖和槲皮素均可被 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 氧化。因此,金丝桃苷、槲皮素 3- O - β -D-葡萄糖苷和芦丁对 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的清除作用很可能是槲皮素与其糖基共同作用的结果,所以表现出比槲皮素更强的活性。

另一组黄酮类成分牡荆素、6"- O -乙酰-牡荆素、牡荆素 2"- O -鼠李糖苷、牡荆素 4"- O -乙酰-2"- O -鼠李糖苷,对两种氧自由基的清除活性比槲皮素及其苷类要弱。因为这一组黄酮均为芹菜素的 C_6 -糖苷,属于 C 苷类化合物,在此条件下不易水解成糖和苷元,另外苯环上也不具有邻二酚羟基^[15]。但这一组成分之间的抗氧化活性差异较小,抗氧化活性的强弱随糖基数目的增加略有降低。可能是由于糖基的空间效应所致。

表儿茶素的活性比槲皮素弱,这表明 2,3 位双键与 4 位羰基是其抗氧化活性的重要基团^[14]。当 2,3 位双键饱和以后,其抗氧化活性就会降低。

3 结论

本研究主要目的是对单于山楂叶中抗氧化主要活性成分进行了筛选。首先将山楂叶提取物分成 4 个部位(石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位),通过对 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的清除活性为导向,

比较这4个部位的活性强弱,确定正丁醇部位为主要活性部位。因此针对山楂叶的正丁醇部位进行系统的纯化分离,从中分离得到大量的多元酚类成分,通过体外抗 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 实验比较这些成分的抗氧化活性。结果表明,所有样品的 IC_{50} 值均较低,表明这些样品均具有较强的抗氧化活性;其中尤以芦丁、槲皮素 3-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、槲皮素和表儿茶素活性最强。因此认为,芦丁、槲皮素 3-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、槲皮素和表儿茶素等可能是单子山楂叶抗氧化和治疗心血管疾病的主要活性物质。

References:

- [1] Mabberley D J. *The Plant-book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- [2] Phipps J B. Biogeographic, taxonomic, and cladistic relationships between east Asiatic and North American *Crataegus* [J]. *Ann Missouri Bot Garden*, 1983, 70: 667-700.
- [3] Christensen K I. Revision of *Crataegus* Sect. *Crataegus* and *Nothosect*. *Crataegineae* (Rosaceae-Maloideae) in the old world [J]. *Syst Bot Monographs*, 1992, 35: 1-199.
- [4] Ammon H P T, Händel M. *Crataegus*, toxicology and pharmacology. I. Toxicity [J]. *Plant Med*, 1981, 43: 105-120.
- [5] Holubarsch C J F, Colucci W S, Meinertz T, et al. Survival and prognosis: investigation of *Crataegus* extract WS 1442 in congestive heart failure SPICE rationale, study design and study protocol [J]. *Eur J Heart Fail*, 2000, 2: 431-437.
- [6] Kong S, Davison A J. The role of interaction between O_2 , H_2O_2 , e^- , and $O_2^{\cdot-}$ in free radical damage to biological systems [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1980, 704: 18-25.
- [7] Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective [J]. *Clin Chem*, 1996, 4: 498-506.
- [8] Ferrari R, Guardigli G, Mele D, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(4): 1699-1711.
- [9] Zhang Z S, Chang Q, Zhu M, et al. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits [J]. *J Nutr Biochem*, 2001, 12: 144-152.
- [10] Lamaison J L, Carnat A. Content of major flavonoids in flowers and leaves of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. in relation to the phase of development [J]. *Plant Med Phytother*, 1991, 25(1), 12-16.
- [11] Lamaison J L, Carnat A. Content of principal flavonoids of the flowers and leaves of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. (Rosaceae) [J]. *Pharm Acta Helv*, 1990, 65(11): 315-320.
- [12] Ding X B, Jiang Y Q, Zhong Y, et al. Chemical constituents of the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var *major* N. E. Br [M]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(5): 295-297.
- [13] Qin M J, Ji W L, Liu J, et al. Scavenging effects on radicals of isoflavones from rhizom of *Belamcandae chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 640-641.
- [14] Bors W, Heller W, Michel C, et al. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies [J]. *Meth Enzymol*, 1990, 186: 343-355.
- [15] Liu R H, Yu B Y, Qiu S X, et al. Study on scavenging activities for superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) and structure-activity relationship of polyphenolic compounds from leaves of *Crataegus* [J]. *Chin Pharma J* (中国药理学杂志), 2005, 40(14): 1066-1068.

刺五加注射液对大鼠大脑中动脉栓塞所致脑缺血损伤的保护作用

谢湘林¹, 刘宏雁^{1*}, 邹洪斌², 刘 凯¹, 李 晔¹, 臧晓峰¹

(1. 吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一附属医院, 吉林 长春 130021)

刺五加注射液为刺五加的茎叶制成的灭菌水溶液,其主要成分为黄酮,也含有皂苷等其他成分。临床上广泛应用于缺血性脑血管病的治疗。大脑中动脉栓塞与人类缺血性中风比较类似,但关于刺五加注射液对大脑中动脉栓塞所致脑缺血损伤的研究报道甚少,有的研究观察时间较短^[1],本实验旨在探讨刺五加注射液对大脑中动脉栓塞所致脑缺血损伤大鼠的保护作用,为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物:Wistar 大鼠 36 只,雄性,体重 300~350 g,由长春高新医学实验动物中心提供,合格证号:10-5118。

1.2 药品:刺五加注射液(含总黄酮 5 mg/mL)为黑龙江省完达山制药厂生产,批号 200211111。

1.3 实验方法:水合氯醛 0.4 g/kg ip 麻醉大鼠,按文献方法制作局部性脑缺血模型^[2]:将大鼠仰位固

收稿日期:2007-01-19

基金项目:吉林省中医药管理局科研基金(2004-084)

作者简介:谢湘林(1958-),男,吉林省长春市人,高级实验师,主要从事中枢药理方面的研究。

Tel: (0431) 5619705 E-mail: xielx@jlu.edu.cn

* 通讯作者 刘宏雁