

小远志中糖酯类成分及其体外抗黄嘌呤氧化酶活性研究

周凌云^{1,2}, 李盼盼², 余小红², 王军民², 鲁斌², 华燕^{2*}

1. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002

2. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224

摘要: 目的 研究小远志 *Polygala sibirica* var. *megalopha* 中的糖酯类化学成分及其抗黄嘌呤氧化酶活性, 并分析其构效关系。方法 小远志 75%乙醇提取物通过 D101 大孔树脂, 依次用水和 35%、65%、95%乙醇洗脱, 采用尿酸生成法检测出 65%乙醇洗脱部分抗黄嘌呤氧化酶活性最高 ($IC_{50}=10.83 \mu\text{g/mL}$), 对该部分采用多种柱色谱方法进行分离纯化, 结合活性追踪, 得到 4 个对黄嘌呤氧化酶具有高抑制活性的糖酯类化合物。结果 4 个糖酯类化合物分别鉴定为远志寡糖酯 A (1)、3,6'-二芥子酰基蔗糖 (2)、3'-*E*-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-6-苯基蔗糖 (3)、3'-*E*-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-4-苯基蔗糖 (4), 均为首次从该植物中分离得到。化合物 1、3、4 对黄嘌呤氧化酶的 IC_{50} 分别为 9.5、10.2、7.7 $\mu\text{mol/L}$, 比对照品别嘌呤醇 ($IC_{50}=11.2 \mu\text{mol/L}$) 抑制作用略强, 而化合物 2 ($IC_{50}=1.3 \mu\text{mol/L}$) 则显示出更强的抗黄嘌呤氧化酶活性, 推测该类糖酯结构中苯乙烯基与糖基相连的结构片段是发挥药效的重要基团。结论 糖酯类化合物作为新的黄嘌呤氧化酶高效抑制剂, 具有开发成为抗痛风药的潜力。

关键词: 小远志; 糖酯类成分; 抗黄嘌呤氧化酶活性; 3'-*E*-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-4-苯基蔗糖; 3,6'-二芥子酰基蔗糖

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)23-4146-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.005

Glycolipids from *Polygala sibirica* var. *megalopha* and their *in vitro* inhibitory activity on xanthine oxidase

ZHOU Ling-yun^{1,2}, LI Pan-pan², YU Xiao-hong², WANG Jun-min², LU Bin², HUA Yan²

1. School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

2. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Objective To investigate the glycolipids from *Polygala sibirica* var. *megalopha* and their structure-activity relationship of xanthine oxidase (XO) inhibitory activity. **Methods** The 75% EtOH extract of *P. sibirica* var. *megalopha* was chromatographed with D101 macroporous resins column by water, 35% EtOH, 65% EtOH, and 95% EtOH, successively. Compared to other elution parts, the 65% EtOH elution part exhibited stronger XO inhibition. Further bioassay-guided separation led to the isolation of four known glycolipids, which demonstrated potent XO inhibition. **Results** Four compounds were identified to be tenuifolioside A (1), 3,6'-disinapoyl sucrose (2), 3'-*E*-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-6-benzoyl sucrose (3), and 3'-*E*-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-4-benzoyl sucrose (4) through spectroscopic data analysis. All compounds were obtained from this plant for the first time. This enzyme inhibition was dose dependent and the IC_{50} values of compounds 1, 3, and 4 were 9.5, 10.2, and 7.7 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Among them, compound 2 had significantly higher XO inhibitory activity than that of the control allopurinol ($IC_{50}=11.2 \mu\text{mol/L}$). It was speculated that the styryl side chain linking with sugar base played an important role on the XO inhibitory activity. **Conclusion** Glycolipides as a novel series of XO inhibitors, may be developed into a promising remedy for human gout.

Key words: *Polygala sibirica* L. var. *megalopha* Fr.; glycolipids; xanthine oxidase inhibitory activity; 3'-*E*-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-4-benzoyl sucrose; 3,6'-disinapoyl sucrose

小远志 *Polygala sibirica* L. var. *megalopha* Fr. 是云南一种民间药用植物, 主要用于解热散寒和

祛风止痛^[1]。文献报道其中主要成分为黄酮类化合物^[2-3]。本课题组前期研究工作中将小远志 75%乙醇

收稿日期: 2016-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260083); 皖南医学院重点科研项目培育基金 (WK2016Z06)

作者简介: 周凌云 (1980—), 男, 博士在读, 主要从事天然产物研究与开发。Tel: 13965151840 E-mail: zly4321@sina.com

*通信作者 华燕 (1968—), 女, 教授, 主要从事天然产物研究与开发。Tel: 13888668877 E-mail: huayan1216@163.com

提取物通过 D101 大孔树脂柱色谱,依次用水和 35%、65%、95%乙醇洗脱,并采用尿酸生成法来测定 4 部分洗脱物对黄嘌呤氧化酶(XO)的抑制活性。表 1 显示 65%乙醇洗脱物有更高的抗 XO 的活性。当样品质量浓度达到 10.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率超过了 50%,而其他的洗脱物活性稍低。同时,当样品质量浓度降低至 1.75 $\mu\text{g/mL}$ 时,其余提取物抑制率已经不显著,而 65%乙醇洗脱物仍然具有 31.6%的抑制率。因此,本实验对体外 XO 抑制活性较高的小远志 65%乙醇洗脱物进行化学成分的分离,以期发现其中对 XO 抑制率更高的单体化合物。通过分离纯化,结合活性追踪,得到 4 个对 XO 有较高抑制活性的糖酯类化合物,分别鉴定为远志寡糖酯 A (tenuifolioside A, **1**)、3,6'-二芥子酰基蔗糖 (3,6'-disinapoyl sucrose, **2**)、3'-E-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-6-苯基蔗糖 (3'-E-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-6-benzoyl sucrose, **3**)、3'-E-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-4-苯基蔗糖 (3'-E-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-4-benzoyl sucrose, **4**),均为首次从该植物中分离得到。

糖酯类物质具有一定的生物活性,如抗菌^[4]、免疫调节^[5]等,但是对于抗 XO 的活性未见报道。XO 高效抑制剂有助于减少尿酸的生成,能够缓解和治疗痛风症状^[6]。本实验分离得到的糖酯类化合物与对照品别嘌呤醇相比较,对 XO 有更好的抑制活性,同时

表 1 小远志各洗脱部分体外抗 XO 活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 *In vitro* inhibitory activity of elution parts against XO ($\bar{x} \pm s, n=3$)

溶剂	质量浓度 ^{a/} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	IC ₅₀ ^{b/} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
水	1.75	4.97 $\pm$ 1.50	26.61
	3.50	13.53 $\pm$ 1.40	
	7.00	16.23 $\pm$ 1.60	
	10.50	29.68 $\pm$ 2.20	
35%乙醇	1.75	11.78 $\pm$ 2.00	12.62
	3.50	14.02 $\pm$ 2.10	
	7.00	34.32 $\pm$ 2.00	
	10.50	45.85 $\pm$ 2.30	
65%乙醇	1.75	31.60 $\pm$ 1.00	10.83
	3.50	34.88 $\pm$ 1.20	
	7.00	40.50 $\pm$ 1.30	
	10.50	53.69 $\pm$ 1.50	
95%乙醇	1.75	12.26 $\pm$ 3.60	10.91
	3.50	20.56 $\pm$ 2.70	
	7.00	36.25 $\pm$ 1.50	
	10.50	50.48 $\pm$ 3.40	

a-所有样品均溶于 DMSO b- $P < 0.05$, 下同

a-all samples were dissolved in DMSO b- $P < 0.05$, same as below

作为天然来源的化合物,避免了别嘌呤醇严重的副作用^[7],为进一步开发新的抗痛风药物奠定了基础。

1 仪器与材料

Bruker AM-500 兆超导核磁共振仪 (Bruker 公司); Bruker HTC/Esquire spectrometer 型 LC-MS (Bruker 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); 半制备色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ 反相柱 (Agilent 公司); UV-2450 紫外可见分光光度计 (北京岛津仪器有限公司)。薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ 板和柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品;凝胶 Sephadex LH-20 (Amershm 生科公司);反相填充材料 RP₁₈ (40~60 μm , Merck 公司)。XO (批号 1001669570) 溶于牛奶中,购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司;别嘌呤醇 (批号 HFBM160120319003),黄嘌呤 (批号 HX0429) 购于合肥博美生物有限公司。

小远志 *Polygala sibirica* L. var. *megalopha* Fr. 干燥全草 5 kg, 2012 年 8 月采自云南省昭通市永善县。由西南林业大学杜凡教授鉴定,标本 (2012010) 保存在西南林业大学林学院植物资源利用系药用植物教研室。

2 提取与分离

小远志干燥全草约 5 kg, 粉碎后用 75%乙醇回流提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩回收乙醇, 得到浸膏 1.7 kg。浸膏用温水溶解后, 经 D101 大孔吸附树脂柱色谱, 依次用水和 35%、65%及 95%乙醇洗脱。65%乙醇洗脱液回收溶剂后得到 480 g 粗提样品。样品经硅胶柱色谱, 用氯仿-甲醇 (1:0 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱, 得到了 7 个组分 Fr. 1 (31 g)、2 (56 g)、3 (47 g)、4 (57 g)、5 (122 g)、6 (13 g)、7 (106 g)。Fr. 2 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 9:1 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱, 得到 3 个组分 A、B 和 C。B (40 g) 经 RP₁₈ (甲醇-水 30:70 $\rightarrow$ 70:30) 洗脱后得到 11 个部分。B4 部分 (0.2 g) 经过硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 20:1 $\rightarrow$ 1:1) 洗脱得到 12 个部分, B4-7 经 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 除掉部分色素后, 再经过半制备型 HPLC 分离, 乙腈-水 (47:53) 洗脱, 得到化合物 **1** (126 mg)、**2** (25 mg)。Fr. 4 经过硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 10:1 $\rightarrow$ 0:1) 洗脱得到 10 个部分 (A~J)。E 部分 (10 g) 经过 RP₁₈ (甲醇-水 20:80 $\rightarrow$ 70:30) 洗脱后, 得到 14 个部分。E1 (161 mg) 经半制备型 HPLC 分离, 乙腈-水 (10:90) 洗脱, 依次得到化合物 **3** (25 mg)、**4** (17 mg)。化合物结构见图 1。

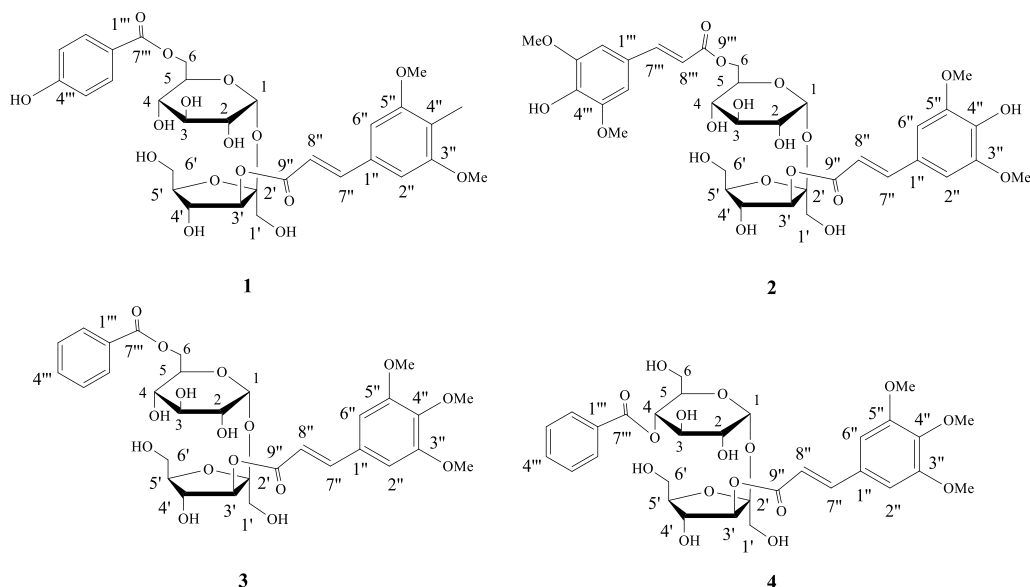


图 1 化合物 1~4 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—4

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末, 根据负离子 ESI-MS 谱给出准分子离子峰 m/z : 681 $[M-H]^-$, 结合 ^{13}C -DEPT NMR 谱, 推测分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_{17}$, 不饱和度为 13。 ^1H -NMR (500 MHz, Pyridine- d_5) δ : 7.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''', 5'''), 7.71 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 6.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 6.95 (2H, s, H-2'', 6''), 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''', 6'''), 5.49 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.86 (6H, s, OMe), 3.78 (3H, s, OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, Pyridine- d_5) δ : 166.7 (C-7'''), 166.3 (C-9''), 163.5 (C-4'''), 154.0 (C-3'', 5''), 145.7 (C-7''), 140.7 (C-4''), 132.4 (C-2''', 6'''), 130.3 (C-1''), 121.4 (C-1'''), 117.6 (C-8''), 116.0 (C-3''', 5'''), 106.2 (C-2'', 6''), 104.7 (C-2'), 93.0 (C-1), 84.6 (C-5'), 79.8 (C-3'), 75.0 (C-3), 73.6 (C-4'), 73.1 (C-2), 72.3 (C-5), 71.1 (C-4), 65.6 (C-1'), 64.5 (C-6), 62.7 (C-6'), 56.1, 60.5 (OMe)。以上光谱数据与文献报道^[4]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为远志寡糖酯 A。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, 根据负离子 ESI-MS 谱给出准分子离子峰 m/z : 753 $[M-H]^-$, 结合 ^{13}C -DEPT NMR 谱, 推测分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$, 不饱和度为 14。 ^1H -NMR (500 MHz, Pyridine- d_5) δ : 7.70 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'''), 7.05 (2H, s, H-2'', 6''), 7.03 (4H, s, H-2''', 6'''), 6.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 6.45 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'''), 5.48 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-1), 3.87 (6H, s,

OMe), 3.85 (6H, s, OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, Pyridine- d_5) δ : 167.6 (C-9''), 166.7 (C-9'''), 149.1 (C-3'', 3''', 5'', 5'''), 146.5 (C-7''), 145.9 (C-7'''), 140.4 (C-4'', 4'''), 125.1 (C-1''), 125.0 (C-1'''), 115.4 (C-8''), 115.1 (C-8'''), 106.8 (C-2'', 6''), 106.6 (C-2''', 6'''), 104.7 (C-2'), 92.7 (C-1), 84.7 (C-5'), 79.3 (C-3'), 75.2 (C-3), 74.0 (C-2), 73.1 (C-4'), 72.2 (C-5), 71.6 (C-4), 65.7 (C-1'), 65.1 (C-6), 63.3 (C-6'), 56.2, 56.3 (OMe)。以上数据与文献报道^[4]基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 3,6'-二芥子酰基蔗糖。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, 根据正离子 ESI-MS 谱给出准分子离子峰 m/z : 689 $[M+Na]^+$, 结合 ^{13}C -DEPT NMR 谱, 推测分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$, 不饱和度为 13。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.71 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 6.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 6.95 (2H, s, H-2'', 6''), 5.48 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.86 (6H, s, OMe), 3.78 (3H, s, OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.0 (C-7'''), 167.7 (C-9''), 154.8 (C-3'', 5''), 147.2 (C-7''), 141.2 (C-4''), 134.3 (C-4'''), 131.4 (C-1''), 131.2 (C-1'''), 130.7 (C-3''', 5'''), 129.6 (C-2''', 6'''), 117.7 (C-8''), 106.8 (C-2'', 6''), 104.8 (C-2'), 93.1 (C-1), 84.1 (C-5'), 79.6 (C-3'), 74.9 (C-3), 74.0 (C-4'), 73.0 (C-2), 72.4 (C-5), 71.5 (C-4), 65.5 (C-1'), 65.5 (C-6), 63.4 (C-6'), 56.6, 61.1 (OMe)。以上数据与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 3'-*E*-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-6-苯基蔗糖。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, 根据正离子 ESI-MS 谱给出准分子离子峰 m/z : 689 $[M+Na]^+$, 结合 ^{13}C -DEPT NMR 谱, 推测分子式为 $C_{31}H_{38}O_{16}$, 不饱和度为 13。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7"), 6.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8"), 6.93 (2H, s, H-2", 6"), 5.47 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.86 (6H, s, OMe), 3.78 (3H, s, OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.0 (C-7""), 167.8 (C-9"), 154.8 (C-3", 5"), 147.2 (C-7"), 141.2 (C-4"), 134.3 (C-4""), 131.5 (C-1"), 131.3 (C-1""), 130.7 (C-3""), 129.6 (C-2""), 117.8 (C-8"), 106.8 (C-2", 6"), 104.9 (C-2'), 93.1 (C-1), 84.1 (C-5'), 79.6 (C-3'), 74.9 (C-3), 74.0 (C-4'), 73.2 (C-2), 72.4 (C-5), 76.6 (C-4),

65.6 (C-1'), 60.8 (C-6), 63.4 (C-6'), 56.7, 61.2 (OMe)。以上数据与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 3'-E-3,4,5-三甲氧基肉桂酰基-4-苯基蔗糖。

4 抗 XO 活性测试

抗 XO 活性实验参考文献方法^[9]进行改进。按照表 2 顺序依次加入不同试样 (其中供试样浓度分别预先配制成 1.75、3.50、7.00、10.50 $\mu g/mL$), 混合均匀, 水浴温度为 25 $^{\circ}C$, 反应时间 30 min, 用紫外分光光度计测定各处理样品, 在 290 nm 处检测吸光度 (A) 值。根据以下公式计算不同质量浓度样品对 XO 的抑制率 (表 3)。其中, $A_1 \sim A_4$ 为实验处理 1~4 在 290 nm 处的 A 值。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)$$

表 2 抗 XO 试验反应体系
Table 2 Reaction system of XO inhibiting test

处理	供试样品 (不同质量浓度)/ μL	PBS 缓冲液 (pH 7.4)/ μL	XO (0.04 U/mL)/ μL	黄嘌呤溶液 (0.48 mmol/L)/ μL
1	200	200	0	0
2	800	1300	1 000	1 125
3	500	0	500	0
4	500	500	500	500

表 3 糖酯与对照品别嘌呤醇体外抗 XO 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 *In vitro* inhibitory activity of glycolipids and allopurinol against XO ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	样品浓度 $a/$ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	抑制率/ %	IC ₅₀ ^{b/} ($\mu mol \cdot mL^{-1}$)
1	1.75	20.51 $\pm$ 2.70	9.5
	3.50	33.24 $\pm$ 1.90	
	7.00	52.12 $\pm$ 1.50	
	10.50	62.34 $\pm$ 2.30	
2	1.75	68.31 $\pm$ 1.70	1.3
	3.50	70.68 $\pm$ 1.40	
	7.00	89.92 $\pm$ 2.50	
	10.50	91.94 $\pm$ 0.90	
3	1.75	19.11 $\pm$ 1.30	10.2
	3.50	31.63 $\pm$ 2.40	
	7.00	51.32 $\pm$ 2.00	
	10.50	61.90 $\pm$ 0.10	
4	1.75	27.36 $\pm$ 1.70	7.7
	3.50	38.18 $\pm$ 1.90	
	7.00	57.22 $\pm$ 0.50	
	10.50	68.14 $\pm$ 0.80	
别嘌呤醇	1.75	53.45 $\pm$ 2.50	11.2
	3.50	82.02 $\pm$ 1.40	
	7.00	93.81 $\pm$ 0.50	
	10.50	97.75 $\pm$ 0.80	

表 3 显示了 4 个糖酯与对照品别嘌呤醇体外抗 XO 活性。化合物 **1**、**3**、**4** 的抑制活性 (IC₅₀ 分别为 9.5、10.2、7.7 $\mu mol/L$) 比对照品别嘌呤醇 (IC₅₀ = 11.2 $\mu mol/L$) 略高, 而化合物 **2** (IC₅₀ = 1.3 $\mu mol/L$) 则显示了比对照品更高的抑制活性。结合结构, 推测其中的苯乙烯基与糖基相连的片段在空间上与 XO 有较高的适应性, 可以与黄嘌呤竞争, 从而起到抑制尿酸生成的作用。化合物 **2** 相比其他 3 个糖酯类化合物, 可能由于分子中含有 2 个起效片段, 其抑制效果更强。

5 结论

本实验根据活性追踪, 分离得到了 4 个对 XO 有较强抑制活性的糖酯类化合物, 并初步对构效关系提出了一些假设, 为进一步研究构效关系提供了方向。这一类新型的高效抗 XO 的化合物, 也有着进一步被开发成治疗痛风药物的潜力。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 宛 瑜, 郁慧珍, 叶 玲. 从小远志中分离黄酮醇和口山酮衍生物 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 30(7): 51-55.

- [3] Huang Y J, Zhou L Y, Wang J M, *et al.* Two new flavonol glycosides from *Polygala sibirica* L. var. *megalo*pha Fr. [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21494-21500.
- [4] Jiang Y, Tu P F, Chen X J. Isolation of two sucrose esters from *Polygala tenuifolia* by high speed countercurrent chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2005, 28(10): 1583-1592.
- [5] Zou M, Yu S S, Wang K, *et al.* Glycosylation of ent-kaurene derivatives and an evaluation of their cytotoxic activities [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(3): 289-295.
- [6] 韩莹, 朱翊, 傅得兴. 非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的药理与临床评价 [J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(8): 635-638.
- [7] Umamaheswari M, Asokkumar K, Somasundaram A, *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109(3): 547-511.
- [8] Miyase T, Ueno A. Sucrose derivatives from the roots of *Polygala tenuifolia* [J]. *Shoya Kugaku Zashi*, 1993, 47(3): 267-276.
- [9] 齐万虎, 蒋企洲, 蒋建勤. 黄瑞香中化学成分抑制黄嘌呤氧化酶活性及其抑制机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 141-144.