

绞股蓝中木脂素体外抗氧化及抑菌活性研究

王晓闻¹, 章华平², 陈峰², 王茜³, 温伟业⁴

(1.山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801; 2.克莱姆森大学食品与营养系, 美国 南卡罗来纳州 克莱姆森 29634; 3.克莱姆森大学遗传与生物化学系, 美国 南卡罗来纳州 克莱姆森 29634; 4.山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要:干燥绞股蓝粉碎后用乙醇反复浸泡, 合并浸泡液减压浓缩后多次反复用正相硅胶柱层析、反相硅胶(ODS-AQ)柱层析和凝胶 LH-20 柱层析进行分离, 得 3 个纯化合物 I、II、III 并对其体外抗氧化和抑菌作用进行研究。结果表明: 结构鉴定表明 3 个化合物均为木脂素类物质。化合物 III 对 DPPH 自由基有较强清除作用, 化合物 I 的清除能力较弱, 而化合物 II 在实验浓度范围内没有显示出清除 DPPH 自由基作用; 3 种化合物对金属的螯合能力都比较弱; 化合物 II 对变异链球菌有一定的抑制作用, 对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用, 而对大肠杆菌和沙门氏菌显示较弱的抑制作用; 化合物 III 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌仅显示出微弱的抑制作用, 化合物 I 也显示出与化合物 III 相似的抑菌趋势, 但作用更弱。

关键词:绞股蓝; 木脂素; 抗氧化; 抑菌

in vitro Antioxidant and Anti-microbial Activities of Lignan Compounds from *Gynostemma pentaphyllum*

WANG Xiao-wen¹, ZHANG Hua-ping², CHEN Feng², WANG Xi³, WEN Wei-ye⁴

(1. Food Science and Engineering College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
2. Department of Food Science and Human Nutrition, Clemson University, Clemson South Carolina 29634, USA;
3. Department of Genetics and Biochemistry, Clemson University, Clemson South Carolina 29634, USA;
4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Chemical investigations of the EtOH extract of *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae) led to the isolation of 3 lignans, named compounds I, II and III. Compound III showed stronger DPPH free radical scavenging activity when compared to BHT at the same concentrations, while compound I had only very little DPPH free radical scavenging activity and compound II failed to scavenge DPPH free radicals within the experimental concentration range. All the compounds had a weaker ability to chelate Fe²⁺ when compared to EDTA. Compound II inhibited *Streptococcus mutans* to a certain extent and strongly inhibited *Staphylococcus aureus*, while had very little inhibitory effect against *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*; also, compound III could weakly inhibit *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*; and compound I had the same but weaker antimicrobial spectrum as that of compound III.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; lignans; antioxidant activity; anti-microbial activity

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0154-04

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 又名七叶胆、公罗锅底、落地生根、小苦药、遍地生根、五叶参等, 属于葫芦科(Cucurbitaceae)绞股蓝属(*Gynostemma*), 多年生草质攀援藤本植物^[1-2], 是一种传统的中药, 在我国有悠久的历史。现代药理学研究认为绞股蓝具有降低胆固醇水平、调节血压、增强免疫能力、镇静、抗疲劳、抗溃疡等作用^[3-5]。

还有报道绞股蓝的水煎溶液有抑菌作用^[6]。在报道的绞股蓝化学成分中主要是绞股蓝皂甙, 据 Scifinder 数据库资料显示, 截至 2007 年 7 月科学家已经从绞股蓝中分离出 100 多种绞股蓝皂甙, 但是未见有木脂素的报道。本研究在前期实验基础上, 对分离得到的 3 种木脂素抑菌作用进行研究, 为扩展绞股蓝的应用提供参考。

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 山西省出国留学人员科研项目(2009040)

作者简介: 王晓闻(1968—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: wwxxw11@163.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

绞股蓝由山西农业大学动物药厂提供, 由山西农业大学动物科技学院中兽医教研室鉴定为绞股蓝干燥全草, 取根茎备用。

供试菌株: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, C56024)、沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, ATCC 10708)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 4350)、变异链球菌(*Streptococcus mutans* Clarke, ATCC 25175TM)购于美国 ATCC 公司。

柱层析硅胶(200~300目) 青岛海洋化工有限公司; Sephadex LH-20 凝胶、正反相薄层层析板德国 Merk 公司; AQ12S50-1000、ODS-AQ 反相柱层析硅胶 日本 YMC 公司。

DPPH、BHT 美国 Sigma 公司; FeCl₂、3-(2-吡啶基)-5,6-双(4-苯磺酸)-1,2,4-三嗪(Ferrozine) 美国 Fluka 公司; EDTA、甲醇 美国 Fisher 公司。

Brucker AM-300 核磁共振仪(¹H (300 MHz)、¹³C(75 MHz)、四甲基硅(TMS)为标准物质、CD₃OD 为样品溶剂); Q-TOF microTM 质谱仪 美国 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 绞股蓝木脂素的提取分离纯化

干燥的绞股蓝根及茎 5kg 用 95% 乙醇于室温下萃取 3 次(15L × 3), 每次 24h, 合并萃取液, 减压浓缩干燥, 得乙醇粗提物。将粗提物分散于适量水中, 分别用氯仿萃取、弃氯仿层, 再用乙酸乙酯反复萃取。收集乙酸乙酯层, 减压浓缩干燥后, 硅胶柱层析进行分离, 用氯仿、甲醇混合液梯度洗脱, 获得一较纯组分。获得的组分进行二次硅胶层析, 正己烷和丙酮梯度洗脱, 在正己烷与丙酮体积比为 4:1 处获得化合物 II, 并用甲苯和丙酮混合溶液溶解在室温下缓慢挥发得到无色结晶; 将正己烷和丙酮体积比为 1:1 处获得的组分, 用反相硅胶层析进一步纯化, 洗脱液为甲醇和水, 在甲醇和水体积比为 3:7 处获得黄色粉末并用 Sephadex LH-20 进行纯化得到化合物 I, 在甲醇和水体积比为 1:1 时获得无色粉末为化合物 III。对 3 个纯化化合物进行结构鉴定。

1.2.2 结构鉴定

在美国 Clemson 大学化学系进行并提供数据。

1.2.3 体外抗氧化能力测定

1.2.3.1 体外清除 DPPH 自由基清除能力的研究

DPPH 自由基(1,1-苯基-2-苦肟基)清除能力方法参照 Yamaguchi 等^[7]的报道略作改进。将待测物用甲醇溶解, 配成一定浓度, 并作梯度稀释。DPPH 自由基

浓度 0.25mmol/L。在试管中分别加入 0.5mL 待测液和 0.5mL DPPH 自由基溶液, 充分振摇后放于暗处在室温下反应 30min 然后于波长 517nm 处测定吸光度。用 0.5mL 待测液加等体积的甲醇作样品对照, 而 0.5mL DPPH 自由基溶液加等体积的甲醇作空白, 测定时用纯甲醇调零。按照公式(1)计算样品对 DPPH 自由基的清除能力。以 BHT 作为标准对照。做 3 次重复取平均值。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{样品+DPPH}} - A_{\text{样品+甲醇}}}{A_{\text{DPPH+甲醇}}}) \times 100 \quad (1)$$

1.2.3.2 体外螯合金属的能力

此方法采用 Dinis 等^[8]报道的方法进行适当改进。将 FeCl₂ 和 Ferrozine 试剂分别配成 2mmol/L 和 5mmol/L 的溶液, 样品处理同 1.2.1 节。取 600μL 待测液与 40μL FeCl₂ 混合后加入 80μL Ferrozine 试剂溶液, 充分混匀后在室温下反应 10min 后在波长 562nm 处测吸光度, 同时做用等体积蒸馏水代替待测液做空白, 等体积蒸馏水代替 Ferrozine 试剂做样品空白。用 EDTA 反应作标准, 按公式(2)计算样品的金属螯合能力。

$$\text{螯合率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{样品空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}}) \times 100 \quad (2)$$

1.2.4 抑菌实验

取 7 支无菌试管分别加入 1mL 菌悬液, 1 号管中加入 1mL 质量浓度为 5mg/mL 的化合物溶液, 混匀, 按照两倍稀释法依次稀释至 6 号管, 从 6 号管中吸取 1mL 混合液弃去, 7 号管做阳性对照, 另取一管加灭菌水做阴性对照。这样各试管中药物质质量浓度分别为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078mg/mL, 将试管在 37℃ 下培养 18h 后, 从上述试管中各取 0.5mL 接种于制备好的琼脂培养基上观察菌落生长情况。

2 结果与分析

2.1 绞股蓝分离物结构鉴定

得到的 3 个化合物中, 化合物 I 为一种新的化合物, 命名为 Ligballinone, 化合物 II 得到结晶并经 X 衍射验证了其结构^[9]。化合物 III 为无色粉末, 分子式: C₁₈H₂₀O₄, 相对分子质量 300。碳谱及 DEPT 谱, 碳谱上显示有 23 个碳信号, ¹³C DEPT 显示有 4 个 CH₂: δ 65.43、δ 62.54、δ 36.13、δ 32.81。7 个 CH: δ 129.96、δ 128.51、δ 126.14、δ 116.53、δ 110.01、δ 88.57、δ 55.22。其结构解析如图 1 所示, 核磁数据见表 1。δ 7.21 2H, d, J = 8.5 在 HMQC (¹J coupling) 图谱上对应的碳 δ 128.51, 其在 DEPT 上明显是 CH, 峰强度明显高于其他 CH 氢谱上积分为两个氢, 所以为两个 CH 重

表 2 3 种化合物对细菌的抑制作用
Table 2 Antimicrobial activities of compounds I, II and III

化合物	菌株	样品质量浓度/(mg/mL)						对照	
		2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	阳性对照	阴性对照
I	变异链球菌(<i>S.mutans</i>)	++	++	++	++	++	++	++	—
	金黄色葡萄球菌(<i>S.aureus</i>)	+	+	++	++	++	++	++	—
	肠炎沙门氏菌(<i>S. enteritidis</i>)	+	++	++	++	++	++	++	—
	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	+	++	++	++	++	++	++	—
II	变异链球菌(<i>S.mutans</i>)	—	—	+	+	++	++	++	—
	金黄色葡萄球菌(<i>S.aureus</i>)	—	—	—	—	+	+	++	—
	肠炎沙门氏菌(<i>S. enteritidis</i>)	—	±	+	++	++	++	++	—
	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	±	+	++	++	++	++	++	—
III	变异链球菌(<i>S.mutans</i>)	+	+	++	++	++	++	++	—
	金黄色葡萄球菌(<i>S.aureus</i>)	—	±	+	++	++	++	++	—
	肠炎沙门氏菌(<i>S. enteritidis</i>)	+	++	++	++	++	++	++	—
	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	+	+	++	++	++	++	++	—

注：—,阴性，表示无菌生长；±,疑似有菌生长；+,有菌生长；++,有大量菌生长。

3 个纯化合物对金属离子螯合作用很微弱(图 4)。化合物 III 虽然有很强的清除 DPPH 自由基的作用，但对金属离子的螯合作用却很弱。说明化合物 III 的抗氧化活性体现在对自由基的清除能力较强，化合物 III 对于其他自由基如羟自由基、超氧阴离子自由基等的影响有待进一步研究。

2.3 化合物 I、II、III 抑菌活性

用不同质量浓度的化合物分别对 4 种细菌做抑菌实验结果见表 2。

由表 2 可见，在实验浓度范围内化合物 II 对变异链球菌有一定的抑制作用，对金黄色葡萄球菌有着较强的抑制作用，而对大肠杆菌和沙门氏菌显示较弱的抑制作用；化合物 III 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌仅显示出微弱的抑制作用；化合物 I 也显示出与化合物 III 相似的抑菌趋势，但作用更弱。

3 结 论

从绞股蓝中分离出 3 个木脂素类化合物，3 个木脂素类化合物中只有化合物 III 有较强的清除 DPPH 自由基的能力，化合物 I 只有微弱的清除能力，而化合物 II 在实验质量浓度范围内没有显示出对 DPPH 自由基的清除作用，3 种化合物对金属的螯合能力在实验质量浓度范围内都很低。

变异链球菌(*Streptococcus mutans*)是寄生于人口腔中的微生物，是引起人类龋齿的主要微生物之一；金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌是常见的食源性致病

菌。3 种化合物在一定程度上对 4 种细菌显示抑制其生长的作用。

参考文献：

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志[M]. 北京:科学出版社, 1995: 389-390.

[2] BLUMERT M, LIU Jialiu. Jiaogulan-China's "immortality" herb[M]. Badger: Torchlight Publishing Inc, 1999.

[3] 齐刚, 张莉. 绞股蓝的药理作用研究进展[J]. 武警医学院学报, 2003, 12(3): 239-241.

[4] LIU Xin, YE Wencai, MO Ziyao, et al. Three dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*[J]. *Planta Medica*, 2005, 71(9): 880-884.

[5] FENG Yin, HU Lihong. Studies on chemical constituent of Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*)[J]. *ACS Symposium Series*, 2006, 925: 170-184.

[6] 曾晓黎. 绞股蓝的体外抗菌活性实验[J]. 中成药, 1999, 21(6): 308-310.

[7] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(6): 1200-1204.

[8] DINIS T C, MADERIA V M, ALMEIDA L M. Action of phenolic derivates (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavenger[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315(1): 161-169.

[9] WANG Xiaowen, ZHANG Huaping, CHEN Feng, et al. A new lignan from *Gynostemma pentaphyllum*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2009, 20(5): 589-591.

[10] PIETERS L, van DYCK S, GAO M, et al. Synthesis and biological evaluaton of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, 42(26): 5475-5481.