

## 红景天苷及其衍生物体外清除自由基作用的研究

蔡臻<sup>1</sup>, 石力夫<sup>1</sup>, 姚斌<sup>2</sup>, 陈士明<sup>3</sup> (1. 第二军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 3. 复旦大学分析测试中心, 上海 200433)

**摘要:**目的 研究红景天苷及其衍生物体外清除羟自由基 ( $\text{OH}\cdot$ ) 和超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^-$ ) 的能力。方法 用电子顺磁共振 (EPR) 波谱仪, 检测 ①由二甲基亚砷 (DMPO) 自旋捕获 Fenton 反应产生的  $\text{OH}\cdot$  的加合物的信号强度。②DMSO 在碱性有氧条件下产生的  $\text{O}_2^-$ ; 根据加入受试化合物前后 EPR 谱线强度的变化, 计算受试化合物清除自由基的效率。结果 1-(3-羟基) 苯乙基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷清除  $\text{OH}\cdot$  和  $\text{O}_2^-$  的作用最强, 优于红景天苷。结论 苯环上基团及其位置的改变、糖的类型, 可以影响红景天苷清除自由基的能力, 其中糖基对化合物清除作用的影响最大。

**关键词:**红景天苷;衍生物;羟自由基;超氧阴离子自由基;电子顺磁共振

中图分类号: S567.239; R285.5      文献标识码: A      文章编号: 1007-7693(2005)02-0114-03

## Effects of salidroside and its derivatives on the radicals by EPR method

CAI Zhen<sup>1</sup>, SHI Li-Fu<sup>1</sup>, YAO Bin<sup>2</sup>, CHEN Yim ing<sup>3</sup> (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Organic, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To research salidroside and its derivatives on the hydroxy radicals ( $\text{OH}\cdot$ ) and superoxide anion radicals ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) *in vitro*. **METHOD** ①  $\text{OH}\cdot$  generated in Fenton reaction and  $\text{O}_2\cdot^-$  generated in the alkaline dimethyl sulfoxide were used as model systems respectively, and signals of spin trapping adducts ( $\text{DMPO-OH}\cdot$ ) and  $\text{O}_2\cdot^-$  were measured by electron paramagnetic resonance (EPR). The effects of salidroside and its derivatives on EPR signals of adducts were observed. **RESULTS** The eliminating effect of m-hydroxyphenethyl- $\beta$ -D-galactoside on  $\text{OH}\cdot$  and  $\text{O}_2\cdot^-$  was stronger than the ones of salidroside and other derivatives. **CONCLUSION** The length of carbochain connecting benzene ring, hydroxyl group and its position in benzene ring and the types of saccharide group connecting aglucon were major factors on the eliminating effects of salidroside and its derivatives for  $\text{OH}\cdot$  and  $\text{O}_2\cdot^-$ , and the type of saccharide group connecting aglucon is the most important factor.

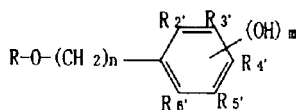
**KEY WORDS:** salidroside ; derivative; hydroxy radical; superoxide anion radicals ; EPR

自由基与癌症、衰老、心血管疾病等慢性病密切相关<sup>[1]</sup>。因此,抗氧化药物的研究成为近年来的研究热点。红景天苷(salidroside),化学名对羟苯乙基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-hydroxyphenethyl- $\beta$ -D-glucoside),是一种主要从高原药用植物红景天(*Rhodiola sachalinensis*)和常用中药女贞子(*Ligustrum lucidum*)中分离得到的活性化合物<sup>[2,3]</sup>。

近年来研究发现,红景天苷具有抗缺氧<sup>[4]</sup>、抗氧化作用,可以保护大脑皮层神经细胞免受超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )和

表 1 红景天苷及其衍生物的化学结构

**Tab 1** Salidroside and its derivatives



编号	化合物名称	R	R2'	R3'	R4'	R5'	R6'	m	n
1	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷(红景天苷)	D(+)葡萄糖	H	H	OH	H	H	1	2
2	1-(3-羟基)苯乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷	D(+)葡萄糖	H	OH	H	H	H	1	2
3	1-苯甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷	D(+)葡萄糖	H	H	H	H	H	0	1
4	1-苯丙基-β-D-吡喃葡萄糖苷	D(+)葡萄糖	H	H	H	H	H	0	3
5	1-(2-羟基)苯甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷	D(+)葡萄糖	OH	H	H	H	H	1	1
6	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃半乳糖苷	D(+)半乳糖	H	H	OH	H	H	1	2

编号	化合物名称	R	R2'	R3'	R4'	R5'	R6'	m	n
7	1-(3-羟基)苯乙基-β-D-吡喃半乳糖苷	D(+)半乳糖	H	OH	H	H	H	1	2
8	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃甘露糖苷	D(+)甘露糖	H	H	OH	H	H	1	2

1.2 仪器和试剂

ER-200D-SRC型电子顺磁共振(EPR)仪(德国 Bruker公司)。DMPO(5,5-dimethylpyrroline-N-oxide),Sigma公司;FeSO<sub>4</sub>,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,NaOH均为市售分析纯试剂。

2 方法和结果

2.1 受试样品的配制

受试样品均用三蒸水溶解稀释至所需浓度。

2.2 EPR测定

2.2.1 用 Fenton反应作为产生 OH· 自由基的模型体系,采用自旋捕获试剂 DMPO捕获 OH· 自由基,在 EPR波谱仪上测得自旋加合物的 EPR 谱。Fenton 反应体系简单,DMPO-OH· 加合物的 EPR波谱较为稳定,见图 1,可以用峰高反映羟自由基的量。DMPO捕获 Fenton反应产生自由基的机制如下:

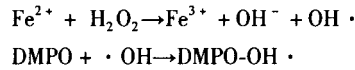
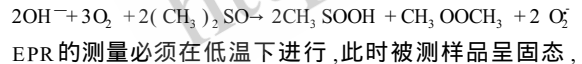


图 1 DMPO-OH· 加合物的 EPR波谱

Fig 1 The EPR spectrum of DMPO-OH· complex

根据试验要求,在反应体系中加入 FeSO<sub>4</sub> 0.6mmol·L<sup>-1</sup>,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mmol·L<sup>-1</sup>,磷酸缓冲液(pH=7.4) 0.2mol·L<sup>-1</sup>,DMPO 100mmol·L<sup>-1</sup>,根据加入受试化合物前后 EPR谱线的强度变化,计算清除 OH· 自由基的效率。选用 DMPO-OH· 的 EPR谱第 2 峰的相对峰高作为 OH· 信号指标。实验参数:微波频率 9.82GHz,微波功率 20mW,调制频率 100kHz,调制幅度 0.1mT,监测温度 250K。

2.2.2 在碱性 DMSO反应体系中,O<sub>2</sub> 直接参与产生自由基的反应,O<sub>2</sub> 在 DMSO溶液中发生了单电子转移反应,产生 O<sub>2</sub>·,此反应方程式如下<sup>[6]</sup>:



EPR的测量必须在低温下进行,此时被测样品呈固态,得到了 g<sub>||</sub>=2.1015, g<sub>⊥</sub>=2.0078 的各向异性谱,该信号是 O<sub>2</sub>· 存在的表征<sup>[6,7]</sup>。见图 2。

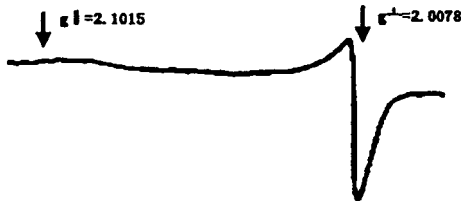


图 2 O<sub>2</sub>· 的 EPR信号图谱

Fig 2 EPR spectrum of O<sub>2</sub>·

用二甲基亚砷(DMSO)在碱性有氧条件下产生 O<sub>2</sub>·,并

用 EPR 直接测定<sup>[8]</sup>。根据试验要求,将含有饱和空气的 DMSO与 5mmol·L<sup>-1</sup>的 NaOH溶液于室温下混合,一经混合立即计时,30min后定量吸取反应液置于直径为 3mm 样品管内进行测定。实验参数:微波频率 9.66GHz,微波功率 20mW,调制频率 100kHz,调制幅度 0.5mT,监测温度 130K。

2.2.3 数据处理 依据以下公式计算得出不同受试样品清除自由基的效率 E 值,其中 h 为加入受试样品后模型体系中 OH· 或 O<sub>2</sub>· 的 EPR信号强度的测量均值,h<sub>0</sub>为未加受试样品的空白对照体系中的 OH· 或 O<sub>2</sub>· 的 EPR信号强度的测量均值。E 值为负值表示受试化合物对 OH· 或 O<sub>2</sub>· 的抑制作用,正值则表示为增加作用。E=(h-h<sub>0</sub>)/h<sub>0</sub>×100%

2.3 结果

红景天苷及其 7 种衍生物清除 OH· 和 O<sub>2</sub>· 的作用结果见表 2,其中以红景天苷为对照品。

表 2 红景天苷及其衍生物对羟自由基和超氧阴离子自由基的作用

Tab 2 The effects of salidroside and its derivatives on the hydroxy radicals and superoxide anion radicals

编号	化合物名称
1	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷(红景天苷)
2	1-(3-羟基)苯乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷
3	1-苯甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷
4	1-苯丙基-β-D-吡喃葡萄糖苷
5	1-(2-羟基)苯甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷
6	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃半乳糖苷
7	1-(3-羟基)苯乙基-β-D-吡喃半乳糖苷
8	1-(4-羟基)苯乙基-β-D-吡喃甘露糖苷

红景天苷(对照品)对 OH· 和 O<sub>2</sub>· 均有一定的清除作用,清除效率可达 63.0%和 75.8%;化合物 2,6,7 对 OH· 和 O<sub>2</sub>· 的清除作用与对照品相比都有不同程度的增加,化合物 4,5,8 则为不同程度的降低。清除作用最强的为化合物 7 和 6,它们对 OH· 和 O<sub>2</sub>· 的清除作用分别超过对照品清除作用的 34.0%,26.7%和 31.9%,28.5%;而化合物 5 对 OH· 和 O<sub>2</sub>· 的清除作用较对照品有所降低。

3 讨论

3.1 化学结构对清除 OH· 的影响

OH· 是一种氧化能力很强的自由基,是造成脂质过氧化、蛋白质和多糖分解的重要活性氧。所以,对羟自由基的研究引起人们的重视,而测定及筛选抗 OH· 作为药物抗氧化能力的一项重要指标。在受试的 8 个化合物中,以 1-(3-羟基)苯乙基-β-D-吡喃半乳糖苷清除 OH· 的作用最强。化合物 1 与 2 及 6 与 7 的结果提示,苯环上羟基取代基的位置可以影响化合物的清除自由基活性,羟基在 3 位上的化合物的作用强于 4 位上的化合物;但从化合物 3 和 5 结果可见 2' 位上连接羟基后使化合物清除 OH· 的能力下降;从本实验结果,我们认为羟基的引入会影响化合物清除 OH· 的作用,但究竟是增强还是减弱还需进一步研究。从化合物 3 与 4

结果,提示苯环上碳链的长短对化合物的清除自由基有一定的影响,短链(甲基)优于长链(丙基)。在对糖基取代基的研究发现,半乳糖取代基作用最强,葡萄糖与甘露糖作用相近。化合物 1, 2, 6, 7 与 8 结果提示,半乳糖苷的抗  $\text{OH}\cdot$  作用超过葡萄糖苷和甘露糖苷。

### 3.2 化学物结构对清除 $\text{O}_2^-$ 的影响

化合物 1 与 2, 6 与 7 的结果提示,苯环上羟基取代基的位置可以影响化合物的清除氧自由基 ( $\text{O}_2^-$ ) 活性,取代基在 3 位上的化合物的作用强于 4 位上的化合物。从受试化合物 3 与 4 结果,提示苯环上碳链的长短对化合物的清除氧自由基有影响,短链(甲基)优于长链(丙基)。但两个化合物上未有羟基取代基,与受试化合物 5 相比,清除氧自由基的能力较弱,所以我们认为羟基取代基可以增强化合物的抗氧自由基的作用,但由于此三个化合物的抗氧自由基作用均较弱(低于红景天苷),在化合物的结构改造方面应该放弃这方面的思路。在对糖基取代基的研究发现,半乳糖取代基作用最强,葡萄糖次之,甘露糖作用最差。受试化合物 1, 6 与 8, 2 与 7 结果提示,半乳糖苷的抗氧自由基作用均超过葡萄糖苷。从本研究的 8 个化合物中,认为 1-(3 羟基)苯乙基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷抗氧自由基的作用为最强。

### 3.3 影响该类型化合物清除 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^-$ 能力的因素

从本实验的结果可以认为影响因素包括:苯环上羟基的引入,羟基的位置,苯环与糖之间碳链的长短,以及所连接的糖的类型;综合本实验结果,提示糖基对化合物清除  $\text{OH}\cdot$  和  $\text{O}_2^-$  作用的影响最大。下一步深入研究的目的,就是要从所

获得的初步研究信息入手,有针对性地进一步合成系列化合物,进行活性试验,以确定其构效关系,最终筛选抗自由基活性最强的目标化合物,为新药研究奠定基础。

### 参考文献

- [1] 崔剑,李兆陇,洪啸吟.自由基生物抗氧化与疾病[J].清华大学学报(自然科学版),2000,40(6):9.
- [2] 徐宝军,郑毅男,李向高.红景天属植物研究新进展[J].中药材,2000,23(9):580.
- [3] 石力夫,蔡溱,曹颖琰,等.中药女贞子的化学成分及其药理作用[J].药学实践杂志,1997,15(4):197.
- [4] 叶于聪,陈钦铭,金凯平,等.红景天苷对培养心肌细胞缺氧后再给氧损伤后的影响[J].中国药理学报,1993,14(5):424.
- [5] 李天威,孔乐凯,母敬郁,等.红景天苷对培养大鼠皮层神经细胞  $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的保护作用[J].中风与神经疾病杂志,1997,14(3):143.
- [6] Hyland K, Auclair C. The formation of superoxide radical anions by a reaction between  $\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$  and dimethyl sulfoxide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1981,102(1):531.
- [7] Knowles PF, Gibson JF, Pick FM, et al. Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to free radical, the superoxide ion[J]. Biochem J, 1969,111(1):53.
- [8] 陈士明,陆亚蒙,严小敏,等.超氧阴离子自由基的产生与天然药物的作用[J].复旦学报(自然科学版),1991,30(1):32.

收稿日期:2003-11-21