

黑柄炭角菌产生的 DPPH 自由基捕捉成分*

吴根福

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

摘 要:对黑柄炭角菌深层发酵制品中的 DPPH 自由基捕捉成分进行研究。经硅胶柱层析、中压液相色谱顺相和反相分离、制备型高压液相色谱分离等一系列步骤,共获得相对纯度在 85% 以上,收量在 2mg 以上的自由基捕捉物质 20 个,对其中的 B4-16 进行了质谱、¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹³C HMBC、红外光谱等的测定,测得分子式为 C₁₀H₁₀O₄,推断它为 5,8 二羟基-3-甲基-3,4 二氢异香豆素。在 20 μmol/L 时,它的 DPPH 自由基捕捉活性为维生素 C 的 1.67 倍,维生素 E 的 2.1 倍。

关键词:黑柄炭角菌,自由基捕捉成分,结构鉴定

中图分类号:Q949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0363-04

黑柄炭角菌(*Xylaria nigripes*)是一种药用真菌,其菌核系传统中药乌灵参。据中国药用真菌学记载^[1],具有益气健脑、养血安神等多种保健功效。陈宛如等^[2]曾对黑柄炭角菌的化学组成进行了分析,对腺苷、多糖、γ-氨基丁酸、维生素 B6、甘露醇等一批活性物质进行了定性或定量的测定,马志章等^[3]就黑柄炭角菌及其多糖对贫血大鼠造血功能和小鼠巨噬细胞功能的影响进行了免疫活性测定,从而对它的保健机理有了初步的了解。本文利用 DPPH(1,1-二苯-2-苦肟基)对黑柄炭角菌中自由基的捕捉成分进行了分离筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 黑柄炭角菌菌粉:由浙江佐力医药保健品有限公司提供。批号 970902。

1.1.2 其它所用仪器及材料:薄层层析用 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); MPLC 用 BPLC-600-FC (Yamazen); HPLC 用 Chromatocorder 21; NMR 用 ALPHA400 (JEOL)核磁共振仪; MS 用 JEOL JMS-DX-302 质谱仪; IR 用日立 270-50 红外光谱仪,溴化钾錠剂法测定。所用有机溶剂为日本产分析纯试剂,所用 NMR 试剂为光谱纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 自由基捕捉物质的浸提:参照文献[4],取黑柄炭角菌菌粉 500g,装入 2000mL 三角瓶中,加入提取液(丙酮:水 = 80:20)1000mL,25℃浸提 7d(每天摇动 3 次),滤过,沉淀用同样提取液洗涤 2 次,每次 250 mL,合并滤液,减压蒸去丙酮,用 1 mol/L HCl 调节水层 pH 至 3.0,再用乙酸乙酯抽提酯溶性成分,在抽提液中加入无水硫酸钠脱水,滤过后减压蒸去乙酸乙酯,获得黑柄炭角菌菌粉的酯溶性提取物。

* 本研究受 Rotary International 资助

作者简介:吴根福(1965-),男,浙江余姚人,浙江大学生命科学院副教授,硕士,主要从事微生物学方面的研究。

收稿日期:2000-04-21,修回日期:2000-11-13

1.2.2 黑柄炭角菌菌粉中酯溶性提取物的分部分离:将分离所得的酯溶性提取物用硅胶 (Silica gel 60) 柱层析, 流动相依次为 80% 己烷/20% 乙酸乙酯, 60% 己烷/40% 乙酸乙酯, 40% 己烷/60% 乙酸乙酯, 20% 己烷/80% 乙酸乙酯, 乙酸乙酯, 甲醇。将各层析液减压蒸发后分别得到样品 A、B、C、D、E、F。

1.2.3 组分 B、C 中 DPPH 自由基捕捉物的分离:将组分 B、C 先用中压液相色谱 (MPLC) 正相分离, 再进行 MPLC 的反相分离; 如果样品纯度不够, 则在制备型高压液相色谱 (HPLC) 中分离。

1.2.4 单离物纯度的检验:单离物的纯度用硅胶薄层层析 (TLC) 及 HPLC 分析 260nm 的吸收来检验。

1.2.5 自由基捕捉成分的鉴定:将分离物进行 TLC, 风干后, 喷上 DPPH 溶液, 褪色者为 DPPH 阳性 (自由基捕捉物)。其抗氧化能力用褪色时间来判定: 在 1min 内褪色用 + + + 表示, 在 1h 内褪色用 + + 表示, 在 1d 内褪色用 + 表示。

1.2.6 化学量论的脂质自由基捕捉实验:参照文献 [5], 按表 3 加入试剂, 加盖, 室温下放置 30min 后, 于 517nm 处测吸光度。

2 结果和分析

2.1 酯溶性提取物的分部分离

黑柄炭角菌菌粉浸出液经乙酸乙酯抽提后, 得到酯溶性提取物 11970.5mg。装硅胶柱用不同比例的己烷/乙酸乙酯层析, 得到 A、B、C、D、E、F 六个组分, 其得率与部分性质见表 1。

表 1 抽提物的得率及部分性质

Table 1 The yield and physical characteristics of extracted substances

Fraction	Weight/mg	Yield/%	Anti-oxidizing	Physical characteristics
A	6599.0	55.1	+ +	Oily liquid
B	433.2	3.6	+ + +	Oily liquid
C	687.7	5.7	+ + +	Oily liquid with crystal
D	229.8	1.9	+ +	Crystal
E	351.1	2.9	+	Oily liquid with crystal
F	3436.7	28.7	+ +	Oily liquid

2.2 B、C 组分中自由基清除剂的分离

将分部分离收集到的 B、C 组分减压浓缩后, 再用 MPLC, HPLC 等方法分离, 共获得纯度较高 (260nm 下 HPLC 中面积百分比大于 85%), 收量较大 (大于 2mg) 的自由基捕捉物样品 20 个。其中 C12-5 和 C6-14-3 的 HPLC 保留时间及 ^1H NMR 图谱与曾经分离到的 7,4'-二羟基异黄酮和 5,7,4'-三羟基异黄酮一致, 推测为该二化合物; Cl-ppt 也有与下述 B4-16 相似的氢谱, 可能是 B4-16 的类似物。

2.3 B4-16 结构的鉴定

B4-16 为白色结晶, 熔点 198℃, 易溶于甲醇、丙酮, 较难溶于氯仿, 我们对它进行了 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、 ^1H - ^{13}C HMBC、FAB-MS、IR 的测定, 结果见图 1, 表 2。根据这些数据并参照文献 [6,7], 推断它的分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, 是一种 5,8 二羟基-3-甲基-3,4-二氢异香豆素。

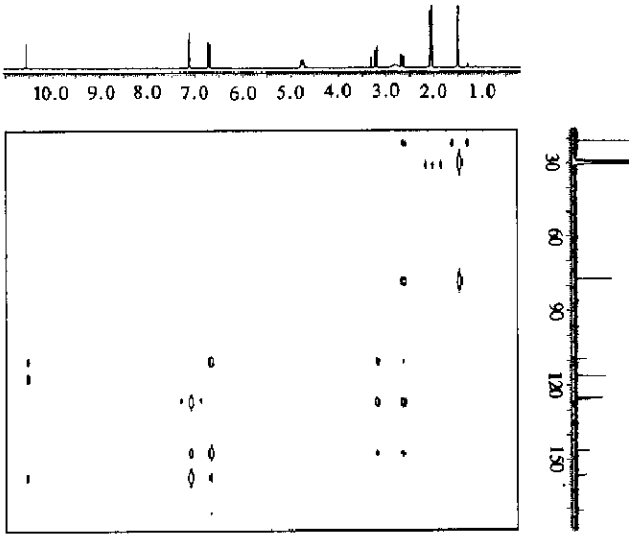


图 1 B4-16 的 ¹H-¹³C HMBC 图谱

Fig.1 ¹H-¹³C HMBC of B4-16

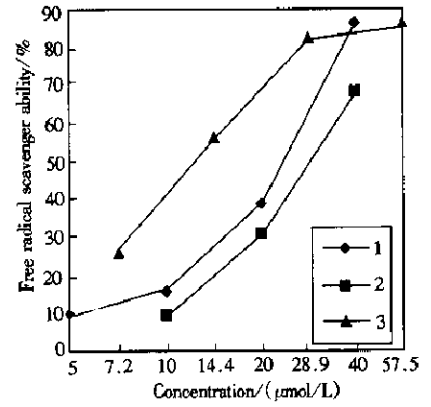


图 2 B4-16 的自由基捕捉百分率

Fig.2 The DPPH free-radical scavenging percentage of B4-16

1. Vc; 2. V_E; 3. B4-16.

表 2 B4-16 的几种光谱数据

Table 2 The several spectrum characteristics of B4-16

Spectrum	Data
FAB-MS/(m/z)	194, 176, 165, 152, 128, 111, 97, 88, 68, 60
¹ H-NMR(δ)	10.612(1H, s); 7.171(1H, d, J = 8.8Hz); 6.754(1H, d, J = 8.8Hz); 4.796(1H, m); 3.248(1H, dd, J = 16.8, 3.2Hz); 2.701(1H, dd, J = 16.8, 12.0Hz); 1.549(3H, d, J = 6.4)
¹³ C-NMR(δ)	170.779, 156.284, 146.328, 125.628, 124.773, 116.164, 109.207, 76.924, 29.124, 21.060
IR(KBr)/nm	3250, 2950, 2450, 1660, 1600, 1490, 1300, 1220, 1140, 1060, 830, 520

2.4 B4-16 的化学量论的脂质自由基捕捉实验

将 B4-16(560μg/mL, 用 EtOH 配制)连同对照 α-Toc (V_E, 860g/mL, 用 EtOH 配制)溶液、ASA (Vc, 350μg/mL, 用 pH5.5 的 0.1mol/L 醋酸缓冲液配制)溶液按下表加量后, 30℃ 室温反应 30min, 于 517nm 处测吸光度。结果见表 3。若它们的自由基捕捉活性按捕捉百分率(1 - 样品 OD₅₁₇/对照 OD₅₁₇) × 100% 计算, 则其结果如图 2 所示。对于相同摩尔浓度(20μmol/L)的样品, B4-16 的 DPPH 自由基捕捉活性约为维生素 E 的 1.67 倍, 维生素 C 的 2.1 倍。

表 3 B4-16 的自由基捕捉活性

Table 3 The DPPH free-radical scavenging activity of B4-16

0.1mol/L Acetate buffer/mL	EtOH/mL	0.5mmol/L DPPH/mL	Vc/mL	V _E /mL	Sample /mL	OD ₅₁₇
2.0	2.00	1.0				0.946
1.9	2.00	1.0	0.1			0.131
2.0	1.00	1.0		0.1		0.325
2.0	1.98	1.0			0.025	0.417
2.0	1.95	1.0			0.050	0.167
2.0	1.90	1.0			0.100	0.133
2.0	1.80	1.0			0.200	0.129

致谢 感谢国际 Rotary 组织 (Rotary International) 及其所属的日本静冈俱乐部 (the 2620th section) 提供费用; 感谢静冈县立大学及其所属的微生物生产学研究室提供研究条件; 感谢广田阳教授和阿部尚澍先生给予的悉心指导。

参 考 文 献

- [1] 徐锦堂主编. 中国药用真菌学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 664 ~ 674.
 [2] 陈宛如, 方鸿峰, 马志章, 等. 中国药学杂志, 1990, 11: 647 ~ 649.
 [3] 马志章, 查士隽, 虞研原, 等. 科技通报, 1992, 4: 252 ~ 255.
 [4] Sanbongi C, Osakabe N, atsune M, et al. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 454 ~ 459.
 [5] 吴根福, 吴雪昌. 微生物学报, 2000, 40(4): 394 ~ 399.
 [6] Marden A A, Raimundo B F, Otto R G. *Phytochemistry*, 1978, 17: 511 ~ 516.
 [7] Michel D, Jean F B, Albert K, et al. *Phytochemistry*, 1980, 19: 2221 ~ 2222.

A STUDY ON DPPH FREE-RADICAL SCAVENGERS FROM *XYLARIA NIGRIPES*

Wu Genfu

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The DPPH free-radical scavengers from the fungal Chinese medicine 'Wulingshen' (*Xylaria nigripes*) were studied. After separation using silica gel column chromatography, MPLC and HPLC, 20 DPPH free-radical scavengers with purity higher than 85% and yield more than 2 mg were screened, in which compound B4-16 had relatively higher yield and stronger free radical scavenging activity. The formula of compound B4-16 was determined to be C₁₀H₁₀O₄ (MW: 194) based on its FAB-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹³C HMBC, IR spectra, and its structure was elucidated. It was identical with 5, 8-dihydroxy-3-methyl-3, 4-dihydroisocoumarin. At the concentration of 20 μmol/L, its DPPH free radical scavenging activity was as 1.67 times as that of vitamin C or 2.10 times as that of Vitamin E.

Key words: *Xylaria nigripes*, Free-radical scavenger, Chemical structure