

蜈蚣草化学成分及抑制乙酰胆碱酯酶生物活性研究

殷帅文*, 胡文杰, 叶飞飞, 李天翔, 黄莎莎

井冈山大学生命科学学院, 吉安 343009

摘要:采用多种分离分析手段对蜈蚣草(*Pteris vittata*)乙醇提取物进行系统的化学成分和乙酰胆碱酯酶抑制活性研究,应用现代波谱技术鉴定了其中的6个化学成分,分别是芹菜素(1)、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(2)、木犀草素(3)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖(4)、山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷(5)、β-谷甾醇(6),所有化合物均系首次从该种中获得。化合物5具有一定抑制乙酰胆碱酯酶活性。

关键词:蜈蚣草;化学成分;生物活性

中图分类号:Q501;Q503

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.013

Study on the Constituents and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of *Pteris vittata*

YIN Shuai-wen*, HU Wen-jie, YE Fei-fei, LI Tian-xiang, HUANG Sha-sha

School of Life Science, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China

Abstract: The chemical constituents of the EtOH extract of *Pteris vittata* from Jiangxi Province were studied. Several compounds were isolated by repeated gel column chromatography. On the basis of spectral data, their structures were characterized as apigenin (1), apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside (2), luteolin (3), luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside (4), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (5), β-sitosterol (6). All Compounds were isolated from this species for the first time. Compound 5 showed a certain acetylcholinesterase inhibitory activity.

Key words: *Pteris vittata*; chemical constituents; bioactivity

蜈蚣草(*Pteris vittata*)为凤尾蕨科、凤尾蕨属植物,别名蜈蚣蕨、长叶甘草蕨、舒筋草、牛肋巴,生长在山坡、路边的钙质土或石灰岩壁缝中,广布于长江以南地区,北到陕西、甘肃和河南南部。其性味淡、平,祛风活血,解毒杀虫;主要用来防治流行性感、痢疾、风湿疼痛、跌打损伤;外用治蜈蚣咬伤、疥疮^[1]。目前国内外关于蜈蚣草的研究主要围绕着砷富集及环境治理^[2,3],而对蜈蚣草有效成分的研究则较少,集中在总黄酮的提取工艺以及抗氧化活性上面^[4-6],为此,本文对其进行了系统的化学成分研究,从中报道了6个化合物(化合物1~5结构见图1),并首次报道了其抑制乙酰胆碱酯酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

收稿日期:2017-12-22 接受日期:2018-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31260076);江西省自然科学基金(20114BAB204025)

* 通信作者 E-mail:shwyin@126.com

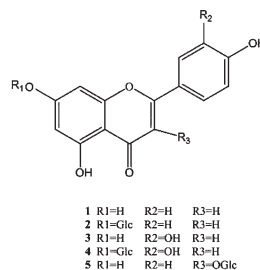


图1 化合物1~5结构

Fig. 1 Structures of compound 1-5

1.1.1 材料

蜈蚣草(*Pteris vittata*)全草于2011年7~8月份采集于江西井冈山地区,在阴凉通风处晾干、粉碎。样品由井冈山大学生命科学学院周兵副教授鉴定。凭证标本(C. 20110001)保存于井冈山大学生命科学学院标本室。

1.1.2 仪器与试剂

电子轰击质谱(EI-MS)测定采用HP 5988A GC/MS型质谱仪;NMR测定采用Bruker AM-400型超导核磁共振仪;吸光度测定采用日本Shimadzu公

司 UV2550 紫外可见分光光度计,水浴采用宁波天恒仪器厂 SC215 超级数控恒温槽,浓缩采用瑞士 BüCHI 公司旋转蒸发仪。柱层析硅胶(200 ~ 300 目)及薄层层析(TLC)硅胶 GF₂₅₄(10 ~ 40 μm)为青岛海洋化工厂出品,用 254 nm 紫外灯检测,辅以喷 5% H₂SO₄-乙醇溶液后加热显色。乙酰胆碱酯酶(Sigma 公司),的磷酸缓冲盐溶液(PBS),二硫二硝基苯甲酸(DTNB)(Sigma 公司),硫代乙酰胆碱(Sigma 公司),4% 十二烷基硫酸钠(Sigma 公司),阳性对照 Tacrine (Sigma 公司),其余化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 提取和分离

将粉碎的蜈蚣草全草(1.3 kg)以 95% 乙醇浸泡提取 3 次,每次 3 天,将提取液合并后减压浓缩得浸膏(125 g)。浸膏溶于 1 L 蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 次,分别得到石油醚萃取物(18 g)、乙酸乙酯萃取物(25 g)和正丁醇萃取物(30 g)。石油醚萃取物经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱)后得到共约 5 个组分,其中,组分 2 经溶剂挥发析出结晶,得到化合物 6(300 g),乙酸乙酯部分经减压柱层析(石油醚-乙酸乙酯洗脱)后分为极性递增的 6 个部分,组分 2 反复上凝胶柱用氯仿:甲醇 = 1:1 洗脱,得到化合物 1(20 mg),组分 3 反复上凝胶柱用氯仿:甲醇 = 1:1 洗脱,得到化合物和 3(35 mg),组分 5 拌样上硅胶柱,用氯仿:丙酮 = 5:2 洗脱,所得部分再反复上凝胶柱用氯仿:甲醇 = 1:1 洗脱,得到化合物 2(18 mg)和 4(25 mg)和 5(30 mg)。

1.2.2 活性测试方法

实验采用改良的 Ellman 方法^[7]进行,简单的说,2.65 mL PBS (pH8.0),50 μL AChE (0.85 U/mL,buffer pH8),100 μL 15 mM DTNB 和样品溶液 100 μL 加入试管,37 °C 预热 2 min,然后加入 100 μL 15 mM ATch,在 37 °C 保温 20 min 后立即加入 1 mL 0.4% SDS 终止反应,将所得溶液立即在 412 nm 下测量吸光值并根据下式计算抑制率;

$$\text{抑制率}(\%) = [A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})] / A_{\text{对照}} \times 100$$

这里 $A_{\text{对照}}$ 是指样品溶液为没有添加样品的 50% 乙醇溶液时的吸光值, $A_{\text{样品}}$ 是指添加样品溶液的吸光值,而 $A_{\text{样品空白}}$ 则表示添加样品溶液但没有添加底物 ATch 时的吸光值。所有实验重复三次并计算平均值和标准差,阳性对照为他克林。

2 结构鉴定

化合物 1 淡黄色粉末;mp. 344 ~ 346 °C,盐酸镁粉反应阳性。ESIMS m/z : 269 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.05 (1H, *s*, 5-OH), 10.63 (2H, *br. s*, H-7, 4'-OH), 7.95 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, *d*, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, *s*, H-3), 6.53 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, H-8), 6.24 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 171.9 (C-2), 100.7 (C-3), 180.5 (C-4), 161.3 (C-5), 100.6 (C-6), 162.8 (C-7), 95.0 (C-8), 157.9 (C-9), 101.6 (C-10), 119.7 (C-1'), 128.1 (C-2'), 116.3 (C-3'), 163.5 (C-4'), 116.3 (C-5'), 128.1 (C-6'), 上述波谱数据与文献^[8]报道数值基本一致,故鉴定为芹菜素(Apigenin)。

化合物 2 淡黄色粉末;mp. 225 ~ 228 °C,盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。ESIMS m/z : 455 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.98 (1H, *s*, 5-OH), 10.0 (1H, *s*, 4'-OH), 7.95 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.83 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.76 (1H, *s*, H-3), 6.44 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, H-6), 5.07 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-glc-1); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.9 (C-2), 102.7 (C-3), 181.5 (C-4), 161.3 (C-5), 99.6 (C-6), 162.8 (C-7), 95.0 (C-8), 157.7 (C-9), 105.6 (C-10), 118.7 (C-1'), 128.9 (C-2'), 116.9 (C-3'), 164.5 (C-4'), 116.9 (C-5') 128.9 (C-6'), 100.1 (Glc-1), 73.2 (Glc-2), 77.2 (Glc-3), 69.8 (Glc-4), 76.5 (Glc-5), 60.8 (Glc-6), 上述波谱数据与文献^[8]报道数值基本一致,故鉴定为芹菜素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷(Apigenin-7-*O*-β-D-glucopyranoside)。

化合物 3 淡黄色粉末;mp. 326 ~ 328 °C,盐酸镁粉反应阳性。ESIMS m/z : 285 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.96 (1H, *s*, 5-OH), 10.0 (3H, *br. s*, 7, 3', 4'-OH), 7.42 (1H, *dd*, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-, 6'), 7.38 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.83 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.66 (1H, *s*, H-3), 6.44 (1H, *d*, *J* = 1.4 Hz, H-8), 6.2 (1H, *d*, *J* = 1.4 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.0 (C-2), 102.7 (C-3), 181.8 (C-4), 157.3 (C-5), 99.2 (C-6), 164.8 (C-7), 94.0 (C-8), 161.6 (C-9), 103.6 (C-10), 118.7 (C-1'), 113.9 (C-2'), 149.9 (C-3'),

145.5 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.9 (C-6'), 上述波谱数据与文献^[9,10]报道数值基本一致,故鉴定为木犀草素(Luteolin)。

化合物 4 淡黄色粉末; mp. 253 ~ 256 °C, 盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。ESIMS m/z : 471 $[M + Na]^+$; ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 9.98 (2H, br. s, 3', 4'-OH), 7.45 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.74 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.07 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-glc-1); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.4 (C-2), 102.7 (C-3), 181.5 (C-4), 161.2 (C-5), 99.6 (C-6), 162.8 (C-7), 94.8 (C-8), 156.7 (C-9), 105.6 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.9 (C-2'), 146.9 (C-3'), 149.5 (C-4'), 115.9 (C-5'), 119.9 (C-6'), 100.1 (Glc-1), 73.2 (Glc-2), 76.2 (Glc-3), 69.8 (Glc-4), 76.5 (Glc-5), 60.8 (Glc-6), 上述波谱数据与文献^[8]报道数值基本一致,故鉴定为木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖(Luteolin-7-O- β -D-glucopyranoside)。

化合物 5 淡黄色粉末; mp. 178 ~ 182 °C, 盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。ESIMS m/z : 449.3 $[M + H]^+$, ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.66 (1H, s, 5-OH), 10.80 (1H, br. s, 7-OH), 10.16 (1H, s, 4'-OH), 8.38 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.18 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', 5'), 7.15 (1H, s, H-8), 6.66 (1H, s, H-6), 6.24 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-glc-1), 4.05-4.15 (5H, m, H-glc-2, 3, 4, 5, 6 α), 4.0 (1H, m, H-glc-6 β); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.0 (C-2), 133.7 (C-3), 177.8 (C-4), 161.3 (C-5), 99.0 (C-6), 164.8 (C-7), 94.0 (C-8), 156.6 (C-9), 104.1 (C-10), 120.7 (C-1'), 130.9 (C-2'), 114.9 (C-3'), 160.5 (C-4'), 114.9 (C-5'), 130.9 (C-6'), 102.8 (Glc-1), 74.2 (Glc-2), 77.2 (Glc-3), 69.8 (Glc-4), 77.5 (Glc-5), 61.8 (Glc-6), 上述波谱数据与文献^[11]报道数值基本一致,故鉴定为山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷(Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside)。

化合物 6 无色针状晶体; 易溶于氯仿, mp. 132 ~ 134 °C, 薄层喷硫酸-乙醇溶液加热显紫红色。该化合物经 TLC 与 β -谷甾醇的对照品对照, 在 3 种溶剂体系下其 R_f 值一致, 故鉴定为 β -谷甾醇。

3 结论

在浓度为 0.1 mg/mL 时, 化合物山柰素-3-O- α -L-葡萄糖苷对乙酰胆碱酯酶活性的抑制率为 68.3%, 在浓度为 0.25 mg/mL 时, 其对乙酰胆碱酯酶活性的抑制率为 85.1%, 而在浓度为 0.25 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时, 其他的化合物对乙酰胆碱酯酶活性的抑制率均小于 50%。在化合物的构效关系讨论中, 与山柰素-3-O- α -L-葡萄糖苷同样为黄酮类化合物的芹菜素、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷等的抑制率均小于 50%, 提示黄酮类化合物的 3 位取代基团对乙酰胆碱酯酶活性的抑制可能有比较大的影响。

早老性痴呆症(又称阿尔茨海默氏病, Alzheimer's Disease, AD)是发生于老年和老年前期以进行性神经退化为特征的大脑退行性病变, 是中枢神经系统变性性疾病, 其主要临床表现为进行性认知功能减退并伴有行为障碍和情绪异常等, 严重者直至失去生活自理能力^[12,13]。目前的研究认为 AD 是一种多病因疾病, 胆碱能假说是目前最为被广泛接受的病理理论^[14-16]。因此, 乙酰胆碱酯酶抑制剂(Acetylcholinesterase Inhibitor, AChEI)药物是目前研究最多、最为活跃的抗早老性痴呆症药物^[14-18]。然而, 从植物中筛选并开发出的抗老年性痴呆症的药物并不多, 系统的进行植物乙酰胆碱酯酶抑制活性研究的报道也很少^[14], 本实验对蜈蚣草乙醇提取物进行了系统的化学研究, 并对其化学成分进行了乙酰胆碱酯酶抑制活性研究, 实验结果显示部分化合物具有较高的抑制乙酰胆碱酯酶活性, 为防治早老性痴呆症的药物研究提供了具有一定价值的活性先导结构。

参考文献

- 1 Xie ZW(谢宗万). The national assembly of Chinese herbal medicine(全国中草药汇编)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 646-647.
- 2 Pan ZM(潘志明), Deng TL(邓天龙). A review of researches on *Pteris vittata* phytoremediation of arsenic polluted soils[J]. *Soils(土壤)*, 2007, 39: 341-346.
- 3 Huang ZC, An ZZ. Arsenic uptake and transport of *Pteris vittata* L. as influenced by phosphate and inorganic arsenic species under sand culture[J]. *J Environ Sci*, 2007, 19: 714-718.
- 4 Zhou XJ(周向军), Yang ZQ(杨宗琪), Jing HY(景红艳),

- et al.* Study on optimization of total flavonoids extraction technology in *Pteris vittata* L. [J]. *Res Dev & Market*(资源开发与市场), 2010, 26: 210-211.
- 5 Hong YL(洪叶岚), Ma J(马骥), Xiao YP(肖娅萍), *et al.* Determination of quercetin and kaempferol in 21 Ferns from Tsinling Mountains by RP/HPLC [J]. *J. instrumental Analysis*(分析测试学报), 2010, 29: 294-297.
- 6 Ding LJ(丁利君), Su GL(苏桂良). Extraction of flavonoids from ladder brake with microwave and its antioxidative activity [J]. *J Food Sci Biotech*(食品与生物技术学报), 2009, 28: 623-626.
- 7 Perry, NSL, Houghton, PJ, Theolad, A, *et al.* In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52: 895-902.
- 8 Chi F(郗峰), Deng J(邓君), Wang YH(王彦涵). Chemical constituents from *Lagotis breviflora* [J]. *Chin J Chin Materia Med*(中国中药杂志), 2010, 35: 869-871.
- 9 Wang WS(王文蜀), Wang ZQ(王志蹇), Zhou YW(周亚伟). Studies on chemical constituents from *Pteris multifida* [J]. *J Chin Med Materials*(中药材), 2008, 31: 1165-1167.
- 10 Xing CX(邢春秀), Xie N(谢宁), Yang N(杨念), *et al.* Chemical constituents of *Ainsliaea fragrans* [J]. *Jiangsu Pharm Clin Res*(江苏药学与临床研究), 2006, 14: 39-41.
- 11 Qian ZM(钱正明), Li HJ(李会军), Qi FF(齐芳芳), *et al.* Studies on chemical constituents of *Lonicera syringantha* Maxim. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2007, 42: 1132-1134.
- 12 Jann, MW. Preclinical pharmacology of metrifonate [J]. *Pharmacotherapy*, 1998, 18: 55-67.
- 13 Aisen, PS, Davis, KL. The search for disease-modifying treatment for Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1997, 48: 35-41.
- 14 Ma XQ, Tan CH, Zhu DY, *et al.* A survey of potential huperzine A natural resources in China the Huperziaceae [J]. *J Ethnopharm*, 2006, 104: 54-67.
- 15 Yin SW(殷帅文), He XM(何旭梅), Wang W(王伟), *et al.* Constituents and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Woodwardia japonica* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 958-961.
- 16 Zang J(张景), Feng TT(冯亭亭), Zhang MJ(张明柱). Content determination and acetylcholinesterase inhibitory effect of isoflavones from fermented soybean [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 310-315.
- 17 Silveyra MX, Garcia-Ayllon MS, Calero M, *et al.* Altered glycosylation of acetylcholinesterase in the creutzfeldt-jakob cerebrospinal fluid [J]. *J Mol Neurosci*, 2006, 30: 65-66.
- 18 Ma XQ, Gang DR. The *Lycopodium alkaloids* [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 752-772.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院