

银杏酸单体对黄嘌呤氧化酶的体外抑制活性研究

夏宏军^{1*}, 褚梦颖¹, 徐云婷¹, 吴玲玲¹, 李巍²

¹扬州大学医学院药理学系; ²扬州大学医学院临床医学系, 扬州 225001

摘要:本研究首次系统评价了银杏酸单体化合物对黄嘌呤氧化酶的体外抑制活性。银杏外种皮的无水乙醇提取物通过开放硅胶柱色谱和半制备型反相高效液相色谱分离, 得到五个银杏酸单体化合物。以别嘌呤醇为阳性药物, 采用微孔板法评价它们对黄嘌呤氧化酶的抑制作用。每个浓度设 4 个复孔, 使用酶标仪在 295 nm 波长下测定每孔吸光度, 计算平均抑制率; 实验重复 3 次, 采用 Graphpad prism 5.0 软件计算 IC₅₀ 值。结果表明, 银杏酸 C13:0 和银杏酸 C15:1 对黄嘌呤氧化酶的 IC₅₀ 值分别为 31.81 ± 1.87 μmol/L 和 25.48 ± 0.66 μmol/L (n = 3), 显示了一定程度的黄嘌呤氧化酶抑制活性。

关键词:银杏外种皮; 银杏酸单体化合物; 黄嘌呤氧化酶; 抑制活性

中图分类号: R914.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.8.017

Inhibitory Activities of Ginkgolic Acid Monomers from *Ginkgo biloba* Sarcotesta on Xanthine Oxidase *In Vitro*

XIA Hong-jun^{1*}, CHU Meng-ying¹, XU Yun-ting¹, WU Ling-ling¹, LI Wei²

¹Department of Pharmacy, Medical College, Yangzhou University; ²Department of Clinical Medicine, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: To study the inhibitory activities of ginkgolic acid monomers from *Ginkgo biloba* sarcotesta on xanthine oxidase (XOD) *in vitro* for the first time, the absolute ethanol extract of *Ginkgo biloba* sarcotesta was separated by open silica gel column chromatography and purified by semi-preparative reversed phase HPLC subsequently, and five ginkgolic acid monomers were obtained. Their inhibitory activities on XOD *in vitro* were evaluated by microplate-based method, and allopurinol was used as a positive drug. Each concentration had four replicates, and mean inhibition ratios were calculated according to absorbance measured on a microplate reader at 295 nm. The experiments were repeated for three times, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by using Graphpad prism 5.0 software. Conclusion was made that ginkgolic acid (13:0) and ginkgolic acid (15:1) have shown certain inhibitory activities on XOD *in vitro*, and their IC₅₀ values were 31.81 ± 1.87 μmol/L and 25.48 ± 0.66 μmol/L (n = 3), respectively.

Key words: *Ginkgo biloba* sarcotesta; ginkgolic acid monomers; xanthine oxidase; inhibitory activity

黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)催化次黄嘌呤生成黄嘌呤, 再进一步生成尿酸; 或者直接催化黄嘌呤生成尿酸, 并伴随有超氧阴离子的产生。尿酸在体内蓄积, 可引发痛风; 而超氧阴离子可能引起机体的氧化应激损伤, 已有的研究表明氧化应激与心血管疾病、肿瘤等发生过程存在密切的关联^[1]。因此, 寻找高效的 XOD 抑制剂具有广阔的应用前景。

银杏酸(Ginkgolic acids)是分布于银杏叶、果和

外种皮中的生物活性物质, 在外种皮中的含量最高。银杏中主要的银杏酸单体化合物包括银杏酸 C13:0, 银杏酸 C15:0, 银杏酸 C15:1, 银杏酸 C17:1 和银杏酸 C17:2, 化学结构如图 1 所示。它们是一类水杨酸衍生物, 区别在于苯环 6 位取代的侧链碳原子数(13 ~ 17)和双键数(0 ~ 2)^[2]。随着银杏酸的深入研究, 发现银杏酸具有多种药理活性, 如抗菌^[3-5]、抗焦虑^[6]、抑制酪氨酸酶^[7]、杀虫(或其宿主)^[8-10]等, 并对体内、外的肿瘤细胞显示了一定的抑制生长作用^[11-17]。目前, 尚缺乏银杏酸对 XOD 抑制作用的系统研究。

本研究从银杏外种皮中分离得到五个银杏酸单体化合物, 采用微孔板法评价银杏酸单体化合物对

XOD 的体外抑制活性,为银杏酸的进一步研究提供科学依据。

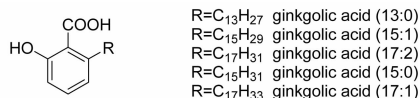


图1 银杏酸单体化合物的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of five ginkgolic acid monomers

1 仪器与材料

1.1 试剂

银杏果(实验室采自于扬州市江都);无水乙醇,石油醚,乙酸乙酯,冰醋酸,磷酸二氢钾,三水合磷酸氢二钾,乙二胺四乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);柱色谱用硅胶(200~300目,青岛海洋化工厂);色谱甲醇(美国TEDIA公司);别嘌呤醇(纯度>98%,上海阿拉丁试剂公司);氘代氯仿,黄嘌呤(xanthine, XA),黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD; E. C. 1.17.3.2, Grade IV)和二甲基亚砷均购自于美国Sigma公司。

1.2 仪器

核磁共振波谱仪(AVANCE 600,德国布鲁克公司);超高分辨飞行时间质谱仪(maXis,德国布鲁克公司);安捷伦1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);LC3000型高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司);酶标仪(synergy2,美国伯腾公司),数据采集采用Gen5软件;旋转蒸发器(N-1100,上海爱朗仪器有限公司);循环水式真空泵(SHZ-DIII,巩义市予华仪器有限责任公司);电子天平(BSA224S,北京赛多利斯科学仪器有限公司);超纯水仪(UPH-II-10T,四川优普超纯科技有限公司);酸度计(PB-10,北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 银杏酸单体化合物的提取分离与结构鉴定

2.1.1 提取分离

将208g晒干的银杏外种皮用无水乙醇回流提取两次,每次1500mL,合并提取液于45℃下减压蒸干得到浸膏110g。将浸膏分散在500mL的蒸馏水中,依次用等体积的石油醚和乙酸乙酯分别萃取两次,萃取液于45℃下减压蒸干得到石油醚提取物11.8g和乙酸乙酯提取物2.2g。点板并展开,在紫外检测波长254nm下观察,将石油醚、乙酸乙酯提

取物合并,进行开放硅胶柱色谱分离,依次用石油醚,石油醚-乙酸乙酯(9:1、8:2、7:3、1:1;含1%冰醋酸)梯度洗脱。点板并展开,在紫外检测波长254nm下观察,合并显蓝紫色荧光斑点的洗脱组分,减压蒸干,得到银杏总酸12.3766g。银杏总酸经半制备型反相高效液相色谱反复纯化,得到银杏酸的五个单体化合物。

2.1.2 纯度分析和结构鉴定

采用HPLC-DAD对分离得到的五个银杏酸单体化合物进行纯度分析,并通过¹H NMR, ¹³C NMR和高分辨质谱(HR-MS)对其进行结构鉴定。

2.2 银杏酸单体化合物对XOD体外抑制活性的研究

2.2.1 溶液配制

磷酸盐缓冲液(PBS)的配制:精密称取磷酸二氢钾0.9562g、三水合磷酸氢二钾6.9470g及乙二胺四乙酸(EDTA)18.9mg,加入超纯水超声溶解,定容至500mL,得到pH7.5的磷酸盐缓冲液。

底物XA溶液的配制:精密称取XA7.8mg,加入PBS适量,水浴加热并用玻璃棒搅拌至溶液澄清,放至室温,用PBS定容至50mL,得到1mmol/L XA溶液。底物溶液临用前重新配制。

XOD溶液的配制:购得的XOD(10U),用PBS稀释并定容至5mL,得到2U/mL XOD贮备液,对其进行分装,于-20℃保存。用时取出,用PBS稀释成16mU/mL工作酶液,置于冰盒中保存并尽快进行实验。

2.2.2 供试品溶液的配制

分别精密称取银杏酸C13:0,银杏酸C15:1,银杏酸C15:0,银杏酸C17:2,银杏酸C17:1和阳性药物别嘌呤醇适量,用二甲基亚砷(DMSO)溶解成浓度分别为39.0、36.1、36.0、24.2、37.9、36.7mmol/L贮备液,于4℃保存。实验时用PBS稀释成不同系列浓度的溶液,使得反应体系中银杏酸C13:0终浓度分别为200、100、50、25、10μmol/L;银杏酸C15:1终浓度分别为100、50、25、10、5μmol/L;银杏酸C15:0终浓度分别为300、200、100、50、25μmol/L;银杏酸C17:2终浓度分别为300、200、100、50、25μmol/L;银杏酸C17:1终浓度分别为300、200、100、50、25μmol/L;别嘌呤醇终浓度分别为10、5、2、1、0.5μmol/L。反应体系中DMSO含量小于1%(v:v)。

2.2.3 测定方法

参照文献^[18]中 XOD 抑制率的测定方法并进行改良。先将不同浓度的供试品溶液、XOD 溶液和 PBS,依次加入 96 孔板,在酶标仪中于 25 °C 预孵育 5 min,然后加入底物 XA 溶液启动反应,反应体系的终体积为 200 μ L,于 25 °C 反应 15 min。在 295

nm 下,以空白组调零,测定供试品组吸光度 A_0 ;再以阴性对照组调零,测定阳性对照组吸光度 A_1 。XOD 抑制率(Inhibition ratio, IR)按以下公式计算: $IR(\%) = [(A_1 - A_0)/A_1] \times 100\%$ 。每个浓度设 4 个复孔,实验重复 3 次。反应体系中各溶液的加入体积如表 1 所示。

表 1 反应体系中各溶液的加入体积

Table 1 Volume of various solutions added in reaction system

溶液 Solutions	供试品组 Sample group (μ L)	空白组 Blank group (μ L)	阳性对照组 Positive control group (μ L)	阴性对照组 Negative control group (μ L)
供试品溶液 Sample solutions	50	50	0	0
磷酸盐缓冲液 PBS	50	100	100	150
XOD 溶液 XOD Solution (16 mU/mL)	50	0	50	0
XA 溶液 XA Solution (1 mmol/L)	50	50	50	50

2.2.4 数据分析

各供试品对 XOD 的半数抑制浓度(IC_{50})根据不同的抑制浓度及其平均抑制率采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行计算。

3 结果与讨论

3.1 银杏酸单体化合物的纯度分析和结构鉴定

经 HPLC-DAD 分析,分离得到的五个银杏酸单体化合物的纯度均 > 95%;测定的五个银杏酸单体化合物的¹H NMR、¹³C NMR 和 HR-MS 数据如下:

化合物 1 白色固体;HR-ESI-MS m/z : 321.2418 [$M + H$]⁺,分子式 $C_{20}H_{32}O_3$; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.34 (1H, dd, $J = 7.2, 7.6$ Hz, H-4), 6.85 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-3), 6.75 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5), 2.96 (2H, t, H-1'), 1.59 (2H, m, H-2'), 1.25 (m), 0.87 (3H, t, H-13'); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 175.6 (Ar-COOH), 163.0 (C-2), 147.6 (C-6), 135.1 (C-4), 122.7 (C-5), 115.7 (C-3), 110.9 (C-1), 36.4 (C-1'), 32.0, 31.9, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 22.7 (C-12'), 14.1 (C-13')。以上数据对比文献^[11,19]基本一致,因此鉴定该化合物为银杏酸 C13:0。

化合物 2 淡黄色油状物;HR-ESI-MS m/z : 347.2537 [$M + H$]⁺,分子式 $C_{22}H_{34}O_3$; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.34 (1H, dd, $J = 7.2, 7.8$ Hz, H-4), 6.86 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3), 6.76 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 5.34 (2H, m, H-8', 9'),

2.96 (2H, t, H-1'), 2.01 (4H, m), 1.59 (2H, m, H-2'), 1.31 (m), 0.88 (3H, t, H-15'); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 175.7 (Ar-COOH), 163.4 (C-2), 147.6 (C-6), 135.2 (C-4), 130.0, 129.8 (C-8', 9'), 122.7 (C-5), 115.8 (C-3), 110.6 (C-1), 36.4 (C-1'), 32.0, 31.8, 29.8, 29.7, 29.4, 29.3, 29.0, 27.2, 27.2, 22.7 (C-14'), 14.1 (C-15')。以上数据对比文献^[11,19]基本一致,因此鉴定该化合物为银杏酸 C15:1。

化合物 3 淡黄色油状物;HR-ESI-MS m/z : 373.2738 [$M + H$]⁺,分子式 $C_{24}H_{36}O_3$; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 11.03 (1H, s, Ar-COOH), 7.35 (1H, dd, $J = 7.2, 8.4$ Hz, H-4), 6.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.76 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 5.37 (4H, m, -CH=CH-), 2.97 (2H, t, H-1'), 2.77 (2H, m, =CH-CH₂-CH=), 2.05 (4H, m), 1.59 (2H, m, H-2'), 1.33 (m), 0.88 (3H, t, H-17'); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 175.3 (Ar-COOH), 163.7 (C-2), 147.6 (C-6), 135.3 (C-4), 130.2, 130.2, 128.0, 128.0 (-CH=CH-), 122.7 (C-5), 115.9 (C-3), 110.5 (C-1), 36.5 (C-1'), 32.0, 31.5, 29.8, 29.7, 29.7, 29.4, 29.4, 29.3, 27.2, 25.7 (=CH-CH₂-CH=), 22.6 (C-16'), 14.1 (C-17')。以上数据对比文献^[19]基本一致,因此鉴定该化合物为银杏酸 C17:2。

化合物 4 白色固体;HR-ESI-MS m/z : 349.2739 [$M + H$]⁺,分子式 $C_{22}H_{36}O_3$; ¹H NMR

(CDCl_3 , 600 MHz) δ : 7.34 (1H, dd, $J = 7.2, 8.4$ Hz, H-4), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.75 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 2.96 (2H, t, H-1'), 1.58 (2H, m, H-2'), 1.25 (m), 0.87 (3H, t, H-15'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 175.0 (Ar-COOH), 163.4 (C-2), 147.5 (C-6), 135.1 (C-4), 122.6 (C-5), 115.7 (C-3), 110.7 (C-1), 36.4 (C-1'), 32.0, 31.9, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 22.7 (C-14'), 14.1 (C-15')。以上数据对比文献^[19]基本一致,因此鉴定该化合物为银杏酸 C15:0。

化合物 5 淡黄色油状物; HR-ESI-MS m/z : 375.2897 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 分子式 $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 7.36 (1H, dd, $J = 7.2, 8.4$ Hz, H-4), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 6.76

(1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 5.34 (2H, m, H-10', 11'), 2.96 (2H, t, H-1'), 2.00 (4H, m), 1.58 (2H, m, H-2'), 1.28 (m), 0.88 (3H, t, H-17'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 175.1 (Ar-COOH), 163.2 (C-2), 147.4 (C-6), 135.0 (C-4), 129.9, 129.8 (C-10', 11'), 122.6 (C-5), 115.7 (C-3), 111.0 (C-1), 36.4 (C-1'), 32.0, 31.9, 31.8, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.0, 27.2, 22.6 (C-16'), 14.1 (C-17')。以上数据对比文献^[11,19]基本一致,因此鉴定该化合物为银杏酸 C17:1。

3.2 银杏酸单体化合物对 XOD 的体外抑制活性

以供试品的对数浓度($\lg C$)为横坐标,平均抑制率(IR)为纵坐标作图(如图2所示),计算各供试品对 XOD 体外抑制活性的 IC_{50} 值如表2所示。

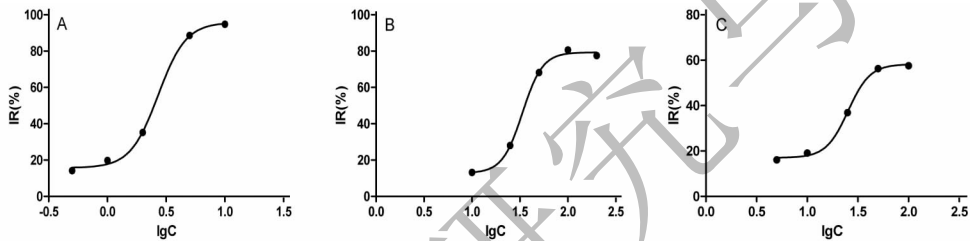


图2 供试品的对数浓度($\lg C$)与平均抑制率(IR)关系图(A)别嘌呤醇,(B)银杏酸 C13:0,(C)银杏酸 C15:1

Fig. 2 Plots of inhibition ratios versus logarithmic concentrations (A) allopurinol, (B) ginkgolic acid (13:0), (C) ginkgolic acid (15:1)

表2 供试品对 XOD 的体外抑制活性($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibitory activities of five ginkgolic acid monomers and allopurinol on XOD *in vitro* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

供试品 Samples	半数抑制浓度 The half inhibitory concentrations ($\mu\text{mol/L}$)
别嘌呤醇 Allopurinol	2.58 \pm 0.23
银杏酸 C13:0 Ginkgolic acid (13:0)	31.81 \pm 1.87
银杏酸 C15:1 Ginkgolic acid (15:1)	25.48 \pm 0.66
银杏酸 C15:0 Ginkgolic acid (15:0)	-
银杏酸 C17:1 Ginkgolic acid (17:1)	-
银杏酸 C17:2 Ginkgolic acid (17:2)	-

注:-,无量效关系。

Note:-, no dose-effect relationship was observed.

本研究中,银杏外种皮提取物经过开放硅胶柱色谱分离可有效地富集银杏总酸,文献报道了通过硅胶柱纯化后银杏总酸的纯度可达到97.5%^[20],有利于进一步使用半制备型反相高效液相色谱分离得到五个银杏酸单体化合物。XOD 酶促反应中,反应终产物尿酸在295nm 波长处有特异性光吸收,通过在此波长下测定尿酸的吸光度,首次系统评价了五

个银杏酸单体化合物对 XOD 的抑制作用。由表2可知,银杏酸 C13:0 和银杏酸 C15:1 显示了较好的体外抑制 XOD 的活性, IC_{50} 值分别为 $31.81 \pm 1.87 \mu\text{mol/L}$ 和 $25.48 \pm 0.66 \mu\text{mol/L}$ 。而银杏酸 C15:0、银杏酸 C17:1 和银杏酸 C17:2 在酶抑制实验中,浓度与抑制率之间不存在量效关系,因此,无法计算 IC_{50} 值。以上结果可为进一步研究银杏酸的抗氧化

作用机制以及评价银杏酸对痛风和氧化应激损伤的干预作用提供一定的依据。

参考文献

- 1 Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174:1195-1208.
- 2 Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216:2002-2032.
- 3 Hua ZB, Wu CE, Fan GJ, et al. The antibacterial activity and mechanism of ginkgolic acid C15:1 [J]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17:5.
- 4 Lee JH, Kim YG, Ryu SY, et al. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation[J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 174:47-55.
- 5 Yang XM(杨小明), Zhu W(朱伟), Chen J(陈钧), et al. Study on anti-bacterium activity of ginkgolic acids and their monomers[J]. *Chin Med Mat(中草药)*, 2004, 27:661-663.
- 6 Satyan KS, Jaiswal AK, Ghosal S, et al. Anxiolytic activity of ginkgolic acid conjugates from Indian *Ginkgo biloba*[J]. *Psychopharmacology(Berl)*, 1998, 136:148-152.
- 7 Fu YQ, Hong S, Li D, et al. Novel chemical synthesis of ginkgolic acid(13:0) and evaluation of its tyrosinase inhibitory activity[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61:5347-5352.
- 8 Wu L, Jiang XG, Shen YJ, et al. Efficacy of ginkgolic acids against *Cryptosporidium andersoni* in cell culture[J]. *Parasitol Res*, 2011, 109:1475-1479.
- 9 Chen SX, Wu L, Jiang XG, et al. Anti-*Toxoplasma gondii* activity of GAS *in vitro*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118:503-507.
- 10 Mao ZH(毛佐华), Yu PZ(俞培忠), Sun K(孙锴), et al. Preparation of five ginkgolic acid monomers and their molluscicidal effects against *Oncomelania hupensis*[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis(中国寄生虫学与寄生虫病杂志)*, 2007, 25:274-278.
- 11 Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, et al. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35:3016-3020.
- 12 Baek SH, Lee JH, Kim C, et al. Ginkgolic acid C 17:1, derived from *Ginkgo biloba* leaves, suppresses constitutive and inducible STAT3 activation through induction of PTEN and SHP-1 tyrosine phosphatase [J]. *Molecules*, 2017, 22. pii: E276.
- 13 Baek SH, Ko JH, Lee JH, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232:346-354.
- 14 Ma JG, Duan WX, Han SX, et al. Ginkgolic acid suppresses the development of pancreatic cancer by inhibiting pathways driving lipogenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6:20993-21003.
- 15 Oh J, Hwang IH, Hong CE, et al. Inhibition of fatty acid synthase by ginkgolic acids from the leaves of *Ginkgo biloba* and their cytotoxic activity[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28:565-568.
- 16 Zhou CC, Li XY, Du W, et al. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis[J]. *Chemotherapy*, 2010, 56:393-402.
- 17 Lee JS, Cho YS, Park EJ, et al. Phospholipase C γ 1 inhibitory principles from the sarcotestas of *Ginkgo biloba*[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61:867-871.
- 18 Xie T(谢涛), Qin ZZ(秦至臻), Zhou R(周睿), et al. Establishment of double targets of high throughput screening model for xanthine oxidase inhibitors and superoxide anion scavengers[J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2015, 50:447-452.
- 19 van Beek TA, Wintermans MS. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 930:109-117.
- 20 Wu Q(吴琼), Du XD(杜小弟), Lei JH(雷家珩), et al. Integrated extraction of biologically active substance from *Ginkgo biloba* sarcotesta[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29:1048-1052.