

## 栓皮栎虫瘿的酚性成分及其生物活性

周志宏<sup>1</sup>, 李玛玲<sup>2</sup>, 陈国珍<sup>2</sup>, 陈植和<sup>2</sup>, 杨崇仁<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院昆明植物研究所植物化学开放研究实验室, 云南 昆明 650204;

2 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650003)

**摘要:** 从栓皮栎 (*Quercus variabilis* Bl.) 虫瘿中分离了 2 对平衡互变异构体和 4 个单体化合物, 通过光谱数据和化学方法鉴定为: G-1 为 1-O-(3'-没食子酰基)没食子酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖和 1-O-(4'-没食子酰基)没食子酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖的平衡互变异构体, G-2 为 3-O-没食子酰基-没食子酸和 4-O-没食子酰基-没食子酸的平衡互变异构体, G-3 为 1, 6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖, G-4 为 1, 2, 3, 6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖, G-5 为 1-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖吡喃糖, G-6 为没食子酸甲酯。对 G-1、G-3 和 G-4 进行了初步的抗肿瘤、抗脂质过氧化和抗血小板聚集活性实验。

**关键词:** 壳斗科; 栓皮栎; 虫瘿; 酚性成分; 抗肿瘤活性; 抗脂质过氧化活性; 抗血小板聚集活性

中图分类号: Q 946, R 285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2001)01-0126-09

## Phenolic Constituents of Galls of *Quercus variabilis* and Their Activities

ZHOU Zhi-Hong<sup>1</sup>, LI Ma-Ling<sup>2</sup>, CHEN Guo-Zhen<sup>2</sup>,  
CHEN Zhi-He<sup>2</sup>, YANG Chong-Ren<sup>1\*</sup>

(1 Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;  
2 Yunnan Key Laboratory of Pharmacology of Natural Products, Kunming College of Medicine, Kunming 650204, China)

**Abstract:** Two tautomers, G-1 [1-O-(3'-galloyl)-galloyl-β-D-glucopyranose and 1-O-(4'-galloyl) galloyl-β-D-glucopyranose] and G-2 [3-galloyl-gallic acid and 4-galloyl-gallic acid] were isolated from *Quercus variabilis* Bl., together with four pure phenolic compounds: G-3 (1, 6-O-digalloyl-β-D-glucopyranose), G-4 (1, 2, 3, 6-O-tetragalloyl-β-D-glucopyranose), G-5 (1-O-galloyl-β-D-glucopyranose) and G-6 (gallic acid methyl ester) respectively. The inhibitory effects of G-1, G-3 and G-4 on some tumor strains, lipid peroxidation and blood platelet aggregation were investigated *in vitro*.

**Key words:** Fagaceae, *Quercus variabilis*, Phenoloids, Antitumor, Anti-lipid peroxidation, Anti-blood platelet aggregation

\* 通信联系人

收稿日期: 1999-08-03, 1999-10-20 接受发表

壳斗科 (Fagaceae) 植物栓皮栎 (*Quercus variabilis* Bl.), 又称软木栎、粗皮栎、白麻栎, 我国大部分省区都有分布, 其壳斗富含单宁, 种子含淀粉, 可供酿酒和作饲料 (中国科学院植物研究所, 1972)。该植物叶背常生长虫瘿。虫瘿的形、色似樱桃, 质地坚硬, 是由一种象鼻虫产卵于叶脉中刺激植物细胞快速增殖发育而成。一些植物的虫瘿是重要的单宁原料, 在轻化工业和医药工业中均有重要的价值。日本九州大学西冈五夫的研究组曾对我国产五倍子 (*Rhus chinensis* Mill 虫瘿) 和土耳其产五倍子 (*Quercus infectoria* 虫瘿) 的单宁成分进行过研究 (Nishizawa, 1982, 1983)。本文报道昆明产栓皮栎虫瘿的酚性化学成分及其生理活性。

## 1 结果与讨论

新鲜栓皮栎虫瘿 105g 的 50% 丙酮浸提物经葡聚糖凝胶和大孔吸附树脂等柱层析分离纯化, 得两对缩酚酸型平衡互变异构体 (G-1 和 G-2) 和 4 个酚类化合物单体 (G-3 ~ G-6)。在化学结构鉴定的基础上, 进行了初步的体外肿瘤细胞毒活性, 抗脂质过氧化活性, 以及抗血小板聚集活性实验研究。

### 1.1 化合物的结构鉴定

G-1 为灰白色无定形粉末, 红外光谱在  $3373\text{cm}^{-1}$  有羟基吸收峰,  $1717\text{cm}^{-1}$  有羰基吸收峰; 负离子 HRFAB-MS 给出其分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{14}$ ; 其  $^{13}\text{C}$  NMR 谱上有一典型的  $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基信号 (89.14, 78.72, 78.02, 74.00, 71.06, 62.31), 端基碳的高场化学位移表明该糖基以酯甙键的形式存在 (孙旺达, 1988);  $^1\text{H}$  NMR 谱上端基质子信号 85.66 (d,  $J = 7.0\text{Hz}$ ), 表明葡萄糖为  $\beta$  构型。 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱提示其酚性部分为 (3'-没食子酰基) 没食子酰基和 (4'-没食子酰基) 没食子酰基的混合物, 二者的比例约为 3:1 (Table 1, 2)。具有两个没食子酸单元以上的多没食子酸酯都属于缩酚酸酯类, 其没食子酰基的酯键比糖酯键易于水解, 在邻位羟基的影响下, 缩酚型的酯键能在极缓和的条件下被甲醇分解, 生成没食子酸甲酯, 也能在较为温和的条件下分解生成更简单的没食子酸糖酯和没食子酸。将 G-1 进行甲醇醇解, 在  $50^\circ\text{C}$  的水浴中 20 min 即有没食子酸甲酯和 1-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖生成; 将 G-1 溶解于蒸馏水中, 在  $58^\circ\text{C}$  的水浴中加热 30 min 即有没食子酸和 1-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖生成 (Fig 1)。鉴于间-二没食子酰基与对-二没食子酰基类水解单宁常具有平衡互变现象, 难以进一步分离纯化 (Nishizawa, 1982), 故 G-1 应为 1-O-(3'-没食子酰基) 没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖 (1) 和 1-O-(4'-没食子酰基) 没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖 (2) 的平衡互变异构体混合物, 二者比例约为 3:1。

G-2 为灰褐色无定形粉末, 负离子 HRFAB-MS 谱给出分子式为  $(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9)$ ; 其  $^{13}\text{C}$  NMR 谱和  $^1\text{H}$  NMR 谱除没有  $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基信号外, 其它信号与 G-1 基本一致, 并与文献报道的间-二没食子酰甲酯和对-二没食子酰甲酯平衡互变异构体的化学位移值基本一致 (Nishizawa, 1982) (Table 1, 2)。故 G-2 应为 3-O-没食子酰基-没食子酸 (3) 和 4-O-没食子酰基-没食子酸 (4) 的平衡互变异构体混合物。

G-3 为白色无定形粉末, 负离子 FAB-MS 质谱得准分子离子峰  $m/z$  483 [ $\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{14})-\text{H}$ ] $^-$ , 与 1 的分子量相同; 红外光谱上有羟基和羰基的吸收峰 ( $3390, 1704\text{cm}^{-1}$ );

其 $^{13}\text{C}$  NMR 和 $^1\text{H}$  NMR 谱中 $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖的信号除 C-1 位酯化外, C-6 位向低场位移至 $\delta 64.42$ , 表明葡萄糖 6 位上亦连接了没食子酰基。因此, G-3 鉴定为 1, 6-二-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖 (5) (Nonaka, 1983)。

G-4 为白色粒状结晶, 负离子 FAB-MS 质谱得准分子离子峰  $m/z$  787 [ $\text{M}(\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{22})-\text{H}]^-$ , 提示该化合物由 4 个单元的没食子酰基和 1 单元葡萄糖基组成; 红外光谱上有羟基和羰基吸收峰 ( $3309, 1707\text{cm}^{-1}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR 谱中 $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖的化学位移与文献报道的 1, 2, 3, 6-四-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖 (6) 一致 (Nishizawa, 1983)。

G-5 为白色无定形粉末, 负离子 FAB-MS 质谱得准分子离子峰  $m/z$  331 [ $\text{M}(\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{10})-\text{H}]^-$ 。红外光谱有羟基和羰基吸收峰 ( $3400, 1715\text{cm}^{-1}$ );  $^{13}\text{C}$  和 $^1\text{H}$  NMR 谱上只有各一单元的 $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基和没食子酰基信号。葡萄糖端基碳的化学位移在 $\delta 95.81$ 的高磁场范围, 说明其 C-1 位连接了没食子酰基 (Table 1, 2)。故 G-5 鉴定为 1-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖 (7) (Kashiwada, 1984)。

Table 1  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds 1-8 ( $\delta, \text{CD}_3\text{OD}$ )

Compound	1	2	3	4	5	6	7	8	
Glc									
1	96.14				95.89	93.73		95.81	
2	74.00				74.03	72.28		73.70	
3	78.02				76.35	76.31		77.56	
4	71.06				71.18	69.47		70.75	
5	78.72				77.95	76.31		78.37	
6	62.31				64.42	63.69		62.03	
Galloyl	间位	对位	间位	对位					
1'	120.50	128.20	120.27	124.21	121.33	119.63	120.17	120.39	121.37
2'	117.88	110.89	117.23	110.17	110.26	110.40	110.43	110.78	110.19
3'	144.89	151.68	142.86	150.49	146.35	146.09	146.09	146.17	146.30
4'	140.14	132.70	140.32	133.00	140.31	139.84	139.90	140.31	139.73
5'	146.53	151.68	146.77	150.49	146.35	146.09	146.09	146.17	146.30
6'	115.19	110.89	115.48	110.17	110.26	110.40	110.43	110.78	110.19
C=O	166.52	166.32	166.95	166.48	168.29	166.29	167.15	167.33	169.26
1"	120.78	120.80	120.27	120.27	120.66	120.75	121.06		
2"	110.88	110.32	111.20	110.62	110.65	110.43	110.65		
3"	147.60	146.52	146.04	145.90	146.35	146.23	146.23		
4"	140.45	138.50	139.74	140.32	139.77	140.12	140.60		
5"	147.60	146.52	146.04	145.90	146.35	146.23	146.23		
6"	110.88	110.32	111.20	110.62	110.65	110.43	110.65		
C=O	166.32	166.30	166.95	166.48	166.95	167.71	168.21		
$\text{CH}_3\text{O}$									

Table 2  $^1\text{H}$  NMR data of compounds 1~8 ( $\delta_{\text{H}}$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Compound	1	2	3	4	5	6	7	8
Glc								
1	5.67, d, $J=7.0\text{Hz}$				5.72, d, $J=6.7\text{Hz}$	6.13, d, $J=8.2\text{Hz}$	5.64, d, $J=7.6\text{Hz}$	
2						5.47, dd, $J=8.1,$ $10.3\text{Hz}$		
3	3.30~3.51, m (H-2-5)				3.39~3.60, m (H-2-5)	5.64, t, $J=9.2\text{Hz}$	3.40~3.55, m (H-2-5)	
4						4.02, t, $J=9.0\text{Hz}$		
5						4.08, m		
6	3.84, d, $J=11.2\text{Hz}$				4.58, dd, $J=1.6,$ $12.0\text{Hz}$	4.65, dd, $J=1.4,$ $11.4\text{Hz}$	3.86, d, $J=11.4\text{Hz}$	
	3.69, dd, $J=4.6, 12.4\text{Hz}$				4.43, dd, $J=4.9,$ $12.1\text{Hz}$	4.53, dd, $J=4.4,$ $12.2\text{Hz}$	3.71, dd, $J=4.9,$ $12.2\text{Hz}$	
Galloyl								
	间位	对位	间位	对位				
	7.45, d, $J=2.0\text{Hz}$	7.23, s	7.40, s	7.27, s	7.17, s 7.05, s	6.97, s 7.06, s	7.15, s	7.05, s
	7.38, d, $J=2.0\text{Hz},$	7.18, s	7.27, s	7.12s		7.08, s 7.16, s		
	7.22, s							3.80, s
$\text{CH}_3\text{O}$								

G-6 为浅褐色针状结晶,  $^1\text{H}$  NMR 谱上有甲氧基质子  $\delta 3.80$  (s, 3H) 和没食子酰基质子信号  $\delta 7.05$  (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR 谱上有甲氧基碳的高场化学位移 ( $\delta 52.51$ ), 提示甲氧基与没食子酰基的羰基相连。所以, G-6 应为没食子酸甲酯 (8), 其光谱数据与文献报道的一致 (孙旺达, 1988)。

Table 3 Effects of G-3 and G-4 on lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{2+}$  and cysteine

Compound		Inhibition (%)
G-1	26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	96.6 $\pm$ 0.17
G-3	26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	96.4 $\pm$ 0.20
G-4	26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	96.4 $\pm$ 0.17
Vitamin E	26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	76.8 $\pm$ 3.10

Table 4 Effects of G-1, G-3 and G-4 on cancer cell lines

Compound	Strains IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	HL60	KB	AS49	SGC7901	HeLa1	HeLa2
G-1	91.2	> 200	60.3	> 200	56.2	30.2
G-3	> 200	ND *	ND	ND	ND	ND
G-4	20.0	> 200	> 200	40.7	> 200	141.3
Control mitoxantrone	0.08	0.53	0.26	0.62	0.49	0.58

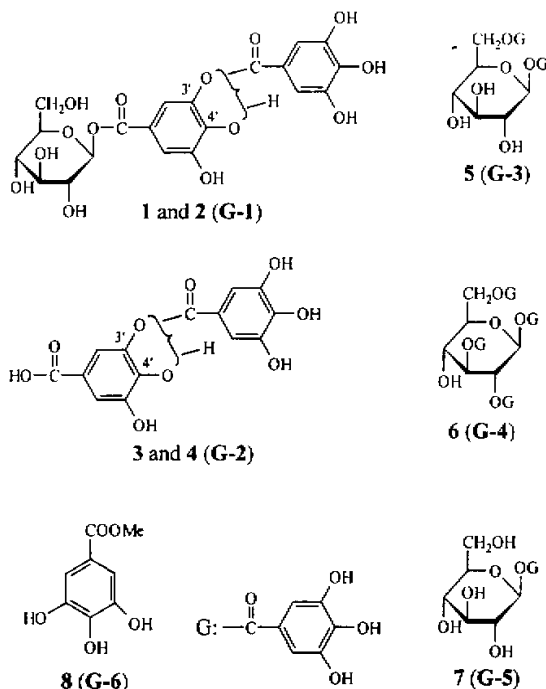


Fig 1. Structure of compounds 1~8

## 1.2 生物活性测定

1.2.1 抗脂质过氧化活性 实验结果表明, G-1, G-3 和 G-4 对  $\text{Fe}^{2+}$  - 半胱氨酸反应系统所激发的微粒体脂质过氧化有显著抑制活性 (Table 3)。

1.2.2 对肿瘤细胞株的细胞毒活性 体外实验结果表明, G-1 和 G-4 对 6 个肿瘤细胞株有不同程度的抑制作用, 其中 G-1 对 HeLa2、G-4 对 HL60 细胞株的抑制活性较强; G-3 没有抑制活性 (Table 4)。

1.2.3 对血小板聚集的抑制活性 体外抑制实验结果表明, G-1、G-3 和 G-4 对由血小板活化因子 (PAF)、花生四烯酸 (AA) 和二磷酸腺苷 (ADP) 所致血小板聚集没有抑

制作用。

### 1.3 讨论

栓皮栎叶虫瘿中分离到的化合物主要是水解单宁和没食子酸衍生物, 与国产五倍子和土尔其五倍子的酚性成分类似 (Nishizawa, 1982, 1983)。其中, G-1 和 G-2 为间-二没食子酰基与对-二没食子酰基的平衡互变异构体混合物, 这是缩酚酸型水解单宁常见的现象, 难以进一步分离纯化 (Nishizawa, 1982); G-6 可能是 G-1 和 G-2 等缩酚型聚没食子酸酯在分离纯化过程由甲醇醇解而生成的 (Fig 1, 2) (孙旺达, 1988)。栓皮栎的虫瘿富含具有拒食作用的单宁类化合物, 象鼻虫幼虫通过虫瘿寄生于栓皮栎叶上, 在虫瘿中不仅获得养料生长发育, 并得到保护, 防止天敌昆虫和鸟类的侵袭。虫瘿寄生的叶片通常发育瘦小, 栓皮栎表象上是受害者, 二者在生态学方面的相互关系尚有待于进一步的研究。

对 G-1、G-3 和 G-4 的初步体外生物活性实验研究结果表明, 这几个水解单宁均有显著的抗脂质过氧化活性; G-1 和 G-4 对 6 个肿瘤细胞株有不同程度的抑制作用; 三者对血小板聚集均无抑制活性, 这可能与它们分子中没食子酰基上的酚羟基有关。水解单宁类化合物的生物活性及其构效关系有待进一步研究。

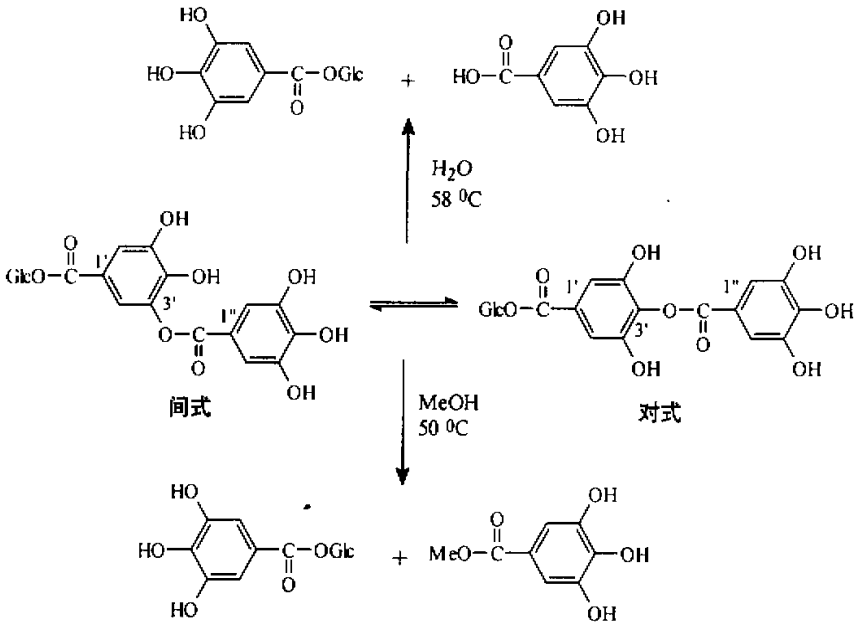


Fig 2 The tautomers of G-1 and its hydrolysis and alkalolysis

## 2 实验部分

IR 谱用 Bio-Rad FTS-135 仪以 KBr 压片法测试; UV 谱用 Shimadzu UV-210A 仪以甲醇为溶剂测定, 旋光谱用 SEPA-300 仪以甲醇为溶剂测定;  $^{13}\text{C}$  和  $^1\text{H}$  NMR 谱用 Bruker-400 仪, 以 TMS 为内标在  $\text{CD}_3\text{OD}$  中测定; 负离子 FAB-MS 谱在 VG Autospec 3000 谱仪上测定。

实验样品采集于中国科学院昆明植物研究所植物园, 栓皮栎植物由我所分类室李锡文研究员鉴定, 标本存于该室标本馆; 虫瘿由中国科学院昆明动物研究所昆虫室杨大荣副研究员鉴定。

## 2.1 提取与分离

新鲜栓皮栎虫瘿 105 g, 捣碎后用 50% 丙酮室温浸提 3 次, 每次浸泡 24 h, 回收溶剂至小体积, 经大孔吸附树脂 Diaion 柱层析处理, 用水和甲醇洗脱。甲醇洗脱物浓缩至小体积后用 Sephadex LH-20 柱层析分离, 50% 甲醇洗脱, 得 4 个组分 (Fr. 1-4)。Fr. 1 用 MCI gel CHP20 柱层析分离, 10% - 60% 甲醇洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱层析纯化, 以 50% 甲醇洗脱, 得 G-1 (化合物 1 和 2) (200 mg) 和 G-3 (化合物 5) (30 mg); Fr. 2 浓缩放置, 得粒状结晶, 为 G-4 (化合物 6) (700 mg); Fr. 3 经 MCI gel CHP 20P 柱层析分离, 5% - 50% 甲醇洗脱, 再用 Sephadex LH-20 柱层析纯化, 以 30% 甲醇洗脱, 得 G-2 (化合物 3 和 4) (140 mg) 和 G-5 (化合物 7) (25 mg); Fr. 4 浓缩放置得结晶 G-6 (化合物 8) (20 mg)。

## 2.2 结构鉴定

G-1 灰白色无定形粉末,  $UV\lambda_{\max} \text{nm}$ : 218, 277。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3373, 1717, 1537, 1448, 1324, 1202, 1074, 1023, 958, 931, 886, 873。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 483  $[\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{14}) - \text{H}]^{-}$ , 负离子 HRFAB-MS  $m/z$ : 483.0816  $[\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{14}) - \text{H}]^{-}$  (计算值: 483.0775)。 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见 Table 1 和 2。

G-1 的水解 G-1 (50 mg) 溶解于 10 mL 蒸馏水中, 在 58℃ 的水浴中恒温加热, TLC 检测, 加热 20 min 时检测到没食子酸和 1-O-没食子酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖, 随着时间推移没食子酸等水解产物逐渐增多。48 min 后, 将水解液在 Sephadex LH-20 柱上层析纯化, 以 50% 乙醇为洗脱剂, 得 G-5 (25 mg) 和没食子酸 (16 mg) (Zhang, 1995)。

G-1 的醇解 G-1 (50 mg) 溶解于 10 mL 甲醇中, 在 50℃ 的水浴中恒温加热, TLC 检测, 加热 30 min 时检测到没食子酸甲酯和 1-O-没食子酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖, 随着时间推移没食子酸等水解产物逐渐增多。20 min 后将醇解溶液在 Sephadex LH-20 柱上层析分离, 以 30% 乙醇为洗脱剂, 得 G-5 (20 mg) 和 G-6 (19 mg)。

G-2 褐色无定形粉末,  $UV\lambda_{\max} \text{nm}$ : 216, 280。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 321  $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 。负离子 HRFAB-MS  $m/z$ : 321.0259  $[\text{M}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9) - \text{H}]^{-}$  (计算值: 321.0247)。 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见 Table 1 和 2。

G-3 白色无定形粉末,  $UV\lambda_{\max} \text{nm}$ : 218, 280。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3390, 1704, 1688, 1625, 1542, 1453, 1395, 1361, 1283, 1258, 1227, 1146, 1090, 1030, 991, 954, 908, 868。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 483  $[\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_{14}) - \text{H}]^{-}$ 。 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见 Table 1 和 2。

G-4 白色粒状结晶,  $UV\lambda_{\max} \text{nm}$ : 218, 280.5。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3309, 1707, 1615, 1538, 1450, 1350, 1204, 1094, 1030, 964, 867, 812。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 787  $[\text{M}(\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{22}) - \text{H}]^{-}$ 。 $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据见 Table 1 和 2。

G-5 灰白色粉末,  $UV\lambda_{\max} \text{nm}$ : 218.5, 279。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 1715, 1623, 1554, 1519, 1451, 1402, 1358, 1327, 1244, 1214, 1144, 1111, 1070, 1044, 1024, 986, 949,

898, 866, 757.。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 331  $[M(C_{13}H_{16}O_{10})-H]^-$ 。<sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 数据见 Table 1 和 2。

G-6 浅褐色针状结晶,  $UV\lambda_{max}nm$ : 218, 275。负离子 FAB-MS  $m/z$ : 182  $[M(C_8H_8O_5)-2H]^-$ 。<sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR 数据见 Table 1 和 2。

### 2.3 生物活性实验方法

2.3.1 抗脂质过氧化实验方法 选用雄性 SD 大鼠 (体重 250 ~ 300 g), 参照文献方法制备大鼠肝微粒体 (Liu 等, 1992), Lowry 法进行微粒体蛋白定量 (Lowry 等, 1951), 用  $Fe^{2+}$ -半胱氨酸 (Cys) 反应系统产生氧自由基激发脂质过氧化反应 (Andrew 等, 1983)。以 TEP 为标准, 用硫代巴比妥酸显色法测定反应终产物中丙二醛 (MDA) 含量。若加入 Cys 和  $FeSO_4$  前在体系中加入待测样品, 即可观察其对脂质过氧化反应过程中 MDA 生产的影响。以下列公式计算脂质过氧化抑制率: 脂质过氧化抑制率 (%) =  $100 \times (\text{对照管 MDA 含量} - \text{样品管 MDA 含量}) / \text{对照管 MDA 含量}$ 。

2.3.2 抗肿瘤细胞株实验方法 体外抑瘤试验采用改良 MTT 比色分析法进行检测 (周建军等, 1993)。受试样品先用 DMSO 配制成  $10^{-2}$  mol/L 后, 再用生理盐水依次稀释成  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  mol/L 5 个浓度, 样品溶解良好。取对数生长期的各细胞株, 将细胞浓度调整为  $4 \times 10^4$  /mL, 加入 96 孔板中, 90  $\mu$ L/孔。贴壁细胞在培养箱中放置 4h 待贴壁后加入不同浓度的待测样品, 每孔 10  $\mu$ L。阴性对照为等体积的生理盐水, 阳性对照为米托蒽醌。加药组及对照组均设 4 个复孔, 另设 4 个只加培养基的孔为调零孔。样品的终浓度分别为  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L。细胞在 37 $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  培养箱中分别孵育 48 h (悬浮细胞)、72 h (贴壁细胞) 后, 加入 MTT 5 mg/mL (Sigma), 10  $\mu$ L/孔。继续培养 4 h 后, 加入三联液 [10% SDS - 5% 异丁醇 - 0.012 mol/L HCl (w/v/v)], 100  $\mu$ L/孔, 放置 12 h 后, 用酶标仪 (Biotech EL-340, 美国) 在 570nm、630nm 双波长下测定各孔的 OD 值。

细胞存活率 (%) = (样品孔的 OD 均值/阴性对照孔的 OD 均值)  $\times$  100; 细胞抑制率 = 100 - 细胞存活率。用 GWBASIC 软件计算各受试药的  $IC_{50}$ 。

2.3.3 抗血小板聚集实验方法 参照《药理实验方法学》(徐叔云等, 1994) 进行样品制备, 以比浊法进行测定。步骤如下: 用硅化注射器 (预先吸好 1/10 血量的 3.8% 枸橼酸钠溶液) 取家兔血浆, 以 1000 r/min 离心 5 min, 吸出上层 PRP。余下的血浆再以 3000 r/min 离心 15 min, 管中上清液即 PPP。计 PRP 中血小板数, 以 PPP 调节 PRP 使血小板数在 40 ~ 45 的范围。取一定量 PRP 置于比浊管内, 加药液及对照液测定。

致谢 本所植物化学研究室仪器组测定光谱数据, 分类室李锡文研究员鉴定植物标本; 中国科学院昆明动物研究所昆虫室杨大荣副研究员鉴定虫瘿标本。

### [参考文献]

- 中国科学院植物研究所, 1972. 中国高等植物图鉴 (第 1 册) [M]. 北京: 科学出版社, 457  
孙达旺, 1988. 植物单宁化学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 247 ~ 261



- 周建军, 1993. 评价抗痛物质活性的改良 MTT 法 [J]. 中国医药工业杂志, 24 (4): 455 ~ 457
- 徐叔云, 卞如濂, 陈修等, 1994. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1121
- Andrew J F, Searle R L, 1983. Stimulation of microsomal lipid peroxidation by iron and cysteine [J]. *Biochem*, 212: 549 ~ 554
- Kashiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, 1984. Tannins and related compounds. XXIII. Rhubarb (4); Isolation and structures of new classes of gallotannins [J]. *Chem Pharm Bull*, 32 (9): 3461 ~ 3470
- Liu G T, Zhang T M, Wang B E, et al, 1992. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidation damage to biomembranes [J]. *Biochemical Pharmacology*, 43 (2): 147 ~ 152
- Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L, et al, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Bio Chem*, 193: 265 ~ 276
- Nishizawa M, Yamagishi T, Nonaka G, et al, 1982. Tannins and related compounds. Part 5. Characterization of polygalloylglucoses from Chinese gallotannin [J]. *J Chem Soc, Perkin Trans, I*: 2963 ~ 2968
- Nishizawa M, Yamagishi T, Nonaka G, et al, 1983. Tannins and related compounds. Part 9. Isolation and characterization of polygalloylglucoses from Turkish galls (*Quercus infectoria*) [J]. *J Chem Soc Perkin Trans, I*: 961 ~ 965
- Nonaka G, Nishioka I. 1983. Tannins and related compounds. X. Rhubarb (2); Isolation and structures of a glycerol gallate, gallic acid glucoside gallates, galloylglucoses and solindleyin [J]. *Chem Pharm Bull*, 31 (5): 1652 ~ 1658
- Zhang W J, Liu Y Q, Li X C, et al, 1995. Chemical constituents of "ecological tea" from Yunnan [J]. *Acta Bot Yunn* (云南植物研究), 17 (2): 204 ~ 208