

## 金银花中酚酸类和黄酮类成分的黄嘌呤氧化酶抑制活性

李英, 陈君\*, 李萍\*\*

(中国药科大学现代中药教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 建立基于紫外分光光度原理的微孔板筛选方法,用于金银花药材中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选,并进行抑制活性测定。通过对筛选条件优化,建立了可靠的筛选模型,并对从金银花中分离得到的20个单体化合物进行了筛选,发现8个酚酸类成分和4个黄酮类成分具有黄嘌呤氧化酶抑制活性,其中3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯、槲皮素和木犀草素有很好的活性,其 $IC_{50}$ 分别为8.36, 6.46和2.08  $\mu\text{mol/L}$ 。筛选结果表明,金银花中黄酮苷元的活性优于黄酮苷,双咖啡酰奎宁酸的活性明显优于单咖啡酰奎宁酸类成分,双咖啡酰奎宁酸甲酯的活性明显优于双咖啡酰奎宁酸,且双咖啡酰奎宁酸的5位取代对化合物的活性贡献最大。

**关键词** 黄嘌呤氧化酶抑制剂;金银花;尿酸;构效关系

中图分类号 R284 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)05-0407-05

Inhibitory activity of the flavonoids and phenolic acids from *Jinyinhua* on the xanthine oxidase

LI Ying, CHEN Jun\*, LI Ping\*\*

Key Laboratory of Modern Chinese Medicines (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** The inhibitory effect on of xanthine oxidase was assayed by high-throughput microplate spectrophotometer in ultraviolet region and the developed method was used to screen the compounds separated from *Jinyinhua*. The *in vitro* high-throughput screening method for xanthine oxidase inhibitors was developed and optimized with four flavonoids and eight phenolic acids in *Jinyinhua* being discovered to have xanthine oxidase inhibitory activity. It was found that quercetin, luteolin and 3,4-di-caffeoylquinic acid methyl had excellent activity and their  $IC_{50}$  values were 8.36, 6.46 and 2.08  $\mu\text{mol/L}$  respectively. In the crude drug of *Jinyinhua*, the activity of flavonoid aglycones was better than that of flavonoid glycosides, and the activity of double caffeoyl quinic acids was better than that of single caffeoyl quinic acids. Moreover, the activity of phenolic conjugates of methylated quinic acid was significantly better than that of quinic acid, and the 5-caffeoyl moiety contributed most to the activity of double caffeoyl quinic acids.

**Key words** Xanthine oxidase inhibitors; *Jinyinhua*; uric acid; structure-activity relationships

This project was supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0868); the National Natural Science Foundation of China (No. 30801521) and the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-09-0769)

近年来,随着我国人民生活水平的提高和生活节奏的加快,痛风的发病率持续上升,痛风和高尿酸血症已成为当今老年常见疾病。痛风还与高血

压、肾脏疾病、代谢综合征、高脂血症、糖尿病、胰岛素抵抗和心血管疾病等多种病症相关,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。痛风的发生是由体内产生尿酸过多及

\* 收稿日期 2011-04-20 通讯作者 \* Tel:025-83271382 E-mail:chenj2002@gmail.com

\*\* Tel:025-83271379 E-mail:liping2004@126.com

**基金项目** 教育部长江学者与创新团队发展计划资助项目(No. IRT0868);国家自然科学基金资助项目(No. 30801521);教育部新世纪优秀人才计划资助项目(No. NCET-09-0769)

肾清除能力下降,尿酸体内蓄积,导致尿酸盐结晶在关节及各脏器沉积。因此,痛风的治疗通常采取的手段是促进尿酸排泄和抑制尿酸生成,并采用适当措施改善相关症状。体内尿酸的形成与嘌呤代谢有关,在嘌呤代谢的最后步骤中,次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下生成黄嘌呤,再进一步生成尿酸,抑制该酶的活性可以有效减少尿酸生成。临床上治疗痛风的药物发展缓慢,目前只有 20 世纪 60 年代上市的黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇(allopurinol)<sup>[2-3]</sup>和 2009 年 2 月美国 FDA 批准的非布索坦(febugostat)<sup>[4]</sup>用于痛风治疗。中药治疗痛风已有几千年的历史,从中药中寻找高效低毒的黄嘌呤氧化酶抑制剂具有很大优势及良好前景<sup>[5]</sup>。

金银花是我国常用中药,应用历史悠久。2010 年版《中华人民共和国药典》一部<sup>[6]</sup>收载忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花为金银花正品药材,而同属植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand. -Mazz、红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq. 华南忍冬 *L. confusa* DC. 及黄褐毛忍冬、*L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花则为山银花,均具有清热解毒,凉散风热之功效。常用于痈肿疔疮,喉痹,丹毒,热血毒痢,风热感冒,温病发热等疾病<sup>[7]</sup>。中医临床上将含有金银花的方剂用于痛风疾病的治疗。现代研究报道金银花水提液及甲醇提取液可抑制黄嘌呤氧化酶的活性<sup>[8]</sup>。另外,有台湾学者报道红腺忍冬提取物及从红腺忍冬中分离得到的忍冬黄素具有较好的抑制黄嘌呤氧化酶的活性<sup>[9]</sup>。然而,目前尚缺乏金银花对黄嘌呤氧化酶抑制活性的系统深入研究。

本研究通过建立基于紫外分光光度法原理的高通量筛选方法,对前期从金银花中分离的 20 个成分进行体外黄嘌呤氧化酶抑制活性研究,以期阐明金银花抑制黄嘌呤氧化酶活性的物质基础,并对活性成分的构效关系进行了初步探讨,为抗痛风药物研制提供物质基础。

## 1 材 料

### 1.1 药品和试剂

黄嘌呤(xanthine, XA)、黄嘌呤氧化酶(xanthine

oxidase, XOD)购自美国 Sigma 公司;阳性对照别嘌呤(纯度大于 98%)购于上海阿拉丁试剂公司;实验样品:5-*O*-咖啡酰奎宁酸(5-*O*-caffeoylquinic acid, **1**), 3-*O*-咖啡酰奎宁酸(3-*O*-caffeoylquinic acid, **2**), 1-*O*-咖啡酰奎宁酸(1-*O*-caffeoylquinic acid, **3**), 3,4-二咖啡酰奎宁酸(3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid, **4**), 4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, **5**), 3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, **6**), 1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, **7**), 1,3-二咖啡酰奎宁酸(1,3-*di-O*-caffeoylquinic acid, **8**), 咖啡酸(caffeic acid, **9**), 咖啡酸乙酯(caffeic acid ethyl ester, **10**), 3-*O*-咖啡酰奎宁酸丁酯(3-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester, **11**), 3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **12**), 3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯(3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid methyl ester, **13**), 槲皮素(querletin, **14**), 芦丁(rutin, **15**), 异槲皮苷(isoquercitrin, **16**), 木犀草素(luteolin, **17**), 木犀草苷(luteolin-*O*-glucoside, **18**), 苜蓿苷(tricin-*O*-glucoside, **19**)和马钱苷(loganin, **20**), 结构式如图 1 所示。以上实验样品均为本课题组从金银花类药材中分离制备,并经 MS, <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 等波谱手段确证结构,经 HPLC-DAD 分析,纯度均大于 98%;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪 器

酶标仪 Synergy2(美国 Bio-Tek 公司),数据采集采用 Gen5 软件。Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 溶液配制

缓冲液配制:精密称取 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.478 0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 3.473 0 g 及乙二胺四乙酸(EDTA) 9.31 mg,加入超纯水约 240 mL 超声促溶,取出,定容至 250 mL 即得含 75 mmol/L 磷酸根离子、200 μmol/L EDTA, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PB)。

底物配制:精密称取黄嘌呤 3.65 mg,加入 PB 约 45 mL 超声促溶,取出,定容至 50 mL,置于 45 °C 水浴锅加热溶解,即得 0.48 mmol/L 底物溶液。底物溶液需每天新鲜配制。

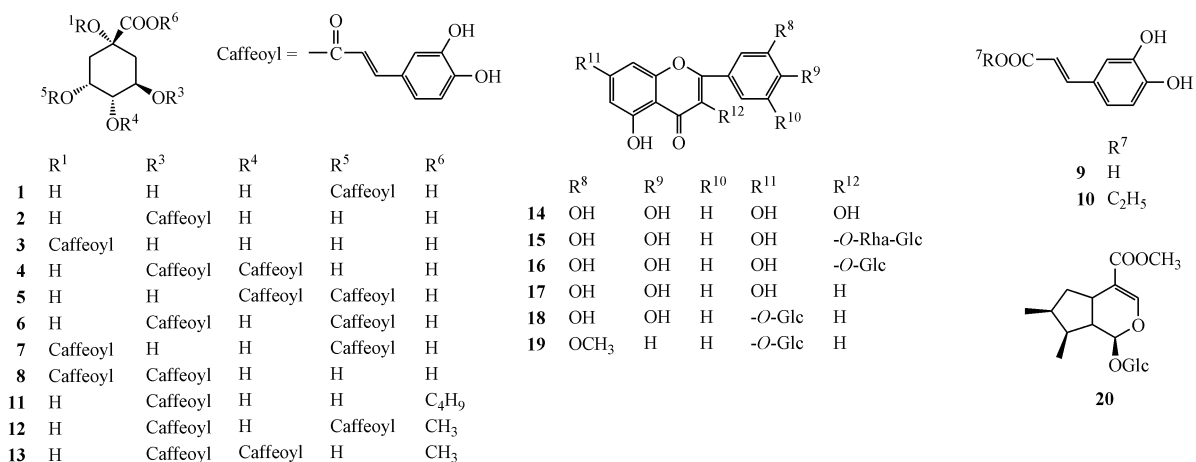


Figure 1 Chemical structures of compounds (1-20) separated from *Jinyinhua*

酶液配制:购得的 XOD 用少量 PB 稀释后分装为每管含 0.16 U 的 XOD 贮备液,于 -70 °C 保存,用时取出,用 PB 稀释成 0.08 U/mL 的工作酶液,置于冰上保存。为避免反复冻融降低酶活,每次实验前需预估所需酶量,取适量黄嘌呤氧化酶贮备液配制成工作酶液。

### 2.2 供试药物的配制

精密称取适量标准品,用二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 20 mmol/L 贮备液,于 -20 °C 避光保存。用时用 PB 稀释至不同浓度,DMSO 含量小于 5%。

### 2.3 黄嘌呤氧化酶抑制剂高通量筛选

将样品及空白溶液(空白为 PB)100 μL、酶液 50 μL(终浓度 0.02 U/mL),依次加入 96 孔板,在酶标仪上 37 °C 孵育 3 min,加入底物 50 μL(终浓度 0.12 mmol/L)启动反应,在 295 nm 处每隔 15 s 读数一次,记录吸收度 A,共计 5 min。每组平行设置 4 个复孔。抑制率 (%) 可通过样品组及空白组 A 值的变化,用下列公式计算:抑制率 (%) =  $[(dA/dt)_{\text{空白}} - (dA/dt)_{\text{样品}}] / (dA/dt)_{\text{空白}} \times 100$ 。其中  $(dA/dt)_{\text{空白}}$  为空白组的反应速率,  $(dA/dt)_{\text{样品}}$  为样品组反应速率。dA/dt 的时间段选择在 15 ~ 195 s。取 4 个复孔测定的平均值,即得样品的抑制率。

本试验以别嘌呤作为阳性对照。将初筛得到的高活性样品(抑制率大于 50%)稀释至 5 ~ 8 个浓度,进行梯度复筛。根据抑制剂的浓度及其平均抑制率,经非线性回归方法计算得各样品的 IC<sub>50</sub>。

## 3 结果

### 3.1 高通量筛选方法的建立与优化

3.1.1 反应体系的优化 体系组成的不同会对抑制率结果产生影响,因此,需要对酶及底物的用量进行考察,确定最佳条件。如图 2 所示,当底物浓度一定时(0.12 mmol/L),酶浓度越高紫外检测信号窗越大,仪器测定的系统误差越小,但其达平台的时间也越短,操作时间也越少。当酶浓度一定时(0.02 U/mL),底物浓度过量时反应以恒定速率进行,因此,只需确保在该酶浓度下底物过量即可。

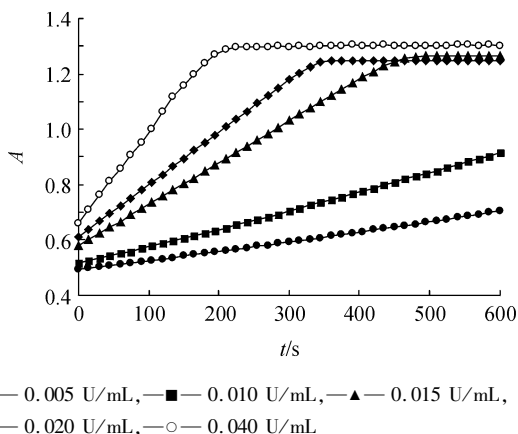


Figure 2 Xanthine-xanthine oxidase kinetics of different enzyme concentrations

本实验对黄嘌呤氧化酶终浓度 0.040, 0.020, 0.015, 0.010, 0.005 U/mL, 黄嘌呤终浓度 0.24, 0.16, 0.12, 0.10, 0.08, 0.06 mmol/L 进行考察,确定以酶 0.02 U/mL 底物 0.12 mmol/L 终浓度为最

佳体系。该条件下底物过量,系统误差小,且能保证足够的操作时间。

3.1.2 反应时间的选择 为选择适当的反应时间,对优化的酶-底物体系进行动力学跟踪,通过吸光度对时间作图即得,如图2中酶浓度为0.02 U/mL的折线图所示。前300 s反应以恒定速度进行,为该反应的初速度,300 s后进入平台期。因此,确定反应时间为300 s。考虑到操作所需时间,选择15~195 s时间段计算反应的初速度。

3.1.3 酶活稳定性考察与使用条件优化 实验中酶自身状态对检测结果影响很大,每天实验前从冷冻冰箱取出的酶液无法即刻用完,酶的状态可能随取出后时间延长而活性降低,从而影响实验结果。为此,有必要对酶的稳定性进行考察。本实验对不同放置条件及时间的酶活性进行考察。考察结果如表1所示,表明酶在8 h之内室温及冰浴条件下均稳定。室温会随天气变化产生影响,因此本实验将工作酶液保存于冰浴中,以保证实验不会因气候变化而产生波动。

**Table 1** Investigation and optimization of enzyme activity conditions ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Condition	dA/dt		
	0	4	8 h
Room Temp.	0.102 ± 0.021	0.099 ± 0.035	0.098 ± 0.030
Ice bath	0.102 ± 0.021	0.103 ± 0.024	0.101 ± 0.019

3.1.4 反应体系中DMSO含量的限度考察 本实验中将各样本溶于DMSO中制备成贮备液,用时用PB稀释成所需浓度。因此,有必要考察DMSO的含量对酶活的影响,排除其影响,以确保抑制作用与加入的样本有关,与DMSO无关。本实验对终浓度0%,1%,2%,4%,5%,8%,10%的DMSO进行考察,结果dA/dt分别为0.101 ± 0.029、0.099 ± 0.031、0.102 ± 0.026、0.101 ± 0.023、0.098 ± 0.030、0.091 ± 0.019、0.083 ± 0.023,说明DMSO含量小于5%不对酶活造成影响。

### 3.2 筛选结果

应用建立的高通量XOD抑制活性筛选方法,对从金银花类药材中分离得到的20个成分进行了活性测定,结果见表2。

实验结果发现,20个化合物中有12个有明显活性,它们在100 μmol/L浓度时对黄嘌呤氧化酶的抑制率大于15%(在本反应系统下,当4,5-二咖啡

酰奎宁酸浓度为100 μmol/L时,在295 nm处的A值超过酶标仪读数范围,表中所列为4,5-二咖啡酰奎宁酸浓度为80 μmol/L时对XOD的抑制率),占总量的60%,其中9个化合物抑制率均大于50%。为此,进一步对这9个化合物进行量效关系研究,发现均有较好的量效关系。各化合物的量效关系经非线性回归计算得出IC<sub>50</sub>,见表3。

**Table 2** Inhibition of the isolated compounds from *Jinyinhua* ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Compd.	Inhibition <sup>a</sup> /%	Compd.	Inhibition <sup>a</sup> /%
1	0.59 ± 0.41	11	7.04 ± 3.59
2	0.86 ± 3.00	12	73.22 ± 2.19
3	0.63 ± 2.26	13	91.9 ± 1.19
4	30.39 ± 0.45	14	94.4 ± 0.38
5	55.89 ± 2.18 <sup>b</sup>	15	82.49 ± 0.60
6	69.46 ± 4.35	16	7.75 ± 3.67
7	64.25 ± 1.75	17	92.29 ± 0.96
8	17.26 ± 2.62	18	67.85 ± 0.68
9	5.66 ± 1.25	19	9.99 ± 1.89
10	32.33 ± 2.26	20	1.18 ± 2.72

<sup>a</sup> Concentration of the compounds were 100 μmol/L except compound 5; <sup>b</sup> Concentration of compound 5 was 80 μmol/L

**Table 3** IC<sub>50</sub> of the active compounds from *Jinyinhua* ( $n=4$ )

Compd.	IC <sub>50</sub> /(μmol/L)	Compd.	IC <sub>50</sub> /(μmol/L)
Allopurinol	3.01	13	8.36
5	76.66	14	6.46
6	71.01	15	45.66
7	50.69	17	2.08
12	30.97	18	37.39

### 3.3 结果分析

筛选结果表明黄酮苷元、黄酮苷、双咖啡酰奎宁酸、双咖啡酰奎宁酸甲酯有较好的活性。3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯、槲皮素、木犀草素甚至与阳性药别嘌醇的IC<sub>50</sub>数量级相同,活性相当。而环烯醚萜苷类的马钱苷并没有表现出抑制活性。初步判断金银花类药材抑制XOD活性可能与其含有的双咖啡酰奎宁酸类和黄酮类化合物有关,可推测这两类化合物是其发挥活性的物质基础。

分别比较各类型化合物的活性后发现:①黄酮类化合物苷元活性远远大于苷的活性,苷元连上糖链后活性下降明显甚至消失。例如木犀草素的IC<sub>50</sub>为2.08 μmol/L而木犀草苷的IC<sub>50</sub>为37.39 μmol/L,槲皮素的IC<sub>50</sub>为6.46 μmol/L而芦丁的IC<sub>50</sub>为45.66 μmol/L,异槲皮苷的IC<sub>50</sub>大于100 μmol/L。②黄酮3位无酚羟基如木犀草素或者3位酚羟基连上糖侧链如芦丁均有活性,说明

3位酚羟基与活性关联不大。③黄酮7位酚羟基连上糖侧链后活性有一定程度降低,但活性并没降低至无,可能是7位酚羟基与酶的活性中心关联不大。如木犀草素7位连上-Glc成木犀草苷后活性降低。④黄酮3',4'位上的邻二酚羟基结构可能与黄酮的活性相关,当破坏了3',4'位上该结构,活性降低甚至消失。如苜蓿苷3'位的酚羟基被甲氧基取代后活性极弱。⑤黄酮苷因其连接的糖链差异活性也存在差异。例如,槲皮素3位上有-Rha-Glc侧链的芦丁活性很好,但是连上-Glc侧链的异槲皮苷活性则很差。⑥双咖啡酰奎宁酸类化合物甲酯化后的活性明显优于未酯化的双咖啡酰奎宁酸的活性。例如3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯的 $IC_{50}$ 为30.97  $\mu\text{mol/L}$ ,而3,5-二咖啡酰奎宁酸 $IC_{50}$ 为71.01  $\mu\text{mol/L}$ ,3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯的 $IC_{50}$ 为8.36  $\mu\text{mol/L}$ ,而3,4-二咖啡酰奎宁酸的 $IC_{50}$ 大于100  $\mu\text{mol/L}$ 。⑦单咖啡酰奎宁酸活性较之双咖啡酰奎宁酸差,但其酯化后活性有所增加。例如,3-O-咖啡酰奎宁酸丁酯活性优于3-O-咖啡酰奎宁酸。⑧咖啡酸乙酯活性优于咖啡酸。⑨双咖啡酰奎宁酸的5位取代对化合物的活性贡献最大。例如1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯有很好的抑制黄嘌呤氧化酶活性,而1,3-二咖啡酰奎宁酸和3,4-二咖啡酰奎宁酸活性很弱。以上活性的差异可能与化合物脂溶性有关。化合物脂溶性的增加使其更易与黄嘌呤氧化酶的疏水活性中心结合,从而表现出更好的酶抑制活性。

## 4 讨论

Nguyen等<sup>[10]</sup>对菊科植物 *Chrysanthemum sinense* 花中的多种黄酮及咖啡酰奎宁酸类化合物进行了XOD抑制活性的测定,木犀草素、木犀草苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯、4,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸甲酯等化合物的 $IC_{50}$ 与本实验测定的结果相似,在一个数量级之内;双咖啡酰奎宁酸甲酯的活性明显优于双咖啡酰奎宁酸;黄酮苷元活性明显优于黄酮苷。Gongora等<sup>[11]</sup>研究也表明双咖啡酰奎宁酸类

化合物甲酯化后的活性明显优于未酯化的。本研究对金银花中酚酸类和黄酮类成分的构效关系进行了分析,与上述文献报道的结果一致。

本研究建立了基于紫外分光光度法的吸收光比色法,检测尿酸生成的量,用于XOD抑制剂的筛选及其抑制活性测定。该法操作简单、易于推广,具有快速、取样量小的特点,可同时进行多样品平行检测,适于大批量样品测定,能满足高通量筛选的要求,为从中药中寻找高效低毒的XOD抑制剂提供保障。

## 参考文献

- [1] Baker JF, Krishnan E, Chen L, et al. Serum uric acid and cardiovascular disease: recent developments, and where do they leave us [J]? *Am J Med*, 2005, **118**(8): 8 162 - 8 261.
- [2] 黄玉斌 (Huang YB). 381 例别嘌醇不良反应分析[J]. 中国药物应用与监测 (*Chin J Drug Appl Monitor*), 2005, **1**(4): 32 - 34.
- [3] Halevy S, Ghislain PD, Mockenhaupt M, et al. Allopurinol is the most common cause of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Europe and Israel [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2008, **58**(1): 25 - 32.
- [4] 唐春雷 (Tang CL), 王德才 (Wang DC), 陈 姝 (Chen S), 等. 新型抗痛风药物非布索坦 [J]. 中国新药杂志 (*Chin New Drugs J*), 2009, **18**(7): 577 - 581.
- [5] 黎 莉 (Li L), 陈科力 (Chen KL), 方继德 (Fang JD). 中草药来源的黄嘌呤氧化酶抑制剂的研究进展 [J]. 中药材 (*J Chin Med Mater*), 2006, **29**(12): 1 386 - 1 389.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 28, 205.
- [7] 中华本草编委会. 中华本草: 第7卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 529.
- [8] Kong LD, Cai Y, Huang WW, et al. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, **73**(1/2): 199 - 207.
- [9] Chien SC, Yang CW, Tseng YH, et al. *Lonicera hypoglauca* inhibits xanthine oxidase and reduces serum uric acid in mice [J]. *Planta Med*, 2009, **75**(4): 302 - 306.
- [10] Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, et al. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense* [J]. *Planta Med*, 2006, **72**(1): 46 - 51.
- [11] Gongora L, Manez S, Giner RM, et al. Inhibition of xanthine oxidase by phenolic conjugates of methylated quinic acid [J]. *Planta Med*, 2003, **69**(5): 396 - 401.