

Anti-Aging Substances from Maca Supercritical Extract

Lihong Cheng¹, Yanfei Lin¹, Yanhui Wang¹, Pak Kum Ju², Kim Tae Seok², Lan Xiang¹, Yeo IK-Hyun², Jianhua Qi^{1*}

¹College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang

²Institute of Food & Culture, Pulmuone Co., Ltd., Seoul Korea

Email: *qijianhua@zju.edu.cn

Received: Mar. 15th, 2017; accepted: Mar. 28th, 2017; published: Mar. 31st, 2017

Abstract

Extracts of several products of Pulmuone were screened for their anti-aging activity using the K6001 yeast strain bioassay system. Maca supercritical extract significantly exhibited anti-aging activity and two active compounds were isolated from the extract. The structures were elucidated by the spectroscopic data and comparison with those reported. One structure was proposed to be *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1), and another was identified as *n*-benzylmyristamide (2). Both compounds significantly extended the replicative lifespan of K6001 yeast strain. To confirm the structure of compound 1, *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1) was synthesized and biological activity was evaluated. The synthesized *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1) is identical to natural compound 1 from spectroscopic data and biological activity.

Keywords

Maca, Anti-Aging, Macamides, Yeast K6001 Strain

玛咖超临界提取物中的抗衰老活性物质

程丽红¹, 林燕飞¹, 王艳惠¹, 朴金株², 金泰硕², 向 兰¹, 吕翼炫², 戚建华^{1*}

¹浙江大学药学院, 浙江 杭州

²韩国圃美多技术院, 韩国 首尔

Email: *qijianhua@zju.edu.cn

收稿日期: 2017年3月15日; 录用日期: 2017年3月28日; 发布日期: 2017年3月31日

*通讯作者。

文章引用: 程丽红, 林燕飞, 王艳惠, 朴金株, 金泰硕, 向兰, 吕翼炫, 戚建华. 玛咖超临界提取物中的抗衰老活性物质[J]. 有机化学研究, 2017, 5(1): 45-50. <https://doi.org/10.12677/jocr.2017.51007>

摘要

本研究采用酵母突变株K6001作为生物活性筛选系统,对韩国圃美多公司多个产品进行筛选,发现玛咖超临界提取粉末具有较好的抗衰老活性。因此对该原料中的抗衰老活性物质进行了研究并从中分离得到了两个活性化合物(1, 2)。这两个化合物都能显著延长酵母突变株的复制性寿命。通过波谱分析以及文献数据比对,推测活性化合物1的结构为*n*-benzyl-(9*Z*)-octadecenamide(1),确定活性化合物2的结构为*n*-benzylmyristamide(2)。为了进一步确认化合物1的结构,合成了*n*-benzyl-(9*Z*)-octadecenamide(1),并且测定了其生物活性,结果表明合成得到的*n*-benzyl-(9*Z*)-octadecenamide的波谱数据及生物活性与天然来源的化合物1相同。

关键词

玛咖, 抗衰老, 玛咖酰胺, K6001酵母

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

衰老是随着时间的推移,生物体出现的生理功能和形态结构退行性变化的过程,是人类生命进程中不可避免的。根据联合国世界人口及世界人口老龄化资料,全球超过60岁老龄人口的比例从1990年的9.2%升高至2013年的11.7%,并预计到2050年老龄人口将超过20亿,比例将占全球总人数的21.1%[1]。其中,我国自从上个世纪实行计划生育以来,老年人口在总人口中占得比例相对提高,老龄化进展较其他发展中国家快,据世界卫生组织中国老龄化报告显示,预计中国超过60岁老龄人口的比例将从2010年的12.4%升高至2040年的28%[2]。衰老过程在整体、组织、细胞乃至分子水平随处可见,导致衰老的原因又是多方面的,衰老机理也极为复杂。目前常见的衰老学说有衰老基因学说、端粒DNA缩短学说、自由基衰老学说[3]等。面对当下越来越严峻的社会人口老龄化趋势,如何延缓衰老、降低衰老相关疾病的发生率以及延长机体寿命受到越来越多人的重视。

拥有简单易操作的生物活性筛选模型对于从天然产物中探寻具有潜在抗衰活性的化合物具有重要意义。现阶段,用于抗衰老研究的主要生物模型有酵母、线虫、果蝇、小鼠等。其中小鼠属哺乳动物,亲缘关系与人类最近,用小鼠做实验所得的结果更具有可信度,但其繁殖饲养的费用较高,实验周期较长且不容易操作,因此更多地用于药物研究后期而很少在药物初筛阶段使用。酵母、线虫、果蝇虽属低等生物,与人类的亲缘关系较远,但是均有人类衰老调控子的同源基因,且由于其简单易操作的优势一直是抗衰老研究的主要模型。其中酵母衰老的重要调控子组蛋白去乙酰化酶Sir2和人类的SIRT1是同源蛋白,都对衰老有着重要的调控作用[4]。因其生命周期短,成本低,操作简单,便于大量培养而更适合实验室初步筛选抗衰老物质。

1996年Bobola等发现了酵母的突变株K6001,该突变株在葡萄糖培养基中,只有母细胞会分裂增殖,而子细胞不能持续分裂,因此单个母细胞产生子细胞的个数是能确定的[5],此突变株的发现大大简化了传统测试酵母细胞复制性寿命的方法及操作。2004年,Jarolim等将这株酵母细胞应用于酵母复制性寿命的研究,并且发现其在白藜芦醇(10 μM)的条件下,其复制性寿命同样可以被显著延长[6]。本团队在酵母

突变株 K6001 活性系统引导下, 已从多种天然产物如天麻[7]、淡菜[8]、麦冬[9]、灵芝孢子粉[10] [11]等中提取分离出来多种结构类型不同的具有抗衰老活性的化合物。

玛咖(*Lepidium meyenii* Walp)原产于秘鲁海拔 3500 - 4450 米的安第斯山脉。玛咖在秘鲁当地作为药食两用的植物已经有 2000 多年的历史。传统上用于改善性功能、提高生育能力、抗疲劳、免疫调节等[12] [13], 而且无任何毒副作用, 以玛咖为主要原料的各类保健品近年来受到越来越多人的青睐。韩国圃美多公司以秘鲁胡宁省栽培的玛咖为原料, 在萃取压力为 30 MPa, 萃取温度为 40℃的条件下进行超临界 CO₂ 萃取, 之后, 将糊精、阿拉伯胶与其混合最终使它成粉末状, 最终得到玛咖超临界提取粉末。

本研究对韩国圃美多公司来源多个产品进行筛选, 对玛咖超临界提取粉末的抗衰老活性物质进行了研究, 在酵母突变株 K6001 活性系统引导下, 分离得到两个玛咖酰胺(macamide)类化合物 *n*-benzyl-(9*Z*)-octadecenamide(**1**), *n*-benzylmyristamide(**2**), 且具有显著的延长酵母突变株 K6001 复制性寿命的作用。

2. 材料与方方法

2.1. 材料与仪器

P-230 型高效液相色谱仪(大连依利特公司); 6224A TOF 型液质联用(美国 Agilent 公司); AVIII-500 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司); 色谱柱 Capcell PAK C18, 色谱柱 Develosil PH-HG-5(日本 Nacalai tesque 公司); K6001 菌株由奥地利萨尔茨堡大学的 Breitenbach 教授提供; 玛咖超临界提取粉末由韩国圃美多公司提供; 油酸(>85%, 东京化成工业株式会社); 无水二氯甲烷(99.9%, 北京百灵威科技有限公司); 新戊酰氯(99%, 北京百灵威科技有限公司); 卞胺(99%, 北京百灵威科技有限公司); DMAP, 4-二甲氨基吡啶(99%, 阿拉丁); 其他试剂为色谱纯或分析纯。

2.2. 生物活性测定方法

2.2.1. 培养基的配制

1)半乳糖液体培养基的配置: 1%酵母粉、2%蛋白胨、3%半乳糖(质量体积比), 121℃高压灭菌 20 分钟后, 备用;

2)葡萄糖液体培养基的配置: 1%酵母粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖(质量体积比), 121℃高压灭菌 20 分钟后, 备用;

3)固体培养基的配置: 相应液体培养基加入 2%琼脂(质量体积比)。

2.2.2. 活性测定方法

1)将冻存于-30℃冰箱中的 K6001 菌株取出, 恢复至室温后, 用 PBS 清洗三次, 然后加入到 5 mL 无菌的半乳糖液体培养基中, 28℃, 160 rpm 摇床中培养 24~28 h 至其生长至对数期后, 从摇床中取出酵母菌株, 混匀后取出 1 mL, 离心, 用 PBS 洗涤三次, 除去所含的半乳糖液体培养基, 再用 PBS 稀释后, 用血球计数板于显微镜下观察计数。

2)向直径 6 cm 的玻璃培养皿(已灭菌)中加入 5 mL 葡萄糖培养基(含 2%琼脂), 待冷却成固体培养基后, 分别向不同的培养皿加入用等体积乙醇溶解的阳性(10 μM 白藜芦醇)或其他样品, 待乙醇挥发后, 分别加入约 5000 个酵母, 用灭菌后的玻璃涂布器将其均匀地涂布于培养基表面, 在 28℃的条件下培养两天。

3)在 10 倍目镜, 20 倍物镜显微镜下观察酵母母细胞产生的子细胞个数: 随机选取 40 个含单个酵母母细胞的菌落, 观察其周围的子细胞个数并记录, 通过和阴性、阳性对比, 统计分析, 评价样品活性。

2.3. 数据统计与分析

通过 SPSS(Statistic Package for Social Science)统计软件, 对每个样品的 40 个数据进行分析, 计算各组的酵母平均寿命值, 并对各加样组与阴性对照组进行一对一的 T-检验, P 值小于 0.05 则样品的活性与对照组相比具有显著性差异。

3. 结果与讨论

3.1. 玛咖超临界提取粉末中活性物质的分离、纯化

在玛咖超临界提取粉末(15 g)中加入 120 ml 50%甲醇水混合溶剂, 震荡后 3000 rpm 离心 10 min, 上清液经 ODS 柱层析分离(溶剂体系体积比为甲醇:水 = 5:5, 7:3, 10:0), 根据 TLC 结果合并得到 4 个组分。分别对这四个组分进行抗衰老活性测定, 结果显示第 3 个组分(洗脱溶剂体系体积比为甲醇:水 = 10:0)具有显著延长酵母突变株复制性寿命的活性。故对该活性组分继续进行正相硅胶柱色谱分离(硅胶 200 - 300 目, 溶剂体系体积比为正己烷:乙酸乙酯 = 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 3:7, 0:10), 根据 TLC 结果合并得到 4 个组分并进行了活性测试, 随后对活性部位第 2 个组分(正己烷:乙酸乙酯 = 8:2)进行两次 HPLC 纯化, 第一次纯化条件为: 色谱柱 Capcell PAK C18(ϕ 10/250 mm), 流速 3 mL/min, 检测波长 210 nm, 流动相 90%甲醇-水混合溶剂, 得到活性馏分(t_R = 21.6 min); 第二次纯化条件为: 色谱柱 Develosil PH-HG-5(ϕ 10/250 mm), 流速 2 mL/min, 检测波长 210 nm, 流动相 90%甲醇-水混合溶剂, 得到活性化合物 **1**(1.8 mg, t_R = 9.3 min)(图 1), 发现该化合物在浓度为 3 μ M 和 10 μ M 时均能显著延长酵母的复制性寿命(图 2(a))。之后, 对进行了正向硅胶柱色谱分离的第 4 个活性组分(正己烷:乙酸乙酯 = 7:3)进行反相 ODS 柱层析分离, 得到活性化合物 **2**(1.6 mg)(图 1), 发现该化合物在浓度为 3 μ M 时能显著延长酵母的复制性寿命(图 2(b))。

3.2. 玛咖超临界提取粉末中活性物质的结构鉴定

活性化合物(1): 白色粉末, MS: m/z 372 $[M+H]^+$ 。根据其 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.28 - 7.35 (m, 5H), 5.66 (s, 1H), 5.35 (m, 2H), 4.45 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 2.21 (m, 2H), 2.02 (m, 4H), 1.66 (m, 2H), 1.27 - 1.30 (m, 20H), 0.88 (t, 3H, J = 6.5 Hz)。将 1H -NMR 与文献[14]进行比对, 基本一致, 所以此化合物结构初步确定为 *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide(图 1)。

活性化合物(2): 白色粉末, MS: m/z 318 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.27-7.35 (m, 5H), 5.66 (br s, 1H), 4.45 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 2.21 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 1.65 (m, 2H), 1.25 - 1.30 (m, 20H), 0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz)。将 1H NMR 与文献[15]进行比对, 完全一致, 所以此化合物结构确定为 *n*-benzylmyristamide(图 1)。

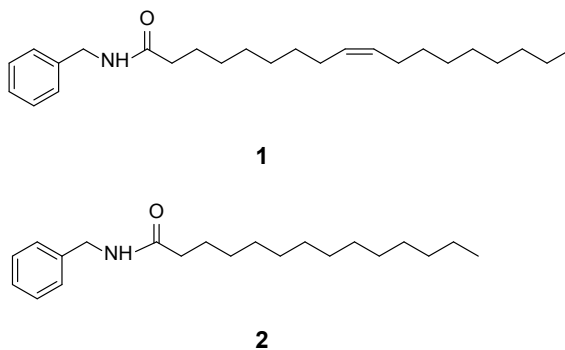


Figure 1. Chemical structures of *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (**1**) and *n*-benzylmyristamide (**2**)
图 1. *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (**1**)及 *n*-benzylmyristamide (**2**)的化学结构

3.3. 活性化合物 1 的合成

将油酸(141 mg, 0.5 mmol)溶于 5 mL 无水二氯甲烷中, 在 0°C 下加入新戊酰氯(181 mg, 1.5 mmol), 室温搅拌 1 h 后, 加入 DMAP(74 mg, 0.6 mmol)和苄胺(82 μ L, 0.75 mmol), 继续搅拌 3 h 后, 加少量水停止反应(图 3) [15]。减压浓缩后将产物溶于 30 mL 乙酸乙酯中, 分别用饱和碳酸氢钠, 稀盐酸溶液洗涤, 之后, 有机层用无水硫酸钠干燥, 经减压浓缩得无色透明油状物, 该油状物经硅胶柱分离(正己烷:乙酸乙酯 = 7:3)得白色固体(102 mg), 该白色固体经 HPLC 纯化(甲醇:水 = 98:2)得无色固体(75 mg)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.27~7.35 (m, 5H), 5.75 (s, 1H), 5.34 (m, 2H), 4.44 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz), 2.20 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.00 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.26 - 1.30 (m, 20H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz)。生物活性测试结果表明该合成化合物在浓度为 3 μM 和 10 μM 时能显著延长酵母的复制性寿命, 与天然来源的化合物活性一致。因此确认活性化合物 1 的结构确定为 *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide。

4. 结论

在 K6001 酵母活性筛选系统的引导下, 对韩国圃美多公司来源的多个产品的抗衰老活性进行筛选, 发现玛咖超临界提取粉末具有较好的抗衰老活性, 因此对该原料中的抗衰老活性物质进行了研究, 通过正、反相柱分离, 以及 HPLC 纯化, 得到两个具有显著抗衰老活性的化合物。通过波谱解析及有机合成, 确定活性化合物 1 的结构为 *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide(1), 活性化合物 2 的结构为 *n*-benzylmyristamide(2)。本研究结果表明圃美多公司来源的咖超临界提取粉末具有显著的抗衰老活性, 该活性化合物在更高级别生物模型中的作用效果及作用机制有待进一步的研究。

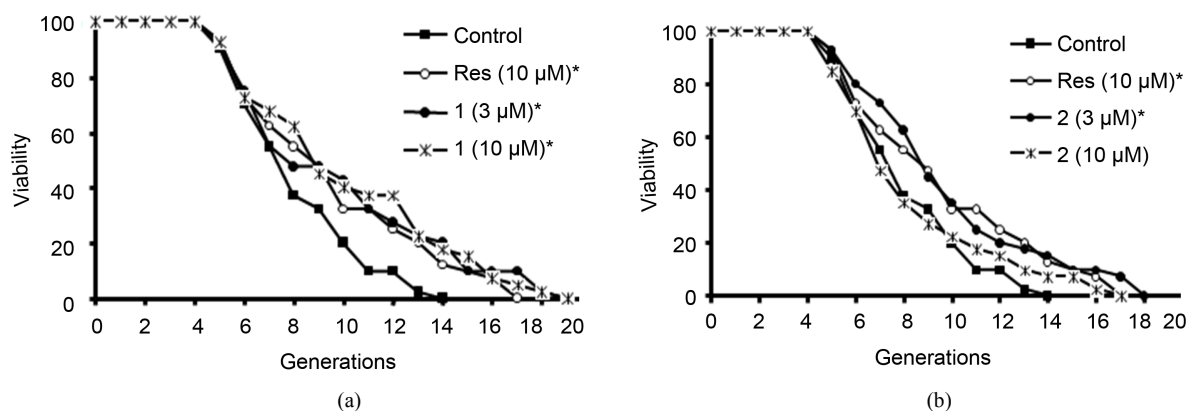


Figure 2. Biological activity results of *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide(1) and *n*-benzylmyristamide(2) \blacksquare : Treated with negative control (anhydrous ethanol); \circ : Treated with the positive control (resveratrol, 10 μM); \bullet : Treated with 1/2 at a concentration of 3 μM ; \times : Treated with 1/2 at a concentration of 10 μM .

图 2. *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1)及 *n*-benzylmyristamide (2)的活性测定结果 \blacksquare : 阴性对照组(无水乙醇); \circ : 阳性对照组(白藜芦醇, 10 μM); \bullet : 化合物 1 或者化合物 2(3 μM); \times : 化合物 1 或者化合物 2(10 μM)

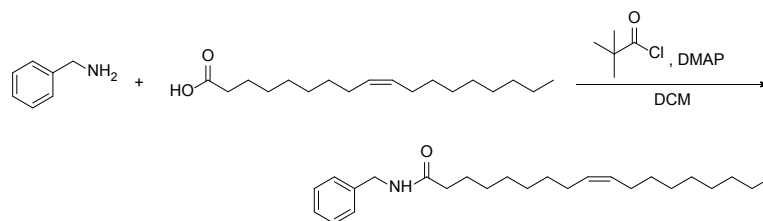


Figure 3. Synthesis of *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1)

图 3. *n*-benzyl-(9Z)-octadecenamide (1)的合成

致 谢

主要由韩国圃美多公司资助，部分获得国家自然科学基金(No. 21661140001)支持。

参考文献 (References)

- [1] Sander, M., Oxlund, B., Jespersen, A., Krasnik, A., Mortensen, E.L., Westendorp, R.G.J. and Rasmussen, L.J. (2015) The Challenges of Human Population Ageing. *Age and Ageing*, **44**, 185-187. <https://doi.org/10.1093/ageing/afu189>
- [2] World Health Organization (2015) China Country Assessment Report on Ageing and Health. World Health Organization.
- [3] Costa, J.P., Vitorino, R., Silva, G.M., Vogel, C., Duarte, A.C. and Rocha-Santos, T. (2016) A Synopsis on Aging-Theories, Mechanisms and Future Prospects. *Ageing Research Reviews*, **29**, 90-112.
- [4] Haigis, M.C. and Guarente, L.P. (2006) Mammalian Sirtuins-Emerging Roles in Physiology, Aging, and Calorie Restriction. *Genes and Development*, **20**, 2913-2921. <https://doi.org/10.1101/gad.1467506>
- [5] Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H. and Nasmyth, K. (1996) Asymmetric Accumulation of Ash1p in Postanaphase Nuclei Depends on a Myosin and Restricts Yeast Mating-Type Switching to Mother Cells. *Cell*, **84**, 699-709.
- [6] Jarolim, S., Millen, J., Heeren, G., Laun, P., Goldfarb, D.S. and Breitenbach, M. (2004) A Novel Assay for Replicative Lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **5**, 169-177.
- [7] Lin, Y.F., Sun, Y.J., Weng, Y.F., Matsuura, A., Xiang, L. and Qi, J.H. (2016) Parishin from *Gastrodia elata* Extends the Lifespan of Yeast via Regulation of Sir2/Uth1/TOR Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, Article ID: 4074690. <https://doi.org/10.1155/2016/4074690>
- [8] Sun, Y.J., Lin, Y.F., Cao, X.L., Xiang, L. and Qi, J.H. (2014) Sterols from *Mytilidae* Show Anti-Aging and Neuroprotective Effects via Anti-Oxidative Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 21660-21673. <https://doi.org/10.3390/ijms151221660>
- [9] Sun, K.Y., Cao, X.L., Pei, L., Matsuura, A., Xiang, L. and Qi, J.H. (2013) A Steroidal Saponin from *Ophiopogon japonicus* Extends the Lifespan of Yeast via the Pathway Involved in SOD and UTH1. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 4461-4475. <https://doi.org/10.3390/ijms14034461>
- [10] Weng, Y.F., Lu J., Xiang, L., Matsuura, A., Zhang, Y., Huang, Q.M. and Qi, J.H. (2011) Ganodermasides C and D, Two New Anti-Aging Ergosterols from Spores of the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **75**, 800-803. <https://doi.org/10.1271/bbb.100918>
- [11] Weng, Y.F., Xiang, L., Matsuura, A., Zhang, Y., Huang, Q.M. and Qi, J.H. (2010) Ganodermasides A and B, Two novel Anti-Aging Ergosterols from Spores of a Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* on Yeast via UTH1 Gene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, 999-1002.
- [12] Choi, E.H., Kang, J.I., Cho, J.Y., Lee, S.H., Kim, T.S., Yeo, I.H. and Chun, H.S. (2012) Supplementation of Standardized Lipid-Soluble Extract from Maca (*Lepidium meyenii*) Increases Swimming Endurance Capacity in Rats. *Journal of Functional Foods*, **4**, 568-573.
- [13] Lee, K.J., Dabrowski, K., Rinchar, J., Gomez, C., Guz, L. and Vilchez, C. (2004) Supplementation of Maca (*Lepidium meyenii*) Tuber Meal in Diets Improves Growth Rate and Survival of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Alevins and Juveniles. *Aquaculture Research*, **35**, 215-223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01022.x>
- [14] Mccollom, M.M., Villinski, J.R., Mcphail, K.L., Craker, L.E. and Gafner, S. (2005) Analysis of Macamides in Samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, **16**, 463-469. <https://doi.org/10.1002/pca.871>
- [15] Wu, H., Kelley, C.J., Pino-figueroa, A., Vu, H.D. and Maher, T.J. (2013) Macamides and Their Synthetic Analogs: Evaluation of *in Vitro* FAAH Inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 5188-5197.