

山莓叶中有效成分的分离鉴定及其生物活性研究

陈雪香¹, 欧阳文², 李俊¹, 王群¹, 杨媛¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

摘要: 本文以山莓叶乙醇提取物为研究对象, 通过溶剂萃取、硅胶柱层析、结晶等方法进行分离纯化。采用核磁共振 (NMR)、质谱 (MS)、红外光谱法 (IR) 及与文献对比的方法对其分离的单体进行结构鉴定。利用刃天青 96 孔板微量稀释法、MTT 法研究单体化合物的抑菌及抗肿瘤活性。研究结果表明: 从山莓叶中分离纯化物质经结构鉴定分别为: 三萜化合物类 2 α 、3 β 、23 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸 (1) 和黄酮类化合物山奈酚-3-O- β -D-(6"-对羟基桂皮酰基)-葡萄糖苷 (2); 抑菌实验表明化合物 1 对供试的大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌最低抑菌浓度分别为: 15.6 μ g/mL、15.6 μ g/mL、31.25 μ g/mL、15.6 μ g/mL, 化合物 2 的最低抑菌浓度分别为: 31.25 μ g/mL、62.5 μ g/mL、62.5 μ g/mL、62.5 μ g/mL。化合物 1 对 HepG2、MCF-7、OVCAR3 的半数抑制率 (IC₅₀) 分别为: 34.2 μ M、60.43 μ M、62.3 μ M。化合物 1 具有很好的抑菌和较好的抗肿瘤活性。而化合物 2 对 HepG2、MCF-7、OVCAR3 细胞的抑制作用不明显。

关键词: 山莓; 分离; 结构鉴定; 抑菌; 细胞毒性

文章编号: 1673-9078(2015)12-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.009

Isolation and Identification of Active Ingredients in *Rubus corchorifolia* L.f. Leaves and Their Bioactivities

CHEN Xue-xiang¹, OU Yang-wen², LI Jun¹, WANG Qun¹, YANG Yuan¹, CAO Yong¹

(1.College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

(2.School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: The ethanol extract of *Rubus corchorifolia* leaves was used in this study, and its active compounds were isolated and purified using solvent extraction, silica gel column chromatography, and crystallization methods. The structures of the isolated monomeric compounds were identified using nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS), infrared (IR) spectroscopy, and comparisons with literature data. The antibacterial and antitumor activities of the monomeric compounds were studied by resazurin microdilution (96-well plate) assay and MTT assay. The two compounds isolated and purified from *Rubus corchorifolia* leaves were identified as 2 α ,3 β ,23 α -trihydroxy-12-en-28-ursolic acid (1) and flavonoid compound kaempferol-3-O- β -D-(6"-p-hydroxycoumaroyl)-glucoside (2). The minimum inhibitory concentrations (MICs) of compound 1/compound 2 on *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* were 15.6 μ g/mL/31.25 μ g/mL, 15.6 μ g/mL/62.5 μ g/mL, 31.25 μ g/mL/62.5 μ g/mL, and 15.6 μ g/mL/62.5 μ g/mL, respectively. The half inhibitory concentration (IC₅₀) of compound 1 on HepG2, MCF-7, and OVCAR3 cells was 34.2 μ M, 60.43 μ M, and 62.3 μ M, respectively. Compound 1 showed good antibacterial and antitumor activities, while the inhibitory effects of compound 2 on HepG2, MCF-7, and OVCAR3 cell lines were not significant.

Key words: *Rubus corchorifolia* L.f.; isolation; structure identification; bacteriostasis; cytotoxicity

山莓 (*Rubus corchorifolius* L.f) 属蔷薇科 (Rosaceae) 科悬钩子属植物 (*Rubus*.L) 中的一种落叶灌木^[1]。又名悬钩子、三月泡, 除冬北、甘肃青海、新疆外, 广布于
收稿日期: 2015-03-12

基金项目: 广东省科技计划农业公关项目 (2012A020602038); 广州市科技计划重点项目 (11C32100704); 广东省中医药局科研课题 (2010276)

作者简介: 陈雪香 (1981-), 女, 在读博士研究生, 研究方向为食品化学与营养

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品化学与营养

全国各地, 长江流域的野生资源最为丰富, 野生资源蕴藏量相当大^[2]。我国利用山莓的历史悠久^[3], 在古书《本草纲目》、《本草拾遗》、《食疗本草》、《名医别录》中就有山莓药用价值的详细记载, 其药用已有上千年历史。山莓的果、根及叶均可入药, 果以未成熟果入药, 民间常作为覆盆子代用品。山莓具有抗氧化能力、降血脂、抗菌、镇痛、抗炎、祛痰、平喘、抗病毒、抗腹泻、抗炎, 防治癌症等多种功效^[4-6]。根据现有的文献报道, 山莓叶中含有香豆素、茶多酚、鞣质、生

物碱、黄酮、二萜等化合物^[7-9]，从山莓叶中乙醇提取物中已分离到8个新的二萜化合物和化合物。目前对山莓的研究，虽然有报道其具抗氧化能力、降血脂、有抗菌、镇痛、抗炎、祛痰、平喘、抗病毒、抗炎、防治癌症等多种的功能、但大多集中在粗提物的效果的评价，并未对其起主要作用的单体化合物进行分离纯化及结构鉴定和系统的活性研究。我们通过前期研究发现，山莓的乙醇提取物具有抗菌和抗肿瘤活性，因此为了更深入地了解其抗菌和抗肿瘤的物质基础，本文对山莓的乙醇提取物进行分离纯化和行结构鉴定，并采用当前国际通用的抑菌方法—刃天青96孔板微量稀释和细胞毒性方法—MTT法对其抑菌和抗肿瘤活性进行研。为旨在为更好的开发山莓利用的食药价值提供有力的参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 山莓叶

2013年7月采于吉首大学张家界校区后山，经廖博儒教授鉴定为蔷薇科悬钩子属植物山莓(*Rubus corchorifolius* L.f)。将采集的山莓叶阴干，粉碎过60目筛，备用。

1.1.2 供试菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)，金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)，痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)，沙门氏菌(*Salmonella*)均购于广东省微生物研究。

1.1.3 供试细胞

肝癌细胞(HepG2)，人乳腺癌细胞(MCF-7)，人卵巢癌细胞(OVCAR3)均购于中山大学实验动物中心细胞库。

1.1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基：

牛肉膏0.3 g；蛋白胨1.0 g；氯化钠0.5 g；琼脂2.0 g；蒸馏水100 mL；pH 7.0~7.2；灭菌121 °C；22 min。

1.1.5 试剂

MTT (MP Biomedicals LLC)，台盼蓝 (SIGMA 公司)，胰酶 (吉诺生物医药技术有限公司)，青-链霉素 (GIBCO 公司)，DEME 培养基 (GIBCO 公司)，胎牛清血 (THERMO 公司)。硅胶 G、柱层析硅胶 (200-300 目)、薄层硅胶均为青岛海洋化工厂生产95%乙醇，氯仿，乙酸乙酯，氯化钠，无水乙醚，无水硫酸钠，石油醚，碳酸钠，亚硝酸钠，氢氧化钠，

甲醇，正丁醇，二甲基亚砷等，正丁醇，香兰素，硫酸，所用试剂均为分析纯。

1.1.6 主要仪器设备

TC-2323 二氧化碳培养箱，美国 SHELDON 公司；Ac2-4s1 生物安全柜，新加坡艺思高科技有限公司；多功能酶标仪，珀金埃尔默股份有限公司；400 MHz 核磁，BRUKZR 公司；INOVA-600 核磁共振仪器，美国 Varian；LCQ DECA XP 液相色谱质谱联用仪态，美国 Thermo Finnigae 公司)；移液器，美国伯乐公司；LEO 场发射扫描电子显微镜，德国里奥公司，96 孔培养板，美国 Corning 公司；IL-62 培养箱，日本雅马哈公司；CCV-1311 超净工作台，日本日立公司；MD-41 磁力搅拌器，日本雅马哈公司；旋转蒸发器，上海申生科技有限公司；DHG-9070 烘箱，上海东欣科学仪器有限公司；电热高压蒸汽灭菌锅，江阴滨江医疗设备厂；FD-1PF 冷冻干燥机，北京德天佑科技发展有限公司；KQ-500B 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；AL104 电子天平，上海梅特勒托利多仪器有限公司；W2-100 恒温水浴锅，上海申生科技有限公司；TDL-5 离心机，上海安亭科技仪器厂；LC-62 培养箱，日本雅马哈公司；血球计数板，上海医乐医用光学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 山莓叶乙醇粗提物的制备

称取粉碎的山莓叶3500 g，加入10倍体积80%的乙醇，搅匀，先超声提取30 min，然后于室温下浸提48 h，过滤，滤渣再重复提取一次，合并滤液，浓缩冻干备用。

1.2.2 液液萃取分离纯化

将浸膏液用依次用石油醚，氯仿、乙酸乙酯、正丁醇反复多次萃取，将萃取液分别浓缩，冷冻干燥。分别得石油醚，氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取物，乙酸乙酯萃取物进行脱羧质处理。

1.2.3 乙酸乙酯萃取物脱羧质试验

将乙酸乙酯萃取物和正丁醇用水溶解，样品水溶液加4%明胶水溶液，至沉淀完全，过滤，滤液减压浓缩至小体积，加3~5倍酒精，使过量明胶沉淀，然后滤去沉淀。浓缩后冷冻干燥。

1.2.4 乙酸乙酯萃取物分离纯化

将脱羧质后的组份行进行硅胶柱层析。上样量为15 g，用氯仿与甲醇进行梯度(80:1、60:1、40:1、20:1、10:1)洗脱，每个梯度的洗脱体积是1300 mL，每50 mL馏份收集为一个样，其收集150个馏分。每瓶取1 mL每10瓶取得的样进行合并，分别表示为：Fr.1.1, Fr.1.2，

Fr.1.3, Fr.1.4, Fr.1.5, Fr.1.6, Fr.1.7, Fr.1.8, Fr.1.9, Fr.1.10, Fr.1.11, Fr.1.12, Fr.1.13, Fr.1.14, Fr.1.15, 浓缩冷冻干燥, 用于抑菌实验, 每个馏分剩余样进行 TLC 展开, 用 1% 的硫酸香草醛进行显色, 合并相同组份。经 TLC 检测合并相同组份, 其中组份 Fr.1.6-7 经甲醇重结晶得化合物 1 (20 mg), Fr.1.12 经甲醇重结晶后得化合物 2 (40 mg)。

1.2.5 化合物结构鉴定

采用薄层硅胶 G 板, 展开剂为环己烷: 丙酮=1: 1 进行薄层分析。用 LCQ DECA XP 液相色谱质谱联用仪, 大气压力化学电离源对其分子量进行分析。用 Vector 33 傅里叶变换红外谱仪扫描分析, 扫描范围 $4000\text{ cm}^{-1}\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。化合物 ^1H 和 ^{13}C 核磁谱采用核磁共振波谱仪测定, 样品用 $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ 溶解, 并与文献对比分析。

1.2.6 抑菌活性测定试验

本实验运用 96 孔板微量稀释法进行化合物的抑菌活性的测定, 该抑菌试验使用 96 孔板 (8 行 \times 12 列), 可以在短时间内确定样品最低抑菌浓度 (MIC)^[10]。在检测前, 分别将供试化合物和硫酸卡那霉素 (阳性对照) 溶于甲醇中, 制成 1.0 mg/mL 的浓度, 并将刃天青溶于蒸馏水中, 配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液。实验时分别将刃天青指示剂 (100 $\mu\text{g/mL}$) 到加 100 μL 到 96 孔板的第 11 列的每孔中。然后将 7.5 mL 的指示剂溶液和 5 mL 测试菌溶液 (10^8 cfu/mL) 混匀, 转移混合液到 96 孔板上其余 11 列的孔中 (1~10 列和 12 列), 每孔转移 100 μL 。转移待测化合物溶液 100 μL 到其中一行的第一个的孔中, 混匀后从此孔转移 100 μL 到同一行的第二个孔中, 再混匀后又从第二个孔转移 100 μL 到第三个孔中……以此类推, 使每个孔中的待测化合物的浓度依次稀释成前一个孔的二分之一, 直到第十个孔为止, 第十个孔的液体混匀后抽取 100 μL 扔掉。阳性对照为硫酸卡那霉素 (1.0 mg/mL), 阴性对照为纯甲醇。最后将培养板放在 37 $^\circ\text{C}$ 下培养 5~6 h, 有活性的标志为从蓝色到粉红色; 发生颜色变化的最低稀释浓度即为待测化合物的最低抑菌浓度 (MIC), 三次独立实验的 MIC 值作为最终的 MIC 值^[11]。

1.2.7 扫描电镜观察化合物 1 作用大肠杆菌形态的影响

将培养至对数生长期的供试菌加入至浓度为含化合物 1 的浓度为: 512 $\mu\text{g/mL}$, 使每毫升药基含菌体 10^7 cfu/mL , 于摇床中培养 (37 $^\circ\text{C}$, 130 r/min), 从加药培养开始计时, 于 4.5 h 取样, 4000 r/min 离心 4 min 收集菌体。菌体沉淀后用生理盐水冲洗, 再离心, 重复 4 次。洗涤后的菌体沉淀, 按照扫描电镜

生物样品制备方法, 涂到金属箔片上, 真空干燥固定、喷金, 于扫描电镜上观察菌体形态和结构变化。正常未加药的供试菌同上制备, 于扫描电镜上观察, 作为对照。

1.2.8 MTT 法检测化合物的细胞毒性

参考方法^[12]稍作改动, 收集对数期的细胞, 调整细胞悬液浓度, 肝癌细胞 (HepG2, 2000 个/孔), 卵巢癌 (OVCAR3, 1200 个/孔), 乳腺癌细胞 (MCF-7, 2000 个/孔), 每孔加入 200 μL 铺板, 边缘孔用无菌 PBS 填充, 然后在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育培养箱中培养 24 小时, 弃掉上清液, 加入含 100 μM 、75 μM 、50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 样品浓度的完全培养基, 5 个浓度梯度, 每孔加样品溶液 200 μL , 设 5 个复孔。作用 72 h 后, 弃掉上清, 加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。然后在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光值。注意同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜), 实验共重复三次。

1.2.9 数据分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行数据处理, 算出受试化合物的抑制率和 IC_{50} 。

2 结果与讨论

2.1 化合物 1 的结构鉴定

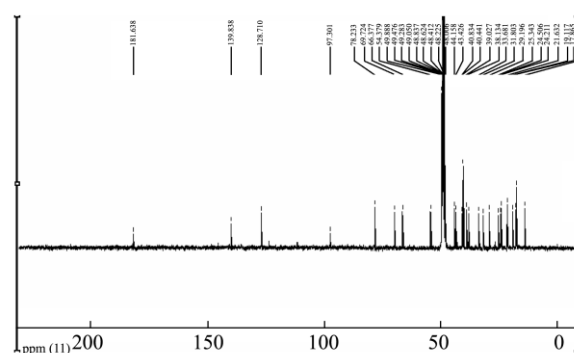


Fig. 1 化合物 1 的 ^{13}C -NMR

Fig.1 ^{13}C -NMR spectrum of compound 1

白色晶体, M.p. 230~132 $^\circ\text{C}$, 旋光度: 149.18 $^\circ$ 全波段扫描 $\lambda_{\text{max}}=211\text{ nm}$ (甲醇), 环己烷: 丙酮=1: 1, $R_f=0.375$, 1% 香草醛硫酸溶液显为单一紫色斑点。分子式为: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ 。化合物 ^1H -NMR 信号为 (CD_3OD , 600 MHz): δ 5.26 (1 H, t, $J=3.6\text{ Hz}$, H-12), 3.68 (1 H, m, H-2), 3.48, 3.25 (each 1 H, d, $J=10.8\text{ Hz}$, H-23), 3.35 (1

H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 1.13, 1.03, 0.96, 0.69 (each 3 H, s), 0.88 (3 H, s), 0.84 (3 H, d, J = 6.6 Hz)。化合物 ¹³C-NMR 信号为 (CD₃OD, 150 MHz): Δ181.6 (C-28), 139.9 (C-13), 126.7 (C-12), 78.2 (C-3), 69.7 (C-2), 66.3 (C-23), 54.4 (C-18), 49.0 (C-17), 48.9 (C-5), 48.2 (C-9), 48.7 (C-17), 44.1 (C-2), 43.4 (C-4), 40.84 (C-14), 40.45 (C-8), 39.0 (C-19), 38.1 (C-10), 33.9 (C-22), 31.8 (C-7), 29.2 (C-21), 28.8 (C-15), 24.5 (C-16), 24.1 (C-11), 24.1 (C-27), 21.9 (C-30), 19.1 (C-6), 17.9 (C-26), 17.7 (C-25), 17.7 (C-29), 13.9 (C-24)。其碳谱和氢谱的数据与文献^[13]中的 2α、3β、23α-三羟基-12-烯-28-乌苏酸数据相一致。因此化合物 1 被命名为 2α、3β、23α-三羟基-12-烯-28-乌苏酸。

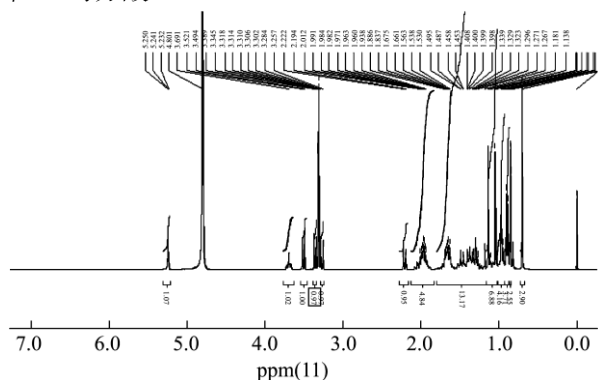


图 2 化合物 1 的 ¹H-NMR
Fig.2 ¹H-NMR spectrum of compound 1

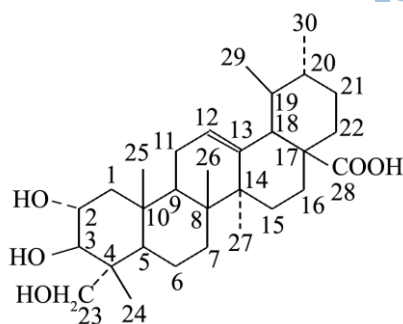


图 3 化合物 1 的结构
Fig.3 Chemical structure of compound 1

2.2 化合物 2 的结构鉴定

黄色粉末状，盐酸镁粉试验显紫红色，证明该化合物为一黄酮类衍生物。M.p. 206~208 °C，旋光度：58.82.0°。全波段扫描 λ_{max} = 315 nm(甲醇)，环己烷：丙酮=1: 1, R_f=0.23, 1% 香草醛硫酸溶液显为单一黄色斑点。化合物 ¹H-NMR 信号为 (CD₃OD, 400 MHz): 7.99 (t, 1h); 7.97 (t, 1h); 7.398 (d, 1h, J=20 Hz); 7.31 (brs, 1h); 7.29 (brs, 1h); 6.7-6.9 (m, 4h, overlapped); 6.30 (d, 1h, J=2.5HZ); 6.13 (d, 1h, J=2.5HZ); 6.06 (d, 1h, J=20 Hz); 5.24 (d, 1h, J=9.5 Hz);

4.32, 4.29 (dd, 1h, J=15 HZ, 3HZ); 4.20, 4.17 (dd, 1h, J=8.5 HZ, 15HZ); 3.51-3.42 (m, 3h, overlapped); 3.33 (m, 1h)。化合物 ¹³C-NMR 信号为 (CD₃OD, 400 MHz): 179.4 (s), 168.8 (s), 165.9 (s), 162.9 (s), 161.5 (s), 161.1 (s), 159.4 (s), 158.4 (s), 146.5 (d), 136.2 (s), 132.2 (d), 131.2 (d), 127.1 (s), 122.7 (s), 116.8 (d), 116.0 (d), 114.7 (d), 105.6 (s), 104.0 (d), 100.0 (d), 94.8 (d), 78.0 (d), 75.8 (d), 75.7 (d), 71.7 (d), 64.3 (t)。IR 数据 (溴化钾压片, cm⁻¹): 3461, 3160, 2924, 2855, 1685, 1657, 1607, 1546, 1503, 1461, 1419, 1358, 1296, 1255, 1180, 1090, 1066, 1031, 824。

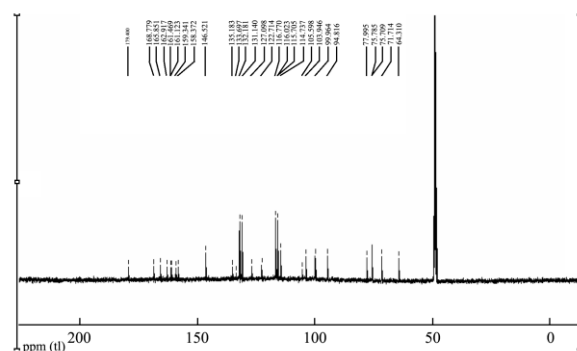


图 4 化合物 2 的 ¹³C-NMR
Fig.4 ¹³C-NMR spectrum of compound 2

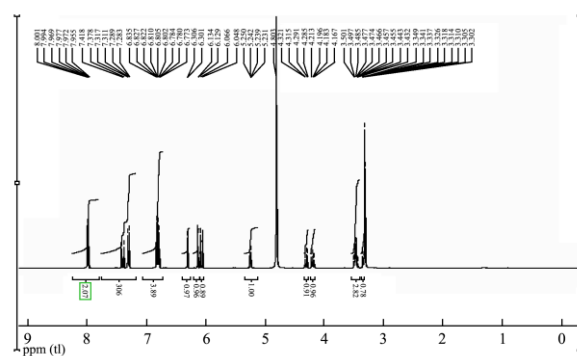


图 5 化合物 2 的 ¹H-NMR
Fig.5 ¹H-NMR spectrum of compound 2

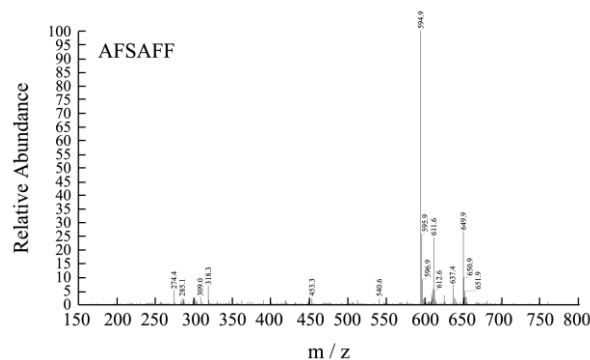


图 6 化合物 2 APCI-MS 图
Fig.6 APCI-MS spectrum of compound 2

APCI-MS: 中有 594 (M+, 基峰), 分子式为 C₃₀H₂₆O₁₃, 分子量为 594, 与 APCI 中一致。从碳谱中, 可见到一 β-D-葡萄糖结构片段, 与 β-D-葡萄糖甲苷数据比较, 知 104.0 (d), 78.0 (d), 75.8 (d), 75.7 (d), 71.7 (d), 64.3 (t) 为六个糖环上碳信号, 从化学位移上分析, 明显为一黄酮类化合物。从 132.2 (d), 116.0 (d) 该两个碳信号强度明显高, 且碳谱信号中还出现了 100.0 (d), 94.8 (d) 这两个高场信号, 说明该化合物具有 5, 7, 4' 羟基取代特征 (溶剂为氘代甲醇, 未见所有羟基活泼质子)。氢 6.30 (d, 1h, J=2.5Hz) 连在碳 94.8 (d) 和氢 6.13 (d, 1h, J=2.5Hz) 连在碳 100.0 (d), 该两氢为一间位耦合, 进一步证实上述推段。HMBC 中, 可见糖环端基质子与碳 135.2 (s) 相关, 说明黄酮苷元在 3 位成苷, 因此化合物 2 的分子式为 C₃₀H₂₆O₁₃, 分子量为 594, 与 APCI 中一致。化合物 2 命名为: 山奈酚-3-O-β-D-(6''-对羟基桂皮酰基)-葡萄糖苷 (kampfreol-3-O-β-D-6''-P-hydroxycoumaroyl-glucoside)。

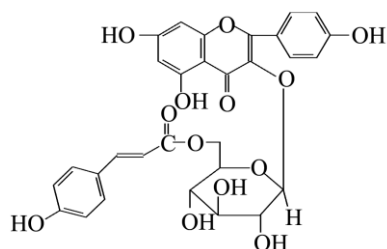


图 7 化合物 2 的结构图

Fig.7 Chemical structure of compound 2

2.3 抑菌活性研究

2.3.1 两个化合物的最低抑菌浓度的研究

本文采用微量稀释法对两个化合物抑制 1 个革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 和 3 个革兰氏阴性菌菌株 (大肠杆菌, 沙门氏菌和痢疾杆菌) 抑菌活性进行了检测, 结果表明: 化合物 1 对大肠杆菌, 沙门氏菌, 志贺氏痢疾杆菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为: 15.6 μg/mL, 而对金黄色葡萄球菌的 MIC 是 31.25 μg/mL; 化合物 2 对大肠杆菌的最低抑菌浓度 (MIC) 是 31.25 μg/mL, 而对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏痢疾杆菌的最低抑菌浓度 (MIC) 均为 62.5 μg/mL。最低抑菌可以评价抑菌活性的强弱, 最低抑菌浓度越低, 说明其抑菌能力越强。由表 1 可知, 化合物对供试的 4 种菌的最低抑菌浓度是 15.60-31.25 μg/mL, 化合物的对四种供试菌的最低抑菌浓度是: 31.25-62.5 μg/mL, 阳性对照硫酸卡那霉素最低抑菌浓度是: 1.95-3.90 μg/mL, 由以上结果可知, 化合物 1 的抑菌效果优于化合物 2。化合物 1 的抑菌效果虽然比硫酸卡那霉素稍弱些, 但因化合物 1

来自于植物, 属于天然来源的抗菌活性物质, 天然的抗菌物质对人体、动物和食品的危害小, 可以较高剂量的使用, 所以化合物 1 是一种潜在的天然抑菌活性物, 具有重要的研究价值。本文首次报道了化合物 1 的抑菌活性, 对山莓综合开发利用, 提高其利用价值具有重要的意义。

表 1 两个化合物的最低抑菌浓度 (μg/mL)

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of compounds 1 and 2 (μg/mL)

样品名	(μg/mL)			
	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌	志贺氏痢疾杆菌
化合物 1	15.6	15.6	31.25	15.6
化合物 2	31.25	62.5	62.5	62.5
硫酸卡那霉素	3.9	1.95	3.9	3.9

2.3.2 化合物 1 对大肠杆菌形态结构的影响

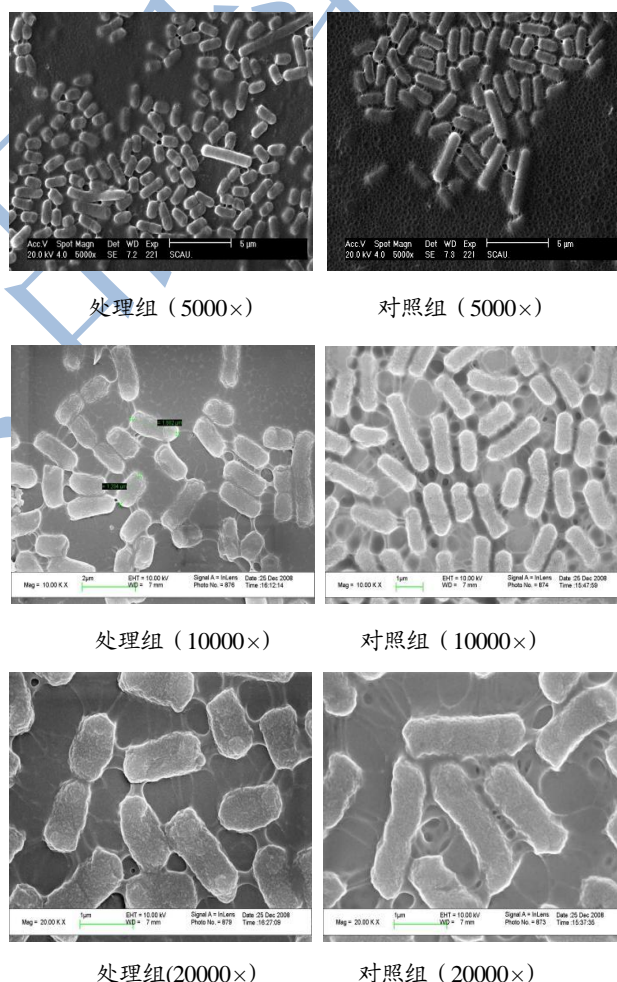


图 8 扫描电镜下正常大肠杆菌与提取物作用大肠杆菌的形态结构

Fig.8 Morphology of normal *E. coli* and extract-treated *E. coli* under scanning electron microscope

为了进一步了解化合物 1 的抑菌机理, 我们选用化合物 1 为研究材料, 大肠杆菌为研究对象, 将化合物 1

作用4.5 h的大肠杆菌和未经化合物1作用大肠杆菌制片后,在扫描电镜下观察菌体的形态结构的变化。

由图8可知:正常的大肠杆菌培养4.5 h后,其细胞表面光滑,菌体饱满,呈两端钝圆的杆状,菌体长大约为2.64 μm 。经化合物1作用4.5 h后的大肠杆菌菌体明显变短,菌体表面变粗糙,皱缩,其生长和分裂受到抑制,其菌体表形态发生了变。由此我们可以初步推测化合物1的抑菌作用可能通过抑制大肠杆菌的生长速度,破坏菌体结构达到抑菌效果。在今后的研究中我们可以研究化合物1作用菌体后的基因,蛋白质的变化来进行更深入的抑菌机理研究。

2.4 细胞毒性研究

表2 两个化合物的细胞毒性(IC_{50} μM)

Table 2 Cytotoxicity of compounds 1 and 2 (IC_{50} μM)

化合物	细胞		
	HepG2	MCF-7	OVCAR3
化合物1	34.2 \pm 1.05	60.43 \pm 1.2	62.23 \pm 2.30
化合物2	>100	>100	>100
阿霉素	0.37 \pm 0.04	3.5 \pm 0.02	0.55 \pm 0.87

采用MTT法研究了两个化合物对HepG2、MCF-7、OVCAR3三种供试癌细胞的毒性。由表2可知:化合物1对HepG2、MCF-7、OVCAR3均有抑制作用,且化合物1对HepG2、MCF-7、OVCAR3细胞表现出明显的剂量依赖性的细胞毒效果,对这3种癌细胞的半数抑率(IC_{50})为分别为34.2 μM 、60.43 μM 、62.3 μM ,其中对HepG2细胞毒性最强,其半数抑率(IC_{50})34.2 μM ,对MCF-7、OVCAR3两种癌细胞的毒性较弱,其半数抑率(IC_{50})分别为60.43 μM 、62.23 μM 。有关化合物1的对癌细胞的抑制作用研究,林娜^[4]采用MTT法的研究化合物1对HepG2的 IC_{50} 为27 μM ,而本文研究化合物1对HepG2的 IC_{50} 为34.2 μM ,比林娜报道的结果偏高一点。化合物2对HepG2、MCF-7、OVCAR3三种癌细胞的半数抑率(IC_{50})均大于100 μM ,说明其对这三种癌细胞没有细胞毒性,不具有抑制细胞增殖的作用。基于本研究的结果,在今后研究中,我们可以深入地开展化合物1对HepG2细胞的抗肿瘤分子机制研究。

3 结论

本文对山莓叶中乙醇提取物有效成分进行了分离鉴定、抑菌及细胞毒性研究:通过研究发现,乙醇提取物分离纯化获得的两个化合物经结构鉴定分别是三萜化合物和黄酮化合物,即2 α 、3 β 、23 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸(1)和山奈酚-3-O- β -D-(6''-对羟基桂皮酰基)-葡萄糖苷(2);

抑菌活性表明化合物三萜类化合物2 α 、3 β 、23 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸的对4种供试菌具有很好的抑制效果,其抑菌效果优于黄酮类化合物山奈酚-3-O- β -D-(6''-对羟基桂皮酰基)-葡萄糖苷。细胞毒性研究表明,三萜化合物2 α 、3 β 、23 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸对HepG2、MCF-7、OVCAR3三种癌细胞的均有抑制作用,且对HepG2细胞的抑制作用最好,而黄酮类化合物山奈酚-3-O- β -D-(6''-对羟基桂皮酰基)-葡萄糖苷对这3种供试的癌细胞没有明显的抑制作用。本文首次报道了化合物1的抑菌活性,这对丰富山莓叶的化学成分及生物活物具有重要的意义,为化合物1的抑菌机理及抗HepG2细胞机理方面提供重要的理论根据。为开发高效、低毒的新型抗菌剂和肿瘤保健品奠定基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第37卷)[M].北京科学出版社,1985
Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. Flora of China Volume 37 [M]. Science Press. Beijing, 1985
- [2] 陈炳华,余望.山莓资源及其开发利用[J].资源开发与市场,2000,16(5):286-287
CHEN Bing-hua, YU Wang. Resources and their exploitation of *rubus corchorifolius* L. f. [J]. Resource Development & Market, 2000, 16(5): 286-287
- [3] 王大来.湖南省悬钩子属药用植物资源及开发利用[J].湖南中药杂志,1997,13(2):87-89
WANG Da-lai. Medicinal Plant Resources, Development and utilization of *rubus corchorifolius* L.f [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 1997, 13(2): 87-89
- [4] 汪新,刘四运,吴新民.池州悬钩子的食用价值与茶多酚含量研究[J].资源开发与市场,2005,21(4):275-280
WANG Xin, LIU Si-yun, WU Xin-min. Rubus edible value in chizhou and its content of tea polyphenols [J]. Resource Development & Market, 2005, 21(4): 275-280
- [5] 陈炳华,余望,刘剑秋.山莓茎叶香豆素成分的初步研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),2001,17(3):81-83
CHEN Bing-hua, YU Wang, LIU Jian-qiu. A primary study on coumarin component in the stems and leaves of *rubus corchorifolius* L. F [J]. Journal of Fujian Teachers University (Natural Science), 2001, 17(3): 81-83
- [6] 章丽,刘晓娟,熊平,等.山莓叶醇提取物对不同模型小鼠腹泻的影响[J].现代食品科技,2012,28(9):1111-1115
ZHANG Li, LIU Xiao-juan, XIONG Ping, et al. Effects of

- ethanol extracts from *rubus corchorifolius* leaves on different models of mice diarrhea [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(9): 1111-1115
- [7] Xue-xiang Chen, Shuang -de Zhou, Yang- wen Ou, et al. Additional ent-kaurane diterpenoids from *rubuscorchorifolius* L. f. [J]. *Helvetica Chimica Acta*. 2010,93 (1): 84-89
- [8] Yang- wen Ou, Xue-xiang Chen, Mi Zhang, et, al. A new ent-kaurane diterpenoid from *Rubuscorchorifolius* L. f. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013,48 (6), 999-1001
- [9] 陈雪香,谭斌,周双德,等.山莓叶抑菌活性物质的提取、抑菌效果及其化学成分初步研究[J].*食品科技*,2008,9: 192- 195
CHEN Xue-xiang, TAN Bin, ZHOU Shuang-de, et al.Preliminary research on extraction, antibiotic effect and chemical constituents of *rubuscor chorifolius* leaves extract [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 9: 192-195
- [10] Sarker S D, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals [J]. *Methods*, 2007, 42 (4), 321-324
- [11] ahman M M, Gray A I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66 (13): 1601- 1606
- [12] Xiao H, Yang C S, Li S M, et al. Monodemethylated polymethoxy flavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 4 (3): 244-252
- [13] 李玖慧,陈光英,韩长日,等.青梅茎的化学成分[J].*中国药科大学学报*,2012,43(1) :25-27
LI Jiu-hui, CHEN Guang-ying, HAN Chang-ri, et al. Chemical constituents from the stems of *Vatica mangachpoi* blanco [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2012, 43 (1) :25 - 27
- [14] 林娜.积雪草酸及其稀土配事物抑制肿瘤细胞增殖的作用及其线粒体机制[D].*江苏大学*,2009
Lin Na. Inhibitory effect on proliferation of cancer cells and the mitochondrial mechanism of both asiatic and its complexes with rare earth [D]. *Jiangsu University*, 2009