

# 栓菌 *Trametes* sp. G048 的化学成分研究

桑志高<sup>1,2</sup>, 李冬利<sup>1</sup>, 陶美华<sup>1</sup>, 涂国全<sup>2</sup>, 章卫民<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东省华南应用微生物重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070; <sup>2</sup>江西农业大学 生物科学与工程学院, 南昌 330045

**摘要:**从栓菌属真菌 *Trametes* sp. G048 的发酵液和菌丝体中分离并鉴定出 6 个化合物, 经波谱数据分析分别鉴定为 isodrimenediol diacetate(**1**)、isodrimenediol 2-acetate(**2**)、脑苷脂 D(**3**)、麦角甾醇(**4**)、过氧化麦角甾醇(**5**)和啤酒甾醇(**6**)。其中化合物 **1** 和 **2** 为新的天然产物。

**关键词:** 栓菌属; 倍半萜; drimane

中图分类号: R284.1; Q946.91; O629

文献标识码: A

## Chemical Constituents of *Trametes* sp. G048

SANG Zhi-gao<sup>1,2</sup>, LI Dong-li<sup>1</sup>, TAO Mei-hua<sup>1</sup>, TU Guo-quan<sup>2</sup>, ZHANG Wei-min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Collection and Application, Guangdong Provincial Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry--Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou 510070, China;

<sup>2</sup>College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

**Abstract:** Six compounds were isolated from the extract of *Trametes* sp. G048 and identified as isodrimenediol diacetate (**1**), isodrimenediol 2-acetate (**2**), cerebroside D (**3**), ergosterol (**4**), ergosterol peroxide (**5**) and cerevisterol (**6**). Compounds **1** and **2** are firstly reported as natural products.

**Key words:** *Trametes* sp.; sesquiterpene; drimane

栓菌属 (*Trametes*) 属于担子菌纲多孔菌目多孔菌科 (Polyporaceae), 是一类广泛分布的真菌, 主要寄生在活立木、立桩上, 有时也生长于腐木上<sup>[1]</sup>。该属真菌在生物制药及食品工业等方面有较高的利用价值, 如云芝 (*Trametes versicolor*) 是著名的药用菌<sup>[2]</sup>。迄今对栓菌属真菌的研究主要集中在菌种分类、漆酶相关研究等方面<sup>[3-5]</sup>, 对栓菌属真菌的代谢产物相关报道很少。为了发掘多孔菌科真菌的药用资源, 作者对采自广东大东山自然保护区的栓菌 *Trametes* sp. G048 的化学成分进行了研究。从其发酵液和菌丝体的乙酸乙酯提取物中分离出 6 个化合物: isodrimenediol diacetate(**1**)、isodrimenediol 2-acetate(**2**)、脑苷脂 D(**3**)、麦角甾醇(**4**)、过氧化麦角甾醇(**5**)和啤酒甾醇(**6**), 其中 **1** 和 **2** 为新的天然产物。

## 1 仪器与试剂

AVANCE III 型 500 MHz 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司), Acquity UPLC-Q-ToF Micro 质谱仪 (Waters 公司), Trace DSQ 气相色谱-质谱联用仪 (Thermo Finnigan 公司), PZ1000B 旋转式大容量普通摇床 (武汉瑞华仪器设备有限公司), RE-2000 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), 超净工作台 (上海恒益科技有限公司)。

柱层析硅胶 (100 ~ 200 目, 200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂), 高效薄层硅胶板 Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck 公司), C<sub>18</sub> 反相硅胶 (40 ~ 75 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd.), 凝胶 Sephadex LH-20 (18 ~ 110 μm, Amersham Biosciences), 溶剂及试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

## 2 菌种与培养条件

菌株 G048 从采自广东省大东山自然保护区的栓菌 (*Trametes* sp.) 子实体中分离获得, 菌种保存于广东省微生物研究所。发酵培养基为: 马铃薯 200

收稿日期: 2011-04-18 接受日期: 2011-07-21

基金项目: 广东省科技计划重点项目“食用菌产业推进关键技术研究与示范”(2009B020201012); 广东省科学院青年科学研究基金 (qnj201009); 广东省科学院优秀青年科技人才基金项目

\* 通讯作者 Tel: 86-20-37656321; E-mail: wnzhang58@yahoo.com.cn

g/L, 葡萄糖 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg/L, pH 自然。用接种针挑取适量菌体, 接种到装有 100 mL 培养液的 250 mL 锥形瓶中, 在 28 °C、130 r/min 的条件下摇床培养 3 d, 获种子培养液。将该种子液按 5% 的接种量接种到装有 250 mL 培养液的 500 mL 锥形瓶中, 培养条件与种子液相同, 培养时间为 7 d, 共发酵 120 L。

### 3 提取与分离

120 L 发酵产物经过滤分离得发酵液和菌丝体, 发酵液用乙酸乙酯萃取 3 次, 40 °C 下减压浓缩得浸膏 5.9 g; 菌丝体置于 55 °C 烘箱烘干、粉碎, 以 98% 乙醇浸提多次, 浓缩至无醇味, 加适量水悬浮, 再用乙酸乙酯萃取 5 次, 40 °C 减压浓缩得浸膏 20.0 g。

浸膏分别用硅胶柱分离, 以石油醚/乙酸乙酯

(100:0 ~ 0:100) 梯度洗脱, 用薄层层析检测 (显色剂为茴香醛-浓硫酸试剂), 合并相似组分, 发酵液部分得到 7 个组分 (F1 ~ F7), 菌丝体部分得到 10 个组分 (M1 ~ M10)。F3 组分采用硅胶柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯(4:1)洗脱, 再经 Sephadex LH-20 以氯仿/甲醇(1:1)洗脱得到化合物 **1** (5.3 mg)。F4 组分采用硅胶柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯(2:1)洗脱, 再经 Sephadex LH-20 以氯仿/甲醇(1:1)洗脱得到化合物 **2** (17.7 mg)。M3 组分用 Sephadex LH-20 柱层析, 以氯仿/甲醇(1:1)洗脱, 再经硅胶柱层析以石油醚/乙酸乙酯(3:1)洗脱得到化合物 **4** (15.9 mg) 和化合物 **5** (9.4 mg)。M5 组分采用硅胶柱层析, 以氯仿/甲醇(5:1)洗脱得到化合物 **6** (4.7 mg)。M9 组分采用 Sephadex LH-20 柱层析, 以氯仿/甲醇(1:1)洗脱, 再经硅胶柱层析以氯仿/甲醇(4:1)洗脱得到化合物 **3** (13.5 mg)。

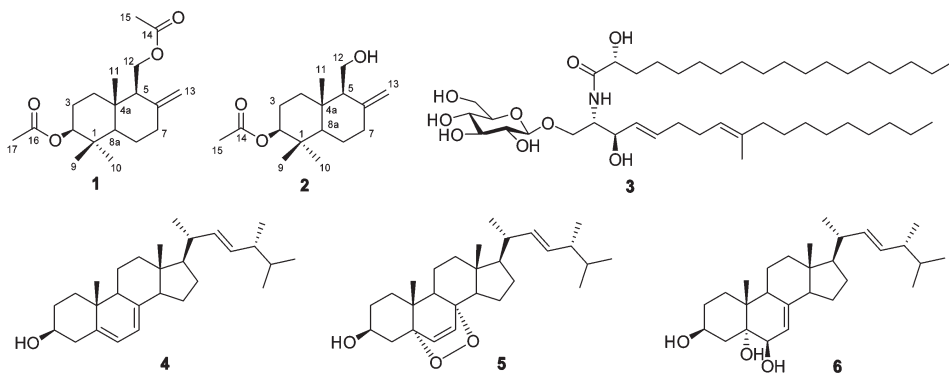


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1-6

### 4 结构鉴定

化合物 **1** 白色固体。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 4.88 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-13 $\beta$ ), 4.55 (1H, dd,  $J = 11.8, 4.1$  Hz, H-2), 4.54 (1H, brs, H-13 $\alpha$ ), 4.28 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.3$  Hz, H-12 $\beta$ ), 4.23 (1H, dd,  $J = 11.4, 8.4$  Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.43 (1H, ddd,  $J = 13.3, 4.2, 2.4$  Hz, H-7 $\beta$ ), 2.06 (3H, s, H-17), 2.03 (3H, s, H-15), 2.09 ~ 2.03 (2H, m), 1.79 ~ 1.73 (2H, m), 1.68 ~ 1.59 (2H, m), 1.50 ~ 1.38 (2H, m), 1.23 (1H, dd,  $J = 12.5, 2.7$  Hz, H-8a), 0.90 (3H, s, H-9), 0.87 (3H, s, H-10), 0.80 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 171.3 (s, C-14), 170.9 (s, C-16), 146.1 (s, C-6), 107.7 (t, C-13), 80.4 (d, C-2), 61.5 (t, C-12), 54.4 (d, C-8a), 54.3

(d, C-5), 38.5 (s, C-4a), 38.0 (s, C-1), 37.3 (t, C-7), 36.6 (t, C-4), 28.3 (q, C-9), 24.1 (t, C-3), 23.3 (t, C-8), 21.3 (q, C-17), 21.1 (q, C-15), 16.6 (q, C-10), 15.1 (q, C-11)。以上数据与文献一致<sup>[6]</sup>, 化合物 **1** 鉴定为 isodrimenediol diacetate, 该化合物只在化学合成 drimane 型倍半萜的过程中得到过, 为新的天然产物。它的前体物质 isodrimenediol 从多孔菌 *Polyporus arcularius* 中分离得到, 被认为是生物合成 drimane 型倍半萜的中间体, 具有一定的抗菌活性<sup>[7]</sup>。

化合物 **2** 白色固体。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 4.97 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, H-13 $\beta$ ), 4.68 (1H, d,  $J = 1.3$  Hz, H-13 $\alpha$ ), 4.54 (1H, dd,  $J = 11.8, 4.3$  Hz, H-2), 3.82 (1H, dd,  $J = 11.0, 3.9$  Hz, H-12 $\beta$ ), 3.78 (1H, dd,  $J = 11.0, 10.9$  Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.44 (1H,

ddd,  $J = 13.1, 4.3, 2.4$  Hz, H-7 $\beta$ ), 2.06 (3H, s, H-15), 2.02 ~ 1.20 (9H, m), 0.88 (3H, s, H-9), 0.85 (3H, s, H-10), 0.75 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 171.9 (s, C-14), 147.9 (s, C-6), 107.8 (t, C-13), 81.3 (d, C-2), 59.6 (d, C-5), 59.5 (t, C-12), 55.3 (d, C-8a), 39.4 (s, C-1), 38.9 (s, C-4a), 38.4 (t, C-7), 37.5 (t, C-4), 29.2 (q, C-9), 25.0 (t, C-3), 24.5 (t, C-8), 22.2 (q, C-15), 17.5 (q, C-10), 16.2 (q, C-11)。以上数据与文献一致<sup>[6]</sup>, 化合物 **2** 鉴定为 isodrimenediol 2-acetate, 该化合物也只在化学合成 drimane 型倍半萜的过程中得到过, 也是新的天然产物。

**化合物 3** 白色粉末。HR-ESI-MS 显示其分子式为 C<sub>43</sub>H<sub>81</sub>ON<sub>9</sub>, 不饱和度为 4。其  $^{13}\text{C}$  NMR 谱显示酰胺羰基  $\delta_{\text{C}}$  176.7,  $\beta$ -D-葡萄糖残基  $\delta_{\text{C}}$  104.2, 77.5, 77.4, 74.5, 71.0, 62.2, 四个烯键碳  $\delta_{\text{C}}$  136.3, 134.1, 130.6, 124.3, 两个末端甲基  $\delta_{\text{C}}$  14.0  $\times$  2, 一个与氮相连的次甲基  $\delta_{\text{C}}$  54.1, 一个连氧亚甲基  $\delta_{\text{C}}$  69.2 和两个连氧次甲基  $\delta_{\text{C}}$  72.6, 72.4。因此推测化合物可能为糖基化的鞘氨醇类化合物。为确定化合物中两个脂肪链的长度, 对其进行甲醇解, 生成的长链饱和和脂肪酸酯通过 GC-MS 确定为 2-羟基十八酸甲酯, 其在  $m/z$  314 处出现碎片峰, 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>, 由此确定该化合物的含羰基饱和脂肪侧链碳个数为 18。 $^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$ : 176.7 (s, C-1'), 136.3 (s, C-9), 134.1 (d, C-5), 130.6 (d, C-4), 124.3 (d, C-8), 104.2 (d, C-1''), 77.5 (d, C-3''), 77.4 (d, C-5''), 74.5 (d, C-2''), 72.6 (d, C-3), 72.4 (d, C-2'), 71.0 (d, C-4''), 69.2 (t, C-1), 62.2 (t, C-6''), 54.1 (d, C-2), 40.3 (t, C-10), 35.4 (t, C-3'), 33.3 (t, C-6), 32.6 (t, C-7, 16), 30.4 ~ 29.9 (t, C-12 ~ 15, 5' ~ 15'), 28.6 (t, C-11), 28.2 (t, C-16'), 25.7 (t, C-4'), 23.3 (t, C-17, 17'), 15.7 (q, C-19), 14.0 (q, C-18, 18')。因此化合物 **3** 鉴定为脑苷脂 D, 其核磁数据与文献<sup>[8]</sup>报道从高等真菌黄鳞多孔菌 *Polyporus ellisii* 中得到的一致, 该化合物也从紫芝中得到过<sup>[9]</sup>。脑苷脂类化合物是细胞膜的重要组成部分, 研究发现它们可以增强阿枯菌素 (aculeacin) 的

抗真菌活性<sup>[10]</sup>。化合物 **4** ~ **6** 均为无色针晶, TLC 分析显示甾醇类化合物的特征斑点。将这 3 个化合物分别与麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇标准样品进行 TLC 分析, 采用 3 种不同的展开体系, 其  $R_f$  值均一致, 混合点不分离, 故分别确定为麦角甾醇、过氧化麦角甾醇、啤酒甾醇。

#### 参考文献

- 1 Zhao JD (赵继鼎). *Flora Fungorum Sinicorum* (中国真菌志)-Polyporaceae. Beijing: Science Press, 1998. 1-44.
- 2 Li JF (李俊峰). The biological characteristics, pharmacological effects and application prospect of *Coriolus versicolor*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2003, 31: 509-510.
- 3 Cui DZ (崔岱宗), Xiang BB (向冰冰). Progress on classification and identification of *Trametes* by molecular taxonomy. *Acad Period Farm Prod Proc* (农产品加工·学刊), 2009, 175: 29-33.
- 4 Zhou HM (周宏敏), Hong YZ (洪宇植), Xiao YZ (肖亚中), et al. High output of a *Trametes* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant enzymes. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2007, 23: 1055-1059.
- 5 Fan FF, Zhuo R, Sun S, et al. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Technol*, 2011, 102: 3126-3137.
- 6 Justicia J, Oltra JE, Barrero AF, et al. Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by Titanocene (III) - evaluation of their antifeedant activity. *Eur J Org Chem*, 2005: 712-718.
- 7 Fleck WF, Schlegel B, Hoffmann P, et al. Isolation of isodrimenediol, a possible intermediate of drimane biosynthesis from *Polyporus arcularius*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 780-781.
- 8 Gao JM, Hu L, Dong ZJ, et al. New glycosphingolipid containing an unusual sphingoid base from the basidiomycete. *Polyporus ellisii*. *Lipids*, 2001, 36: 521-527.
- 9 Liu C (刘超), Chen RY (陈若芸). A new triterpene from fungal fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41: 8-11.
- 10 Sitrin RD, Chan G, Dingerdissen J, et al. Isolation and structure determination of *Pachybasium* cerebrosides which potentiate the antifungal activity of aculeacin. *J Antibiot*, 1988, 41: 469-480.

# 南海中华小尖柳珊瑚中嘌呤和嘧啶类化合物的研究

王萍<sup>1,2</sup>, 漆淑华<sup>1\*</sup>, 黄丽思<sup>1,2</sup>, 贺飞<sup>1</sup>, 农旭华<sup>1,2</sup>, 孙玉林<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:**对采自海南三亚的中华小尖柳珊瑚 *Muricella flexuosa* 的化学成分进行研究, 采用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 柱色谱法及重结晶等手段对化合物进行分离和纯化, 通过理化性质及光谱分析并结合文献对照, 鉴定得到 11 个嘌呤、嘧啶类化合物: 咖啡碱(1), 1,7-二甲基次黄嘌呤(2), 1-甲基次黄嘌呤(3), 7,9-二甲基-6-氮甲基嘌呤-8-酮(4), 7-甲基腺嘌呤(5), 1,7-二甲基嘌呤-6,8-二酮(6), 尿嘧啶(7), 胸腺嘧啶(8), 2'-脱氧尿嘧啶核苷(9), 2'-脱氧胸腺嘧啶核苷(10), 3-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(11)。其中化合物 2~6, 11 为首次从该属中分离得到, 化合物 4 和 11 为新的天然产物。

**关键词:** 中华小尖柳珊瑚 *Muricella flexuosa*; 化学成分; 结构鉴定; 嘌呤; 嘧啶

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Purine and Pyrimidine Analogues from the South China Sea Gorgonian *Muricella flexuosa*

WANG Ping<sup>1,2</sup>, QI Shu-hua<sup>1\*</sup>, HUANG Li-si<sup>1,2</sup>, HE Fei<sup>1</sup>, NONG Xu-hua<sup>1,2</sup>, SUN Yun-lin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301;

<sup>2</sup>Graduate University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Eleven compounds were isolated from the South China Sea gorgonian *Muricella flexuosa* by meanings of silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and recrystallization. Their structures were identified by physicochemical properties, spectroscopic analysis and comparison with the data of literatures. These 11 compounds were caffeine (1), 1,7-diethylhypoxanthine (2), 1-methylhypoxanthine (3), 7,9-dimethyl-6-(N-methyl) purine-8-one (4), 7-ethyladenine (5), 1,7-diethylpurine-6,8-dione (6), uracil (7), thymine (8), 2'-deoxyuridine (9), 2'-deoxythymidine (10), 3-ethyl-2'-deoxythymidine (11). Compounds 2-6 and 11 were obtained from the genus *Muricella* for the first time, and 4 and 11 were isolated from nature for the first time.

**Key words:** gorgonian *Muricella flexuosa*; chemical constituent; structure identification; purine; pyrimidine

柳珊瑚俗称海扇或海鞭, 属于腔肠动物门珊瑚纲八放珊瑚亚纲, 是热带海洋中常见的生物之一<sup>[1]</sup>, 在我国主要分布于广东、广西、海南岛、西沙等南海海域。从上世纪 60 年代 Weinheimer 等从百慕大柳珊瑚中发现具有独特结构和强烈生理活性的前列腺素前体, 半个世纪以来, 科学家从柳珊瑚中分离发现了众多结构新颖, 生物活性丰富的次级代谢产物, 包括甾醇类、萜类、含氮化合物类、长链脂肪酸酯和长链醇类化合物, 这些化合物具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤和抗结核等生物活性<sup>[2,3]</sup>。文献报

道从 *Muricella* 属柳珊瑚中主要分离到甾醇和和二萜类化合物<sup>[4-10]</sup>, 其中张文等从 *Muricella flexuosa* 中分离得到一个新的多羟基甾醇<sup>[6]</sup>。

为寻找有药用价值的海洋天然产物, 我们对南海柳珊瑚进行了一系列的研究, 在对采自海南三亚中华小尖柳珊瑚 *Muricella flexuosa* 化学成分研究过程中, 从乙酸乙酯和正丁醇提取物中分离鉴定了 11 个化合物: 咖啡碱(1)、1,7-二甲基次黄嘌呤(2)、1-甲基次黄嘌呤(3)、7,9-二甲基-6-氮甲基嘌呤-8-酮(4)、7-甲基腺嘌呤(5)、1,7-二甲基嘌呤-6,8-二酮(6)、尿嘧啶(7)、胸腺嘧啶(8)、2'-脱氧尿嘧啶核苷(9)、2'-脱氧胸腺嘧啶核苷(10)和 3-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(11), 本文具体介绍这些化合物的分离、纯化及结构鉴定。

收稿日期: 2011-02-25 接受日期: 2011-05-04

基金项目: 国家自然科学基金课题(20872151, 40976090); 广东省自然科学基金项目(8151030101000020)

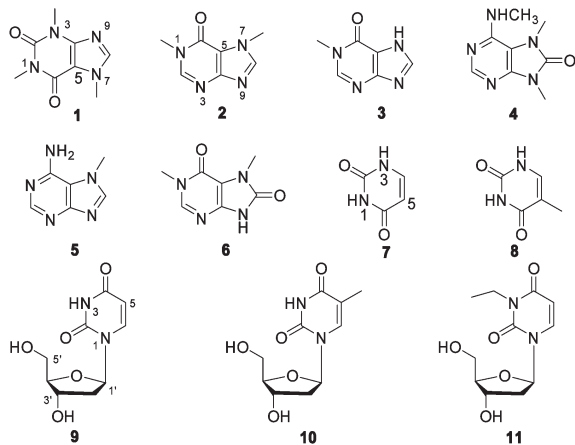
\* 通讯作者 Tel: 86-20-89022112; E-mail: shuhuaqi@scsio.ac.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和材料

$^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱用 Bruker AVANCE 500 MHz 型核磁共振波谱仪测定;质谱仪用 Agilent 6460 Triple Quadruple mass spectrometry 型质谱仪测定;熔点用四川大学科仪厂生产的 XRC21 型显微熔点仪测定;柱层析用硅胶(200~300目)为青岛海洋化工厂生产;TLC 硅胶预制板和制备板由烟台市化学工业研究所生产;溶剂均为分析纯,由天津百世化工有限公司工厂生产。

中华小尖柳珊瑚 2008 年 7 月采自海南省三亚;由中国科学院南海海洋研究所黄晖研究员鉴定,标本编号为 No. 0801,保存于中国科学院南海海洋研究所广东省海洋药物重点实验室。



### 1.2 提取与分离

中华小尖柳珊瑚新鲜样品切碎,用乙醇/二氯甲烷 2:1 提取 3 次,合并提取液,真空浓缩,粗提物加适量水混悬后依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取三次,真空浓缩得乙酸乙酯和正丁醇萃取物分别为 30.7 g 和 35.0 g。

将乙酸乙酯萃取物经硅胶柱(200~300目),以石油醚/丙酮(100:0~0:100)梯度洗脱,通过薄层色谱(TLC)点板合并,得到十个组分:M1~M10,组分 M3 先经硅胶柱层析,后经 Sephadex LH-20 柱色谱,经重结晶得到化合物 **1**(20.3 mg),组分 M6 以氯仿/丙酮(20:1~5:1)梯度洗脱得到化合物 **7**(11.2 mg),**11**(7.8 mg),**6**(6.2 mg);组分 M9 先以氯仿/甲醇(20:1~4:1)梯度洗脱,接着以 Sephadex LH-20 柱色谱进行纯化,以硅胶制备板制备得到化合物 **8**(10.6 mg)。

正丁醇萃取物经硅胶柱(200~300目),以氯仿/甲醇(50:1~7:3)系统进行梯度洗脱,结合薄层色谱(TLC)点板情况,合并为六个组分 D1~d<sub>6</sub>,组分 D1 先经 Sephadex LH-20 柱色谱纯化,以硅胶制备板制备得到化合物 **2**(5.5 mg),**3**(7.6 mg),组分 D4 经反复硅胶柱层析,重结晶得到化合物 **9**(6.6 mg),组分 d<sub>6</sub> 以氯仿/甲醇(20:1~3:1)梯度洗脱,经过 Sephadex LH-20 柱色谱纯化,结合硅胶制备板和重结晶等方法,得到化合物 **10**(9.2 mg),**4**(7.7 mg),**5**(8.9 mg)。

## 2 结构鉴定

**化合物 1** 白色结晶,  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ , mp. 233~235 °C, ESI-MS  $m/z$  195  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 3.36 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -1), 3.54 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -3), 3.96 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -7), 7.48 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 27.6 (q,  $\text{NCH}_3$ -1), 29.5 (q,  $\text{NCH}_3$ -3), 33.2 (q,  $\text{NCH}_3$ -7), 106.7 (s, C-5), 142.9 (d, C-8), 148.2 (s, C-4), 151.2 (s, C-2), 154.7 (s, C-6)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>基本一致,鉴定化合物 **1** 为咖啡因(caffeine)。

**化合物 2** 白色粉末,  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$ , mp. 360~364 °C, ESI-MS  $m/z$  165.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$ : 8.33 (1H, s, H-2), 8.04 (1H, s, H-8), 3.65 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -1), 3.84 (1H, s,  $\text{NCH}_3$ -7);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 157.4 (s, C-6), 154.6 (s, C-4), 149.1 (d, C-2), 144.9 (d, C-8), 115.4 (s, C-5), 29.2 (q,  $\text{NCH}_3$ -1), 32.8 (q,  $\text{NCH}_3$ -7)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>基本一致,鉴定化合物 **2** 为 1,7-二甲基次黄嘌呤(1,7-dimethylhypoxanthine)。

**化合物 3** 白色粉末,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$ , mp. 360~363 °C, ESI-MS  $m/z$  139.3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 8.32 (1H, s, H-2), 7.90 (1H, s, H-8), 7.78 (1H, s, H-7), 3.88 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ -1);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 157.5 (s, C-6), 154.7 (s, C-4), 149.3 (d, C-2), 144.9 (d, C-8), 115.5 (s, C-5), 29.3 (q,  $\text{NCH}_3$ -1)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>基本一致,鉴定化合物 **3** 为 1-甲基次黄嘌呤(1-methylhypoxanthine)。

**化合物 4** 无色针状固体,  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$ , mp. 222~223 °C, ESI-MS  $m/z$ : 194.0  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7.83 (1H, s, H-2), 6.62 (1H, d, J

= 4.0 Hz, NH-6), 3.86 (3H, s, NCH<sub>3</sub>-7), 3.50 (3H, s, NCH<sub>3</sub>-9), 2.78 (3H, d, *J* = 4.5 Hz, NHCH<sub>3</sub>-6); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 154.8 (s, C-6), 153.2 (d, C-2), 151.4 (s, C-4), 154.7 (d, C-8), 119.6 (d, C-5), 33.4 (NCH<sub>3</sub>-7), 32.8 (NCH<sub>3</sub>-9)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **4** 为 7,9-二甲基-6-甲基氨基-嘌呤-8-酮 (7,9-dimethyl-6-methylamino-purine-8-one)。

**化合物 5** 无色针状固体, C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>, mp. 220 ~ 225 °C, ESI-MS *m/z*: 150.3 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 8.29 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, s, H-8), 7.81, 7.77 (2H, s, NH<sub>2</sub>-6), 3.89 (3H, s, NCH<sub>3</sub>-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 155.9 (s, C-6), 152.4 (d, C-2), 150.3 (s, C-4), 138.9 (d, C-8), 118.6 (d, C-5), 33.1 (NCH<sub>3</sub>-7)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **5** 为 7-甲基腺嘌呤 (7-methyladenine)。

**化合物 6** 针状晶体, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, mp. 大于 320 °C, ESI-MS *m/z*: 195.1 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 7.94 (1H, s, H-2), 3.53 (3H, s, NCH<sub>3</sub>-7), 3.45 (3H, s, NCH<sub>3</sub>-1); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 156.9 (s, C-6), 153.0 (s, C-8), 150.7 (s, C-4), 143.1 (d, C-2), 107.2 (s, C-5), 32.4 (NCH<sub>3</sub>-7), 33.7 (NCH<sub>3</sub>-9)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **6** 为 1,7-二甲基嘌呤-6,8-二酮 (1,7-dimethylpurine-6,8-dione)。

**化合物 7** 淡黄色固体, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mp. 290 ~ 292 °C, ESI-MS *m/z*: 113.3 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 11.00 (1H, br s, NH-3), 10.97 (1H, br s, NH-1), 5.44 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-5), 7.38 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-4); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 152.1 (s, C-2), 165.2 (s, C-6), 142.5 (d, C-4), 100.6 (d, C-5)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致, 鉴定化合物 **7** 为尿嘧啶 (uracil)。

**化合物 8** 白色粉末, C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mp. 大于 300 °C, ESI-MS *m/z*: 127 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 10.99 (1H, br s, NH-1), 10.57 (1H, br s, NH-3), 7.23 (1H, s, H-4), 1.71 (1H, s, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 151.46 (s, C-2), 164.84 (s, C-6), 137.57 (d, C-4), 107.28 (s, C-5), 13.3 (q, CH<sub>3</sub>-5)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致, 鉴定化合物 **8** 为胸腺嘧啶 (thymine)。

**化合物 9** 白色结晶性粉末, C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, mp. 162 ~ 164 °C, ESI-MS *m/z*: 229.1 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 11.26 (1H, br s, H-3), 5.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.14 (1H, dd, *J* = 7.5, 6.5 Hz, H-1'), 2.08 (2H, m, H-2'), 4.23 (1H, m, H-3'), 3.78 (1H, dd, *J* = 7.0, 3.0 Hz, H-4'), 3.52 (2H, dd, *J* = 12.0, 3.5 Hz, H-5'); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 150.4 (s, C-2), 163.1 (s, C-4), 101.7 (d, C-5), 140.5 (d, C-6), 84.1 (d, C-1'), 39.8 (t, C-2'), 70.3 (d, C-3'), 87.4 (d, C-4'), 61.2 (t, C-5')。以上数据与文献报道<sup>[16]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **9** 为 2'-脱氧尿嘧啶核苷 (2'-deoxyuridine)。

**化合物 10** 白色结晶性粉末, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, mp. 188 ~ 189 °C, ESI-MS *m/z*: 243.1 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 11.28 (1H, br s, H-3), 1.77 (3H, br s, 5-CH<sub>3</sub>), 7.72 (1H, br s, H-6), 6.15 (1H, dd, *J* = 7.5, 6.0 Hz, H-1'), 2.07 (2H, m, H-2'), 4.24 (1H, m, H-3'), 3.75 (1H, dd, *J* = 7.0, 3.0 Hz, H-4'), 3.56 (2H, br d, *J* = 10.5 Hz, H-5'), 5.30 (1H, br s, 3'-OH), 5.11 (1H, br s, 5'-OH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 150.4 (s, C-2), 164.7 (s, C-4), 109.3 (s, C-5), 136.1 (d, C-6), 83.7 (d, C-1'), 40.4 (t, C-2'), 70.4 (d, C-3'), 87.2 (d, C-4'), 61.2 (t, C-5'), 12.2 (q, CH<sub>3</sub>-5)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **10** 为 2'-脱氧胸腺嘧啶核苷 (2'-deoxythymidine)。

**化合物 11** 白色结晶性粉末, C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, mp. 191 ~ 193 °C, ESI-MS *m/z*: 257.1 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 7.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 5.62 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.13 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 2.07 (2H, m, H-2'), 4.23 (1H, m, H-3'), 3.77 (1H, dd, *J* = 6.5, 3.5 Hz, H-4'), 3.54 (2H, br d, *J* = 11.0 Hz, H-5'), 2.86 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>-3), 1.18 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3), 5.35 (1H, br s, 3'-OH), 5.14 (1H, br s, 5'-OH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz) δ: 150.4 (s, C-2), 163.2 (s, C-4), 101.7 (s, C-5), 140.6 (d, C-6), 87.4 (d, C-1'), 38.9 (t, C-2'), 70.4 (d, C-3'), 84.1 (d, C-4'), 61.2 (t, C-5'), 41.2 (t, NCH<sub>2</sub>-3), 10.9 (q, NCH<sub>3</sub>-3)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>基本一致, 鉴定化合物 **11** 为 3-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (3-ethyl-2'-deoxyuridine)。

## 参考文献

- 1 Liaw CC, Shen YC, Lin YS, *et al.* Frajunolides E-K, briarane diterpenes from *Junceella fragilis*. *J Nat Prod*, 2008, 71: 1551-1556.
- 2 Ai XH(艾小红), Chen YX(陈亿新), Qi SH(漆淑华). Recent progress in the chemical and pharmacological study of Chinese corals. *J Guangzhou Univ*(广州大学学报), 2006, 5:49-56.
- 3 Zhang W(张文), Guo YW(郭跃伟). A pharmaceutical perspective on gorgonian; chemistry and bioactivity. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2003, 1:69-75.
- 4 Yan XH(严小红), Li ZY(李震宇), Guo YW(郭跃伟). Chemical component studies of the South China Sea gorgonian *Muricella sinensis*. *Org Chem*(有机化学), 2008, 28: 1264-1267.
- 5 Li TT(李婷婷), Tang XL(唐旭利), Li GQ(李国强). Studies on chemical constituents of gorgonian *Muricella siboga*. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2010, 29: 1-5.
- 6 Zhang W, Huang H, Ding Y, *et al.* Three new polyoxygenated steroids from two species of the South China Sea gorgonian *Muricella flexuosa* and *Menella verrucosa* Brundin. *Helv Chim Acta*, 2006, 89: 813-820.
- 7 Seo Y, Shin J, Song JI. New secosteroids from an undescribed gorgonian of the genus *Muricella*. *J Nat Prod*, 1995, 58: 1291-1295.
- 8 Seo YW, Rho JR, Cho KW, *et al.* Isolation of diterpenoids of the cladiellane class from gorgonians of the genus *Muricella*. *J Nat Prod*, 1998, 61: 1441-1443.
- 9 Seo YW, Rho JR, Cho KW, *et al.* Isolation of diterpenoids of the cladiellane class from gorgonians of the genus *Muricella*. *J Nat Prod*, 1997, 60: 171-174.
- 10 Seo YW, Cho KW, Chung S, *et al.* A new cladiellin diterpenoid from the gorgonian *Muricella* sp. *Nat Prod Lett*, 2000, 14: 197-203.
- 11 Zhao N(赵楠), Gao HY(高慧媛), Sun BH(孙博航), *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Camelliasinensis*. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2007, 24: 211-214.
- 12 Sun JL(孙建龙), Deng AJ(邓安君), Li ZH(李志宏), *et al.* Structure determination of five trace chemical constituents from roots of *Linum usitatissimum*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2011, 2: 158-161.
- 13 Saito T, Mori S, Chikazawa J, *et al.* Purines. LVII. Regioselective alkylation of N6, 9-disubstituted 8-oxoadenines; syntheses of the sea anemone purine caissarone and some positional isomers and analogs. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41: 1746-1752.
- 14 Chen Q(陈泉), Wu LJ(吴立军), Ruan LJ(阮丽军). Chemical studies on the constituents of *Lophat-herum gracile* Brongn. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2002, 19: 257-259.
- 15 Rahat M, Bergmann F, Ilana T. Purine-6, 8-diones; A study of their ionisation and their methylation reactions. *JCS Perkin I*, 1974, 19: 2229-2236.
- 16 Zou ZR(邹峥嵘), Yi YH(易杨华), Yao XS(姚新生), *et al.* Studies on chemical constituents of *Acaudina molpadioides* Semper. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2004, 2: 348-350.
- 17 Rao ZG(饶志刚), Deng SZ(邓松之), Li FY(李风英). Studies on the chemical constituents of the soft coral *Sarcophyton molle* from south China sea. *Org Chem*(有机化学), 1997, 17: 252-255.
- 18 Kimura T, Kuze J, Teraoka S, *et al.* Central nervous system depressant effects of N3-substituted derivatives of deoxyuridine in mice. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 142-145.

# 云南透骨草的化学成分研究

扶教龙<sup>1</sup>,谭昌恒<sup>2\*</sup>,谭俊杰<sup>2</sup>,陈佳佳<sup>1</sup>,邱业先<sup>1</sup>,朱大元<sup>2</sup>

<sup>1</sup>苏州科技学院化学与生物工程学院,苏州 215009;<sup>2</sup>中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室,上海 201203

**摘要:**从云南透骨草全草 95% 乙醇提取物中分离得到 11 个化合物,经波谱分析鉴定为山奈酚 3-*O*- $\alpha$ -*L*-吡喃鼠李糖苷(**1**),番石榴苷(**2**),滇白珠甲苷(**3**),槲皮苷(**4**),(-)-5'-甲氧基异落叶松脂醇 9-*O*- $\beta$ -*D*-木糖苷(**5**),五味子苷(**6**),(-)-表儿茶素(**7**),异槲皮苷(**8**),金鸡纳素 Ia(**9**),熊果酸(**10**)和 2,5-双-( $\beta$ -苯乙基)苯酚(**11**)。其中化合物 **1**、**2**、**9** 和 **11** 为首次从该植物中分得,化合物 **11** 是首次报导的天然产物。

**关键词:**云南透骨草;杜鹃花科;化学成分

中图分类号:R284.1;Q946.91

文献标识码:A

## Chemical Constituents of *Gaultheria yunnanensis*

FU Jiao-long<sup>1</sup>, TAN Chang-heng<sup>2\*</sup>, TAN Jun-jie<sup>2</sup>, CHEN Jia-jia<sup>1</sup>, QIU Ye-xian<sup>1</sup>, ZHU Da-yuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Chemistry and Bioengineering, University of Science and Technology of Suzhou, Suzhou 215009, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

**Abstract:** Eleven compounds were isolated from the 95% ethanol extract of the whole plants of *Gaultheria yunnanensis*, which were identified to be kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranoside (**1**), guajaverin (**2**), gaultheroside A (**3**), quercitrin (**4**), (-)-5'-methoxyisolariciresinol 9-*O*- $\beta$ -*D*-xylopyranoside (**5**), schizandriside (**6**), (-)-epicatechin (**7**), isoquercitrin (**8**), cinchonain Ia (**9**), ursolic acid (**10**), and 2,5-bis( $\beta$ -phenylethyl)phenol (**11**). Among them, **1**, **2**, **9** and **11** were firstly obtained from the plant, and **2** was reported as natural compound at the first time.

**Key words:** *Gaultheria yunnanensis*; Ericaceae; chemical constituents

云南透骨草(*Gaultheria yunnanensis*),又名滇白珠、透骨香、九木香等,为杜鹃花科白珠属植物,具有清热解毒、活血化痰、祛风除湿、顺气平喘的功能,主治风湿病、眩晕、闭经、风寒感冒、咳嗽、哮喘等症<sup>[1]</sup>。我们对采自云南的云南透骨草全草进行了化学成分研究,从中分离并鉴定了 11 个化合物,分别为山奈酚 3-*O*- $\alpha$ -*L*-吡喃鼠李糖苷(**1**),番石榴苷(**2**),滇白珠甲苷(**3**),槲皮苷(**4**),(-)-5'-甲氧基异落叶松脂醇 9-*O*- $\beta$ -*D*-木糖苷(**5**),五味子苷(**6**),(-)-表儿茶素(**7**),异槲皮苷(**8**),金鸡纳素 Ia(**9**),熊果酸(**10**)和 2,5-双-( $\beta$ -苯乙基)苯酚(**11**)。其中,化合物 **1**、**2**、**9** 和 **11** 为首次从该植物中分得,化合物 **11** 是首次报导的天然产物。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

Finnigan-MAT-95 质谱仪;Bruker DRX 400 核磁

共振仪,TMS 为内标; Nicolet Magna 750 FTIR 型红外分光光度仪;柱层析用硅胶(青岛海洋化工厂);薄层层析硅胶预制板 HSGF<sub>254</sub>(烟台化工研究院);葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden);反相硅胶 LiChrospher 100 Rp-18 (50  $\mu$ m) (Merck);其他各种溶剂均为分析纯。云南透骨草全草于 2005 年 5 月采集于云南,由中国科学院上海药物研究所黄骥博士鉴定。

### 1.2 提取与分离

干燥的云南透骨草全草 10 kg 用 95% 乙醇提取三次(15 L  $\times$  3),浓缩成浸膏(1.5 kg),将浸膏悬浮于 4 L 水中,然后分别用等量石油醚、乙酸乙酯和正丁醇各萃取三次,减压浓缩,得石油醚部位(35 g)、乙酸乙酯部位(195 g)和正丁醇部位(890 g)。经大孔树脂、硅胶、Sephadex LH-20 和反相硅胶柱层析分离纯化,从乙酸乙酯部位分得 **1**(13 mg)、**2**(16 mg)、**3**(27 mg)、**4**(27 mg)、**5**(24 mg)、**6**(32 mg)、**7**(41 mg)、**8**(31 mg)和 **9**(27 mg);从正丁醇部位分得 **10**(19 mg)和 **11**(62 mg)。



## 2 结构鉴定

**化合物 1**  $C_{21}H_{20}O_{10}$ , 黄色粉末。 $[\alpha]_D^{20} -152^\circ$  ( $c$  0.12, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 455 ( $[M + Na]^+$ ), 887 $[2M + Na]^+$ , 431 $[M - H]^-$  和 863 $[2M - H]^-$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.78 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', H-6'), 6.94 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', H-5'), 6.33 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.52 (1H, dd,  $J = 1.6, 3.4$  Hz, H-2''), 5.47 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-1''), 3.93 (1H, dd,  $J = 3.4, 9.0$  Hz, H-3''), 3.39 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-4''), 3.39 (1H, m, H-5''), 0.98 (3H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-6'');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 179.4 (C-4), 166.3 (C-7), 163.2 (C-5), 161.7 (C-4'), 159.2 (C-2), 158.6 (C-9), 135.6 (C-3), 131.8 (2C, C-2' and C-6'), 122.5 (C-1'), 116.7 (2C, C-3' and C-5'), 105.8 (C-10), 100.5 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8), 73.6 (C-4''), 73.4 (C-2''), 72.1 (C-5''), 70.7 (C-3''), 18.2 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[2]</sup>报道的山奈酚 3-*O*- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷 (Kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside) 一致。

**化合物 2**  $C_{20}H_{18}O_{11}$ , 黄色粉末。 $[\alpha]_D^{20} -35^\circ$  ( $c$  0.15, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 457 $[M + Na]^+$ , 891 $[2M + Na]^+$  和 433 $[M - H]^-$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.75 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2' and H-6'), 6.96 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3' and H-5'), 6.35 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.43 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-1'');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 180.0 (C-4), 166.5 (C-7), 163.5 (C-5), 159.2 (C-9), 158.9 (C-2), 150.5 (C-4'), 146.5 (C-3'), 136.1 (C-3), 123.5 (C-6'), 123.4 (C-1'), 117.9 (C-5'), 116.7 (C-2'), 106.2 (C-10), 105.1 (C-1''), 100.4 (C-6), 95.2 (C-8), 74.6 (C-2''), 73.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 67.5 (C-5''). 以上数据与文献<sup>[3,4]</sup>报道的番石榴苷 (Guaijaverin) 一致。

**化合物 3**  $C_{27}H_{36}O_{12}$ , 白色粉末。 $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$  ( $c$  0.20, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 575 $[M + Na]^+$ , 1127 $[2M + Na]^+$  和 551 $[M - H]^-$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.55 (1H, s, H-5), 6.42 (2H, s, H-2' and H-6'), 5.08 (1H, m, H-1), 4.80 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1''), 4.38 (1H, m, H-2a), 4.28 (1H, m, H-5''), 4.27 Hz, H-4a), 4.15 (1H, m, H-4''), 4.11

(1H, m, H-3''), 4.08 (2H, m, H-3a), 4.02 (1H, m, H-2''), 3.90 (1H, dd,  $J = 9.77, 3.97$  Hz, H-2a), 3.78 (6H, s, OMe-3', -5'), 3.76 (3H, s, OMe-6), 3.73 (3H, s, OMe-8), 3.64 (1H, m, H-5''), 3.13 (1H, dd,  $J = 14.95, 11.90$  Hz, H-4b), 3.04 (1H, dd,  $J = 14.95, 4.28$  Hz, H-4), 2.69 (1H, m, H-2), 2.17 (1H, m, H-3);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 149.4 (2C, C-3' and C-5'), 149.1 (C-8), 148.1 (C-6), 139.9 (C-7), 139.4 (C-1'), 134.9 (C-4'), 130.6 (C-10), 126.9 (C-9), 108.2 (C-5), 107.4 (2C, C-2' and C-6'), 106.0 (C-1''), 78.5 (C-3''), 75.4 (C-2''), 71.7 (C-4''), 71.4 (C-2a), 67.5 (C-5''), 66.5 (C-3a), 60.5 (OMe-8), 57.3 (2C, OMe-3' and OMe-5'), 57.0 (OMe-6), 47.2 (C-2), 43.5 (C-1), 41.0 (C-3), 34.4 (C-4)。以上数据与文献<sup>[5,6]</sup>报道的滇白珠甲苷 (Gaultheroside A) 一致。

**化合物 4**  $C_{21}H_{20}O_{11}$ , 黄色粉末。 $[\alpha]_D^{20} -145^\circ$  ( $c$  0.18, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 471 $[M + Na]^+$ , 919 $[2M + Na]^+$ , 447 $[M - H]^-$  和 895 $[2M - H]^-$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.30 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-2'), 7.26 (1H, dd,  $J = 2.1, 9.0$  Hz, H-6'), 6.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.41 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.22 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 5.26 (1H, d,  $J = 0.8$  Hz, H-1''), 0.95 (3H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-6'');  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 179.8 (C-4), 165.9 (C-7), 163.3 (C-5), 159.5 (C-9), 158.7 (C-2), 150.0 (C-4'), 146.5 (C-3'), 136.6 (C-3), 123.4 (2C, C-1' and C-6'), 117.4 (C-5'), 116.7 (C-2'), 106.2 (C-10), 103.8 (C-1''), 100.2 (C-6), 95.2 (C-8), 73.7 (C-4''), 72.5 (C-3''), 72.3 (2C, C-2'' and C-5''), 18.0 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道的槲皮苷 (Quercitrin) 一致。

**化合物 5**  $C_{26}H_{34}O_{11}$ , 白色粉末。 $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$  ( $c$  0.21, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 545 $[M + Na]^+$ , 1067 $[2M + Na]^+$  和 521 $[M - H]^-$ ;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.98 (2H, s, H-2' and H-6'), 6.88 (2H, s, H-5 and H-8), 4.60 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1''), 4.56 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz, H-2a), 4.51 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-1), 4.26 (1H, t,  $J = 5.8, 5.5$  Hz, H-5''), 4.16 (1H, m, H-4''), 4.05 (1H, m, H-3''), 3.99 (1H, m, H-2''), 3.78 (6H, s, OMe-3' and OMe-5'), 4.22 (2H, m, H-3a), 3.73 (3H, s, OMe-6), 3.62 (1H, m, H-2a), 3.58 (1H, m, H-5''), 3.31 (1H, dd,  $J$

= 15.6, 11.3 Hz, H-4b), 3.11 (1H, dd,  $J = 16.1, 4.9$  Hz, H-4a), 2.47 (1H, m, H-3), 2.40 (1H, m, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 149.2 (2C, C-3' and C-5'), 148.3 (C-6), 138.7 (C-7), 136.6 (C-1'), 135.8 (C-4'), 134.0 (C-9), 128.0 (C-10), 117.8 (C-8), 112.8 (C-5), 107.9 (2C, C-2' and C-6'), 106.0 (C-1''), 78.4 (C-3''), 75.2 (C-2''), 71.1 (C-4''), 68.5 (C-2a), 67.1 (C-5''), 64.2 (C-3a), 56.3 (2C, OMe-3' and OMe-5'), 56.1 (OMe-6), 47.8 (C-1), 45.3 (C-2), 39.1 (C-3), 33.7 (C-4)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道的(-)-5'-甲氧基异落叶松脂醇 9-*O*- $\beta$ -D-木糖苷 [(-)-5'-Methoxyisolariciresinol 9-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside] 一致。

**化合物 6**  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ , 白色粉末。  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 25^\circ$  ( $c$  0.17, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 515  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1007  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  和 491  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.27 (1H, s, H-2'), 7.15 (1H, s, H-5'), 6.98 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H-6'), 6.86 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-8), 4.61 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1''), 4.56 (1H, dd,  $J = 9.8, 2.4$  Hz, H-2a), 4.51 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-1), 4.24 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-5''), 4.22 (2H, m, H-3a), 4.14 (1H, m, H-4''), 4.06 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-3''), 3.99 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-2''), 3.79 (3H, s, OMe-6), 3.71 (3H, s, OMe-3'), 3.66 (1H, dd,  $J = 9.8, 3.0$  Hz, H-2a), 3.57 (1H, t,  $J = 5.1$  Hz, H-5''), 3.31 (1H, dd,  $J = 15.6, 11.3$  Hz, H-4b), 3.11 (1H, dd,  $J = 15.9, 4.6$  Hz, H-4a), 2.47 (1H, m, H-3), 2.36 (1H, m, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 148.2 (C-3'), 147.3 (C-6), 145.8 (C-4'), 137.6 (C-1'), 136.7 (C-7), 134.0 (C-9), 128.0 (C-10), 117.8 (C-8), 116.6 (C-5'), 113.9 (C-2'), 112.8 (C-5), 112.6 (C-6'), 106.0 (C-1''), 78.4 (C-3''), 75.2 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.5 (C-2a), 67.2 (C-5''), 64.2 (C-3a), 56.1 (OMe-6), 55.9 (OMe-3'), 47.3 (C-1), 45.5 (C-2), 39.3 (C-3), 33.9 (C-4)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道的五味子苷 (Schizandriside) 一致。

**化合物 7**  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ , 白色粉末。  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 58^\circ$  ( $c$  0.15, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 289  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 6.98 (1H, s, H-2'), 6.77 (1H, s, H-6'), 6.75 (1H, s, H-5'), 6.02 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 5.90 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 4.81 (1H, br. s, H-2), 4.17 (1H, s, H-3), 2.81 (1H, dd,  $J$

= 16.5, 4.6 Hz, H-4a), 2.65 (1H, dd,  $J = 16.6, 3.5$  Hz, H-4b);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 156.8 (C-5), 156.7 (C-7), 156.4 (C-9), 144.8 (C-4'), 144.2 (C-3'), 131.6 (C-1'), 118.6 (C-5'), 115.6 (C-6'), 114.9 (C-2'), 99.6 (C-10), 95.9 (C-6), 95.3 (C-8), 78.9 (C-2), 66.6 (C-3), 28.5 (C-4)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道的表儿茶素 [(-)-epicatechin] 一致。

**化合物 8**  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ , 黄色针晶 (甲醇)。 mp. 239 ~ 241  $^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 18^\circ$  ( $c$  0.09, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 487  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 951  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  和 463  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.56 (2H, m, H-2' and H-5'), 6.84 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6'), 6.40 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 6.20 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 5.45 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-6''),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 177.8 (C-4), 161.4 (C-5), 156.7 (C-2), 156.5 (C-9), 148.5 (C-4'), 144.1 (C-3'), 133.6 (C-3), 121.8 (C-5'), 121.3 (C-1'), 116.4 (C-6'), 115.3 (C-2'), 104.0 (C-10), 101.1 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 77.6 (C-5''), 76.7 (C-3''), 74.3 (C-2''), 70.1 (C-4''), 64.3 (C-7), 61.1 (C-6'')。以上数据与文献<sup>[8,9]</sup>报道的异槲皮苷 (Isoquercitrin) 一致。

**化合物 9**  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_9$ , 浅黄色针状结晶 (丙酮)。 mp. 178 ~ 180  $^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 196^\circ$  ( $c$  0.11, MeOH); ESI-MS  $m/z$ : 453  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 927  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  和 451  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 903  $[2\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$ )  $\delta$ : 7.10 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 6.83 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.2$  Hz, H-6'), 6.64 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-6''), 6.61 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2''), 6.46 (1H, dd,  $J = 7.9, 2.0$  Hz, H-5''), 6.25 (1H, s, H-6), 4.89 (1H, br. s, H-2), 4.54 (1H, dd,  $J = 6.1, 2.3$  Hz, H-12), 4.30 (1H, m, H-3), 3.12 (1H, dd,  $J = 6.2, 6.1$  Hz, H-13b), 2.93 (1H, m, H-4a), 2.88 (1H, m, H-4b), 2.85 (1H, dd,  $J = 16.2, 2.3$  Hz, H-13a);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 171.2 (C-13), 156.6 (C-6), 152.5 (C-8), 145.4 (C-4''), 145.0 (C-3''), 144.7 (C-4'), 144.1 (C-3'), 134.5 (C-1''), 131.2 (C-1'), 118.4 (C-6'), 118.4 (C-6''), 115.8 (C-5'), 115.8 (C-5''), 115.4 (C-10), 114.5 (C-2'), 114.5 (C-2''), 105.2 (C-9), 104.5 (C-5), 95.8 (C-7), 80.7 (C-2), 67.5 (C-3), 38.8 (C-11), 35.7 (C-

12), 29.0 (C-4)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道的金鸡纳素 Ia (Cinchonain Ia) 一致。

**化合物 10** C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 白色粉末。[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 74° (c 0.13, MeOH); ESI-MS *m/z*: 479 [M + Na]<sup>+</sup>, 935 [2M + Na]<sup>+</sup> 和 455 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 5.46 (1H, m, H-12), 4.17 (1H, m, H-3), 1.29 (6H, s, H-27 and H-29), 1.07 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-24), 1.02 (6H, s, H-25 and H-26), 0.96 (3H, s, H-30); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 180.1 (C-28), 144.9 (C-13), 122.4 (C-12), 78.7 (C-3), 55.6 (C-5), 48.4 (C-19), 48.1 (C-9), 46.5 (C-17), 42.3 (C-14), 42.0 (C-8), 39.9 (C-18), 38.7 (C-4), 38.5 (C-1), 38.4 (C-10), 34.3 (C-22), 33.3 (C-29), 33.2 (C-21), 33.1 (C-7), 31.0 (C-20), 29.0 (C-15), 28.3 (C-23), 27.1 (C-2), 26.2 (C-27), 23.9 (C-16), 23.8 (C-30), 23.7 (C-11), 18.8 (C-6), 18.3 (C-24), 17.4 (C-26), 16.8 (C-25)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道的熊果酸 (Ursolic acid) 一致。

**化合物 11** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O, 白色粉末。EI-MS *m/z* (%): 302 (55), 287 (100), 209 (18), 197 (12), 105 (20); HR-EI-MS *m/z*: 302.1678; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.13 (2H, m, H-5" and H-7"), 7.12 (2H, m, H-5' and H-7'), 7.10 (5H, m, H-4, H-4', H-8', H-4" and H-8"), 7.09 (2H, m, H-6' and H-6"), 7.07 (1H, m, H-3), 6.68 (1H, m, H-6), 4.44 (1H, s, OH), 4.32 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, H-1'), 4.05 (1H, dd, *J* = 7.0, 3.6 Hz, H-1"), 1.53 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2"), 1.50 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-2'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 151.7 (C-1), 147.1 (C-3"), 145.8 (C-3'), 138.8 (C-4), 132.1 (C-2), 128.6 (C-5', C-7'), 128.6 (C-5", C-7"), 127.8 (C-4', C-8'), 127.8 (C-4", C-8"), 127.5 (C-3), 126.6 (C-6'), 126.5 (C-5), 126.2 (C-6"), 116.1 (C-6), 44.5 (C-1"), 38.6 (C-1'), 21.3 (C-2'), 23.0 (C-2")。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道的 2,5-bis(β-phenylethyl) phenol [2,5-双-(β-苯乙基)苯酚] 一致。

#### 参考文献

1 Ma XJ(马小军), Zhao L(赵玲), Du CF(杜程芳), *et al.*

- Advances in studies on *Gaultheria leucocarpa* var. *yunnanensis* and medicinal plants of *Gaultheria leucocarpa*. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2001, 32:945-949.
- 2 Tan JJ(谭俊杰), Jiang SH(蒋山好), Zhu DY(朱大元). Studies on the chemical constituents of *Pleurospermum lindleyanum*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17:267-273.
- 3 Tetsuo I, Jun-ichi K, Tsunao H, *et al.* An acylated flavonol glycoside from *Lasiobema Japonica*. *Phytochemistry*, 1990, 29:1013-1014.
- 4 Guo L(郭雷), Gong BQ(龚邦强). Isolation and identification of mPGES-1 expression inhibitor from *Craibiodendron yunnanense*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:839-841.
- 5 Ogawa M, Oghihara Y. Studies on the constituents of *Enkianthus nudipes* V. A new ligand xyloside from the stems. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24:2102.
- 6 Zhang ZZ(张治针), Guo DA(果德安), Li CL(李长龄), *et al.* Studies on the lignan glycosides from *Gaultheria yunnanensis*. *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 1999, 34:128-131.
- 7 Ma XJ(马小军), Du CF(杜程芳), Zheng JH(郑俊华), *et al.* Studies on chemical constituents of *Gaultheria leucocarpa* var. *yunnanensis* (Franch.) T. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2001, 26:844-845.
- 8 Zhou ZH(周志宏), Yang CR(杨崇仁). Chemical constituents of crude green tea, the material of Pu-er tea in Yunnan. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 2000, 22:343-350.
- 9 Gao GY(高光耀), Chen SB(陈四保), Wang LW(王立为), *et al.* Studies on the chemical constituents of *Narrow-raceme meadowrue* (*Thalictrum atriplex*) III. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2000, 31:133-136.
- 10 Chen HF, Tanaka T, Nonaka GI, *et al.* Phenylpropanoid-substituted catechins from *castanopsis hystrix* and structure revision of cinchonains. *Phytochemistry*, 1990, 33:183-187.
- 11 Wu LJ(吴立军), Xiang T(相婷), Liu TH(刘铁汉), *et al.* NMR study of 3β-(*p*-hydroxy *trans* cinnamoyloxy)-2α-hydroxy-oleanic acid. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 1998, 29:367-369.
- 12 Motoh M, Yoko K, Chiseko W, *et al.* Identification of migrants from nitrile-butadiene rubber gloves. *J Food Hygienic Soc Japan*, 2003, 44:103-109.

# 珍珠荚蒾的化学成分研究

李薇薇, 史海明, 王梦月, 李晓波\*

上海交通大学药学院, 上海 200240

**摘要:** 从珍珠荚蒾 (*Viburnum foetidum* var. *ceanothoides*) 的枝叶中分离得到 14 个化合物, 经鉴定分别为: 白桦醇 (1), 熊果醇 (2),  $\beta$ -谷甾醇 (3), 白桦脂酸 (4), 熊果酸 (5), 对羟基苯甲酸 (6), 4,4'-二羟基- $\alpha$ -古柯间二酸 (7), 反式对香豆酸 (8), 顺式对香豆酸 (9), 红花菜豆酸 (10), 原儿茶酸 (11), 胡萝卜苷 (12), 1-*O*-(6-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-4-allylbenzene (13) 和 apigenin 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (14)。其中, 化合物 1、7、9、10 和 13 为首次从荚蒾属中分离得到; 所有化合物均首次从珍珠荚蒾中分离得到。

**关键词:** 珍珠荚蒾; 化学成分

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Chemical Constituents from the Stems and Leaves of *Viburnum foetidum* var. *ceanothoides*

LI Wei-wei, SHI Hai-ming, WANG Meng-yue, LI Xiao-bo\*

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Fourteen compounds were isolated from the stems and leaves of *Viburnum foetidum* var. *ceanothoides*. Their structures were identified as betulin (1), uvaol (2),  $\beta$ -sitosterol (3), betulinic acid (4), ursolic acid (5), p-hydroxybenzoic acid (6), 4,4'-dihydroxy- $\alpha$ -truxillic acid (7), E-p-coumaric acid (8), Z-p-coumaric acid (9), phaseic acid (10), protocatechuic acid (11), daucosterol (12), 1-*O*-(6-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-4-allylbenzene (13), and apigenin 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (14). This is first report of the presence of compounds 1, 7, 9, 10 and 13 in the genus *Viburnum* and 1-14 in this plant.

**Key words:** *Viburnum foetidum* var. *ceanothoides*; chemical constituents

## Introduction

*Viburnum foetidum* Wall. var. *ceanothoides* (C. H. Wright) Hand. -Mazz. belongs to the genus *Viburnum* (Adoxaceae), distributed in Yunnan, Sichuan and Guizhou provinces of China. The roots, stems, leaves and fruits have been used in Chinese folk medicines to treat stomatitis, eczema, fractures, bone-setters injury and trauma hemorrhage<sup>[1]</sup>. The phytochemical investigation on *V. foetidum* var. *ceanothoides* hasn't been reported so far. In our research, fourteen compounds were isolated. This is first report of the presence of compounds 1, 7, 9, 10 and 13 in the genus *Viburnum* and 1-

14 in this plant.

## Experimental

### General

The MS were measured on an Agilent 1100 series mass spectrometer or Waters UPLC Acquity/QTOFMS Premier. NMR spectra were measured on Bruker DRX-500 or Bruker Avance III 400 instruments. Shimadzu LC-2010AHT HPLC System and Waters C<sub>18</sub> column (7.8 × 300 mm, 6  $\mu$ m) were used for semipreparative HPLC. Silica gel for column chromatography and pre-coated silica GF<sub>254</sub> plates for TLC were produced by Qingdao Haiyang Chemical Co. Ltd. ODS and D101 macroporous resin were purchased from YMC Co. Ltd, Japan and Tianjin Haiguang Chemical Co. Ltd. respectively.

### Plant Material

The stems and leaves of *V. foetidum* Wall. var.

Received March 25, 2011; Accepted June 30, 2011

Foundation Item: This study was supported by National Comprehensive Technology Platforms for Innovative Drug R&D (2009ZX09301-007).

\* Corresponding author Tel: 86-21-34204806; E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

*ceanothoides* were collected from Chengjiang County, Yunnan Province of China, in May 2008, and were identified by Associate Prof. Wang Meng-Yue. The voucher specimen of *V. foetidum* var. *ceanothoides* (No. 080530) was deposited at School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University.

### Extraction and isolation

The dried stems and leaves of *V. foetidum* var. *ceanothoides* (23 kg) were milled and extracted three times (3 × 2 L) with 75% EtOH for 2h each time, with the solvent removed under reduced pressure. The 75% ethanolic extract was suspended in water, and then was partitioned with petroleum ether, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and n-BuOH successively. The petroleum ether-soluble fraction (90 g) was subjected to silica gel column eluting with a petroleum ether (PE)-EtOAc (100:0 to 2:1) gradient system to yield frs. 1-8. Fr. 4 was chromatographed on a silica gel column eluting with PE-Me<sub>2</sub>CO (8:1) to provide frs. 4.1-4.5. Fr. 4.2 followed by semipreparative HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O; 95:5) to provide **1** (18.2 mg) and **2** (19.3 mg). The chloroform-soluble fraction (86 g) was subjected to silica gel column eluting with a PE-EtOAc (100:0 to 1:1) gradient system to yield frs. 1-10. After recrystallization of fr. 3 with CH<sub>3</sub>OH, **3** (1.8 g) was obtained. Fr. 4 was chromatographed on a silica gel column eluting with PE-Me<sub>2</sub>CO (6:1) to afford **4** (200 mg). Fr. 5 was chromatographed on a silica gel column eluting with PE-Me<sub>2</sub>CO (5:1) to afford **5** (1.0 g). The EtOAc-soluble fraction (90 g) was subjected to silica gel column eluting with a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (100:0 to 2:1) gradient system to yield frs. 1-11. Fr. 3 was chromatographed on a silica gel column eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (10:1) to provide frs. 3.1-3.4. Fr. 3.2 was further purified by semipreparative HPLC (MeCN:H<sub>2</sub>O (containing 1% TFA) = 12:88) to provide **6** (6.2 mg), **7** (10.6 mg), **8** (23.5 mg) and **9** (13.5 mg). Fr. 4 was purified by preparative TLC with CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-HCOOH (100:25:1), **10** (24.2 mg) and **11** (50.3 mg) were obtained. Fr. 6 was applied to silica gel and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (10:1) to afford **12** (2.0 g). The n-BuOH-soluble fraction (320 g) was subjected to a macroporous resin column with a gradient elution

(20%, 40%, 60%, 80%, 95% EtOH/H<sub>2</sub>O) to yield frs. 1-5. Fr. 2 and Fr. 3 was chromatographed on a silica gel column eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (50:1 to 2:1) to yield frs. 2.1-2.8. Fr. 2.3 was subjected to an ODS column eluting with 30% MeOH/H<sub>2</sub>O to afford Fr. 2.3.1-2.3.5. Fr. 2.3.3 was purified by preparative TLC with CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O-HCOOH (60:40:10:1) to provide **13** (58.2 mg). Fr. 2.5 was subjected on silica gel column eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (5:1) to afford **14** (1.2 g).

### Identification

**Betulin (1)** C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, white powder, ESI-MS *m/z*: 465.2 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 3.19 (1H, dd, *J* = 11.5, 4.5 Hz, H-3α), 2.38 (1H, m, H-19), 3.34 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-28α), 3.80 (1H, dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz, H-28β), 4.58 (1H, brs, H-29α), 4.68 (1H, brs, H-29β), 0.97, 0.76, 0.83, 1.02, 0.98, 1.68 (each 3H, s, 6 × CH<sub>3</sub>, H-23, 24, 25, 26, 27, 30); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 38.6 (C-1), 27.3 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.9 (C-8), 50.3 (C-9), 37.1 (C-10), 20.8 (C-11), 25.1 (C-12), 37.2 (C-13), 42.7 (C-14), 27.0 (C-15), 29.1 (C-16), 47.7 (C-17), 48.7 (C-18), 47.7 (C-19), 150.5 (C-20), 29.7 (C-21), 33.9 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.7 (C-27), 60.5 (C-28), 109.7 (C-29), 19.1 (C-30). The NMR spectral data were in consistent with those reported [2].

**Uvaol (2)** C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, white powder, ESI-MS *m/z*: 465.3 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 5.14 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, H-12), 3.53 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-28), 3.21 (2H, m), 1.11, 1.00, 0.99, 0.95, 0.80 (each 3H, s, 5 × CH<sub>3</sub>), 0.94 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-30), 0.81 (3H, d, *J* = 5.0 Hz, H-29); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 38.7 (C-1), 27.2 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.1 (C-5), 18.3 (C-6), 35.2 (C-7), 39.4 (C-8), 47.6 (C-9), 38.0 (C-10), 26.0 (C-11), 125.0 (C-12), 138.7 (C-13), 42.0 (C-14), 29.7 (C-15), 23.4 (C-16), 36.9 (C-17), 54.0 (C-18), 39.3 (C-19), 40.0 (C-20), 32.8 (C-21), 30.6 (C-22), 28.7 (C-23), 15.6 (C-24), 15.7 (C-25), 17.4 (C-26), 23.3 (C-27), 70.0 (C-28), 16.8 (C-29),

21. 3 (C-30). The NMR spectral data were in consistent with those reported [3].

**Betulinic acid (4)**  $C_{30}H_{48}O_3$ , white powder, ESI-MS  $m/z$ : 455. 3 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR ( $C_5D_5N$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1. 82 (1H, m, H-2), 3. 42 (1H, t,  $J = 7. 2$  Hz, H-3), 2. 71 (1H, m, H-13), 1. 51 (1H, m, H-16 $\alpha$ ), 2. 62 (1H, d,  $J = 11. 7$  Hz, H-16 $\beta$ ), 3. 51 (1H, m, H-19), 4. 92 (1H, s, H-29 $\alpha$ ), 4. 74 (1H, s, H-29 $\beta$ ), 0. 78, 0. 98, 1. 02, 1. 03, 1. 19, 1. 76 (each 3H, s, 6  $\times$  CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR ( $C_5D_5N$ , 100 MHz)  $\delta$ : 40. 5 (C-1), 29. 6 (C-2), 79. 3 (C-3), 40. 8 (C-4), 57. 2 (C-5), 20. 0 (C-6), 36. 1 (C-7), 42. 3 (C-8), 52. 2 (C-9), 38. 8 (C-10), 22. 4 (C-11), 27. 4 (C-12), 39. 8 (C-13), 44. 1 (C-14), 31. 5 (C-15), 34. 1 (C-16), 57. 9 (C-17), 51. 0 (C-18), 49. 0 (C-19), 152. 6 (C-20), 32. 5 (C-21), 38. 9 (C-22), 29. 9 (C-23), 17. 6 (C-24), 17. 7 (C-25), 17. 7 (C-26), 16. 1 (C-27), 180. 1 (C-28), 111. 2 (C-29), 20. 7 (C-30). The NMR spectral data were in consistent with those reported [4].

***p*-Hydroxybenzoic acid (6)**  $C_7H_6O_3$ , white powder, HR-TOF MS  $m/z$ : 139. 0395 [M + H]<sup>+</sup>, 137. 0239 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6. 80 (2H, d,  $J = 8. 0$  Hz, H-3, 5), 7. 78 (2H, d,  $J = 8. 0$  Hz, H-2, 6), 10. 27 (1H, s, OH), 12. 40 (1H, s, COOH). The NMR spectral data were in consistent with those reported [5].

**4, 4'-Dihydroxy-a-truxillic acid (7)**  $C_{18}H_{16}O_6$ , white powder, HR-TOF-MS  $m/z$ : 327. 0847 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 3. 65 (2H, m, H- $\beta$ ,  $\beta'$ ), 4. 12 (2H, m, H- $\alpha$ ,  $\alpha'$ ), 6. 69 (4H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-3, 3', 5, 5'), 7. 11 (4H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-2, 2', 6, 6'), 9. 30 (2H, s, 2  $\times$  OH), 11. 98 (2H, s, 2  $\times$  COOH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 40. 3 (C- $\alpha$ ,  $\alpha'$ ), 46. 7 (C- $\beta$ ,  $\beta'$ ), 114. 9 (C-3, 3', 5, 5'), 128. 6 (C-2, 2', 6, 6'), 129. 6 (C-1, 1'), 156. 1 (C-4, 4'), 173. 1 (2  $\times$  COOH). The <sup>1</sup>H NMR spectral data were in consistent with those reported [6].

***E*-*p*-Coumaric acid (8)**  $C_9H_8O_3$ , white powder, HR-TOF-MS  $m/z$ : 165. 0552 [M + H]<sup>+</sup>, 163. 0397 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7. 60 (1H, d,  $J = 16. 0$  Hz, H-7), 7. 44 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-2, 6), 6. 80 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-3, 5), 6. 28 (1H, d,  $J = 16. 0$  Hz, H-8). The NMR spectral data were in con-

sistent with those reported [7].

***Z*-*p*-Coumaric acid (9)**  $C_9H_8O_3$ , white powder, HR-TOF MS  $m/z$ : 165. 0551 [M + H]<sup>+</sup>, 163. 0397 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7. 61 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-2, 6), 6. 78 (1H, d,  $J = 12. 5$  Hz, H-7), 6. 74 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-3, 5), 5. 78 (1H, d,  $J = 12. 5$  Hz, H-8). The NMR spectral data were in consistent with those reported [7].

**Phaseic acid (10)**  $C_{15}H_{20}O_5$ , white powder, APCI-MS  $m/z$ : 279. 1 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$ : 1. 01 (3H, s, H-9'), 1. 21 (3H, s, H-7'), 2. 07 (3H, d,  $J = 1. 0$  Hz, H-6), 2. 38 (1H, dd,  $J = 18. 0, 2. 5$  Hz, H-5' pro-R), 2. 47 (1H, dd,  $J = 17. 5, 2. 5$  Hz, H-3' pro-S), 2. 70 (1H, dd,  $J = 18. 0, 2. 5$  Hz, H-5' pro-S), 2. 80 (1H, d,  $J = 18. 0$  Hz, H-3' pro-R), 3. 66 (1H, d,  $J = 8. 0$  Hz, H-8' pro-S), 3. 94 (1H, dd,  $J = 8. 0, 2. 5$  Hz, H-8' pro-R), 5. 79 (1H, brs, H-2), 6. 45 (1H, d,  $J = 15. 5$  Hz, H-5), 8. 10 (1H, d,  $J = 15. 5$  Hz, H-4); <sup>13</sup>C NMR ( $CD_3OD$ , 125 MHz)  $\delta$ : 170. 0 (C-1), 120. 2 (C-2), 151. 4 (C-3), 133. 2 (C-4), 133. 9 (C-5), 21. 5 (C-6), 83. 2 (C-1'), 88. 1 (C-2'), 54. 3 (C-3'), 211. 2 (C-4'), 53. 5 (C-5'), 49. 8 (C-6'), 19. 7 (C-7'), 78. 9 (C-8'), 16. 1 (C-9'). The NMR spectral data were in consistent with those reported [8].

**Protocatechuic acid (11)**  $C_7H_6O_4$ , white powder, APCI-MS  $m/z$ : 152. 9 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$ : 6. 73 (1H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-5), 7. 35 (1H, dd,  $J = 8. 5, 2. 0$  Hz, H-6), 7. 42 (1H, d,  $J = 2. 0$  Hz, H-2). The NMR spectral data were in consistent with those reported [9].

**1-O-(6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-4-allylbenzene (13)**  $C_{21}H_{30}O_{10}$ , white powder, ESI-MS  $m/z$ : 465. 2 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz)  $\delta$ : 1. 22 (3H, d,  $J = 6. 0$  Hz, H-6''), 3. 33 (3H, m, H-3', H-4, H-4''), 3. 38 (2H, m, H-7), 3. 47 (1H, m, H-2'), 3. 55 (1H, m, H-5'), 3. 62 (1H, dd,  $J = 11. 0, 6. 5$  Hz, H-6' $\alpha$ ), 3. 68 (1H, dd,  $J = 6. 0, 3. 0$  Hz, H-5''), 3. 72 (1H, dd,  $J = 9. 5, 3. 5$  Hz, H-3''), 3. 86 (1H, m, H-2''), 4. 03 (1H, dd,  $J = 11. 0, 1. 5$  Hz, H-6' $\beta$ ), 4. 73 (1H, d,  $J = 1. 0$  Hz, H-1''), 4. 82 (1H, d, H-1'), 5. 02 (1H, m, H-9 $\alpha$ ), 5. 06 (1H, m, H-9 $\beta$ ), 5. 94 (1H, m, H-8), 7. 03 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-3, 5), 7. 12 (2H, d,  $J = 8. 5$  Hz, H-2, 6); <sup>13</sup>C NMR ( $CD_3OD$ ,

125 MHz)  $\delta$ : 157.4 (C-1), 117.9 (C-2), 130.5 (C-3), 135.3 (C-4), 130.5 (C-5), 40.3 (C-7), 139.1 (C-8), 115.7 (C-9), 102.5 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.5 (C-4'), 76.8 (C-5'), 67.8 (C-6'), 102.1 (C-1''), 72.4 (C-2''), 72.1 (C-3''), 74.0 (C-4''), 69.8 (C-5''), 17.9 (C-6''). The NMR spectral data were in consistent with those reported [10].

**Apigenin 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (14)** C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>, yellow needles, ESI-MS  $m/z$ : 579.2 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 1.20 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-6'''), 5.13 (brs, H-1'''), 5.23 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1''), 6.37 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6), 6.79 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8), 6.88 (1H, s, H-3), 6.95 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-3', 5'), 7.94 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-2', 6'); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 164.2 (C-2), 103.2 (C-3), 182.0 (C-4), 161.4 (C-5), 99.3 (C-6), 162.5 (C-7), 94.5 (C-8), 157.0 (C-9), 105.4 (C-10), 121.0 (C-1'), 128.5 (C-2', 6'), 116.0 (C-3', 5'), 161.1 (C-4'), 97.8 (C-1''), 76.2 (C-2''), 77.2 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.0 (C-5''), 60.4 (C-6''), 100.4 (C-1'''), 70.5 (C-2'''), 70.4 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 18.0 (C-6'''). The NMR spectral data were in consistent with those reported [11].

$\beta$ -Sitosterol (3), ursolic acid (5) and daucosterol (12) were identified by comparison of  $R_f$  value with the authentic samples.

## References

- 1 Yunnan Institute of Botany. Yunnan Flora (云南植物志). Beijing: Science Press, 1991: 385-386.
- 2 Tinto WF, Blair LC, Alli A, *et al.* Lupane triterpenoids of *Sa-lacia cordata*. *J Nat Prod*, 1992, 55: 395-398.
- 3 Xie GB (谢光波), Zhou SX (周思祥), Lei LD (雷连娣), *et al.* Studies on triterpenoid constituents in leaf of *Ilex pernyi*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 1890-1892.
- 4 Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev*, 2004, 24: 90-114.
- 5 Cho JY, Moon JH, Seong KY, *et al.* Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci Biotech Bioch*, 1998, 62: 2273-2276.
- 6 Chi YM, Nakamura M, Zhao XY, *et al.* Antinociceptive activities of  $\alpha$ -truxillic acid and  $\beta$ -truxinic acid derivatives. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 580-584.
- 7 Bergman M, Varshavsky L, Gottlieb HE, *et al.* The antioxidant activity of aqueous spinach extract; Chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, 2001, 58: 143-152.
- 8 Hirai N, Kondo S, Ohigashi H. Deuterium-labeled phaseic acid and dihydrophaseic acids for internal standards. *Biosci Biotech Bioch*, 2003, 67: 2408-2415.
- 9 Watanabe M, Ohshita Y, Tsushida T. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) Hulls. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1039-1044.
- 10 Ly TN, Yamauchi R, Shimoyamada M, *et al.* Isolation and structural elucidation of some glycosides from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 4919-4924.
- 11 Kee DY, Doc GJ, Yun HH, *et al.* Inhibitors of osteoclast differentiation from *Cephalotaxus koreana*. *J Nat Prod*, 2007, 70: 2029-2032.

# 龙柏乙酸乙酯萃取物抑菌活性成分的分离与鉴定

王海红, 袁忠林\*, 罗 兰, 郝明亮

青岛农业大学, 青岛 266109

**摘要:** 采用活性追踪法和柱层析法, 以苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌等作为供试菌种, 从龙柏乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物中分离得到抑菌活性成分。结果表明, 在供试浓度为 2 mg/mL 时, 龙柏乙酸乙酯萃取物对 6 种植物病菌均有一定的抑制作用, 其中对苹果腐烂病菌和葡萄白腐病菌抑菌活性最好, 抑菌率分别为 83.06% 和 78.87%。其活性成份桉脂素对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌和黄瓜枯萎病菌的  $EC_{50}$  分别为 0.38、0.18、0.47、0.59、0.70 mg/mL 和 1.94 mg/mL。

**关键词:** 龙柏; 抑菌活性; 柱层析; 桉脂素

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Isolation and Identification of Antifungal Components from *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca with Ethyl Acetate

WANG Hai-hong, YUAN Zhong-lin\*, LUO Lan, HAO Ming-liang

Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

**Abstract:** Antifungal components, which isolated from ethanol extract of *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca with ethyl acetate, were tested against *Valsa mali*, *Coniothyrium diplodiella*, and so on, based on bioassay-guided method. The results showed that ethyl acetate extracts of *J. chinensis* had certain inhibition effects to all tested fungi, and the best inhibition rates against *V. mali* and *C. diplodiella* were 83.06% and 78.87% at 2 mg/mL, respectively. The  $EC_{50}$  of the active component Savinin against *V. mali*, *C. diplodiella*, *Gibberella zeae*, *Elsinoe ampelina*, *Phylospora piricola* and *Fusarium oxysporum* were 0.38, 0.18, 0.47, 0.59, 0.70 mg/mL, and 1.94 mg/mL, respectively.

**Key words:** *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca; antifungal activity; column chromatography; savinin

龙柏 (*Juniperus chinensis* cv. Kaizuca) 属于裸子植物, 柏科 (Cupressaceae) 圆柏属 (*Juniperus*), 为圆柏 (桧) 的变种, 其萌芽力强、耐腐朽、耐修剪, 是长江流域重要的园林绿化树种。研究表明, 龙柏精油对土耳其扁谷盗和小菜蛾具有明显的熏蒸效果<sup>[1,2]</sup>, 在一定范围内对双条杉天牛触角电位 (EAG) 反应的强度与剂量呈正相关, 且雌虫的 EAG 反应强于雄虫<sup>[3]</sup>。龙柏叶提取物对多种食品微生物及植物病原真菌表现出显著的抑菌作用<sup>[4-6]</sup>。龙柏水提取物具有一定的杀草活性<sup>[7]</sup>。牛新威等<sup>[8]</sup>采用活性追踪法, 从龙柏茎叶乙醇提取物的石油醚萃取物中分离得到了 4-松香酸, 其对苹果腐烂病菌的  $EC_{50}$  为 0.8624 mg/mL。从上述文献中可看出, 龙柏茎叶中具有生物活性物质, 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物也具有较强的抑菌活性, 但尚未对其进行

进一步研究。本研究在此基础之上, 对龙柏乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物进行了进一步的分离和抑菌活性测定, 为充分挖掘龙柏中的农用抑菌活性成分奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

龙柏乙醇提取物采用文献<sup>[8]</sup>方法制备, 冰箱低温保存, 备用。苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*)、苹果轮纹病菌 (*Phylospora piricola*)、葡萄黑痘病菌 (*Elsinoe ampelina*)、葡萄白腐病菌 (*Coniothyrium diplodiella*)、小麦赤霉病菌 (*Gibberella zeae*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 由青岛农业大学农学与植物保护学院农药学教研室提供。

乙醇、石油醚 (沸程 60 ~ 90 °C)、乙酸乙酯、氯仿、甲醇均为市售分析纯。薄层层析硅胶 (GF<sub>254</sub>)、柱层析硅胶 (200 ~ 300 目) 购自青岛海洋化工厂。



WRS-1B 数字熔点仪、Finnigan MAT90 质谱仪、Bruker AV-500 核磁仪(以  $\text{CDCl}_3$  为溶剂)。

## 1.2 萃取物的制备

将龙柏乙醇提取物加入适量蒸馏水,制成悬浮液,放入分液漏斗内依次加乙酸乙酯进行液-液萃取,重复多次,合并萃取液,对乙酸乙酯萃取液进行减压蒸馏,冷冻干燥,获得乙酸乙酯萃取物。

## 1.3 抑菌活性测定

### 1.3.1 生长速率法

用生长速率法测定乙酸乙酯的抑菌活性<sup>[8-10]</sup>。将乙酸乙酯萃取物用乙酸乙酯配成 0.2 g/mL 的药液,取 1 mL 药液加到 100 mL 经灭菌的 60 °C PDA 培养基中,充分摇匀,以含相等体积乙酸乙酯的 PDA 培养基为对照,然后倒入直径为 60 mm 培养皿内制成平板。待培养基凝固后,在平板中央接种已制备好的供试病原菌菌饼(直径为 4 mm),处理和对照各重复 3 次。置于 26 °C 恒温培养箱中培养,待对照菌落直径为培养皿直径的 3/4 左右时,采用十字交叉法测定菌落直径,用下式求出抑制率:

纯生长量(mm) = 菌落直径 - 菌饼直径(4 mm)

抑菌率(%) =

$$\frac{\text{对照组纯生长量} - \text{处理组纯生长量}}{\text{对照组纯生长量}} \times 100\%$$

### 1.3.2 滤纸片法<sup>[11]</sup>

用滤纸片法测定乙酸乙酯柱层析各流分的抑菌活性。准备直径为 4 mm 的圆形滤纸片若干,灭菌。用灭菌镊子夹取灭菌滤纸片分别放入柱层析的各流份液中浸泡 1 min,取出后在无菌条件下自然风干,备用。制备直径为 60 mm 的 PDA 平板培养基,每皿培养基约 20 mL 待其凝固后,用镊子夹取已风干的滤纸片放在 PDA 平板上,每皿放 4 片,呈正四边形,滤纸片中心距菌落中心 2 cm。在平板中央接种已制备好的供试病原菌菌饼(直径为 4 mm),放入培养箱中,26 °C 恒温培养箱中倒置培养 2~7 d 后观察抑菌带的有无及大小。抑菌带距离大于 3 mm 为强抑菌作用(+++),1~3 mm 为中强抑菌作用(++),小于 1 mm 为弱抑菌作用(+),不产生抑菌带为无抑菌作用(-)。

## 1.4 抑菌活性物质的分离与鉴定

用 200~300 目的硅胶 1600 g 为吸附剂柱层析,74.7 g 萃取物用氯仿溶解后上样;用氯仿:甲醇混合液(100:1、50:1、25:1、10:1、5:1、2:1、1:1)及甲醇梯度洗脱。采用等份法接样,经薄层层析(TLC)

检测后,合并相同的组份,得到不同的流分,对各流分采用滤纸片法进行抑菌活性测定和减压浓缩。对抑菌效果好、样品量较多的流份经 ODS 柱进行进一步的纯化分离,得到纯净化合物,并对其抑菌活性采用生长速率法进行测定并结构鉴定。

## 2 结果分析

### 2.1 龙柏乙酸乙酯萃取物对 6 种植物病原菌的抑制作用

龙柏乙酸乙酯萃取物对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌、黄瓜枯萎病菌的抑制作用见表 1。

表 1 龙柏乙酸乙酯萃取物对 6 种植物病原菌的抑制作用(2 mg/mL)

Table 1 The inhibition effects of *J. chinensis* ethyl acetate extract against 6 kinds of plant pathogenic fungi (2 mg/mL)

| 植物病原菌<br>Plant pathogenic fungi | 对照平均直径(mm)<br>Average diameter of control | 处理平均直径(mm)<br>Average diameter of treatments | 抑菌率(%)<br>Inhibition rate |
|---------------------------------|---|--|---------------------------|
| 苹果腐烂病菌( <i>V. mali</i> )        | 41.5                                      | 11.8   | 83.06 ± 0.97              |
| 葡萄白腐病菌( <i>C. diplodiella</i> ) | 60.0                                      | 15.8   | 78.87 ± 1.76              |
| 小麦赤霉病菌( <i>G. zeae</i> )        | 60.0                                      | 22.2   | 67.56 ± 1.76              |
| 葡萄黑痘病菌( <i>E. ampelina</i> )    | 52.0                                      | 17.5   | 71.88 ± 0.97              |
| 苹果轮纹病菌( <i>P. piricola</i> )    | 48.0                                      | 17.0   | 70.51 ± 2.92              |
| 黄瓜枯萎病菌( <i>F. oxysporum</i> )   | 48.8                                      | 27.7   | 47.21 ± 0.92              |

由表 1 可知,当乙酸乙酯萃取物浓度为 2 mg/mL 时,对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率分别为 83.06%、78.87%、67.56%、71.88%、70.51% 和 47.21%。其中对苹果腐烂病菌和葡萄白腐病菌的抑制效果最好,对黄瓜枯萎病菌的抑制效果较差。

### 2.2 龙柏乙酸乙酯萃取物对 6 种植物病原菌的毒力作用

龙柏乙酸乙酯萃取物对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌和黄瓜枯萎病菌的毒力作用如表 2。

由表 2 可知,乙酸乙酯萃取物对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌和黄瓜枯萎病菌的  $\text{EC}_{50}$  分别为 0.67、1.96、1.39、1.14、1.24 mg/mL 和 3.16 mg/mL。对苹

表 2 龙柏乙酸乙酯萃取物对 6 种植物病原菌的毒力作用

Table 2 The toxicity of *J. chinensis* ethyl acetate extraction against 6 kinds of plant pathogenic fungi

| 植物病原菌<br>Plant pathogens            | 毒力回归方程<br>Toxicity regression equation | 相关系数(r)<br>Correlation coefficient (r) | 有效中浓度 (mg/mL)<br>EC <sub>50</sub> |
|-------------------------------------|--|--|-----------------------------------|
| 苹果腐烂病菌<br>( <i>V. mali</i> )        | $y = 1.3437x + 5.2309$                 | 0.9870                                 | 0.67                              |
| 葡萄白腐病菌<br>( <i>C. diplodiella</i> ) | $y = 1.0769x + 4.6843$                 | 0.9947                                 | 1.96                              |
| 小麦赤霉病菌<br>( <i>G. zeae</i> )        | $y = 1.0950x + 4.8450$                 | 0.9752                                 | 1.39                              |
| 葡萄黑痘病菌<br>( <i>E. ampelina</i> )    | $y = 1.1000x + 4.9360$                 | 0.9950                                 | 1.14                              |
| 苹果轮纹病菌<br>( <i>P. piricola</i> )    | $y = 0.9370x + 4.9120$                 | 0.9940                                 | 1.24                              |
| 黄瓜枯萎病菌<br>( <i>F. oxysporum</i> )   | $y = 0.9540x + 4.5230$                 | 0.9884                                 | 3.16                              |

果腐烂病菌的抑制作用最强,对葡萄黑痘病菌的抑制作用次之,对黄瓜枯萎病菌的抑制作用较差。虽然由表 1 看出在浓度为 2 mg/mL 时,龙柏乙酸乙酯萃取物对葡萄白腐病菌的抑制作用好于对小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌和苹果轮纹病菌的抑制作用,但毒力测定结果却相反,毒力测定的 EC<sub>50</sub>更能体现萃取物的抑菌效果。

### 2.3 龙柏乙酸乙酯萃取物不同流分的抑菌活性

龙柏乙酸乙酯萃取物经柱层析共得到 18 个流分,滤纸片法抑菌活性测定结果表明,流分 7(洗脱剂比例:氯仿:甲醇为 10:1,85.6 mg)和流分 8(氯仿:甲醇为 10:1,34.6 mg)对 6 种病原菌均有强抑制作用;流分 9(氯仿:甲醇为 10:1,31.9 mg)对苹果腐烂病菌为中强抑制作用,对葡萄白腐病菌有弱抑制作用;流分 11(氯仿:甲醇为 10:1,35.7 mg)对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、葡萄黑豆病菌有中强抑制作用。因流分 8 样品量比较少,本试验对抑菌作用较强的流分 7 进行纯化分离。用石油醚:乙酸乙酯(10:1、7:1、5:1、2:1、1:1)和乙酸乙酯梯度脱洗,在石油醚:乙酸乙酯(5:1)得到化合物 A(12.9 mg)。

### 2.4 化合物 A 的活性测定

化合物 A 对 6 种植物病原菌的毒力测定结果见表 3。由表 3 可知,化合物 A 对苹果腐烂病菌、葡萄白腐病菌、小麦赤霉病菌、葡萄黑痘病菌、苹果轮纹病菌和黄瓜枯萎病菌的 EC<sub>50</sub>分别是 0.38、0.18、0.47、0.59、0.70 mg/mL 和 1.94 mg/mL,其中对葡萄白腐病菌的抑制作用最好,对黄瓜枯萎病菌的抑制作用最差。

表 3 化合物 A 对 6 种植物病原菌的抑制作用

Table 3 The inhibition effects of compound A against 6 phytopathogens

| 植物病原菌<br>Plant pathogens            | 毒力回归方程<br>Toxicity regression equation | 相关系数(r)<br>Correlation coefficient (r) | 有效中浓度 (mg/mL)<br>EC <sub>50</sub> |
|-------------------------------------|--|--|-----------------------------------|
| 苹果腐烂病菌<br>( <i>V. mali</i> )        | $y = 1.5689x + 5.6577$                 | 0.9909                                 | 0.38                              |
| 葡萄白腐病菌<br>( <i>C. diplodiella</i> ) | $y = 1.1595x + 5.8749$                 | 0.9764                                 | 0.18                              |
| 小麦赤霉病菌<br>( <i>G. zeae</i> )        | $y = 0.6368x + 5.2069$                 | 0.9986                                 | 0.47                              |
| 葡萄黑痘病菌<br>( <i>E. ampelina</i> )    | $y = 0.6580x + 5.2290$                 | 0.9985                                 | 0.59                              |
| 苹果轮纹病菌<br>( <i>P. piricola</i> )    | $y = 0.6070x + 5.1580$                 | 0.9874                                 | 0.70                              |
| 黄瓜枯萎病菌<br>( <i>F. oxysporum</i> )   | $y = 1.0490x + 4.6970$                 | 0.9654                                 | 1.94                              |

### 2.5 化合物 A 的结构鉴定

化合物 A 为白色晶体(丙酮),m. p. 146 ~ 147 °C,分子式 C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>;ESI-MS ( $m/z$ ):353 [M + H]<sup>+</sup>, 375 [M + Na]<sup>+</sup>, 727 [2M + Na]<sup>+</sup>,表明其相对分子质量为 352。IR (KBr)  $\nu_{\max}$ :3070 (= C-H),2913 (-C-H),1735(六元环内酯 C=O),1640 (C=C),1599、1580、1503、1437(苯环),1030、918(五元环 C-O),827 (= C-H)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ :7.50 (1H, s, H-7),7.08 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6),7.05 (1H, s, H-2),6.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5),6.74 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6'),6.67 (1H, s, H-2'),6.64 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'),6.05 (2H, s, H-10),5.94 (2H, s, H-10'),4.25 (2H, dd,  $J = 9.0$  Hz, H-9'),3.74 (1H, m,  $J = 2.0$  Hz, H-8'),2.59 (2H, dd,  $J = 10.0$  Hz, H-7')。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ :172.5 (s, C-9),149.2 (s, C-3),148.4 (s, C-4),148.0 (s, C-3'),146.6 (s, C-4'),137.3 (d, C-7),131.5 (s, C-1'),128.3 (s, C-1),126.1 (s, C-8),122.1 (d, C-6'),125.9 (d, C-6),109.2 (d, C-5),108.8 (d, C-2'),108.7 (d, C-2),108.5 (d, C-5'),101.8 (t, C-10),101.1 (t, C-10'),69.5 (t, C-9'),40.0 (d, C-8'),

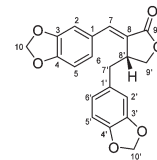


图 1 化合物 A 的结构

Fig. 1 Structures of compound A

37. 6(t, C-7'), 化合物 A 的各种理化、波谱数据与文献[12]报道的一致, 由此推断化合物 A 为桉脂素(Savinin)。

### 3 讨论

本研究通过活性追踪法从龙柏茎叶中分离出一种抑菌活性成分桉脂素, 它是木脂素类化合物, 属于二芳基丁内脂类。该化合物能溶于苯、氯仿、乙酸乙酯、乙醚、乙醇等溶剂, 在石油醚中溶解度极小, 难溶于水, 少数与糖结合成苷, 水溶性增大, 易被酶或酸水解。

桉脂素存在于柏科、杉科、五加科、爵床科、芸香科、伞形科、玄参科、蝶形科等植物体中, 具有肠道驱虫、治疗风湿、通经活络和杀虫剂增效剂等功效<sup>[13]</sup>。此外, 桉脂素还具有抑菌作用、具有强的杀死精子和杀虫活性<sup>[14, 15]</sup>, 对细胞色素 3A4 具有钝化作用<sup>[16]</sup>。Lee 等<sup>[17, 18]</sup>研究表明桉脂素对前列腺素、雌激素活性具有抑制作用。Wen 等<sup>[19]</sup>研究结果表明桦木酸(Betulinic acid)和桉脂素对 SARS-CoV 具有竞争抑制作用。

目前, 国内在桉脂素的研究报导方面还比较少。虽然国外在桉脂素的分离鉴定、作用对象、作用方式等方面有一定的研究, 但目前尚未用于农作物植物病原菌的研究。本研究为进一步开发利用桉脂素奠定了基础。

致谢: 感谢青岛科技大学张玉冰、于永良、钟惠民副教授, 青岛农业大学化学学院吕海涛教授、孙家隆副教授在化合物结构鉴定方面给予的指导和帮助。

#### 参考文献

- Zeng JD(曾建德). Fumigation action of essential oil from *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca against *Cryptolestes turcicus* (Grouville). *J Xiangtan Norm Coll, Nat Sci*(湘潭师范学院学报, 自科版), 2007, 29: 124-126.
- Zhao XY(赵晓燕), Hou YM(侯有明). Bioactivity of the essential oil from *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca against diamondback moth(*Plutella xylostella* (L.)). *Chin Bull Entomol* (昆虫知识), 2006, 43: 57-60.
- Hao DJ(郝德君), Wang Y(王焱), Ma FL(马凤林). Compounds in the essential oil from branches of *Sabina chinensis* and their effects on *Semanotus bifasciatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 600-603.
- Li CR(李传仁), Yan ZK(严赞开). Bacteriostasis on food bacteria of the extracts from *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2005, 33: 294-299.
- Jiang JH(蒋继宏), Li XC(李晓储), Chen FM(陈凤美), et al. Inhibition of plant extracts against *Glomerella cingulata* conidia. *J Jiangsu Forest Sci Technol* (江苏林业科技), 2004, 31: 23-25.
- Niu XW(牛新威), Luo L(罗兰), Yuan ZL(袁忠林), et al. Inhibition of crude extracts of *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca stems and leaves on plant pathogenic fungi. *Inner Mongolia Agric Sci Technol*(内蒙古农业科技), 2008, 4: 57-58.
- Luo L(罗兰), Yuan ZL(袁忠林), Hao ML(郝明亮), et al. Bioassay of herbicidal activity of water extract from branch and leaf of *Sabina chinensis* Kaizuca and its partitioned extracts. *J Plant Resour Environ*(植物资源与环境学报), 2010, 19: 50-55.
- Niu XW(牛新威), Luo L(罗兰), Yuan ZL(袁忠林), et al. Isolation and identification of antifungal components from *Juniperus chinensis* cv. Kaizuca. *Acta Bot Bor-Occid Sin*(西北植物学报), 2009, 29: 2326-2330.
- Mu LY(慕立义). Research Method of Plant Chemical Protection(植物化学保护研究方法). Beijing: China Agriculture Press, 1994.
- Chen NC(陈年春). Technique of Pesticide Bioassay(农药生物测定方法). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1991. 176-781.
- Zhang J(张佳), Wang Y(王莹), Zhang F(张峰), et al. Mensurating the antiseptic activity of extracts from *Artemisia annua* L. to mold with the filter paper method. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2009, 48: 1153-1154.
- Rossi R, Bellina F, Bechini C, et al. A new Stereocontrolled synthesis of the racemic forms of savinin and gadain. *Synthesis*, 1997, 9: 1061-1066.
- Baxter H, Harborne JB, Moss GP. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants, 2nd Ed. CRC Press, 1999.
- Chang ST, Wang SY, Wu CL, et al. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania cryptomerioides* Hayata heartwood. *Holzforchung*, 1999, 53: 487-490.
- Nissanka AP, Karunaratne V, Bandara BM, et al. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Pytochemistry*, 2001, 56: 857-861.
- Yoo HH, Lee SH, Jin C, et al. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by methylenedioxyphenyl lignans from *Acanthopanax chiisanensis*. *Planta Med*, 2008, 74: 822-827.
- Lee S, Ban HS, Kim YP, et al. Lignans from *Acanthopanax chiisanensis* having an inhibitory activity on prostaglandin E2 production. *Phytother Res*, 2005, 19: 103-106.
- Lee S, Yoo HH, Piao XL, et al. Anti-estrogenic activity of lignans from *Acanthopanax chiisanensis* root. *Arch Pharm Res*, 2005, 28: 186-189.
- Wen CC, Kuo YH, Jan JT, et al. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Med Chem*, 2007, 50: 4087-4095.

# 多孔板-MTT 比色法评价植物和微生物代谢产物的抗真菌活性

钟灵允<sup>1</sup>, 王 兰<sup>2</sup>, 单体江<sup>1</sup>, 刘 浩<sup>1</sup>, 赵江林<sup>1</sup>, 徐 梁<sup>1</sup>, 周立刚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193;

<sup>2</sup> 塔里木大学塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 阿拉尔 843300

**摘要:** 多孔板-MTT 比色法测定植物和微生物代谢产物对真菌抑制活性的步骤为: 在多孔板的每孔中依次加入浓度为  $10^5$  孢子/mL 的供试真菌孢子悬液 90  $\mu$ L, 不同浓度的药液 10  $\mu$ L。25  $^{\circ}$ C 暗培养 48 h, 然后每孔中加入 8 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu$ L, 继续培养 10 h 后, 离心去上清, 加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 30 min, 离心后上清液在 510 nm 测定吸光值。采用上述条件测定了白屈菜红碱对稻瘟病菌和西瓜枯萎病菌的 MIC 值分别为 80 和 1.5  $\mu$ g/mL, IC<sub>50</sub> 值分别为 21.99 和 0.78  $\mu$ g/mL; Diepoxin  $\zeta$  对稻瘟病菌的 MIC 和 IC<sub>50</sub> 值分别为 200 和 96.21  $\mu$ g/mL。多孔板-MTT 比色法为快速有效地筛选和评价植物和微生物抗真菌活性成分创造了条件。

**关键词:** 多孔板-MTT 比色法; 植物代谢产物; 微生物代谢产物; 抗真菌活性

中图分类号: Q946.887; Q939.92; S482.2 文献标识码: A

## Evaluation of Antifungal Activity of Plant and Microbial Metabolites by Microplate-MTT Colorimetric Assay

ZHONG Ling-yun<sup>1</sup>, WANG Lan<sup>2</sup>, SHAN Ti-jiang<sup>1</sup>, LIU Hao<sup>1</sup>, ZHAO Jiang-lin<sup>1</sup>, XU Liang<sup>1</sup>, ZHOU Li-gang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resource in Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group of China, Tarim University, Alar 843300, China

**Abstract:** An optimal experimental procedure with the microplate-MTT colorimetric assay was developed, that was as follows: 90  $\mu$ L of fungal spore suspension at concentration of  $10^5$  spores/mL was added in each well of the 96-well microplate first; 10  $\mu$ L of the sample solution with its different concentration was then added, and cultivated for 48 h at 25  $^{\circ}$ C in darkness; 10  $\mu$ L of MTT solution at 8 mg/mL was added into each well, and incubated for another 10 h at 25  $^{\circ}$ C and centrifuged; The supernatant was removed, and 150  $\mu$ L of DMSO was added; After shaking for another 30 min at 15 rpm, light absorption values at 510 nm were obtained for the supernatant transferred in a new plate with a microplate spectrophotometer. With the optimal MTT assay mentioned above, the minimum inhibitory concentration (MIC) values of chelerythrine from *Macleaya cordata* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Magnaporthe oryzae* were 80 and 1.5  $\mu$ g/mL respectively, and the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were 21.99 and 0.78  $\mu$ g/mL, correspondingly. The MIC and IC<sub>50</sub> values of diepoxin  $\zeta$  from the endophytic fungus Dzf12 on *Magnaporthe oryzae* were 200 and 96.21  $\mu$ g/mL. It indicated that the antifungal metabolites from plants and microbes could be evaluated fast and micro-quantitatively by using microplate-MTT colorimetric assay that is favorable for screening antifungal components with a high throughput.

**Key words:** microplate-MTT colorimetric assay; plant metabolites; microbial metabolites; antifungal activity

为了快速、高效地从植物和微生物中筛选抗真菌活性成分, 目前常用的方法有带毒平板法、药剂扩散法、孢子萌发法等, 这些方法均有一定的不足之

处<sup>[1]</sup>。1983 年 Mosmann 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法来间接反映细胞的增殖和活力水平, 其原理是通过活细胞中的琥珀酸脱氢酶 (真核生物位于线粒体中, 原核生物位于细胞膜上) 将淡黄色的 MTT 还原成蓝紫色的甲臞 (Formazane)<sup>[2]</sup>。MTT 在水中具有较好的溶解性, 而甲臞不溶于水, 易溶于乙醇、异丙醇、二甲基亚砷 (DMSO) 等有机溶剂, 通过多孔板分光光度计 (酶标仪) 依颜色深浅可测定出吸光度值。

收稿日期: 2011-06-24 接受日期: 2011-09-19

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20060019048); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放基金 (BRZD1102); 国家自然科学基金 (31071710)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-62731199; E-mail: lgzhou@cau.edu.cn

由于生成甲臜的量与反应的活细胞数量成正比,因此吸光度值的大小可以反映活细胞的数量和活性程度,从而间接反映药物对细胞活力的抑制作用<sup>[3,4]</sup>。目前,MTT 方法已得到愈来愈多的应用,逐步用于检测细胞对化学药物的敏感性、免疫细胞对刺激剂的反应、免疫细胞毒活性和细胞因子活性等领域<sup>[5-8]</sup>。而将此法用来定量评价植物和微生物代谢产物对丝状真菌的抑制活性,鲜见报道。本文优化了真菌接种量,加药时间及 MTT 的浓度等各项可能会影响测定结果的实验条件,并用多孔板-MTT 比色法测定了两种分别来自于植物和内生真菌的抗菌化合物白屈菜红碱(Chelerythrine)和 Diepoxins  $\xi$  对真菌的抑制作用,为将来快速有效地筛选和评价植物和微生物抗菌活性成分创造条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 购自美国 Amresco 公司,用 pH 7.2、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS)配成 2~12 mg/mL 不同浓度的溶液,过滤除菌,于 4 °C 避光保存;多菌灵(Aldrich 公司);两性霉素 B(Amresco 公司);乙醇等溶剂(分析纯,北京化学试剂公司)。

多孔板分光光度计(PowerWave HT, BioTek Instruments, USA);GFL-1083 摇床(日本);多孔培养板(北京);LS-B55L 蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备厂);HZQ-Q 振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);TS-8 转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),HPG-280B 光照培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);FLC-3 超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);AL104 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);TG16W 型多孔板离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

### 1.2 待测样品及药液的配制

白屈菜红碱(Chelerythrine)系本课题组分离自博落回(*Macleaya cordata*),为异喹啉类生物碱<sup>[9]</sup>;Diepoxin  $\zeta$  分离自盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)内生真菌 Dzf12,为螺二萜类化合物<sup>[10]</sup>。初步的活性测定表明,白屈菜红碱和 Diepoxin  $\zeta$  均具有明显的抗细菌和抗真菌活性。取 1 mg 白屈菜红碱(或 Diepoxin  $\zeta$ )溶于 0.5 mL 有机溶剂(Diepoxin  $\zeta$  用 20% 乙醇溶解,白屈菜红碱用 10% DMSO 溶解)中,

配成 2000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用相应的有机溶剂依次稀释成 5.0~1000  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。

对照药剂为两性霉素 B 和多菌灵。取两性霉素 B 1 mg 溶于 1.0 mL 10% DMSO 中,配成 1000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用 10% DMSO 依次稀释成 15.6~500  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。取多菌灵 1 mg 溶于 1.0 mL 20% 乙醇中,配成 1000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用 20% 乙醇依次稀释成 5.0~800  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。

### 1.3 供试真菌培养及孢子悬液的配制

稻瘟病菌 P131 (*Magnaporthe oryzae* P131) 和西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 由中国农业大学植物病理学系提供。稻瘟病菌孢子悬液的制备参照本小组前期的方法<sup>[11]</sup>。西瓜枯萎病菌孢子悬液的制备步骤如下:首先用灭菌的牙签从保存菌种的小管中挑取少量菌丝,接种到 PDA 培养基平板上,用封口膜封好,25 °C 下黑暗培养 5~7 d,待菌丝长满平板后,转接到新鲜 PDA 培养基中継代培养 2~3 次。然后,挑取少量菌丝接种到 PD 培养基中,25 °C,150 rpm 摇培 4~5 d,诱导产孢。用一层纱布过滤收集孢子滤液,弃上清,再往其中加入无菌水,离心 3 次(10000 rpm,每次离心 15 min),利用血球计数板测定孢子浓度。

### 1.4 真菌菌丝在培养基中的生长曲线测定

以稻瘟病菌 P131 和西瓜枯萎病菌为代表性供试真菌,通过测定  $OD_{530\text{nm}}$  吸光值,明确真菌在多孔板中的菌丝生长情况,确定培养时间。操作如下:分别取上述两种孢子悬液 90  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中(孢子悬液用 PD 培养基稀释至  $10^5$  孢子/mL),分别在 4、6、8、10、24、30、48、60 及 72 h 暗培养后测定  $OD_{530\text{nm}}$  值,每个处理重复 3 次。结果(图 1)表明,西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌的菌丝生长曲线较为相似,在 48 h

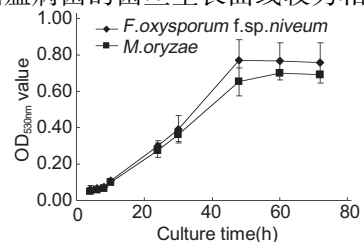


图 1 西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌菌丝在 PD 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Mycelia growth curves of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *M. oryzae* in PD medium

后达到稳定期,因此以下试验采用 48 h 作为药剂与供试真菌共培养时间。

### 1.5 采用多孔板-MTT 比色法测定样品对真菌的抑制活性

最低抑制浓度(MIC)的测定:取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液( $10^5$  孢子/mL),加入到 96 孔板中,然后加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的待测样品,以无菌水为空白对照,阴性对照为相应的溶剂,两性霉素 B 和多菌灵为阳性对照,每处理三个重复。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  8 mg/mL 的 MTT,以肉眼观察判定 MIC 值,即加入 MTT 后不变蓝的孔所对应的最小浓度。

抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ )的测定:取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液,加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的待测样品,以无菌水为空白对照,阴性对照为相应溶剂,两性霉素 B 和多菌灵为阳性对照,每处理三个重复。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  8 mg/mL 的 MTT,继续培养 10 h,2500 rpm 离心,弃上清,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 终止反应。30 min 后再次离心,将上清转移到新 96 孔板中测定其吸光值( $OD_{510\text{nm}}$ ),按下式计算供试样品的抑制率(%):

抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照孔(溶剂对照)} OD_{510\text{nm}} - \text{药液孔 } OD_{510\text{nm}}}{\text{对照孔(溶剂对照)} OD_{510\text{nm}}} \times 100$$

在 Microsoft excel 中,将求得的抑制率转换成抑制率机率值( $Y$ ),将药液浓度( $\mu\text{g/mL}$ )换算成浓度对数( $X$ ),即可求出线性方程  $Y = aX + b$ ,根据线性方程可求出抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 多孔板-MTT 比色法条件的确立和优化

采用两性霉素 B 作为抗真菌物质,西瓜枯萎病菌作为供试真菌,确立并优化多孔板-MTT 比色法的测定条件。

#### 2.1.1 MTT 反应产物甲臞的吸收波长

通过分光光度计测定西瓜枯萎病菌还原的甲臞在 DMSO 溶液中可见光区的最大吸收波长为 510 nm,因此采用 510 nm 作为测定波长。

#### 2.1.2 接种量对 MTT 测定结果的影响

为了探讨孢子悬液的接种量与 MTT 形成甲臞量的关系,用 PD 培养基将孢子悬液依次稀释成  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  孢子/mL,每孔加入孢子悬液 90  $\mu\text{L}$ (3 个重复),培养 48 h 后,加入 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的 MTT(初步确定),继续培养 10 h,2500 rpm 离

心,弃上清,加入 DMSO 终止反应。30 min 后再次离心,将上清转移到新 96 孔板中测定其吸光值。结果(图 2)表明,随着孢子接种量的增加, $OD_{510\text{nm}}$  值(即甲臞量)随之增加,在一定范围内( $10^4 \sim 10^6$  孢子/mL)接种量对数值与  $OD_{510\text{nm}}$  值表现出较好的线性关系,故将此浓度范围定为 MTT 分光光度法测定的线性范围。本试验后续试验采用的孢子悬液的浓度为  $10^5$  孢子/mL。

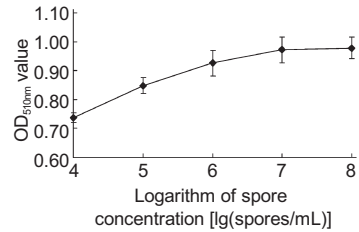


图 2 孢子接种量对数值与吸光值  $OD_{510\text{nm}}$  关系

Fig. 2 Relations between spore concentration logarithm and  $OD_{510\text{nm}}$  values

#### 2.1.3 加入 MTT 后的反应时间

取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液( $10^5$  孢子/mL),加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  无菌水(3 个重复)。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的 MTT,分别在加入 MTT 后的 2、4、8、10、16 h 和 32 h 时测量生成甲臞量的吸光值。结果(图 3)显示,随着反应时间增加,甲臞量呈现增加趋势,在加入 MTT 后反应 10 h 甲臞量达到最大,因此本试验确定加入 MTT 后反应 10 h。

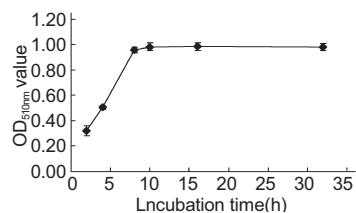


图 3 加入 MTT 后培养时间对 Formazane 生成的影响

Fig. 3 Effects of incubation time on the quantity of formazane after MTT addition

#### 2.1.4 不同 MTT 浓度对甲臞生成量的影响

将 MTT 配成 2、4、6、8 和 10 mg/mL 不同的浓度,测定其浓度与  $OD_{510\text{nm}}$  值的关系。取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液,加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  无菌水(3 个重复)。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的 MTT,继续培养 10 h 后测定其吸光值。结果(图 4)表明 MTT 浓度在 6 ~ 10 mg/mL 范围内,吸光值基本保持不变,因此以下试验 MTT 浓度设为 8 mg/mL。

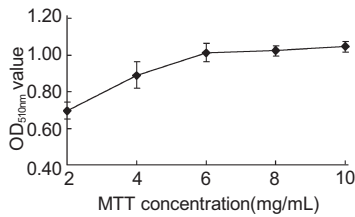


图4 MTT 浓度与 Formazane 生成量的关系

Fig. 4 Relations between MTT concentration and formazane quantity

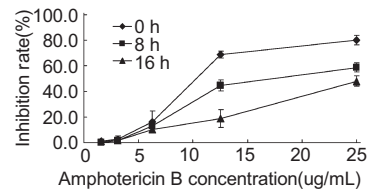


图5 加药时间对菌丝生长抑制率的影响

Fig. 5 Effects of drug addition time on inhibitory rate of mycelia growth

### 2.1.5 加药时间对菌丝生长抑制率的影响

在96孔板中加入一定浓度( $10^5$ 孢子/mL)孢子悬液90  $\mu$ L后,分别在0 h、8 h和16 h时加入不同浓度(1.56、3.13、6.25、12.5、25  $\mu$ g/mL)的两性霉素B 10  $\mu$ L,共培养48 h。加入10  $\mu$ L 8 mg/mL的MTT,继续培养10 h,测定各孔的 $OD_{510nm}$ 值,并计算抑制率。从图5中可以看出,加药越早,抑制率越高。本试验选择0 h加药(即加入孢子悬液后立即加入药剂)。

### 2.2 采用多孔板-MTT 比色法测定样品对真菌的抑制活性

采用优化后的试验方案,测定样品对西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌的抑制活性,结果见表1,白屈菜红碱对西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌都具有较强的抑制作用,最低抑制浓度(MIC)分别为80  $\mu$ g/mL和1.5  $\mu$ g/mL,抑制中浓度( $IC_{50}$ )分别为21.99  $\mu$ g/mL和0.78  $\mu$ g/mL。Diepoxin  $\zeta$ 的抑制活性相对较弱,对稻瘟病菌的MIC和 $IC_{50}$ 值分别为200  $\mu$ g/mL和96.21  $\mu$ g/mL;对西瓜枯萎病菌的MIC大于200  $\mu$ g/mL,未进一步检测 $IC_{50}$ 。

表1 样品对真菌的抑制活性

Table 1 Antifungal activity of the samples

| 样品<br>Sample           | 待测真菌<br>Test fungus | 抑制活性回归方程<br>Regress equation and correlation coefficient | 抑制中浓度<br>$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL) | 最低抑制浓度<br>MIC ( $\mu$ g/mL) |
|------------------------|---------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|
| 白屈菜红碱<br>Chelerythrine | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 0.8130 X + 3.9087 (R = 0.9777)$                     | 21.99                            | 80                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 4.5843 X + 5.4943 (R = 0.9895)$                     | 0.78                             | 1.5                         |
| Diepoxin $\zeta$       | <i>F. o. niveum</i> | -  | -                                | >200                        |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 2.0826 X + 0.8697 (R = 0.9777)$                     | 96.21                            | 200                         |
| 多菌灵 Carbendazim        | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 2.4551 X + 2.5161 (R = 0.9789)$                     | 10.35                            | 20                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 2.2887 X + 1.5068 (R = 0.9799)$                     | 33.60                            | 60                          |
| 两性霉素 B Amphotericin B  | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 2.9647 X + 1.8428 (R = 0.9799)$                     | 11.61                            | 25                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 1.2979 X + 2.6744 (R = 0.9767)$                     | 61.92                            | 100                         |

注: $Y = aX + b$ ,  $Y$ 为抑制率机率值, $X$ 为浓度对数;-表示为样品在浓度为200  $\mu$ g/mL时未检测出;*F. o. niveum*表示为西瓜枯萎病菌;*M. oryzae*表示为稻瘟病菌;多菌灵和两性霉素B为阳性对照。

Note:  $Y = aX + b$ ,  $Y$  is the inhibitory probit value and  $X$  is concentration logarithm of the component; -, undetected below concentration of 200  $\mu$ g/mL; *F. o. niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; *M. oryzae*, *Magnaporthe oryzae*; Both carbendazim and amphotericin B were used as the positive controls.

## 3 讨论

我们研究小组曾采用称量法直接测定样品在液体培养基中对真菌菌丝生长的影响<sup>[12]</sup>,该方法虽然比较准确,但培养体积相对较大,需要较多的样品量,且每次测定的样品数有限,也很难反映活菌丝的活力状态。丝状真菌是多细胞真核生物,代谢生成的甲臞量与活细胞数量之间存在一定的比例关系,因此通过测定吸光值可以反映供试样品对真菌细胞生长的影响。

本研究采用多孔板-MTT比色法测定样品抗真菌活性的优化条件是:每孔加入浓度为 $10^5$ 孢子/mL的供试真菌孢子悬液90  $\mu$ L,不同浓度的药液10  $\mu$ L,25  $^{\circ}$ C暗培养48 h,然后每孔中依次加入8 mg/mL的MTT溶液10  $\mu$ L,继续培养10 h后,离心去上清,加入DMSO 150  $\mu$ L,振荡30 min,离心后上清液在510 nm测定吸光值。采用上述条件测定了白屈菜红碱对稻瘟病菌和西瓜枯萎病菌的 $IC_{50}$ 值分别为21.99  $\mu$ g/mL和0.78  $\mu$ g/mL,Diepoxin  $\zeta$ 对稻瘟病菌 $IC_{50}$ 值为96.21  $\mu$ g/mL。

多孔板-MTT比色法适合于以细菌、酵母菌及产

孢丝状真菌为靶标的抗菌活性测定,该方法通过测定氧化还原产生的甲臞溶液的吸光值来评价抗菌活性的强弱,该方法能对多个样品的抗真菌活性进行快速测定,且样品用量少,符合高通量筛选的要求。本活性测定方法是在多孔板的小孔中接种一定量的孢子悬液(或已萌发的孢子悬液),以保证各处理之间接种生物量的一致,对于不产孢的靶标真菌,可以将菌丝打断,制成均匀的菌丝悬液。本研究所检测的是样品对丝状真菌的抑制活性,若要进一步确定样品的杀真菌浓度,还需要将供试真菌涂布在培养基平板上,通过后续的培养观察是否长出菌落来确定。为了消除样品颜色对 MTT 比色法吸光值的影响,可以将每个样品浓度设对照。如果样品溶液在 510 nm 处有强的光吸收,应考虑采用别的活性测定方法。一些供试真菌在培养过程中能产生有色化合物,会干扰比色测定的结果。

#### 参考文献

- Zhou LG (周立刚). Antimicrobial Compounds from Plants (植物抗菌化合物). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2005.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- Zhao JL (赵江林), Xu LJ (徐利剑), Huang YF (黄永富), et al. Detection of antimicrobial components from extracts of the endophytic fungi associated with *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using TLC-bioautography-MTT assay. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 28-32.
- Tang J (唐静), Tan ML (谈满良), Zhao JL (赵江林), et al. Detection of plant antibacterial components by using microplate-MTT colorimetric assay. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 949-952.
- Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Brit J Cancer*, 1989, 60: 206-210.
- Jahn B, Martin E, Stueben A, et al. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 661-667.
- Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, et al. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3727-3729.
- Meletiadiis J, Meis JFGM, Mouton JW, et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 2949-2954.
- Liu H, Wang J, Zhao J, et al. Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Nat Prod Commun*, 2009, 4: 1557-1560.
- Cai X, Shan T, et al. Spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus Dzf12 of *Dioscorea zingiberensis* and their antimicrobial activities. *Nat Prod Commun*, 2009, 4: 1469-1472.
- Wang J, Zhao J, Liu H, et al. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*, 2010, 15: 6411-6422.
- Liu H (刘浩), Zhang N (张娜), Yin CH (阴春晖), et al. Comparison between radial growth assay and liquid suspension culture assay for screening of antifungal natural compounds. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 577-580.
- Yao LY (姚莉韵), Lu Y (陆阳), Chen ZL (陈泽乃). Studies on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 201-203.
- Tan CY (谭成玉), Hu JE (胡建恩), Wang HD (王焕弟), et al. Study on chemical constitues of *Smalanthus sonchifolius*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40: 1861-1863.
- Sun WJ (孙文基). Extraction and Preparation of Natural Medicinal Compounds (天然药物成分提取分离与制备). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1999. 385.
- Chen Y (陈玉), Yang GZ (杨光忠), Li YC (李援朝). Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 301-303.
- Zhao AH (赵爱华), Zhao QS (赵勤实), Li RT (李蓉涛), et al. Chemical constituents from *Clerodendranthus spicatus*. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2004, 26: 563-568.
- Yang T, Wang CH, Liu HJ, et al. A new antioxidant compound from *Capparis spinosa*. *Pharm Biol*, 2010, 48: 589-594.

(上接第 54 页)



# $\alpha$ -亚麻酸对高脂模型大鼠组织脂肪酸代谢的影响

禹 晓<sup>1,2</sup>, 邓乾春<sup>1</sup>, 黄凤洪<sup>1\*</sup>, 黄庆德<sup>1</sup>, 杨金娥<sup>1</sup><sup>1</sup> 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; <sup>2</sup> 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

**摘要:** 研究不同 ALA 含量油脂对高脂模型大鼠组织脂肪酸代谢的影响。60 只雄性 Wistar 大鼠分为正常组、高脂组、花生油组、13%、27% 和 55% ALA 含量油脂组, 除正常组和高脂组外, 其余各组在饲喂高脂饲料的同时采用灌胃方式连续给予 2 mL/kg. bw 剂量的受试油。试验 6 周后分别测定大鼠各组织脂肪酸组成。结果表明, 高脂饮食能够降低大鼠各组织 *n*-3 脂肪酸含量, 但摄入不同 ALA 油脂可显著增加组织 *n*-3 脂肪酸含量, 并具有一定的剂量效应关系; 但 ALA 及其代谢产物 EPA、DPA 和 DHA 的累积具有组织特异性, 其中肾和心组织中 ALA 累积高于血浆、脑及肝组织, 肝和脑组织中 EPA 和 DPA 含量增加较显著, 而肾和心组织中 EPA 含量不变, 各组织 DHA 含量增加不显著。不同 ALA 油脂组 C18:3 (*n*-6) 和 C20:3 (*n*-6) 差异不显著, 但与花生油组相比, 其血浆、脑和肾组织 C20:4 含量显著降低。因此, 富含 ALA 含量的油脂能够增加组织中 ALA 及其代谢产物在组织中的含量, 提高其在脑组织中的分布比例, 这可能是 ALA 具有心血管保护作用 and 促进脑生长发育的作用机制之一。

**关键词:**  $\alpha$ -亚麻酸; 高脂饮食; 大鼠; 脂肪酸代谢

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Effect of $\alpha$ -Linolenic Acid on Fatty Acid Metabolism of Rats Fed with High Fat Diet

YU Xiao<sup>1,2</sup>, DENG Qian-chun<sup>1</sup>, HUANG Feng-hong<sup>1\*</sup>, HUANG Qing-de<sup>1</sup>, YANG Jin-e<sup>1</sup><sup>1</sup> Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China;<sup>2</sup> Food Science and Technology College, Central China Agriculture University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** In order to investigate the effect of different ALA levels of oils on fatty acid metabolism of rats fed with high fat diet, rats were divided into control (Cont) group, high fat diet (HFD) group, peanut oil (PO) group, 13%, 27% and 55%  $\alpha$ -linolenic acid blend oil (ALA-BO) groups. Besides Cont and HFD groups, other rats were fed with high-fat diet and treated simultaneously with corresponding oils (2 mL/kg. bw) orally for 6 weeks. The total fatty acid composition in plasma, liver, brain, kidney and heart were determined. The results showed that high fat diet could reduce the *n*-3 PUFA levels in all tissues, but increasing ALA intake could result in an incorporation of *n*-3 PUFA in tissues and also showed a dose-effect relationship. There were some tissue-dependent differences in the increase of *n*-3 PUFA levels, the increase of ALA in kidney and heart was greater than that in plasma, brain and liver, and the EPA level in brain and liver enhanced significantly, but no change was observed in DPA level in kidney and heart, and there was no significant change in DHA level in tissues. No difference was revealed in C18:3 (*n*-6) and C20:3 (*n*-6) levels among 13%, 27% and 55% ALA-BO groups, but C20:4 level decreased significantly in plasma, brain and kidney when compared with PO group. Our data suggested that oils rich in ALA could increase the levels of ALA and its metabolites in rat tissues and improve the relative proportion of EPA and DPA in brain, which may be one mechanism of ALA in reducing the risk of cardiovascular disease and promoting the growth of brain.

**Key words:**  $\alpha$ -linolenic acid; high-fat diet; rat; fatty acid metabolism

油脂的营养特性主要取决于其脂肪酸组成, 而

摄入脂肪酸的种类和比例与人的心脑血管健康和营养状况密切相关。关于 *n*-3 多不饱和脂肪酸 (poly-unsaturated fatty acids, PUFA) 心血管保护作用国内外已有不少报道<sup>[1]</sup>, 而食物中脂肪酸种类与机体和试验动物组织脂肪酸组成有很大相关性, 人体或动

收稿日期: 2010-10-20 接受日期: 2011-03-11

基金项目: 国家“863”计划 (2010AA023003)

\* 通讯作者 Tel: 86-27-86827874; Email: yuxiao775@126.com

物摄入富含 *n*-3 PUFA 油脂后,在降低血脂及胆固醇水平的同时,其组织中的脂肪酸组成会产生有利于机体健康的变化。Riediger ND 等<sup>[2]</sup>研究表明,摄入鱼油和亚麻籽油后,小鼠肝脏磷脂中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)水平显著增加。Francois CA 等<sup>[3]</sup>研究表明,7名妇女每天摄入20g亚麻籽油,持续四周后其乳汁、血浆和红细胞中 $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -Linolenic acid, ALA)、EPA和二十二碳五烯酸(Docosapentenoic acid, DPA)的含量均有显著增加,但对DHA的含量没有影响。Harper CR 等<sup>[4]</sup>研究结果也表明,每天从亚麻籽油中摄入3gALA可以使患有慢性疾病的非洲裔美国人血液中EPA和DPA分别增加60%和25%,而对DHA含量没有影响。但关于摄入不同ALA含量油脂对高脂模型大鼠不同组织脂肪酸代谢影响还鲜有报道。

因此本试验通过分析比较高脂模型大鼠不同组织脂肪酸组成的差异,进一步探讨其差异性与受试油脂脂肪酸组成之间的效应关系,最终为分析ALA及其代谢产物在不同组织中累积、迁移和代谢规律提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

花生油和亚麻籽油均购自当地市场。不同ALA含量油脂由亚麻籽油和花生油调和成13%、27%和55%三个梯度,即13%、27%和55%ALA-

BO。受试油的脂肪酸组成及质量指标如表1所示。

BF3-甲醇溶液(美国sigma公司);脂肪酸463标样(NU-CHEK-PREP公司)

### 1.2 实验动物与饲料

清洁级雄性Wistar大鼠,体重150~160g,购于湖北省疾病预防控制中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-005,实验动物使用许可证:SYXK(鄂)2008-005,实验动物质量合格证:00006134;基础饲料由湖北省疾病预防控制中心提供,高脂饲料由78.7%基础饲料、10%蛋黄粉、10%猪脂、1%胆固醇、0.3%胆盐配制而成。

### 1.3 动物分组及喂养

60只Wistar大鼠饲喂基础饲料观察7d,根据体重随机分为6组,每组10只,分别为:正常组、高脂组、花生油组、13%、27%和55%ALA-BO组,除正常组和高脂组外其余各组大鼠在饲喂高脂饲料的同时采用灌胃方式连续给2mL/kg.bw剂量的受试油。

试验期间大鼠分笼饲养,每笼5只,室温 $22 \pm 1$ ℃,相对湿度50%~60%,自然昼夜节律,自由进食、饮水。每天记录摄食量,每天定时称重并按体重灌胃受试油,实验期为6周。末次灌胃后当日晚禁食,不限饮水,次日晨将大鼠用2%戊巴比妥麻醉后腹腔主动脉取血,放入含肝素钠试管中混匀后4℃离心15min(3000r/min)分离得到血浆,-70℃保存至分析,待试验动物处死后采集其脏器(心、肝、肾、脑),-70℃保存至分析。

表1 受试油的脂肪酸组成及质量指标

Table 1 The fatty acid composition and quality indices of oils

| 脂肪酸组成(%)<br>Fatty acid<br>composition | 花生油<br>Peanut oil | 13% ALA 油脂<br>13% ALA-BO | 27% ALA 油脂<br>27% ALA-BO | 55% ALA 油脂<br>55% ALA-BO |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| C16:0                                 | 11.37             | 9.66                     | 8.20                     | 5.20                     |
| C18:0                                 | 4.62              | 4.22                     | 4.00                     | 3.58                     |
| C18:1                                 | 42.65             | 37.46                    | 31.68                    | 20.14                    |
| C18:2                                 | 36.00             | 31.18                    | 26.03                    | 15.58                    |
| C18:3                                 | -                 | 13.62                    | 27.32                    | 55.50                    |
| C20:0                                 | 1.79              | 1.29                     | 0.98                     | -                        |
| C20:1                                 | 0.65              | 0.55                     | 0.43                     | -                        |
| C22:0                                 | 2.93              | 2.02                     | 1.36                     | -                        |
| <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3              | -                 | 2.30                     | 1.00                     | 0.30                     |
| $\Sigma$ SFa                          | 20.70             | 17.19                    | 14.54                    | 8.78                     |
| $\Sigma$ MUFA                         | 43.30             | 38.01                    | 32.11                    | 20.14                    |

|                             |       |       |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| $\Sigma$ PUFa               | 36.00 | 44.80 | 53.35 | 71.08 |
| AV (mg KOH/g)               | 0.88  | 1.05  | 1.55  | 1.92  |
| POV (meqO <sub>2</sub> /kg) | 3.99  | 3.87  | 3.56  | 2.62  |

#### 1.4 血浆、肝脏、脑、肾及心组织脂质的提取

脂质的提取参考 Folch J 等<sup>[5]</sup>,称取约 0.10 g 组织,放入玻璃制磨砂配合的手动均质器中,加入 5 mL 氯仿和甲醇 (V/V=2:1),缓慢均质 1 min,过滤定容至 5 mL,或取 200  $\mu$ L 血浆,加入 5 mL 氯仿和甲醇 (V/V=2:1) 漩涡混匀 10 min,再加 1 mL 蒸馏水混匀,3000 r/min 离心 15 min,除去溶剂上相,再用氯仿、甲醇和水 (V/V/V=3:48:47) 冲洗溶剂界面 3 次,下相及部分冲洗液加入甲醇后融为一相,氮吹, -20  $^{\circ}$ C 保存至分析。

#### 1.5 脂肪酸组成的测定

脂质的甲酯化<sup>[6]</sup>:将提取的脂质在室温条件下氮吹,加入 0.10 mL 甲苯和 0.50 mL BF<sub>3</sub>-甲醇溶液 100  $^{\circ}$ C 水浴 60 min,冷却后加入 0.80 mL 蒸馏水和 0.80 mL 正己烷,漩涡混匀 5 min,离心取正己烷层用于 GC 分析。

气相色谱条件:气相色谱仪 Agilent 公司带全自动进样器 6890 型气相色谱仪, FID 检测器,气相柱为 HP-88 石英毛细管柱 (100  $\times$  0.25, 0.2  $\mu$ m)。GC 程序升温过程为:50  $^{\circ}$ C 保持 1 min,然后以 15  $^{\circ}$ C/min 的升温速度升至 175  $^{\circ}$ C,再以 1  $^{\circ}$ C/min 升至

250  $^{\circ}$ C。进样口和 FID 检测器温度为 250  $^{\circ}$ C,载气为氦气,载气流量为 1.5 mL/min。

#### 1.6 统计分析

所有数据统计分析用 SPSS16.0 软件包,各組间组均数差异性比较用 One-Way ANOVA 方法,统计结果表示为,显著性水平  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 ALA 含量油脂对高脂模型大鼠组织 *n*-3 脂肪酸组成的影响

不同 ALA 含量油脂对高脂模型大鼠组织 *n*-3 脂肪酸组成的影响实验结果如表 2-表 6 所示。表 2 结果表明,高脂饮食能够显著降低大鼠血浆 *n*-3 脂肪酸含量 ( $P < 0.05$ ),与高脂组相比,不同 ALA 油脂能够使 *n*-3 脂肪酸含量显著增加 ( $P < 0.05$ ),其中 55% ALA-BO 作用最显著。花生油组及 13%、27% 和 55% ALA-BO 组 ALA 含量分别比高脂组增加 7%、78%、128% 和 221%, EPA 含量分别增加 33%、116%、133% 和 166%, DPA 含量分别增加 55%、105%、150% 和 215%,不同 ALA 剂量组 DHA 含量虽有所增加,但差异不显著。

表 2 血浆组织脂肪酸组成

Table 2 The fatty acid composition of rats in plasma

| 脂肪酸组成 (%)<br>Fatty acid<br>composition (%) | 正常组<br>Control                | 高脂组<br>HF <sup>d</sup>        | 花生油组<br>PO                    | 13% ALA<br>油脂组<br>13% ALA-BO  | 27% ALA<br>油脂组<br>27% ALA-BO  | 55% ALA<br>油脂组<br>55% ALA-BO  |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C14:0                                      | 0.85 $\pm$ 0.05               | 0.77 $\pm$ 0.22               | 0.64 $\pm$ 0.16               | 0.58 $\pm$ 0.04               | 0.69 $\pm$ 0.03               | 0.81 $\pm$ 0.11               |
| C14:1                                      | 0.33 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  | 0.11 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>  | 0.19 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.20 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>  | 0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>  |
| C16:0                                      | 32.11 $\pm$ 3.30 <sup>a</sup> | 34.17 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup> | 32.33 $\pm$ 1.92 <sup>b</sup> | 31.11 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup> | 29.76 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup> | 29.54 $\pm$ 2.75 <sup>c</sup> |
| C16:1                                      | 0.14 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 0.08 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 0.15 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 0.06 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>  | 0.09 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>  | 0.10 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  |
| C16:1T                                     | 0.71 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.32 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>  | 0.42 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>  | 0.35 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>  | 0.36 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>  | 0.43 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>  |
| C17:0                                      | 2.06 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>  | 1.26 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>  | 1.67 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>  | 1.27 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>  | 1.12 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>  | 1.02 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>  |
| C18:0                                      | 30.12 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup> | 34.08 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup> | 31.57 $\pm$ 3.05 <sup>b</sup> | 30.33 $\pm$ 2.47 <sup>b</sup> | 30.03 $\pm$ 3.01 <sup>b</sup> | 29.65 $\pm$ 4.59 <sup>b</sup> |
| C18:1-9t                                   | 1.06 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>  | 1.53 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>  | 1.70 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>  | 2.07 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>  | 2.01 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>  | 1.77 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>  |
| C18:1-11t                                  | 0.87 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>  | 1.15 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>  | 1.42 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>  | 1.12 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 1.30 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>  | 1.69 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>  |
| C18:1                                      | 3.64 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>  | 2.74 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>  | 3.48 $\pm$ 0.66 <sup>c</sup>  | 3.65 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>  | 3.80 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>  | 4.19 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  |
| C18:1-11 <sup>c</sup>                      | 0.20 $\pm$ 0.07               | 0.17 $\pm$ 0.03               | 0.19 $\pm$ 0.02               | 0.18 $\pm$ 0.11               | 0.18 $\pm$ 0.04               | 0.13 $\pm$ 0.03               |
| C18:2TT                                    | 0.87 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>  | 1.19 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>  | 0.65 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>  | 1.10 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>  | 1.47 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>  | 2.08 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>  |
| C18:2n-6                                   | 3.57 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>  | 2.99 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>  | 3.92 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>  | 4.04 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>  | 4.25 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>  | 4.62 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>  |

|            |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C18: 3n-6  | 0.79 ± 0.17               | 0.67 ± 0.03               | 0.86 ± 0.25               | 0.68 ± 0.11               | 0.81 ± 0.22               | 0.80 ± 0.19               |
| C20: 0     | 0.61 ± 0.06               | 0.50 ± 0.11               | 0.38 ± 0.03               | 0.39 ± 0.13               | 0.46 ± 0.20               | 0.51 ± 0.08               |
| C18: 3n-3  | 0.22 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.14 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.15 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.25 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.32 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>  |
| C20: 1     | 0.36 ± 0.03               | 0.25 ± 0.11               | 0.29 ± 0.05               | 0.29 ± 0.02               | 0.31 ± 0.14               | 0.20 ± 0.04               |
| C20: 2     | 7.92 ± 0.75 <sup>b</sup>  | 8.76 ± 1.25 <sup>b</sup>  | 9.93 ± 0.52 <sup>b</sup>  | 12.87 ± 1.56 <sup>a</sup> | 13.33 ± 1.45 <sup>a</sup> | 12.91 ± 0.62 <sup>a</sup> |
| C22: 0     | 0.96 ± 0.10 <sup>a</sup>  | 1.13 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.64 ± 0.15 <sup>b</sup>  | 1.16 ± 0.19 <sup>a</sup>  | 1.33 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 0.94 ± 0.14 <sup>a</sup>  |
| C20: 3n-6  | 1.08 ± 0.26               | 1.09 ± 0.09               | 1.02 ± 0.26               | 1.07 ± 0.30               | 1.21 ± 0.38               | 1.25 ± 0.05               |
| C20: 4 n-6 | 4.88 ± 0.36 <sup>a</sup>  | 4.14 ± 0.67 <sup>a</sup>  | 4.78 ± 0.76 <sup>a</sup>  | 3.51 ± 0.14 <sup>b</sup>  | 2.24 ± 0.21 <sup>c</sup>  | 2.00 ± 0.25 <sup>c</sup>  |
| C22: 2     | 0.10 ± 0.02               | 0.06 ± 0.01               | 0.03 ± 0.01               | 0.12 ± 0.04               | 0.07 ± 0.02               | 0.14 ± 0.03               |
| C20: 5 EPa | 0.65 ± 0.12 <sup>c</sup>  | 0.36 ± 0.10 <sup>d</sup>  | 0.48 ± 0.07 <sup>d</sup>  | 0.78 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.84 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.96 ± 0.09 <sup>a</sup>  |
| C24: 0     | 0.43 ± 0.11               | 0.38 ± 0.14               | 0.48 ± 0.09               | 0.53 ± 0.05               | 0.43 ± 0.07               | 0.45 ± 0.04               |
| C22: 3     | 0.45 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.54 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.32 ± 0.04 <sup>c</sup>  | 0.94 ± 0.22 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.16 <sup>b</sup>  | 0.32 ± 0.15 <sup>c</sup>  |
| C24: 1     | 0.42 ± 0.05               | 0.34 ± 0.10               | 0.33 ± 0.07               | 0.47 ± 0.10               | 0.36 ± 0.05               | 0.19 ± 0.06               |
| C22: 4     | 0.30 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 0.21 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.27 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.51 ± 0.14 <sup>a</sup>  | 0.26 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.28 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| C22: 5DPa  | 0.22 ± 0.04 <sup>c</sup>  | 0.20 ± 0.03 <sup>c</sup>  | 0.31 ± 0.06 <sup>c</sup>  | 0.41 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.50 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.63 ± 0.05 <sup>a</sup>  |
| C22: 6DHa  | 0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.17 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.16 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.24 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.26 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.31 ± 0.08 <sup>a</sup>  |
| SFA        | 65.14 ± 3.23 <sup>b</sup> | 72.29 ± 1.27 <sup>a</sup> | 67.71 ± 1.11 <sup>b</sup> | 65.37 ± 2.09 <sup>b</sup> | 63.82 ± 1.77 <sup>c</sup> | 62.92 ± 2.47 <sup>c</sup> |
| MUFA       | 9.73 ± 1.90 <sup>a</sup>  | 6.69 ± 1.62 <sup>c</sup>  | 8.17 ± 1.74 <sup>b</sup>  | 8.40 ± 1.82 <sup>b</sup>  | 8.61 ± 1.76 <sup>b</sup>  | 8.89 ± 1.50 <sup>b</sup>  |
| PUFA       | 21.66 ± 1.14 <sup>d</sup> | 20.86 ± 1.21 <sup>c</sup> | 23.21 ± 1.29 <sup>b</sup> | 26.99 ± 1.15 <sup>a</sup> | 26.49 ± 1.18 <sup>a</sup> | 26.95 ± 1.02 <sup>a</sup> |
| n-6        | 15.96 ± 1.89 <sup>a</sup> | 11.63 ± 0.99 <sup>d</sup> | 14.06 ± 1.76 <sup>b</sup> | 12.95 ± 1.22 <sup>c</sup> | 12.31 ± 1.35 <sup>c</sup> | 12.86 ± 1.16 <sup>c</sup> |
| n-3        | 1.28 ± 0.32 <sup>c</sup>  | 0.87 ± 0.21 <sup>d</sup>  | 1.10 ± 0.16 <sup>d</sup>  | 1.68 ± 0.15 <sup>b</sup>  | 1.92 ± 0.24 <sup>b</sup>  | 2.36 ± 0.27 <sup>a</sup>  |
| n-6/n-3    | 12.46 ± 1.21 <sup>b</sup> | 13.37 ± 1.01 <sup>a</sup> | 12.78 ± 0.97 <sup>a</sup> | 7.71 ± 0.87 <sup>c</sup>  | 6.41 ± 0.79 <sup>d</sup>  | 5.45 ± 0.62 <sup>c</sup>  |

注:同行数据间不同上标字母 a、b、c、d、e 代表有显著差异,  $P < 0.05$ 。下同。

Note: Different superscripts letters (a, b, c, d, e) within the same line mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as follow.

表3 结果表明,正常组和高脂组大鼠肝组织 n-3 脂肪酸含量差异显著 ( $P < 0.05$ ),摄入不同 ALA 油脂能够增加肝组织 n-3 脂肪酸的含量 ( $P < 0.05$ )。13%、27% 和 55% ALA-BO 组 ALA 含量分别比高脂组增加 158%、321% 和 456% ( $P < 0.05$ ), EPA 含

量分别增加 78%、128% 和 193% ( $P < 0.05$ ), DPA 含量分别增加 48%、75% 和 104%, DHA 含量分别增加 12%、22% 和 29%,不同 ALA 油脂组 DPA 和 DHA 含量差异不显著。

表3 肝组织脂肪酸组成

Table 3 The fatty acid composition of rats in liver

| 脂肪酸组成 (%)<br>Fatty acid<br>composition (%) | 正常组<br>Control            | 高脂组<br>HF <sup>d</sup>    | 花生油组<br>PO                | 13% ALA<br>油脂组<br>13% ALA-BO | 27% ALA<br>油脂组<br>27% ALA-BO | 55% ALA<br>油脂组<br>55% ALA-BO |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| C14: 0                                     | 0.52 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.53 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.38 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.40 ± 0.07 <sup>b</sup>     | 0.36 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 0.42 ± 0.08 <sup>b</sup>     |
| C14: 1                                     | 0.28 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>     |
| C16: 0                                     | 19.29 ± 2.90 <sup>b</sup> | 22.74 ± 2.91 <sup>a</sup> | 19.30 ± 0.75 <sup>b</sup> | 19.60 ± 0.97 <sup>b</sup>    | 17.00 ± 1.64 <sup>c</sup>    | 13.71 ± 0.70 <sup>d</sup>    |
| C16: 1                                     | 0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.21 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 0.20 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.24 ± 0.01 <sup>a</sup>     | 0.20 ± 0.06 <sup>a</sup>     | 0.19 ± 0.03 <sup>a</sup>     |
| C16: 1T                                    | 0.19 ± 0.13 <sup>b</sup>  | 0.47 ± 0.20 <sup>a</sup>  | 0.42 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.08 <sup>a</sup>     | 0.36 ± 0.07 <sup>a</sup>     | 0.41 ± 0.09 <sup>a</sup>     |
| C17: 0                                     | 0.76 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 0.18 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.20 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 0.20 ± 0.02 <sup>b</sup>     | 0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>     |
| C18: 0                                     | 10.23 ± 7.19 <sup>b</sup> | 14.60 ± 1.76 <sup>a</sup> | 14.22 ± 0.91 <sup>a</sup> | 13.84 ± 0.55 <sup>a</sup>    | 13.32 ± 3.37 <sup>a</sup>    | 13.83 ± 0.67 <sup>a</sup>    |
| C18: 1-9t                                  | 1.32 ± 0.14               | 1.08 ± 0.74               | 0.68 ± 0.34               | 0.61 ± 0.13                  | 0.68 ± 0.56                  | 0.62 ± 0.24                  |
| C18: 1-11t                                 | 1.14 ± 0.08               | 0.79 ± 0.54               | 0.53 ± 0.27               | 0.48 ± 0.12                  | 0.53 ± 0.23                  | 0.45 ± 0.18                  |

|                        |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C18: 1                 | 22.14 ± 1.92 <sup>a</sup> | 19.90 ± 1.79 <sup>c</sup> | 20.70 ± 1.52 <sup>c</sup> | 20.90 ± 1.76 <sup>c</sup> | 21.17 ± 2.85 <sup>b</sup> | 22.67 ± 0.78 <sup>a</sup> |
| C18: 1-11 <sup>c</sup> | 0.89 ± 0.22 <sup>b</sup>  | 1.47 ± 0.27 <sup>a</sup>  | 1.49 ± 0.37 <sup>a</sup>  | 1.59 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 1.40 ± 0.26 <sup>a</sup>  | 1.47 ± 0.24 <sup>a</sup>  |
| C18: 2TT               | 0.34 ± 0.08               | 0.28 ± 0.09               | 0.27 ± 0.04               | 0.33 ± 0.06               | 0.25 ± 0.12               | 0.28 ± 0.06               |
| C18: 2n-6              | 20.60 ± 1.33 <sup>b</sup> | 17.52 ± 2.92 <sup>c</sup> | 20.12 ± 1.31 <sup>b</sup> | 20.12 ± 0.87 <sup>b</sup> | 21.52 ± 3.38 <sup>a</sup> | 22.65 ± 1.93 <sup>a</sup> |
| C18: 3n-6              | 0.39 ± 0.13               | 0.13 ± 0.06               | 0.23 ± 0.08               | 0.13 ± 0.02               | 0.11 ± 0.05               | 0.10 ± 0.02               |
| C18: 3n-3              | 0.47 ± 0.09 <sup>c</sup>  | 0.46 ± 0.11 <sup>c</sup>  | 0.59 ± 0.19 <sup>c</sup>  | 1.19 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 1.94 ± 0.73 <sup>b</sup>  | 2.56 ± 0.68 <sup>a</sup>  |
| C20: 1                 | 0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.55 ± 0.10 <sup>a</sup>  | 0.42 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.42 ± 0.12 <sup>a</sup>  | 0.33 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| C20: 2                 | 4.96 ± 0.08               | 3.31 ± 1.47               | 2.28 ± 0.98               | 2.21 ± 0.50               | 2.14 ± 1.71               | 1.95 ± 0.77               |
| C22: 0                 | 0.96 ± 0.23 <sup>a</sup>  | 0.34 ± 0.18 <sup>b</sup>  | 0.21 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.23 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.20 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.22 ± 0.10 <sup>b</sup>  |
| C20: 3n-6              | 1.01 ± 0.03               | 0.91 ± 0.12               | 1.36 ± 0.09               | 1.18 ± 0.27               | 1.03 ± 0.13               | 0.84 ± 0.16               |
| C20: 4 n-6             | 9.95 ± 1.31               | 10.30 ± 2.53              | 11.47 ± 1.63              | 10.56 ± 1.04              | 10.57 ± 0.29              | 10.40 ± 1.10              |
| C22: 2                 | 0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
| C20: 5EPa              | 0.18 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.14 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.13 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.25 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.32 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>  |
| C24: 0                 | 0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.06 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.06 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
| C22: 3                 | 0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.13 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.08 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.10 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| C24: 1                 | 0.53 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 0.14 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.22 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.16 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.10 ± 0.04 <sup>b</sup>  |
| C22: 4                 | 0.23 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.47 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.60 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 0.40 ± 0.08 <sup>a</sup>  |
| C22: 5DPa              | 0.46 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 0.48 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.45 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.71 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 0.84 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 0.98 ± 0.16 <sup>a</sup>  |
| C22: 6DHa              | 3.11 ± 0.43 <sup>a</sup>  | 2.67 ± 0.60 <sup>b</sup>  | 2.83 ± 0.45 <sup>b</sup>  | 3.01 ± 0.34 <sup>a</sup>  | 3.27 ± 0.41 <sup>a</sup>  | 3.28 ± 0.44 <sup>a</sup>  |
| SFA                    | 31.91 ± 3.25 <sup>c</sup> | 38.45 ± 2.14 <sup>a</sup> | 34.36 ± 1.37 <sup>b</sup> | 34.31 ± 1.56 <sup>b</sup> | 31.14 ± 2.09 <sup>c</sup> | 28.42 ± 1.11 <sup>d</sup> |
| MUFA                   | 26.55 ± 1.19 <sup>a</sup> | 24.19 ± 1.20 <sup>b</sup> | 24.35 ± 1.08 <sup>b</sup> | 24.53 ± 1.26 <sup>b</sup> | 24.61 ± 1.72 <sup>b</sup> | 26.01 ± 1.13 <sup>a</sup> |
| PUFA                   | 3.11 ± 0.67 <sup>a</sup>  | 2.67 ± 0.35 <sup>b</sup>  | 2.83 ± 0.41 <sup>b</sup>  | 3.01 ± 0.22 <sup>a</sup>  | 3.27 ± 0.21 <sup>a</sup>  | 3.28 ± 0.34 <sup>a</sup>  |
| n-6                    | 32.42 ± 1.67 <sup>b</sup> | 29.32 ± 1.56 <sup>c</sup> | 33.77 ± 1.66 <sup>b</sup> | 33.18 ± 1.69 <sup>b</sup> | 35.17 ± 1.44 <sup>a</sup> | 36.55 ± 1.39 <sup>a</sup> |
| n-3                    | 4.22 ± 0.51 <sup>c</sup>  | 3.75 ± 0.19 <sup>d</sup>  | 4.00 ± 0.45 <sup>d</sup>  | 5.16 ± 0.56 <sup>c</sup>  | 6.37 ± 0.33 <sup>b</sup>  | 7.23 ± 0.17 <sup>a</sup>  |
| n-6/n-3                | 7.68 ± 0.99 <sup>b</sup>  | 7.82 ± 1.02 <sup>b</sup>  | 8.44 ± 0.79 <sup>a</sup>  | 6.43 ± 0.82 <sup>c</sup>  | 5.52 ± 0.83 <sup>d</sup>  | 5.05 ± 0.68 <sup>d</sup>  |

表 4 结果表明,与正常组相比,高脂组和花生油组大鼠脑组织 n-3 脂肪酸含量差异不显著,而摄食不同 ALA 油脂后,脑组织 n-3 脂肪酸含量显著增加 ( $P < 0.05$ ),但 13% 和 27% ALA-BO 组差异不显著。13%、27% 和 55% ALA-BO 组 ALA 含量分别比高脂组增加 12%、101% ( $P < 0.05$ ) 和 289% ( $P <$

0.05),EPA 含量分别增加 58%、150% ( $P < 0.05$ ) 和 250% ( $P < 0.05$ ),DPA 含量分别增加 16%、142% ( $P < 0.05$ ) 和 308% ( $P < 0.05$ ),DHA 含量分别增加 12%、18% ( $P < 0.05$ ) 和 28% ( $P < 0.05$ )。

表 4 脑组织脂肪酸组成

Table 4 The fatty acid composition of rats in brain

| 脂肪酸组成(%)<br>Fatty acid<br>composition (%) | 正常组<br>Control            | 高脂组<br>HF <sup>d</sup>    | 花生油组<br>PO                | 13% ALA<br>油脂组<br>13% ALA-BO | 27% ALA<br>油脂组<br>27% ALA-BO | 55% ALA<br>油脂组<br>55% ALA-BO |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| C14: 0                                    | 0.19 ± 0.03               | 0.09 ± 0.02               | 0.19 ± 0.07               | 0.09 ± 0.01                  | 0.21 ± 0.02                  | 0.21 ± 0.03                  |
| C14: 1                                    | 0.08 ± 0.02               | 0.08 ± 0.01               | 0.07 ± 0.02               | 0.06 ± 0.01                  | 0.08 ± 0.01                  | 0.08 ± 0.01                  |
| C16: 0                                    | 25.60 ± 3.91 <sup>b</sup> | 28.90 ± 2.46 <sup>a</sup> | 27.80 ± 1.71 <sup>a</sup> | 25.78 ± 1.02 <sup>b</sup>    | 25.88 ± 1.00 <sup>b</sup>    | 25.67 ± 1.67 <sup>b</sup>    |
| C16: 1                                    | 0.05 ± 0.02               | 0.08 ± 0.01               | 0.11 ± 0.01               | 0.08 ± 0.04                  | 0.09 ± 0.01                  | 0.06 ± 0.01                  |
| C16: 1T                                   | 0.17 ± 0.03               | 0.21 ± 0.02               | 0.28 ± 0.02               | 0.22 ± 0.14                  | 0.21 ± 0.02                  | 0.17 ± 0.01                  |
| C17: 0                                    | 0.27 ± 0.03               | 0.25 ± 0.02               | 0.23 ± 0.04               | 0.21 ± 0.06                  | 0.24 ± 0.02                  | 0.25 ± 0.03                  |

|                       |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C18:0                 | 22.76 ± 2.15 <sup>a</sup> | 24.87 ± 1.47 <sup>a</sup> | 24.91 ± 1.80 <sup>a</sup> | 24.19 ± 1.31 <sup>a</sup> | 23.79 ± 1.63 <sup>a</sup> | 18.70 ± 1.74 <sup>b</sup> |
| C18:1-9t              | 0.50 ± 0.93 <sup>b</sup>  | 1.39 ± 0.14 <sup>a</sup>  | 0.87 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 0.97 ± 0.53 <sup>a</sup>  | 1.11 ± 0.64 <sup>a</sup>  | 1.00 ± 0.30 <sup>a</sup>  |
| C18:1-11t             | 0.65 ± 0.38               | 0.82 ± 0.26               | 0.58 ± 0.09               | 0.84 ± 0.19               | 0.85 ± 0.20               | 0.97 ± 0.17               |
| C18:1                 | 16.55 ± 1.84              | 14.40 ± 1.86              | 15.07 ± 1.99              | 16.04 ± 3.02              | 16.57 ± 0.98              | 17.61 ± 1.82              |
| C18:1-11 <sup>c</sup> | 4.79 ± 0.74 <sup>a</sup>  | 2.94 ± 0.35 <sup>c</sup>  | 3.78 ± 0.91 <sup>b</sup>  | 2.71 ± 0.90 <sup>c</sup>  | 2.68 ± 0.26 <sup>c</sup>  | 2.83 ± 0.93 <sup>c</sup>  |
| C18:2TT               | 0.15 ± 0.02               | 0.13 ± 0.02               | 0.09 ± 0.04               | 0.19 ± 0.05               | 0.19 ± 0.05               | 0.17 ± 0.06               |
| C18:2n-6              | 0.63 ± 0.11               | 0.58 ± 0.08               | 0.75 ± 0.07               | 0.70 ± 0.04               | 0.63 ± 0.05               | 0.60 ± 0.09               |
| C18:3n-6              | 0.68 ± 0.12               | 0.60 ± 0.13               | 0.50 ± 0.04               | 0.66 ± 0.23               | 0.63 ± 0.03               | 0.73 ± 0.07               |
| C20:0                 | 0.02 ± 0.01               | 0.02 ± 0.01               | 0.02 ± 0.01               | 0.05 ± 0.02               | 0.02 ± 0.01               | 0.02 ± 0.01               |
| C18:3n-3              | 1.13 ± 0.35 <sup>c</sup>  | 1.11 ± 0.36 <sup>c</sup>  | 1.06 ± 0.29 <sup>c</sup>  | 1.24 ± 0.03 <sup>c</sup>  | 2.23 ± 0.25 <sup>b</sup>  | 4.32 ± 0.61 <sup>a</sup>  |
| C20:1                 | 0.27 ± 0.09               | 0.32 ± 0.08               | 0.33 ± 0.09               | 0.31 ± 0.04               | 0.24 ± 0.07               | 0.41 ± 0.21               |
| C20:2                 | 5.66 ± 1.40 <sup>a</sup>  | 4.17 ± 0.71 <sup>b</sup>  | 2.94 ± 0.42 <sup>c</sup>  | 3.75 ± 2.35 <sup>b</sup>  | 4.00 ± 0.28 <sup>b</sup>  | 5.53 ± 0.33 <sup>a</sup>  |
| C22:0                 | 0.42 ± 0.17               | 0.51 ± 0.12               | 0.54 ± 0.03               | 0.57 ± 0.05               | 0.48 ± 0.07               | 0.51 ± 0.09               |
| C20:3n-6              | 0.95 ± 0.23 <sup>b</sup>  | 0.55 ± 0.10 <sup>a</sup>  | 0.43 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.53 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.54 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.70 ± 0.12 <sup>a</sup>  |
| C20:4n-6              | 8.19 ± 1.45 <sup>a</sup>  | 6.62 ± 0.74 <sup>b</sup>  | 8.04 ± 0.14 <sup>a</sup>  | 7.39 ± 1.85 <sup>b</sup>  | 7.05 ± 0.89 <sup>b</sup>  | 5.92 ± 0.36 <sup>c</sup>  |
| C22:2                 | 0.15 ± 0.10               | 0.11 ± 0.01               | 0.07 ± 0.01               | 0.14 ± 0.02               | 0.12 ± 0.01               | 0.17 ± 0.04               |
| C20:5EPa              | 0.15 ± 0.08 <sup>c</sup>  | 0.12 ± 0.04 <sup>c</sup>  | 0.13 ± 0.01 <sup>c</sup>  | 0.19 ± 0.07 <sup>c</sup>  | 0.30 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.42 ± 0.08 <sup>a</sup>  |
| C24:0                 | 0.43 ± 0.11               | 0.37 ± 0.06               | 0.29 ± 0.03               | 0.36 ± 0.05               | 0.34 ± 0.04               | 0.41 ± 0.07               |
| C24:1                 | 1.71 ± 0.24 <sup>a</sup>  | 0.98 ± 0.28 <sup>a</sup>  | 0.72 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.83 ± 0.18 <sup>b</sup>  | 0.93 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 1.25 ± 0.26 <sup>a</sup>  |
| C22:4                 | 0.16 ± 0.02               | 0.15 ± 0.03               | 0.13 ± 0.05               | 0.18 ± 0.10               | 0.18 ± 0.04               | 0.13 ± 0.04               |
| C22:5DPa              | 0.10 ± 0.04 <sup>c</sup>  | 0.12 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.13 ± 0.06 <sup>c</sup>  | 0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.49 ± 0.03 <sup>a</sup>  |
| C22:6DHa              | 7.01 ± 0.21 <sup>c</sup>  | 6.85 ± 0.30 <sup>c</sup>  | 6.95 ± 0.76 <sup>c</sup>  | 7.70 ± 0.97 <sup>c</sup>  | 8.09 ± 0.33 <sup>b</sup>  | 8.78 ± 0.92 <sup>a</sup>  |
| SFA                   | 53.69 ± 1.57 <sup>b</sup> | 55.01 ± 2.23 <sup>a</sup> | 53.98 ± 2.65 <sup>b</sup> | 51.25 ± 1.56 <sup>c</sup> | 50.96 ± 1.90 <sup>c</sup> | 45.77 ± 1.89 <sup>d</sup> |
| MUFA                  | 19.87 ± 1.36 <sup>c</sup> | 21.22 ± 1.25 <sup>b</sup> | 21.81 ± 1.21 <sup>b</sup> | 22.06 ± 1.38 <sup>b</sup> | 22.76 ± 1.09 <sup>b</sup> | 24.38 ± 1.11 <sup>a</sup> |
| PUFA                  | 24.96 ± 2.45 <sup>b</sup> | 21.11 ± 2.37 <sup>c</sup> | 21.20 ± 2.89 <sup>c</sup> | 22.80 ± 2.16 <sup>c</sup> | 24.25 ± 1.09 <sup>b</sup> | 27.96 ± 1.77 <sup>a</sup> |
| n-6                   | 19.22 ± 1.81 <sup>c</sup> | 22.15 ± 3.24 <sup>b</sup> | 24.29 ± 3.65 <sup>a</sup> | 24.66 ± 2.89 <sup>a</sup> | 24.79 ± 1.47 <sup>a</sup> | 24.83 ± 1.25 <sup>a</sup> |
| n-3                   | 8.39 ± 1.01 <sup>c</sup>  | 8.20 ± 0.79 <sup>c</sup>  | 8.25 ± 0.82 <sup>c</sup>  | 9.26 ± 0.67 <sup>c</sup>  | 10.91 ± 0.38 <sup>b</sup> | 14.01 ± 0.73 <sup>a</sup> |
| n-6/n-3               | 2.29 ± 0.56 <sup>c</sup>  | 2.70 ± 0.49 <sup>b</sup>  | 2.94 ± 0.33 <sup>a</sup>  | 2.66 ± 0.41 <sup>b</sup>  | 2.27 ± 0.22 <sup>c</sup>  | 1.77 ± 0.50 <sup>d</sup>  |

表5结果表明,高脂饮食能够显著降低大鼠肾组织n-3脂肪酸的含量( $P < 0.05$ ),摄食花生油对n-3脂肪酸含量影响不显著,不同ALA油脂作用显著( $P < 0.05$ ),但13%、27%ALA-BO组差异不显著。其中,不同ALA-BO组ALA含量分别比高脂组增加170%、290%和810%,各试验组EPA含量差

异不显著,DPA含量分别增加46%、66%和86%,DHA含量分别增加15%、43%和56%,其中13%和27%ALA-BO组ALA、DPA含量差异不显著,而27%和55%ALA-BO组DHA差异显著( $P < 0.05$ )。

表5 肾组织脂肪酸组成

Table 5 The fatty acid composition of rats in kidney

| 脂肪酸组成(%)<br>Fatty acid<br>composition (%) | 正常组<br>Control           | 高脂组<br>HF <sup>d</sup>   | 花生油组<br>PO               | 13%ALA<br>油脂组<br>13%ALA-BO | 27%ALA<br>油脂组<br>27%ALA-BO | 55%ALA<br>油脂组<br>55%ALA-BO |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| C14:0                                     | 0.63 ± 0.09              | 0.57 ± 0.12              | 0.50 ± 0.16              | 0.55 ± 0.12                | 0.40 ± 0.03                | 0.43 ± 0.03                |
| C14:1                                     | 0.22 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.10 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.08 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>   |
| C15:0                                     | 0.55 ± 0.12              | 0.29 ± 0.03              | 0.21 ± 0.07              | 0.10 ± 0.02                | 0.33 ± 0.02                | 0.18 ± 0.05                |

|                       |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C16:0                 | 25.28 ± 1.13 <sup>b</sup> | 30.08 ± 0.72 <sup>a</sup> | 24.15 ± 1.43 <sup>b</sup> | 24.01 ± 1.52 <sup>b</sup> | 23.38 ± 1.19 <sup>b</sup> | 23.19 ± 2.06 <sup>b</sup> |
| C16:1                 | 0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.15 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>  |
| C16:1T                | 0.89 ± 0.11               | 1.00 ± 0.30               | 0.86 ± 0.14               | 0.78 ± 0.22               | 0.57 ± 1.13               | 0.61 ± 0.17               |
| C17:0                 | 0.12 ± 0.03               | 0.16 ± 0.01               | 0.34 ± 0.07               | 0.07 ± 0.02               | 0.11 ± 0.04               | 0.11 ± 0.03               |
| C18:0                 | 15.73 ± 1.24 <sup>b</sup> | 17.71 ± 1.32 <sup>a</sup> | 17.59 ± 3.38 <sup>a</sup> | 17.09 ± 1.54 <sup>a</sup> | 17.34 ± 1.46 <sup>a</sup> | 17.13 ± 2.86 <sup>a</sup> |
| C18:1-9t              | 0.29 ± 0.10               | 1.27 ± 0.08               | 0.63 ± 0.21               | 0.64 ± 0.14               | 0.44 ± 0.18               | 0.56 ± 0.19               |
| C18:1-11t             | 0.27 ± 0.04               | 0.18 ± 0.05               | 0.42 ± 0.16               | 0.45 ± 0.12               | 0.30 ± 0.07               | 0.43 ± 0.11               |
| C18:1                 | 16.93 ± 1.07 <sup>c</sup> | 12.38 ± 4.07 <sup>b</sup> | 16.11 ± 4.51 <sup>a</sup> | 16.52 ± 1.70 <sup>a</sup> | 16.92 ± 1.51 <sup>a</sup> | 17.17 ± 2.69 <sup>a</sup> |
| C18:1-11 <sup>c</sup> | 4.04 ± 0.33               | 6.01 ± 0.56               | 4.04 ± 1.07               | 5.15 ± 0.61               | 6.44 ± 1.10               | 5.26 ± 0.30               |
| C18:2TT               | 0.29 ± 0.07               | 0.13 ± 0.05               | 0.21 ± 0.14               | 0.22 ± 0.10               | 0.29 ± 0.08               | 0.29 ± 0.11               |
| C18:2 <sub>n-6</sub>  | 12.54 ± 1.31 <sup>a</sup> | 10.22 ± 1.34 <sup>c</sup> | 11.66 ± 2.54 <sup>b</sup> | 12.10 ± 1.03 <sup>a</sup> | 12.51 ± 2.18 <sup>a</sup> | 12.95 ± 1.98 <sup>a</sup> |
| C18:3 <sub>n-6</sub>  | 0.06 ± 0.01               | 0.05 ± 0.01               | 0.07 ± 0.02               | 0.06 ± 0.01               | 0.06 ± 0.01               | 0.06 ± 0.01               |
| C20:0                 | 0.06 ± 0.01               | 0.16 ± 0.01               | 0.14 ± 0.02               | 0.13 ± 0.01               | 0.09 ± 0.03               | 0.07 ± 0.01               |
| C18:3 <sub>n-3</sub>  | 0.19 ± 0.07 <sup>c</sup>  | 0.10 ± 0.05 <sup>c</sup>  | 0.11 ± 0.06 <sup>c</sup>  | 0.27 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.39 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.91 ± 0.29 <sup>a</sup>  |
| C20:2                 | 1.68 ± 0.24               | 1.44 ± 0.24               | 2.50 ± 0.44               | 2.47 ± 0.74               | 2.16 ± 0.28               | 2.50 ± 1.34               |
| C22:0                 | 0.15 ± 0.03               | 0.08 ± 0.03               | 0.17 ± 0.03               | 0.09 ± 0.02               | 0.10 ± 0.04               | 0.13 ± 0.08               |
| C20:3 <sub>n-6</sub>  | 0.17 ± 0.04               | 0.19 ± 0.03               | 0.15 ± 0.03               | 0.20 ± 0.06               | 0.18 ± 0.05               | 0.23 ± 0.14               |
| C20:4 <sub>n-6</sub>  | 17.31 ± 1.57 <sup>a</sup> | 16.16 ± 3.33 <sup>b</sup> | 16.68 ± 3.16 <sup>b</sup> | 15.29 ± 2.03 <sup>c</sup> | 15.08 ± 1.13 <sup>c</sup> | 14.77 ± 0.58 <sup>c</sup> |
| C22:2                 | 0.15 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.04 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| C20:5EPa              | 0.07 ± 0.01               | 0.03 ± 0.01               | 0.09 ± 0.03               | 0.10 ± 0.04               | 0.09 ± 0.02               | 0.09 ± 0.03               |
| C24:0                 | 1.21 ± 0.20 <sup>a</sup>  | 0.71 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.88 ± 0.13 <sup>b</sup>  | 0.76 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 0.82 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 0.82 ± 0.09 <sup>b</sup>  |
| C24:1                 | 0.40 ± 0.11               | 0.18 ± 0.05               | 0.33 ± 0.19               | 0.16 ± 0.05               | 0.24 ± 0.04               | 0.39 ± 0.11               |
| C22:4                 | 0.12 ± 0.03               | 0.18 ± 0.04               | 0.14 ± 0.02               | 0.14 ± 0.02               | 0.12 ± 0.03               | 0.13 ± 0.06               |
| C22:5DPa              | 0.15 ± 0.08 <sup>c</sup>  | 0.15 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.13 ± 0.06 <sup>c</sup>  | 0.22 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.25 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.28 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| C22:6DHa              | 0.91 ± 0.25 <sup>b</sup>  | 0.85 ± 0.32 <sup>c</sup>  | 0.90 ± 0.15 <sup>c</sup>  | 0.98 ± 0.17 <sup>b</sup>  | 1.22 ± 0.10 <sup>a</sup>  | 1.32 ± 0.11 <sup>a</sup>  |
| SFA                   | 43.73 ± 2.46 <sup>b</sup> | 49.76 ± 3.28 <sup>a</sup> | 43.98 ± 2.09 <sup>b</sup> | 42.80 ± 2.87 <sup>c</sup> | 42.57 ± 2.01 <sup>c</sup> | 42.06 ± 3.05 <sup>c</sup> |
| MUFA                  | 23.18 ± 1.22 <sup>d</sup> | 21.31 ± 1.03 <sup>c</sup> | 22.6 ± 2.66 <sup>c</sup>  | 23.92 ± 3.45 <sup>b</sup> | 24.17 ± 2.14 <sup>a</sup> | 24.67 ± 1.82 <sup>a</sup> |
| PUFA                  | 18.71 ± 2.03 <sup>a</sup> | 17.41 ± 2.10 <sup>b</sup> | 17.99 ± 2.89 <sup>b</sup> | 16.79 ± 1.77 <sup>b</sup> | 16.84 ± 3.04 <sup>b</sup> | 16.7 ± 1.78 <sup>b</sup>  |
| <i>n-6</i>            | 30.08 ± 2.56 <sup>a</sup> | 26.62 ± 2.76 <sup>c</sup> | 28.56 ± 2.33 <sup>b</sup> | 27.65 ± 1.67 <sup>b</sup> | 27.83 ± 1.89 <sup>b</sup> | 28.01 ± 1.72 <sup>b</sup> |
| <i>n-3</i>            | 1.32 ± 0.32 <sup>b</sup>  | 1.13 ± 0.17 <sup>c</sup>  | 1.23 ± 0.26 <sup>c</sup>  | 1.57 ± 0.21 <sup>b</sup>  | 1.95 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 2.60 ± 0.22 <sup>a</sup>  |
| <i>n-6/n-3</i>        | 22.78 ± 2.37 <sup>a</sup> | 23.56 ± 3.02 <sup>b</sup> | 23.21 ± 2.25 <sup>b</sup> | 17.61 ± 2.32 <sup>b</sup> | 14.27 ± 1.16 <sup>b</sup> | 10.77 ± 1.94 <sup>b</sup> |

表6结果表明,高脂饮食能够使大鼠心组织 *n-3* 脂肪酸含量显著降低 ( $P < 0.05$ ),而花生油和不同 ALA-BO 能够显著增加 *n-3* 脂肪酸含量 ( $P < 0.05$ )。其中,ALA 含量分别比高脂组增加 33%、100%、266% 和 733%,各试验组 EPA 含量差异不

显著,DPA 含量分别增加 76%、96%、111% 和 158%,DHA 含量分别增加 25%、51%、75% 和 80%,且组间差异显著 ( $P < 0.05$ ),DPA 含量组间差异不显著,27% 和 55% ALA-BO 组 DHA 含量差异不显著。

表6 心组织脂肪酸组成

Table 6 The fatty acid composition of rats in heart

| 脂肪酸组成(%)<br>Fatty acid<br>composition (%) | 正常组<br>Control           | 高脂组<br>HF <sup>d</sup>   | 花生油组<br>PO               | 13% ALA<br>油脂组<br>13% ALA-BO | 27% ALA<br>油脂组<br>27% ALA-BO | 55% ALA<br>油脂组<br>55% ALA-BO |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| C14:0                                     | 0.27 ± 0.08 <sup>a</sup> | 0.19 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.11 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>     | 0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>     |

|                          |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C14:1                    | 0.46 ± 0.13               | 0.76 ± 0.18               | 0.84 ± 0.15               | 0.90 ± 0.10               | 1.28 ± 0.15               | 0.75 ± 0.43               |
| C16:0                    | 14.43 ± 1.70 <sup>c</sup> | 17.21 ± 3.29 <sup>a</sup> | 15.71 ± 1.12 <sup>b</sup> | 14.04 ± 1.32 <sup>c</sup> | 13.60 ± 0.78 <sup>c</sup> | 13.09 ± 1.16 <sup>c</sup> |
| C16:1                    | 0.55 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 0.41 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 0.10 ± 0.05 <sup>c</sup>  | 0.21 ± 0.16 <sup>b</sup>  | 0.09 ± 0.01 <sup>c</sup>  | 0.13 ± 0.04 <sup>c</sup>  |
| C17:0                    | 0.58 ± 0.18               | 0.82 ± 0.22               | 0.90 ± 0.28               | 0.74 ± 0.10               | 1.09 ± 0.22               | 0.80 ± 0.15               |
| C18:0                    | 25.65 ± 1.50 <sup>c</sup> | 29.94 ± 3.02 <sup>a</sup> | 27.33 ± 2.59 <sup>b</sup> | 26.24 ± 2.42 <sup>b</sup> | 25.46 ± 1.06 <sup>c</sup> | 24.26 ± 2.10 <sup>c</sup> |
| C18:1-9t                 | 0.11 ± 0.05 <sup>c</sup>  | 0.62 ± 0.18 <sup>a</sup>  | 0.13 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.23 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.15 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| C18:1-11t                | 0.10 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.53 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.19 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.16 ± 0.09 <sup>b</sup>  |
| C18:1                    | 9.98 ± 0.93               | 7.13 ± 1.76               | 8.00 ± 4.67               | 7.86 ± 0.69               | 7.40 ± 0.59               | 7.04 ± 0.97               |
| C18:1-11 <sup>c</sup>    | 3.43 ± 0.10               | 2.44 ± 0.51               | 4.45 ± 0.96               | 2.78 ± 0.81               | 2.77 ± 0.14               | 3.01 ± 0.10               |
| C18:2TT                  | 0.15 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 0.33 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.15 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.17 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>  | 0.12 ± 0.08 <sup>c</sup>  |
| C18:2 <i>n</i> -6        | 16.02 ± 0.70 <sup>a</sup> | 9.39 ± 1.61 <sup>c</sup>  | 12.33 ± 1.23 <sup>b</sup> | 12.55 ± 1.08 <sup>b</sup> | 13.65 ± 1.48 <sup>b</sup> | 14.68 ± 1.48 <sup>b</sup> |
| C18:3 <i>n</i> -6        | 0.13 ± 0.02               | 0.10 ± 0.01               | 0.14 ± 0.05               | 0.11 ± 0.01               | 0.08 ± 0.03               | 0.12 ± 0.05               |
| C18:3 <i>n</i> -3        | 0.11 ± 0.09 <sup>c</sup>  | 0.06 ± 0.02 <sup>d</sup>  | 0.08 ± 0.02 <sup>d</sup>  | 0.12 ± 0.03 <sup>c</sup>  | 0.22 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 0.50 ± 0.11 <sup>a</sup>  |
| C20:1                    | 0.08 ± 0.04               | 0.10 ± 0.07               | 0.12 ± 0.02               | 0.11 ± 0.03               | 0.05 ± 0.01               | 0.10 ± 0.04               |
| C20:2                    | 0.26 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 2.46 ± 0.40 <sup>a</sup>  | 0.36 ± 0.13 <sup>b</sup>  | 0.68 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 0.37 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.76 ± 0.08 <sup>b</sup>  |
| C22:0                    | 0.10 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.08 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.16 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.12 ± 0.08 <sup>b</sup>  |
| C20:3 <i>n</i> -6        | 0.13 ± 0.03               | 0.15 ± 0.08               | 0.13 ± 0.02               | 0.21 ± 0.04               | 0.09 ± 0.01               | 0.16 ± 0.11               |
| C20:4 <i>n</i> -6        | 17.29 ± 1.14 <sup>b</sup> | 16.02 ± 2.22 <sup>c</sup> | 18.88 ± 2.53 <sup>a</sup> | 18.83 ± 1.50 <sup>a</sup> | 19.12 ± 1.47 <sup>a</sup> | 19.23 ± 1.64 <sup>a</sup> |
| C22:2                    | 0.03 ± 0.01               | 0.20 ± 0.02               | 0.04 ± 0.01               | 0.04 ± 0.01               | 0.02 ± 0.01               | 0.04 ± 0.02               |
| C20:5EPa                 | 0.08 ± 0.02               | 0.07 ± 0.02               | 0.07 ± 0.01               | 0.08 ± 0.01               | 0.08 ± 0.01               | 0.09 ± 0.01               |
| C22:3                    | 0.56 ± 0.12               | 0.66 ± 0.11               | 0.84 ± 0.22               | 0.54 ± 0.16               | 0.71 ± 0.15               | 0.67 ± 1.18               |
| C24:1                    | 0.13 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 0.40 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.16 ± 0.03 <sup>b</sup>  |
| C22:4                    | 0.52 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 1.99 ± 0.56 <sup>a</sup>  | 2.68 ± 0.50 <sup>a</sup>  | 2.18 ± 0.33 <sup>a</sup>  | 2.22 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 2.11 ± 0.25 <sup>a</sup>  |
| C22:5DPa                 | 1.48 ± 0.16 <sup>b</sup>  | 0.80 ± 0.19 <sup>c</sup>  | 1.41 ± 0.26 <sup>b</sup>  | 1.57 ± 0.21 <sup>a</sup>  | 1.69 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 2.07 ± 0.20 <sup>a</sup>  |
| C22:6DHa                 | 8.57 ± 1.28 <sup>b</sup>  | 5.89 ± 1.37 <sup>c</sup>  | 7.40 ± 2.31 <sup>b</sup>  | 8.93 ± 0.88 <sup>b</sup>  | 10.31 ± 0.25 <sup>a</sup> | 10.60 ± 0.46 <sup>a</sup> |
| SFA                      | 41.03 ± 2.17 <sup>c</sup> | 48.60 ± 3.22 <sup>a</sup> | 44.13 ± 2.70 <sup>b</sup> | 41.30 ± 2.56 <sup>c</sup> | 40.31 ± 3.10 <sup>c</sup> | 38.40 ± 1.90 <sup>c</sup> |
| MUFA                     | 14.84 ± 1.12 <sup>b</sup> | 12.39 ± 1.21 <sup>b</sup> | 13.88 ± 1.19 <sup>a</sup> | 12.46 ± 2.43 <sup>b</sup> | 11.97 ± 1.23 <sup>b</sup> | 11.54 ± 2.09 <sup>b</sup> |
| PUFA                     | 45.83 ± 3.70 <sup>b</sup> | 38.12 ± 2.55 <sup>c</sup> | 44.51 ± 2.43 <sup>b</sup> | 46.01 ± 2.09 <sup>b</sup> | 48.67 ± 2.62 <sup>b</sup> | 51.15 ± 2.50 <sup>a</sup> |
| <i>n</i> -6              | 33.57 ± 2.01 <sup>a</sup> | 25.66 ± 1.78 <sup>b</sup> | 31.48 ± 1.86 <sup>a</sup> | 31.70 ± 2.08 <sup>a</sup> | 32.94 ± 2.27 <sup>a</sup> | 34.19 ± 2.29 <sup>a</sup> |
| <i>n</i> -3              | 10.24 ± 0.78 <sup>b</sup> | 6.82 ± 0.69 <sup>d</sup>  | 8.96 ± 0.62 <sup>c</sup>  | 10.70 ± 0.56 <sup>b</sup> | 12.30 ± 1.01 <sup>a</sup> | 13.26 ± 0.88 <sup>a</sup> |
| <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 | 3.27 ± 0.56 <sup>b</sup>  | 3.76 ± 0.44 <sup>a</sup>  | 3.51 ± 0.67 <sup>a</sup>  | 2.96 ± 0.32 <sup>b</sup>  | 2.67 ± 0.33 <sup>c</sup>  | 2.57 ± 0.45 <sup>c</sup>  |

## 2.2 不同 ALA 含量油脂对高脂模型大鼠组织 *n*-6 脂肪酸组成的影响

与正常组相比,高脂组大鼠血浆、肝、肾及心组织 C18:2 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ),而花生油和不同 ALA-BO 能够增加血浆、肝、肾及心组织 C18:2 含量,但对脑组织 C18:2 含量无显著影响。不同脂肪酸组成膳食对大鼠各组织 C18:3 (*n*-6) 和 C20:3 (*n*-6) 影响不显著。不同 ALA 油脂能够降低血浆 C20:4 含量,分别比花生油组降低 26%、53% 和 58%,但对肝组织 C20:4 含量无影响。不同 ALA-

BO 组大鼠脑组织 C20:4 (*n*-6) 含量也显著降低,分别比花生油组降低 8%、12% 和 26%,其中 13%、27% ALA-BO 组差异不显著。除正常组外,其余各组肾组织 C20:4 含量也显著降低 ( $P < 0.05$ ),而不同 ALA-BO 组 C20:4 含量比花生油组降低 8%、9% 和 11%,但组间差异不显著。与高脂组相比,花生油及 ALA-BO 组心组织 C20:4 含量却显著增加 ( $P < 0.05$ )。

试验结果表明,高脂饮食能够增加大鼠组织 *n*-6/*n*-3 比例,而增加 ALA 摄入量,*n*-6/*n*-3 比例显著



降低,其中血浆和肝组织降低最为显著。

### 2.3 组织 $n-3$ 脂肪酸含量与膳食 ALA 的相关性分析

试验结果表明,除肾和心组织 EPA 外,大鼠各组织中 ALA、EPA、DPA 及 DHA 含量与膳食中 ALA

含量均具有相关性,因此可以通过膳食补充 ALA 及富含 ALA 油脂来增加组织中多不饱和脂肪酸的含量。

表 7 组织  $n-3$  脂肪酸含量与膳食 ALA 的相关性分析

Table 7 The correlation analysis of dietary ALA and tissue  $n-3$  fatty acid composition of rats

| 血浆<br>Plasm <sup>a</sup> | 相关系数 $\gamma$            |            |                          |            |                          |             |                          |            |                          |
|--------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|-------------|--------------------------|------------|--------------------------|
|                          | 膳食 ALA<br>Dietary<br>ALA | 肝<br>Liver | 膳食 ALA<br>Dietary<br>ALA | 脑<br>Brain | 膳食 ALA<br>Dietary<br>ALA | 肾<br>Kidney | 膳食 ALA<br>Dietary<br>ALA | 心<br>Heart | 膳食 ALA<br>Dietary<br>ALA |
| ALa                      | 0.960 **                 | ALa        | 0.741 *                  | ALa        | 0.973 **                 | ALa         | 0.875 **                 | ALa        | 0.928 **                 |
| EPa                      | 0.809 **                 | EPa        | 0.794 *                  | EPa        | 0.857 **                 | EPa         | -0.138                   | EPa        | 0.472                    |
| DPa                      | 0.781 *                  | DPa        | 0.698 *                  | DPa        | 0.968 **                 | DPa         | 0.701 *                  | DPa        | 0.807 **                 |
| DHa                      | 0.689 *                  | DHa        | 0.293                    | DHa        | 0.566                    | DHa         | 0.731 *                  | DHa        | 0.710 *                  |

注: \* 表示组织  $n-3$  脂肪酸与膳食  $n-3$  脂肪酸具有显著相关性, \*\* 表示组织  $n-3$  脂肪酸与膳食  $n-3$  脂肪酸具有极显著相关性。

Note: “\*” shows significant difference ( $P < 0.05$ ), “\*\*” shows very significant difference ( $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

### 3.1 膳食中 ALA 含量对组织中 $n-3$ 脂肪酸的影响具有组织特异性和类别特异性

本试验通过建立 Wistar 高脂大鼠模型,选取血浆、肝、脑、肾及心 5 种组织,比较了各组织脂肪酸组成之间的差异及与受试油脂肪酸组成之间的效应关系,最终分析了 ALA 及其代谢产物 EPA、DPA 及 DHA 在各组织中累积和迁移规律,为阐明 ALA 心脑血管保护作用在脂肪酸代谢上的作用机制提供理论依据。

试验结果表明,增加膳食中 ALA 含量能够显著增加 ALA 在高脂模型大鼠血浆、肝、脑、肾及心组织中的累积,但增加具有组织特异性,肝组织中 ALA 含量增加较少,肾和心组织中 ALA 累积高于血浆、脑及肝组织。这可能是因为肝脏是脂肪酸  $\beta$ -氧化最活跃的组织,Cunnane SC 等<sup>[7]</sup>研究表明,摄入的富含 PUFA 油脂中 85% ALA 通过  $\beta$ -氧化被分解。肝和脑组织中 EPA 含量增加较显著,而肾和心组织中 EPA 含量不变,也在一定程度上解释了 ALA 在心和肾组织中的累积。试验结果还表明,摄食富含 ALA 油脂后大鼠肝和脑组织中 DPA 含量的增加较其它组织显著,除心和肾组织外其它组织 DHA 含量增加不显著,这与 Zhong Fu 等<sup>[8]</sup>、Wiesenfeld PW 等<sup>[9]</sup>和研究结果一致。这是由于 ALA 转化为长链  $n-3$  脂肪酸 ( $n-3$  Long-chain polyunsaturated fatty acids,  $n-3$  LCPUFA) 受多种因素影响,亚油酸通过与 ALA 竞争  $\Delta 6$  去饱和酶而降低其转化率,此外

PUFA: SFA 的比例、EPA、DHA 和反式脂肪酸摄入量及膳食中蛋白质的含量及种类均影响 ALA 的转化率<sup>[10,11]</sup>。心组织 DHA 含量的增加对心肌梗塞、心律失常等具有治疗作用<sup>[12,13]</sup>。

总之,摄食 ALA 及富含 ALA 油脂能够增加组织中 ALA 及其代谢产物 EPA、DPA 和 DHA 在组织中累积,从而具有一定的生理活性效应。Erkkila AT<sup>[14]</sup>等研究表明,血浆脂质中  $n-3$  PUFA 含量增加与冠心病死亡相对风险降低相关。

### 3.2 增加膳食中 ALA 含量能够改变 $n-3$ 脂肪酸在组织中的分布规律

ALA 及其代谢产物在各组织中的分布规律具有组织特异性,对试验所测定的血浆、肝、脑、肾及心 5 个组织而言,ALA 在肝和脑组织中比例较大,占 30% ~ 50%,EPA 在血清中占 50% 左右,肝居于第二,为 20% 左右,DPA 在心脏中累积较多,占 50% 左右。而试验结果表明,通过增加膳食中 ALA 含量能够在一定程度上改善这一分布规律,使 ALA、EPA 和 DPA 向脑组织中迁移,13%、27% 和 55% ALA 油脂组大鼠脑组织 ALA 相对比例分别为 38%、44%、50%,EPA 分别为 14%、18%、21%,DPA 分别为 4%、8% 和 11%,这也可能是高 ALA 亚麻籽油和鱼油等能够促进脑的生长发育有关。

### 3.3 对其他脂肪酸的影响

增加膳食中 ALA 的摄入能够降低高脂模型大鼠组织中饱和脂肪酸的含量,增加 C18:1、C18:2 等不饱和脂肪酸的含量,组织中  $n-6/n-3$  比例却进一步降低,这对进一步促进 ALA 的降血脂活性具有积

极效应<sup>[15]</sup>。此外,摄入不同 ALA 油脂能够对组织 C20:4 产生较大的影响,除肝和心组织外,随着受试油中 ALA 含量的增加能够显著降低大鼠血浆、脑和肾组织 C20:4 含量,这些结果与<sup>[16]</sup>研究结果一致。C20:4 是合成前列腺素( prostaglandins),血栓烷素( thromboxanes)和白细胞三烯( leukotrienes)等二十碳衍生物的直接前体,这些生物活性物质对人体心血管系统及免疫系统具有十分重要的作用,因此 C20:4 对机体的重要性和 DHA 相当,因此摄食高 ALA 油脂对 C20:4 含量的影响需进一步研究。

总之,富含 ALA 含量的油脂能够增加组织中 ALA 及其代谢产物在组织中的含量,提高其在脑组织中的分布比例,这可能是 ALA 具有心脑血管保护作用 and 促进脑生长发育的作用机制之一。

#### 参考文献

- Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 fatty acids in health and disease: Part 1-cardiovascular disease and cancer. *J Med Food*, 2004, 7:387-401.
- Riediger ND, Othman R, Fitz E, et al. Low n-6:n-3 fatty acid ratio, with fish or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. *Eur J Nutr*, 2008, 47:153-160.
- Francois CA, Connor SL, Bolewicz LC, et al. Supplementing lactating women with flaxseed oil does not increase docosahexaenoic acid in their milk. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77:226-33.
- Harper CR, Edwards MC, Jacobson TA, et al. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr*, 2006, 136:83-87.
- Folch J, Les M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals. *J Biol Chem*, 1957, 226:497-509.
- Agren JJ, Julkunen A, Penttila I. Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *J Lipid Res*, 1992, 33:1871-1876.
- Cunnane SC, Anderson MJ. The majority of dietary linoleate in growing rats is  $\beta$ -oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr*, 1997, 127:146-152.
- Zhong Fu, Sinclair AJ. Increased  $\alpha$ -linolenic acid intake increases tissue  $\alpha$ -linolenic acid content and apparent oxidation with little effect on tissue docosahexaenoic acid in the guinea pig. *Lipids*, 2000, 35:395-400.
- Wiesenfeld PW, Babu US, Collins TFX, et al. Flaxseed increased  $\alpha$ -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food Chem Toxic*, 2003, 41:841-845.
- Emken EA, Adlof RO, Duval SM, et al. Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope-labeled oleic, linoleic, and linolenic acids by male subjects. *Lipids*, 1999, 34:785-791.
- Ratnayake WM, Sarwar G, Laffey P. Influence of dietary protein and fat on serum lipids and metabolism of essential fatty acids in rats. *Br J Nutr*, 1997, 78:459-467.
- McLennan PL. Relative effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am J Clin Nutr*, 1993, 57:207-212.
- McLennan PL, Bridle TM, Abeywardena MY, et al. Comparative efficacy of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in modulating ventricular fibrillation threshold in marmoset monkeys. *Am J Clin Nutr*, 1993, 58:666-669.
- Erkkila AT, Lichtenstein AH, Mozaffarian D, et al. Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80:626-632.
- Schwab US, Callaway JC, Erkkil? AT, et al. Effects of hempseed and flaxseed oils on the profile of serum lipids, serum total and lipoprotein lipid concentrations and haemostatic factors. *Eur J Nutr*, 2006, 45:470-477.
- Ander BP, Edel AL, Cullough R, et al. Distribution of omega-3 fatty acids in tissues of rabbits fed a flaxseed-supplemented diet. *Metab Clin Exp*, 2010, 59:620-627.

# 新型染料木素磺酸酯的前药判定与大鼠体内生物利用度

彭游<sup>1,2\*</sup>, 刘新强<sup>1</sup>, 邓泽元<sup>2</sup>

<sup>1</sup>九江学院化工学院, 九江 332005; <sup>2</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047

**摘要:** 为寻找染料木素(GE)新的前药, 采用建立的生物样品中药物浓度测定的液相色谱法对新型大豆异黄酮染料木素磺酸酯(GB)进行前药判定以及大鼠体内药物动力学研究, 以考察前药中染料木素的口服生物利用度是否改善。在大鼠体内药物代谢实验中, 灌胃给予GB的大鼠血浆中能检测到明显的GE。在临床前药物动力学实验中, 该前体静注给药和以40 mg/kg灌胃药后, GE在大鼠体内的动力学过程均符合一室模型。GB中GE的相对口服生物利用度为原药的110.9%。研究表明, 相对于原药GE, 前药中GE的相对口服生物利用度达到预期的改善, 该前药有进一步研究意义。

**关键词:** 染料木素; 磺酸酯; 前药; 药物动力学; 生物利用度

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Prodrug Decision of Novel Genistein Sulfonate and Its Bioavailability in Rats

PENG You<sup>1,2\*</sup>, LIU Xin-qiang<sup>1</sup>, DENG Ze-yuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Engineering, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract:** The oral bioavailability of genistein (GE) in its benzenesulfonate prodrug was studied in search for new drug. The plasma were collected at different points of time after the intragastric or intravenous administration of genistein benzenesulfonate (GB) 40 mg/kg to rats. The GB and GE contents in plasma were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The compartment model was fitted and pharma cokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1. The results indicated that the dynamic processes of GE was consistent with one compartment model after intragastric or intravenous administration of GB prodrug to rats. The relative oral bioavailability of GE in prodrug GB was 110.9%. In conclusion, the above results demonstrated that the oral bioavailability of GE in prodrug had been improved remarkably.

**Key words:** genistein; sulfonate; prodrug; pharmacokinetics; bioavailability

## Introduction

Soybean isoflavone is a class of secondary metabolite in soybean. In recent years the abundant researches indicated the soybean isoflavones in foods had many important physiological functions including preventing cancer, cardiovascular disease and the osteoporosis sickness, anti-oxidation, reducing the female menopause syndrome and the blood sugar, anti-senilly, etc<sup>[1-4]</sup>.

However, among the soybean isoflavones, GE includes three polar groups hydroxyl, its lipophilicity is weak. Simultaneously its hydroxyls formed the intermolecular hydrogen bond, its lattice energy is high, so its hydrophilicity is also weak. Only a small part of GE can be absorbed rapidly and metabolized to glucuronic acid glycosides in vivo, most were degraded and metabolized by microorganisms in the intestine. So, it has the first pass metabolism in the intestine<sup>[5]</sup>. Thus, the defect of solubility and the first pass effect causes its low bioavailability and biological activity. Until now it cannot be used widespread effectively in clinical<sup>[6]</sup>. To improve the oral bioavailability and pharmacological action of GE, our laboratory had designed and synthesized GB by the prodrug principle<sup>[7]</sup>. We hope that com-

Received May 5, 2011; Accepted October 8, 2011

Foundation Item: The authors acknowledge support from the National Natural Science Foundation of China (No. 81160412), the Natural Science Foundation of Jiangxi, China (No. 2010GZ0106) and the Science and Technology Item of the Education Department of Jiangxi Province (No. GJJ11626).

\* Corresponding author E-mail: trihydricid@126.com

found can radically improve solubilities and metabolic stabilities, increase its *in vivo* bioavailability and anti-cancer activity (Fig. 1). To isolate new prodrug that has a good affinity and high bioavailability, metabolism and pharmacokinetics of GB was studied in animals. If the original drug can be determined in plasma, the derivative is prodrug of GE. The pharmacokinetics of this prodrug corroborated was studied *in vivo*, to investigate whether its bioavailability was improved or not. Taking daidzein (DZ) as the internal standard, simultaneous determinations of GE and GB in biological samples were found by the HPLC method, and using the method to study *in vivo* metabolism and pharmacokinetics of GE and GB.

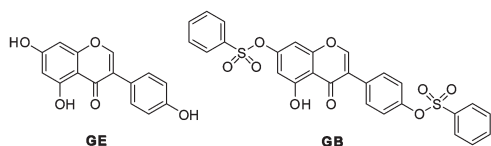


Fig. 1 Structure of GE and its derivative

## Materials and Methods

### Reagents and Materials

**Chemicals** GB was synthesised by our lab (the purity, bigger than 99%, HPLC determination)<sup>[7]</sup>. DZ and GE were provided by Shanxi Huike Botanical Development Co., Ltd. HPLC-grade methanol (produced by Merck Corp.) were used. The other chemicals were of analytical grade.

**Animals** Fifteen of Wistar rats with female/male (2/3) at 200-250 g of body weight, were provided by the Experimental Animal Center of Nanchang University (Certificate of Conformity: SCXK-2009-0009).

### Assay

Concentrations of drugs were determined in plasma using a RP-HPLC method. Analysis was performed on an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, a vacuum degasser, an automatic injector, and a variable wavelength detector. Separation was carried on a 5  $\mu$ L Venusil XBP-C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm, Agela Technologies, China) using 0.1% formic acid; methanol (1:1, v/v) as the mobile phase at a flow rate of

0.5 mL/min. The effluent was monitored at 262 nm with detector sensitivity of 2.00 AUFS, and the maximum absorbance waves for GB was determined at 262 nm with a DAD detector. Agilent Chromatographic Station was used. The column temperature was kept at 20  $^{\circ}$ C. The injected volume of the analyzed samples was 10  $\mu$ L.

### Plasma sample pretreatment

Following addition of 10  $\mu$ L DZ solution (100  $\mu$ g/mL) to 40  $\mu$ L of plasma sample, the sample was swirled for 3 min. And then, 1.0 mL of ethyl acetate were added to this sample. The sample was swirled for 3 min again and centrifuged at 14000 r/min for 10 min to separate layers at 4  $^{\circ}$ C. The organic layer was transferred to clean tube and evaporated to dryness under N<sub>2</sub>. The residue was dissolved in 200  $\mu$ L of methanol, and 10  $\mu$ L was injected into the HPLC system.

### Solution preparation

#### Administration of solution in drug metabolism

Taking minutely 50 mg of drug, added 0.1-0.2 mL dimethyl sulfoxide (DMSO), dissolved drug with ultrasound, diluted to 5.0 mL with PEG-400, so a concentration of 10 mg/mL solution of the drug was prepared that was used for oral administration of rats in the prodrug screening experiments. The solution was prepared just before use.

#### Administration of solution in pharmacokinetics

**Drug solution of intragastric administration:** Taking minutely 40 mg of GE (GB), added 0.1-0.2 mL DMSO, dissolved drug with ultrasound, diluted to 8.0 mL with PEG-400, so a concentration of 5 mg/mL solution of the drug was prepared that was used for oral administration of rats. The solution is prepared and used presently.

**Prodrug solution of intravenous administration:** Taking minutely 40 mg of GB, added 0.1-0.2 mL DMSO, dissolved drug with ultrasound, diluted to 2.0 mL with PEG-400, so a 20 mg/mL solution of the prodrug was prepared that was used for intravenous administration of rats. The solution was prepared just before use.

### The drug metabolism research *in vivo*

A healthy Wistar rat with weight 200-250 g was fasted 12 h and given access to water freely before administra-

tion. The drug GB was gavaged by 100 mg/kg dose to a rat. At 5, 10, 30 min and 1 h after administration, 0.1-0.2 mL of blood were collected through the orbital venous plexus respectively. After centrifuged chilled 10 min with 14000 r/min, blood was separated to plasma. Combining of 0-1 h plasma samples, 0.5 mL of the mixed sample were added 50  $\mu$ L of methanol. The rear operation accorded "1.3 Plasma sample pretreatment" method.

### The pharmacokinetics in rats

#### *Dosage regimen in pharmacokinetics experiments and sample collection*

**Intragastric administration:** Ten healthy Wistar rats, female/male (2/3), weight 200 ~ 250 g, were randomly divided into 2 treatment groups. All animals were fasted 12 h and accessed to water freely before administration. The drugs were gavaged by 40 mg/kg dose (dose volume of 10 mL/kg) respectively. At before administration (0 h), 0.08, 0.17, 0.33, 0.67, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h after administration, 0.1 mL of blood were collected through the orbital venous plexus to heparin tube respectively. After centrifuged chilled at 14000 r/min for 10 min, the upper layer plasma sample was preserved at the -70  $^{\circ}$ C until analysis.

**Intravenous medication:** Randomly five healthy Wistar rats, female/male (2/3), weight 200-250 g, were divided into a treatment group. All animals were fasted 12 h and accessed to water freely before administration. Respectively the prodrug was injected via the tail vein by 40 mg/kg dose (dose volume of 2 mL/kg). At before administration (0 h), 0.08, 0.17, 0.33, 0.67, 1,

2, 4, 6, 8, 12, 24 h after administration, 0.1 mL of blood were collected through the orbital venous plexus to heparin tube respectively. After centrifuged chilled at 14000 r/min for 10 min, the upper layer plasma sample were preserved at the -70  $^{\circ}$ C until analysis.

#### *Determination of drug concentration*

Flowing oral or intravenous administration of drugs, the concentration of the original medicine and the precursor in plasma sample were determined separately by the HPLC method which had been established.

## Data analysis

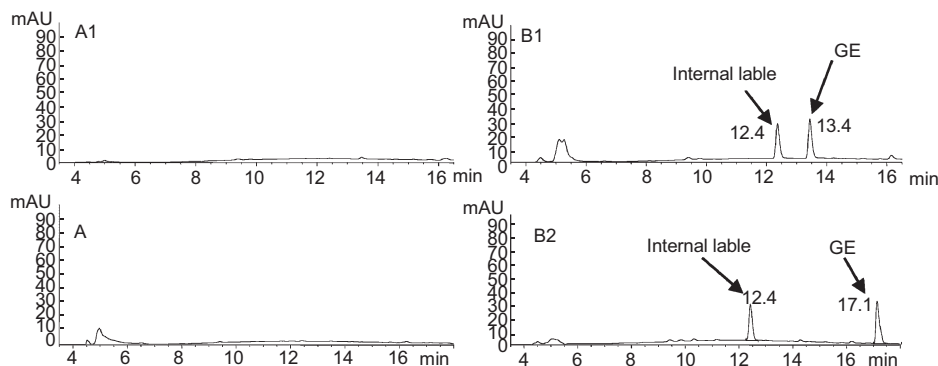
Under the standard curve established by each analysis group, drug concentration was calculated in plasma. Using DAS2.1.1 pharmacokinetic calculation software, the main pharmacokinetic parameters of drugs were calculated through the non-compartment model. The experimental data were statistically analyzed using *t* test. If  $P < 0.05$ , considered significant difference,  $P < 0.01$  considered highly significant difference and  $P > 0.05$  no significant difference.

## Results

### Analysis confirmed

#### *Method selectivity*

The rat blank plasma 50  $\mu$ L were treated according to "1.3 Blood sample pretreatment" method (without internal standard). 10  $\mu$ L was injected into HPLC system and chromatogram Fig. 2 (A) was obtained. The standard solution of the lower limit of quantification of GE, GB was added into a blank plasma respectively and



**Fig. 2 Representative chromatograms of GE and its derivative in plasma samples determined by HPLC method.**

(A) A blank plasma sample; (B) A blank plasma sample spiked with GE (B1), GB (B2) at the lowest limit of quantification.

operated according to the same method (with internal standard), so the chromatogram Fig. 2 (B) were obtained, in which the retention time of GE, GB, and DZ were 13.4, 17.1, 12.4 min respectively. The results showed that endogenous substances in plasma do not interfere with the determination of GE, GB and DZ, also the internal standard DZ and the tested samples do not interfere with each other. The analytic period of each sample was 26.5 min.

#### *Preparation of standard curve*

Adding 10  $\mu\text{L}$  of GE standard series solution to 40  $\mu\text{L}$  of rat blank plasma and eddying 3 min, so their concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were 0.02, 0.08, 0.25, 1.0, 2.5, 10, 40 respectively. The other operation accorded to "1.3 Blood sample pretreatment" method. To the concentration of analytes as abscissa, the ratio of peak area of analytes and internal standard as the vertical axis, carried on the return operation with the weighting least squares method, the standard curve linear regression equation obtained was  $Y = 2 \times 10^{-5} X + 0.0084$ ,  $R^2 = 0.9997$ . The linear range of the determination of concentration of GE in plasma was 0.020 ~ 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  according to the standard curve. The preparation of standard curve of the other drug accorded with GE in plasma. The straight linear regression equation of standard curve of GB in plasma:  $Y = 4 \times 10^{-5} X + 0.0231$ ,  $R^2 = 0.9994$ , the linear range is 0.025 ~ 25.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Adding 10  $\mu\text{L}$  of standard solution of GE to 40  $\mu\text{L}$  of blank plasma, the sample of the equivalent with GE 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was obtained. Carried on 5-sample analysis to the sample, based on the standard curve of the same day, the concentration of each sample was obtained. The determination of the lowest limit of quantification of GB accorded with GE. The results show that the lowest limit of quantification of GE and GB in plasma were 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.0125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with HPLC method respectively. The with-day precision (relative standard deviation, RSD) of GE and GB in lowest limit of quantification concentration was 13.7% and 14.3% respectively, and the accuracy (RE) in this concentration was 9.2% and -8.0% respectively.

#### *The precision and accuracy of methods*

Taking 40  $\mu\text{L}$  blank plasma, the low, medium and high

concentration of three quality control (QC) samples of GE were prepared according to "2.1.2 Preparation of standard Curve" method. Each concentration was completed for 6-sample analysis and determined for three days continuously, and their standard curve was prepared at the same time. Calculating the concentration of QC samples and comparing with the added concentration, the accuracy and precision of determination method of each component was sought. The determination method of RE and RSD of GB accorded with the determination of GE. Experimental data indicate that the with-day and between-day precision of GE, GB were less than 12%, and accuracy were at  $\pm 10\%$ . The determination method of compounds tested in plasma is in compliance with the relevant international standards requirements<sup>[8]</sup>.

#### *The extraction recovery of sample*

According to "2.1.2 Preparation of standard Curve" method, the QC samples of GE, GB and DZ were prepared and the extraction recovery of these samples were reviewed. The results showed that the extraction recovery of three kinds of concentration of components were over 70% in general, only the recovery of GE was 66.1% at high concentration.

#### *The stability of sample*

According to "2.1.2 Preparation of standard Curve" method, the low, medium and high concentration of three QC samples of GE, GB were prepared to study the stability of samples in three different preservation conditions. The results showed that the tested compounds were stable at the -70  $^{\circ}\text{C}$  during 30 d, as well as after three freezing-defrosting circulation. The plasma sample solutions extracted were stable after 24 h at room temperature. The RE of various concentration groups were 10.2% ~ 12.8%.

#### **The drug metabolism research in vivo**

After the Wistar rat was being oral administration of 100 mg/kg GB, its plasma samples were analysed using HPLC. The experimental results as shown in Fig. 3. The results showed that GE can be detected in rat plasma obviously after oral administration of GB to Wistar rats. Thus GB has the natures of prodrug.

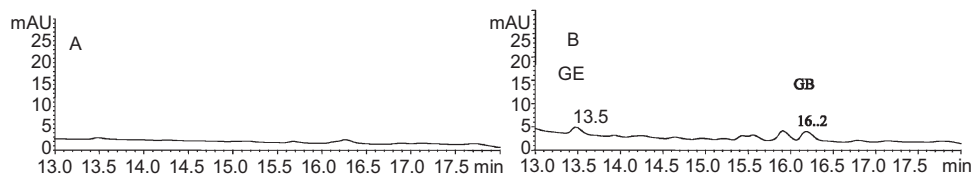


Fig. 3 HPLC of compounds in rat plasma after oral administration of 100 mg/kg GB to Wistar rats. (A-blank plasma.)

## Pharmacokinetics

### Pharmacokinetics of the parent drug

Pharmacokinetics of parent drug GE in rats *in vivo* have been studied in detail in the literature<sup>[9]</sup>. To accurately investigate its relative bioavailability in pro-drug, we have also studied its pharmacokinetics after its intragastric administration to rats under the same experimental conditions.

Following oral administration with 40 mg/kg GE to rats, its mean plasma concentration - time curve see Fig. 4. The blood drug concentration data were fitted with compartment model and pharmacokinetic parameters were calculated by the DAS 2.1.1. It found the dynamic processes of GE consistent with a compartment model after intragastric administration of GE to rats. The pharmacokinetic parameters respectively were:  $t_{1/2}$ ,  $8.18 \pm 5.30$  h;  $C_{max}$ ,  $3511 \pm 2408$  ng/mL;  $T_{max}$ ,  $1.20 \pm 1.60$  h;  $AUC_{0-1}$ ,  $15550 \pm 1649$  ng. h/mL;  $AUC_{0-\infty}$ ,  $18665 \pm 2879$  ng. h/mL. By the drug concentration-time curves and pharmacokinetic parameters, it can be found that the curve of GE appears double peaks after intragastric administration. The  $t_{max1}$ ,  $t_{max2}$  of these two peaks respectively were 10 min and 4 h, and the  $C_{max1}$  and  $C_{max2}$  respectively were 3029 and 1494 ng/mL. Half-life was 8.18 h or so, which showed that GE can be maintained a longer time in the blood and maintain

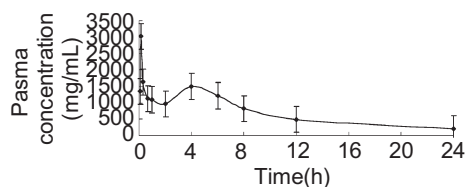


Fig. 4 The mean plasma concentration-time curve of GE following oral administration of 40 mg/kg GE to Wistar rats ( $n = 5$ ). Each value represents the mean  $\pm$  SD of five individual values.

its efficacy.

### Pharmacokinetics of prodrug

The pharmacokinetic behaviors were studied after intragastric or intravenous administration of GB to rats with established HPLC method. After oral and intravenous administration with 40 mg/kg dose of GB to rats, the mean plasma concentration-time curves of GE and GB see Fig. 5 and 6 respectively. Blood drug concentration data were fitted with compartment model by the DAS 2.1.1 software and pharmacokinetic parameters were calculated. It found that the dynamic processes of GE consistent with a compartment model after intragastric administration of GB to rats and that the dynamic processes of GE were consistent with a compartment model after intravenous administration of GB to rats. Pharmacokinetic parameters see Table 1.

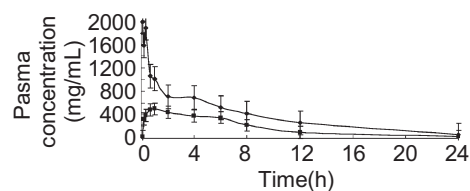


Fig. 5 The mean plasma concentration-time curves of GE ( $\blacklozenge$ ) and GB ( $\blacksquare$ ) following oral administration of 40 mg/kg GB to Wistar rats ( $n = 5$ ). Each value represents the mean  $\pm$  SD of five individual values.

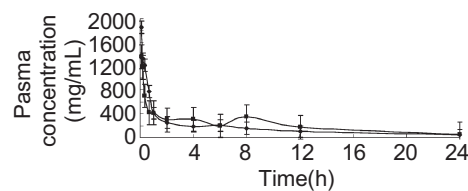


Fig. 6 The mean plasma concentration-time curves of GE ( $\blacklozenge$ ) and GB ( $\blacksquare$ ) following intravenous administration of 40 mg/kg GB to Wistar rats ( $n = 5$ ). Each value represents the mean  $\pm$  SD of five individual values.

**Table 1 The mean non-compartmental pharmacokinetic parameters of DZ and GB in Wistar rats after single oral and intravenous administration of 40 mg/kg GB ( $n = 5$ ). Each value represents the mean  $\pm$  SD for five individual values.**

| Parameters                  | Oral             |                 | Intravenous      |                 |
|-----------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                             | GE               | GB              | GE               | GB              |
| $t_{1/2}$ (h)               | 7.65 $\pm$ 3.59  | 5.09 $\pm$ 2.65 | 8.73 $\pm$ 5.63  | 6.53 $\pm$ 2.43 |
| $T_{max}$ (h)               | 0.15 $\pm$ 0.11  | 0.37 $\pm$ 0.36 |                  |                 |
| $C_{max}$ (ng/mL)           | 566 $\pm$ 281    | 2544 $\pm$ 639  |                  |                 |
| $AUC_{0-t}$ (ng. h/mL)      | 9121 $\pm$ 2404  | 4281 $\pm$ 2011 | 10775 $\pm$ 1013 | 5614 $\pm$ 1259 |
| $AUC_{0-\infty}$ (ng. h/mL) | 10161 $\pm$ 2098 | 4728 $\pm$ 1860 | 12148 $\pm$ 7791 | 6387 $\pm$ 2095 |

By the drug concentration - time curves of Fig. 5 and 6 and Table 1, it can be found that the  $T_{max}$  of GE is about 0.15 h after orally administration of GB to rats. It indicated that GB was rapidly absorbed in vivo and hydrolyzed by enzymes to the parent drug GE. By the drug concentration-time curves, it can be found that the curve of GB appears double peaks after intragastric administration of GB. The  $T_{max1}$ ,  $T_{max2}$  of these two peaks respectively were 5 min and 8 h. The  $C_{max1}$  and  $C_{max2}$  respectively were 1359 and 351 ng/mL. It may be related to that GB has large molecular weight or enterohepatic cycle. Comparison the plasma concentration - time curve area  $AUC_{0-\infty}$  of intravenous and intragastric administration of GB, a small difference between the two showed that first-pass effect would be very small when GB was being orally administration.

### Pharmacokinetic characteristics of prodrug

Following intragastric administration of prodrug, the  $T_{max}$ ,  $t_{1/2}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of GE that come from hydrolysis of prodrug GB see Table 1. The dose of prodrug converted into the equivalent of the same dose ( $D_{test}$ ) of GE by equimolar respectively. The relative bioavailability (Fr) of GE in prodrug was calculated by the formula (1), see Table 2.

$$Fr = \left[ \frac{(D_{standard} \times AUC_{test})}{(D_{test} \times AUC_{standard})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

\*:  $D_{standard}$ : the oral dose of the parent drug,  $D_{test}$ : the dose of the parent drug converted by oral prodrug.  $AUC_{standard}$ : the area under the concentration-time curve of parent drug flowing oral administration of parent drug,  $AUC_{test}$ : the area under the concentration-time curve of parent drug flowing oral administration of prodrug.

**Table 2 The relative bioavailability of GE after single oral administration of GB to Wistar rats.**

|                             | GE               | GE/GB            |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| $t_{1/2}$ (h)               | 8.18 $\pm$ 5.30  | 7.65 $\pm$ 3.59  |
| $T_{max}$ (h)               | 1.20 $\pm$ 1.60  | 0.15 $\pm$ 0.11  |
| $AUC_{0-\infty}$ (ng. h/mL) | 18665 $\pm$ 2879 | 10161 $\pm$ 2098 |
| Fr (%)                      | -                | 110.9            |

After intragastric administration of prodrug, the  $T_{max}$  of GE from the prodrug that was in one hour, is shorter than  $T_{max}$  of parent GE. Perhaps due to the large molecular weight, after intragastric administration of the prodrug GB, it occurred hepatobiliary circulation.

According to the relative bioavailability, drugs in rats release the amount of GE in the order for the GB > GE. It indicated that the kinetic behavior of GB compared with GE is known as a great improvement by proper structural modification.

After intragastric administration of the prodrug, the  $T_{max}$  of GE that come from the hydrolysis of the prodrug was shorter than  $T_{max}$  (1.2 h) of parent GE. After intragastric administration of GB, the half-live was 7.65 h. From Fig. 1, compared to the GE, 4' and 7-OH of GB all were substituted by benzene sulfonate group. Its lipophilic is enhanced, and it may be better to avoid the first pass effect. Its relative bioavailability is larger than GE in experiments. GB maybe have further research value.

## Discussion

The aim of design and synthesis of prodrugs was to solve the specific problems in pharmacy or pharmacology and give the useful nature to drugs. The main objective of sulfonic acid ester-modified of GE was to improve its absorption *in vivo* and block first-pass effect, thus to enhance its bioavailability and pharmacological



effects possibly. Polyhydroxy flavonoids, mainly referring to natural active product GE, DZ, etc., have different degree of pharmacokinetic shortcomings, mainly the first-pass effects, intestinal flora decomposition, fast elimination in vivo, etc., and the same time also poor water solubility in general<sup>[10,11]</sup>. The deficiencies in pharmacokinetics and poor water solubility are main reasons for their low bioavailability. So prodrug modification of such polyhydroxy flavonoids must start from improving these two areas weaknesses.

According to affecting factors of the drug bioavailability, combined with the physical and chemical properties of polyhydroxy flavonoids, as well as their basic transmission characteristic in vivo, the prodrug design for multi-hydroxyflavone was carried out mainly in lipophilic aspect. The big sulphonate group introduced in molecular could seal up its easily metabolized phenol hydroxyl, improve its solubility and amphipathicity, enable to have the good biomembrane endophilicity, increase the absorption rate, avoid the metabolism before circulation, and enhance the bioavailability.

This paper had carried on prodrug screening to the new sulphonate derivative of GE, and conducted the medicine dynamics research of the prodrug confirmed. The experiments indicated that the bioavailability of GE flowing oral administration of GB were better than that of GE following oral administration of GE. This explained that thinking of optimizing kinetic property of GE by sulphonate modification to enhance the oral bioavailability is successful. The novel sulfonic acid ester derivative was prodrug of GE that was confirmed by metabolism screening studies in rats. Its pharmacokinetic studies had showed that the prodrug GB had good oral bioavailability. The idea that we adopted the structural modification of the hydroxyl group of GE to optimize the pharmacokinetic properties, block first-pass metabolism and thus improve the oral bioavailability is

feasible.

## References

- 1 Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, *et al.* Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glucoside conjugates; antitumor isoflavones in soybean foods from American and asian diets. *J Agric Food Chem*, 1993, 41:1961-1967.
- 2 Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric*, 2000, 80:1044-1047.
- 3 Holder CL, Churchwell MI, Doerge DR. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J Agric Food Chem*, 1999, 47:3764-3770.
- 4 Huang J, Luo Q, Li XL, *et al.* Hyperglycemia Lowering Effect of Soybean Isoflavone (SI) on Alloxan-induced Diabetic Mice. *Food Sci*, 2004, 25:166-170.
- 5 Barne S, Sfakinos J, Coward L, *et al.* Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 401:87-100.
- 6 Andlauer W, Kolb J, Stehle P, *et al.* Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. *J Nutr*, 2000, 130:834-846.
- 7 Peng Y, Deng ZY, Lang SJ, *et al.* Preparation and crystal structure of genistein benzensulfonate prodrugs. *J Chem Res*, 2008, 10:555-558.
- 8 Shah VP, Midha KK, Findlay JW, *et al.* Bioanalytical method validationa revisit with a decade of progress. *Pharm Res*, 2000, 17:1551-1557.
- 9 Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, *et al.* Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77:411-419.
- 10 Hur HG, Lay JO, Jr Beger RD, *et al.* Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*, 2000, 174:422-428.
- 11 Hollman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl*, 1998, 20:237-248.

## 西南獐牙菜化学成分的研究

耿家玲<sup>2</sup>, 耿长安<sup>1</sup>, 陈纪军<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;<sup>2</sup>云南省食品药品检验所, 昆明 650011

**摘要:** 对龙胆科(Gentianaceae)獐牙菜属植物西南獐牙菜(*Swertia cincta*)进行化学成分研究, 从中分离鉴定了15个化合物, 包括5个裂环烯醚萜(苷), 2个三萜, 1个口山酮, 4个芳香酸(醇), 以及3个其它类成分。以上化合物分别为: 獐牙菜苦苷(*swertiamarin*, **1**), 龙胆苦苷(*gentiopicroside*, **2**), 红白金花内酯(*erythrocentaurin*, **3**), (-)龙胆内酯((-)-*gentiolactone*, **4**), *angelone* (**5**), 齐墩果酸(*oleanolic acid*, **6**), 3-表-蒲公英赛醇(3-*epi-taraxerol*, **7**), 当药醇苷(*swertianolin*, **8**), 间羟基苯甲醇(*m-hydroxybenzyl alcohol*, **9**), 邻苯二甲酸二甲酯(*dimethyl phthalate*, **10**), 邻苯二甲酸二异丁酯(*diisobutyl phthalate*, **11**), 3,4-二羟基苯甲酸(**12**)和正三十一烷醇(*n-hentriacontanol*, **13**),  $\beta$ -谷甾醇( *$\beta$ -sitosterol*, **14**)和胡萝卜苷(*daucosterol*, **15**)。其中化合物**4~5, 7, 9~13**和**15**为首次从西南獐牙菜中分离得到。

**关键词:** 西南獐牙菜; 龙胆科; 裂环烯醚萜; 三萜; 口山酮; 芳香酸(醇)

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Chemical constituents of *Swertia cincta*GENG Jia-ling<sup>2</sup>, GENG Chang-an<sup>1</sup>, CHEN Ji-jun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; <sup>2</sup>Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650204, China

**Abstract:** Fifteen compounds involving secoiridoids (glycosides), triterpenoids, xanthenes, aromatic acids (alcohols), aliphatic alcohols and steroids were isolated from *Swertia cincta*, which were characterized to be *swertiamarin* (**1**), *gentiopicroside* (**2**), *erythrocentaurin* (**3**), (-) *gentiolactone* (**4**), *angelone* (**5**), *oleanolic acid* (**6**), 3-*epi-taraxerol* (**7**), *swertianolin* (**8**), *m-hydroxybenzyl alcohol* (**9**), *dimethyl phthalate* (**10**), *diisobutyl phthalate* (**11**), 3,4-dihydroxybenzoic acid (**12**), *n-hentriacontanol* (**13**),  $\beta$ -*sitosterol* (**14**) and *daucosterol* (**15**). Compounds **4-5, 7, 9-13** and **15** were obtained from *Swertia cincta* for the first time.

**Key words:** *Swertia cincta*; Gentianaceae; secoiridoids; triterpenoids; xanthenes; aromatic acids (alcohols)

西南獐牙菜(*Swertia cincta* Burkill)又名圈纹獐牙菜,为龙胆科(Gentianaceae)獐牙菜属植物,一年生草本,主要分布于我国云南、四川、贵州等地<sup>[1,2]</sup>,具有清热解毒,利胆除湿等功效,民间将其作为青叶胆治疗黄疸型肝炎。药理活性研究表明,西南獐牙菜水提取物能够促进大鼠胆汁分泌,显示较好的保肝作用<sup>[3]</sup>。然而中国药典仅将其同属植物青叶胆(*Swertia mileensis*)收载作为抗肝炎药物<sup>[4]</sup>。目前国内学者已从西南獐牙菜中鉴定了14个化学成分,化合物类型涉及裂环烯醚萜苷,口山酮,黄酮,三萜

和甾体<sup>[5-8]</sup>。本研究组前期对其同属植物青叶胆进行了系统化学成分研究,从中分离得到一系列具有抗HBV活性的新奇骨架内酯和裂环烯醚萜二聚体苷<sup>[9]</sup>。为了阐明西南獐牙菜和青叶胆化学成分的差异,我们选取西南獐牙菜为研究对象进行化学成分研究。结果从西南獐牙菜中分离得到15个化合物,分别鉴定为:獐牙菜苦苷(**1**),龙胆苦苷(**2**),红白金花内酯(**3**),(-)龙胆内酯(**4**),*angelone* (**5**),齐墩果酸(**6**),3-表-蒲公英赛醇(**7**),当药醇苷(**8**),间羟基苯甲醇(**9**),邻苯二甲酸二甲酯(**10**),邻苯二甲酸二异丁酯(**11**),3,4-二羟基苯甲酸(**12**)和正三十一烷醇(**13**), $\beta$ -谷甾醇(**14**)和胡萝卜苷(**15**),其中,化合物**4~5, 7, 9~13**和**15**为首次从西南獐牙菜中分离得到。

收稿日期: 2011-03-29 接受日期: 2011-06-30

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(81025023)

\* 通讯作者 Tel: 86-871-5223265; E-mail: chenjj@mail.kib.ac.cn

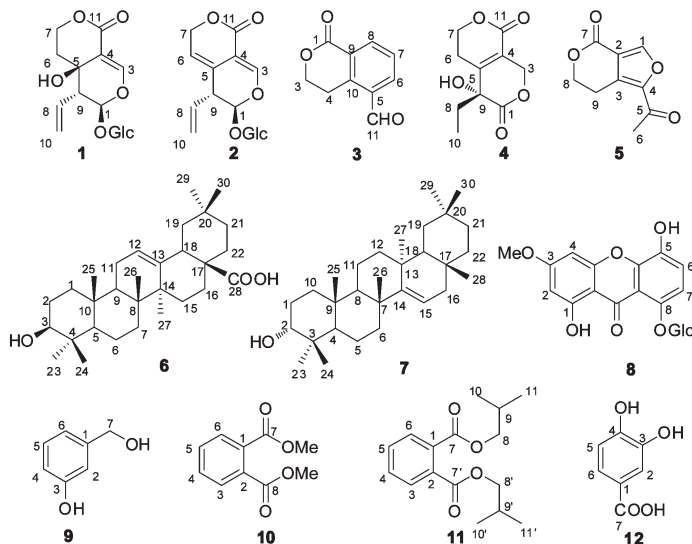


图1 化合物1~12的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-12

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

熔点用四川大学科学仪器厂生产的 XRC-1 型显微熔点仪测定,温度未校正;质谱(MS)用 API QSTAR Pulsar 四极杆飞行时间质谱仪和 AutoSpec Premier P776 三扇型双聚焦磁质谱仪测定;核磁共振谱( $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR)用 Bruker AM-400、DRX-500 和 BRUKER AVANCE III-600 型超导核磁共振波谱仪测定,以 TMS(四甲基硅烷)为内标;旋光用 Jasco P-1020 全自动旋光仪测定,柱色谱硅胶(200~300目)和薄层色谱硅胶(GF<sub>254</sub>)为青岛美高集团有限公司生产;Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司产品;西南獐牙菜于 2008 年 12 月采自云南楚雄,经中国科学院昆明植物所雷立功副研究员鉴定为 *Swertia cineta* Burkill.,标本(NO. 2008-11-3)存放于中国科学院昆明植物研究所抗病毒与天然药物化学研究组。

### 1.2 提取与分离

西南獐牙菜干燥全草(5.0 kg),粉碎后依次用 90% 和 50% 乙醇回流提取 3 次,每次用量 50.0 L,回流 2 h。合并 90% 和 50% 乙醇提取液,减压浓缩至小体积。浓缩液加水稀释至 20.0 L,依次用石油醚(10.0 L × 3)、乙酸乙酯(10.0 L × 3)和正丁醇(10.0 L × 3)萃取,减压回收溶剂得到石油醚萃取部分(25.0 g),乙酸乙酯萃取部分(155.0 g),正丁醇萃取部分(210.0 g)以及水部分(650.0 g)。乙酸

乙酯萃取部分(155.0 g)经硅胶柱(11.0 × 70.0 cm, 2.2 kg)层析,氯仿/甲醇(100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 0/100)梯度洗脱,经硅胶 TLC 检测合并相同流分,得到 7 个组分(A~G)。组分 A(7.0 g)经硅胶柱(3.0 × 50.0 cm, 200 g)层析,石油醚/丙酮(90/10~50/50)梯度洗脱,得到 3 个组分 A-1~A-3。组分 A-1(1.0 g)经多次硅胶柱(1.4 × 30.0 cm, 30.0 g)层析,石油醚/乙酸乙酯(90/10);氯仿/丙酮(98/2)和石油醚/丙酮(95/5)洗脱得到 **10**(70.0 mg), **11**(30.0 mg), **14**(50.0 mg)。组分 A-2(500.0 mg),经硅胶柱(1.4 × 23.0 cm, 20.0 g)层析,氯仿/丙酮(95/5)洗脱,得到 **7**(20.0 mg)。组分 B(5.5 g),经硅胶柱(2.0 × 50.0 cm, 150.0 g)层析,氯仿/丙酮(95/5~70/30)梯度洗脱,得到 5 个组分 B-1~B-5。组分 B-1(750.0 mg)经硅胶柱层析,石油醚/丙酮(90/10)洗脱,再经重结晶(甲醇)得到 **3**(380.0 mg), **5**(10 mg)和 **4**(10 mg)。组分 B-2(1.5 g)经过硅胶柱(1.4 × 30.0 cm, 30.0 g)层析,氯仿/丙酮(90/10~70/30)梯度洗脱,再通过多次柱层析, Sephadex LH-20(氯仿/甲醇 = 1/1)和硅胶柱(氯仿/甲醇 = 98/2)纯化,得到化合物 **6**(310.0 mg), **13**(30.0 mg)和 **9**(25.0 mg)。组分 B-3(0.5 g)经过硅胶柱(1.4 × 30.0 cm, 30.0 g)层析,氯仿/甲醇(95/5~90/10)梯度洗脱,进一步通过 Sephadex LH-20(甲醇)纯化得到化合物 **15**(20.0 mg), **2**(18 mg)和 **1**(30.0 mg)。组分 B-4(200.0 mg)经过硅胶柱(1.4 × 30.0 cm, 30.0 g)层析,氯仿/甲醇(85/15)洗脱,

进一步通过重结晶(甲醇)得到化合物 **8**(20.0 mg) 和 **12**(20 mg)。

## 2 结构鉴定

**化合物 1** 淡黄色粉末, FAB-MS (-)  $m/z$ : 373 [M-H]<sup>-</sup>, 179, 141; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$ : 7.64(1H, s, H-3), 5.72(1H, br s, H-1), 5.42~5.28(3H, m, H-8, 10), 4.75(1H, dd,  $J$  = 11.2, 5.0 Hz, H-7a), 4.64(1H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-1'), 4.35(1H, dd,  $J$  = 11.2, 5.0 Hz, H-7b), 3.89(1H, br d,  $J$  = 11.9 Hz, H-6'a), 3.67(1H, dd,  $J$  = 11.9, 5.6 Hz, H-6'b), 3.39-3.21(4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 2.94(1H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-9), 1.92(1H, ddd,  $J$  = 13.2, 11.2, 5.0 Hz, H-6a), 1.74(1H, br d,  $J$  = 13.2 Hz, H-6b); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$ : 168.1(s, C-11), 154.9(d, C-3), 133.9(d, C-8), 121.3(t, C-10), 108.8(s, C-4), 100.3(d, C-1'), 99.2(d, C-1), 78.5(d, C-5'), 77.7(d, C-3'), 74.3(d, C-2'), 71.4(d, C-4'), 66.0(t, C-7), 64.3(s, C-5), 62.6(t, C-6'), 51.9(d, C-9), 33.8(t, C-6)。与参考文献对照, 化合物 **1** 鉴定为獐牙菜苦苷<sup>[10]</sup>。

**化合物 2** 淡黄色粉末, <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$ : 7.45(1H, s, H-3), 5.76(1H, m, H-6), 5.67(1H, m, H-8), 5.62(1H, br s, H-1), 5.23(2H, m, H-10), 5.04(2H, m, H-7), 4.65(1H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-1'), 3.90(1H, dd,  $J$  = 11.9, 1.9 Hz, H-6'a), 3.67(1H, dd,  $J$  = 11.9, 5.6 Hz, H-6'b), 3.36~3.13(4H, m, H-2', 3', 4', 5'); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$ : 166.3(s, C-11), 150.6(d, C-3), 135.0(d, C-8), 127.0(s, C-5), 118.6(t, C-10), 117.2(d, C-6), 104.9(s, C-4), 100.2(d, C-1'), 98.5(d, C-1), 78.4(d, C-5'), 77.9(d, C-3'), 74.5(d, C-2'), 71.5(d, C-4'), 70.9(t, C-7), 62.8(t, C-6'), 46.6(d, C-9)。以上数据与龙胆苦苷基本一致<sup>[11]</sup>。

**化合物 3** 粉红色针晶, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 10.20(1H, s, H-11), 8.37(1H, dd,  $J$  = 7.5, 1.0 Hz, H-6), 8.05(1H, dd,  $J$  = 7.5, 1.0 Hz, H-8), 7.62(1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-7), 4.55(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-3), 3.56(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-4); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 191.9(d, C-11), 164.0(s, C-1), 141.1(s, C-10), 138.5(d, C-6), 135.7(d, C-8), 132.6(s, C-5), 127.8(d, C-7), 127.7(s, C-9), 66.7(t, C-3), 24.6(t, C-4)。以上数据与文献报道基本

一致, 故鉴定为红白金花内酯<sup>[12]</sup>。

**化合物 4** 无色方晶,  $[\alpha]_D^{19}$  -14.3 ( $c$  0.19, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS (+)  $m/z$ : 447[2M + Na]<sup>+</sup>, 235[M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 400 MHz)  $\delta$ : 5.34(1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-3a), 5.19(1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-3b), 4.42(2H, m, H-7), 2.89(1H, m, H-6a), 2.72(1H, m, H-6b), 2.04(1H, m, H-8a), 1.90(1H, m, H-8b), 1.00(3H, t,  $J$  = 7.4 Hz, H-10); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 100 MHz)  $\delta$ : 172.7(s, C-1), 162.2(s, C-11), 154.5(s, C-5), 120.6(s, C-4), 73.0(s, C-9), 67.1(t, C-7), 66.6(t, C-3), 31.3(t, C-8), 23.2(t, C-6), 8.3(q, C-10)。由以上数据, 化合物 **4** 鉴定为(-)龙胆内酯<sup>[13]</sup>。

**化合物 5** 白色针晶, <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$ : 8.41(1H, s, H-1), 4.55(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-9), 3.19(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-8), 2.50(3H, s, H-6); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$ : 189.7(s, C-5), 163.4(s, C-7), 150.6(d, C-1), 148.7(s, C-4), 130.1(s, C-3), 118.7(s, C-2), 69.9(t, C-9), 26.9(q, C-6), 22.3(t, C-8); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 8.13(1H, s, H-1), 4.52(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-9), 3.20(2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, H-8), 2.52(3H, s, H-6); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 188.4(s, C-5), 160.8(s, C-7), 148.1(d, C-1), 147.2(s, C-4), 128.2(s, C-3), 117.5(s, C-2), 68.4(t, C-9), 26.8(q, C-6), 21.3(t, C-8)。以上数据与文献报道的 angelone 数据基本一致<sup>[14]</sup>。

**化合物 6** 白色粉末, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 5.27(1H, t,  $J$  = 3.4 Hz, H-12), 3.20(1H, m, H-3), 2.80(1H, dd,  $J$  = 10.0, 5.9 Hz, H-18), 1.53(3H, s, Me-27), 1.11(3H, s, Me-30), 1.00(3H, s, Me-29), 0.96(3H, s, Me-26), 0.94(3H, s, Me-25), 0.87(3H, s, Me-24), 0.80(3H, s, Me-23); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 181.9(s, C-28), 143.9(s, C-13), 122.2(d, C-12), 78.9(d, C-3), 55.1(d, C-5), 47.6(s, C-17), 47.6(d, C-9), 46.5(s, C-14), 46.0(t, C-19), 41.1(d, C-18), 38.6(s, C-8), 38.3(s, C-4), 37.0(s, C-10), 33.8(t, C-22), 33.0(t, C-23), 32.5(t, C-7), 32.4(s, C-20), 30.6(q, C-29), 28.5(t, C-1), 28.0(q, C-23), 27.6(t, C-2), 26.9(t, C-15), 25.8(q, C-27), 23.5(q, C-30), 23.3(t, C-16), 23.0(t, C-11), 18.2(t, C-6), 16.9(q, C-26), 15.5(q, C-24), 15.2(q, C-25)。以上数据与文献报

道的齐墩果酸数据基本一致<sup>[15]</sup>。

**化合物 7** 无色针晶, EI-MS  $m/z$ : 427 [M + H]<sup>+</sup> (54), 412 (46), 302 (75), 287 (71), 269 (65), 257 (51), 218 (65), 204 (100), 189 (65), 175 (55), 161 (50), 149 (63), 135 (89), 121 (73), 107 (74), 95 (74), 81 (70), 69 (88); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 5.53 (1H, dd,  $J$  = 8.1, 3.1 Hz, H-15), 3.41 (1H, t,  $J$  = 2.7 Hz, H-3), 1.10 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.83 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 158.1 (s, C-14), 116.7 (d, C-15), 76.2 (d, C-3), 49.2 (d, C-9), 48.9 (d, C-5), 48.7 (d, C-18), 41.2 (t, C-19), 39.0 (s, C-8), 38.1 (s, C-4), 37.7 (t, C-1), 37.5 (s, C-10), 37.3 (s, C-13), 36.6 (t, C-16), 35.7 (s, C-17), 35.1 (t, C-12), 33.7 (t, C-7), 33.3 (q, C-29), 33.0 (t, C-21), 32.2 (t, C-22), 29.9 (q, C-26), 29.8 (q, C-28), 28.8 (s, C-20), 28.2 (q, C-23), 26.0 (q, C-27), 25.0 (t, C-2), 22.1 (q, C-24), 21.2 (q, C-30), 18.7 (t, C-6), 17.4 (t, C-11), 15.2 (q, C-25)。与参考文献对照, 化合物 7 鉴定为 3-表-蒲公英赛醇<sup>[16]</sup>。

**化合物 8** 黄色粉末, <sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz)  $\delta$ : 7.61 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-7), 7.40 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-6), 6.51 (1H, s, H-4), 6.22 (1H, s, H-2), 5.49 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, H-1'), 4.64-4.20 (6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 3.62 (3H, s, OMe); <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz)  $\delta$ : 182.8 (s, C-9), 167.4 (s, C-3), 164.5 (s, C-1), 157.8 (s, C-4a), 151.4 (s, C-8), 146.8 (s, C-4b), 143.3 (s, C-5), 122.6 (d, C-6), 114.0 (d, C-8a), 113.6 (s, C-7), 106.2 (d, C-1'), 105.2 (s, C-8b), 98.3 (d, C-2), 92.7 (d, C-4), 80.0 (d, C-5'), 78.4 (d, C-3'), 75.9 (d, C-2'), 71.8 (d, C-4'), 63.1 (t, C-6'), 56.4 (q, OMe); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.28 (1H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-7), 7.11 (1H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-6), 6.56 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-2), 6.35 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-2), 5.00 (2H, m, H-6'), 4.79 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-1'), 4.64 (1H, t,  $J$  = 5.9 Hz, H-3'), 3.87 (3H, s, OMe), 3.50-3.16 (3H, m, H-2', 4', 5'); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 181.1 (s, C-9), 166.3 (s, C-3), 162.7 (s, C-1), 156.4 (s, C-4a), 149.4 (s, C-8), 145.0 (s, C-4b), 141.0 (s, C-5), 121.1 (d, C-6), 112.4 (d, C-7), 111.9 (s, C-8a), 103.5 (s, C-8b), 103.1 (d, C-1'), 97.2 (d, C-

2), 92.2 (d, C-4), 77.4 (d, C-5'), 76.1 (d, C-3'), 73.5 (d, C-2'), 69.8 (d, C-4'), 60.8 (t, C-6'), 56.1 (q, OMe)。与参考文献对照, 与当药醇苷数据基本一致<sup>[10,17]</sup>。

**化合物 9** 无色针晶, EI-MS  $m/z$ : 124 [M]<sup>+</sup> (100), 123 (62), 107 (35), 106 (37), 105 (46), 95 (75), 77 (40); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.10 (1H, t,  $J$  = 5.2 Hz, H-5), 6.76 (1H, s, H-2), 6.73 (1H, d,  $J$  = 5.2 Hz, H-6), 6.67 (1H, d,  $J$  = 5.2 Hz, H-4), 4.50 (2H, s, H-7); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 156.7 (s, C-3), 142.4 (s, C-1), 129.5 (d, C-5), 118.2 (d, C-6), 114.4 (d, C-4), 113.6 (d, C-2), 64.4 (t, C-7)。以上数据与间羟基苯甲醇数据基本一致<sup>[18]</sup>。

**化合物 10** 无色油状物, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.70 (2H, m, H-3, 6), 7.53 (2H, m, H-4, 5), 3.89 (6H, s, OMe  $\times$  2); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 168.0 (s, C-7, 8), 131.8 (s, C-1, 2), 131.1 (d, C-3, 6), 128.8 (d, C-4, 5), 52.6 (s, OMe  $\times$  2)。由以上数据, 该化合物鉴定为邻苯二甲酸二甲酯<sup>[19]</sup>。

**化合物 11** 无色油状物, EI-MS  $m/z$ : 279 [M + H]<sup>+</sup> (47), 223 (17), 205 (44), 149 (100), 104 (16); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.63 (2H, m, H-3, 6), 7.43 (2H, m, H-4, 5), 4.01 (4H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-8, 8'), 1.95 (2H, m, H-9, 9'), 0.90 (12H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-10, 10', 11, 11'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 167.4 (s, C-7, 7'), 132.3 (s, C-1, 2), 130.8 (d, C-3, 6), 128.7 (d, C-4, 5), 71.6 (t, C-8, 8'), 27.6 (d, C-9, 9'), 19.0 (q, C-10, 10', 11, 11')。与参考文献对照, 将其鉴定为邻苯二甲酸二异丁酯<sup>[20]</sup>。

**化合物 12** 紫色粉末, <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 7.43 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d,  $J$  = 7.7 Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J$  = 7.7 Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ : 170.4 (s, C-7), 151.5 (s, C-4), 146.0 (s, C-3), 123.9 (d, C-6), 123.2 (s, C-1), 117.7 (s, C-2), 115.7 (s, C-5)。以上数据与 3,4-二羟基苯甲酸数据基本一致<sup>[21]</sup>。

**化合物 13** 白色粉末, EI-MS  $m/z$ : 451 [M-H]<sup>+</sup> (1), 427 (30), 421 (3), 412 (5), 393 (10), 365 (40), 337 (35), 302 (32), 287 (18), 204 (45), 125 (40), 111 (63), 97 (80), 83 (87), 69 (88), 57 (100); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 3.64 (2H, t,  $J$  = 6.6 Hz, H-1), 1.57 (2H, m, H-2), 1.42 [56H, m, H-(3-

30)], 0.86 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-31);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 63.1 (t, C-1), 32.8 (t, C-2), 31.9 (t, C-29), 29.6 [t, C-(7-25)], 29.4 [t, C-(4-6)], 29.3 [t, C-(26-28)], 25.7 (t, C-3), 22.7 (t, C-30), 14.1 (q, C-31)。与参考文献对照, 将其鉴定为正三十一烷醇<sup>[22]</sup>。

化合物 **14** 和 **15** 通过 TLC 与标准品比对, 分别鉴定为  $\beta$ -谷甾醇和胡萝卜苷。

#### 参考文献

- 1 Editorial Board of Flora of China (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1988. 62:408.
- 2 Editorial Board of Flora of Yunnan (云南植物志编辑委员会). Flora of Yunnan (云南植物志). Beijing: Science Press, 2000. 11:693.
- 3 Sui YH (隋艳华), Zhao JQ (赵加泉), Cui SK (崔世奎), et al. 香附、青皮、刺梨、茵陈、西南獐牙菜对大鼠胆汁分泌作用的比较. *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 1993, 13:19-20, 44.
- 4 Editorial Board of Chinese Pharmacopoeia (中国药典编委会). Chinese Pharmacopoeia (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010. 182.
- 5 Zhang JW (张俊巍), Mao Q (茅青). Studies on the chemical constituents of *Swertia cincta* Burkill. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19:819-824.
- 6 Gao GY (高光跃), Li M (李鸣), Feng MX (冯毓秀), et al. Determination of effective constituents in 11 *Swertia* and related plants HPLC. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29:910-914.
- 7 Ji LJ (纪兰菊), Bao Y (保怡), Chen GC (陈桂琛), et al. Determination of active constituents in fifteen species *Swertia* of genus by high performance liquid chromatography. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24:1298-1302.
- 8 Xia CL (夏从龙), Zhang H (张浩), Liu GM (刘光明), et al. Quantitative HPLC analysis of four effective components in *Swertia* genus and related plants. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27:1161-1164.
- 9 Geng CA, Wang LJ, Zhang XM, et al. Anti-hepatitis B virus active lactones from the traditional Chinese herb: *Swertia mileensis*. *Chem-Eur J*, 2011, 17, 3893-3903.
- 10 Wang HL (王洪玲), Geng CA (耿长安), Zhang XM (张雪

梅), et al. Chemical constituents of *Swertia macrosperma*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35:3161-3164.

- 11 Zhang YJ (张颖君), Yang CR (杨崇仁). Chemical studies on *Gentianella azurea*, a Tibetan medicinal plant. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1994, 16:401-406.
- 12 Nie RL (聂瑞麟), He RY (何仁远). The erythrocentaurin and swermirin from *Swertia mileensis*. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1984, 6:325-328.
- 13 Suhr JH, Arends P, Jensen B. Gentiolactone, a secoiridoid di-lactone from *Gentiana purpurea*. *Phytochemistry*, 1978, 17:135-138.
- 14 Mulholland DA, Langlois A, Randrianarivelojosia M, et al. The structural elucidation of a novel iridoid derivative from *Tachadenus longiflorus* (Gentianaceae) using the LSD programme and quantum chemical computations. *Phytochem Anal*, 2006, 17:87-90.
- 15 Tan P (谭沛), Liu YL (刘永滢), Hou CY (侯翠英). Structure of swertiapuniside from *Swertia punicea* Hemsl. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1992, 7:476-479.
- 16 Jiang CY (姜春勇), Mu SZ (穆淑珍), Deng B (邓彬), et al. Studies on the chemical constituents from *Euphorbia chrysocoma*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, 32:1390-1392.
- 17 Yu Y (于莹), Wang SS (王世盛), Ding FJ (丁凤娟), et al. Isolation and identification of the chemical constituents from *Swertia yunnanensis* Burk. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2010, 20:125-128.
- 18 Zhan R (詹睿), Liu Y (刘莹), Chen YG (陈业高). Study on the chemical constituents from *Pholidota protracta*. *J Hainan Normal Univ* (海南师范大学学报), 2010, 33:72-75.
- 19 Wang L (王莉), Xiao HB (肖红斌), Liang XM (梁鑫淼). Studies on chemical constituents of *Gastrodia elata*. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), 2003, 34:584-585.
- 20 Zuo W (左伟), Luo DQ (罗都强). Research on the chemical components of the fruit bodies of *Boletus calopus*. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2010, 38:2356-2357, 2361.
- 21 Wang Y (王艳), Zhang CF (张朝凤), Zhang M (张勉). Chemical constituents in roots of *Curcuma kwangsiensis*. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2010, 18:274-275, 278.
- 22 Xiang Y (祥宇), Yao YZ (姚源璋), Zhou QX (周秋香), et al. A new flavone glycoside from *Salsola collina*. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), 2009, 40:1858-1860.

# 中草药玄参化学成分的研究

李 媛, 宋宝安, 杨 松\*, 胡德禹, 金林红

生物质资源综合利用国家地方联合工程实验室 教育部绿色农药与农业生物工程重点实验室  
贵州大学精细化工研究开发中心, 贵阳 550025

**摘要:** 从中草药玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的乙醇溶液中分离得到 14 个化合物, 根据理化性质和光谱数据分析分别鉴定为柳杉酚(1)、 $\beta$ -谷甾醇(2)、羽扇豆醇(3)、熊果酸(4)、鼠李糖(5)、胡萝卜苷(6)、蔗糖(7)、咖啡酸(8)、油酸(9)、3-*O*-(6'-*O*-palmitoyl- $\beta$ -D-glucosyl)-spinasta-7, 22-diene(10)、clematomanshurica saponin E(11)、 $\alpha$ -caryphy(12)、雪松醇(13)和 Scrophuloside A<sub>4</sub>(14)。其中化合物 3, 5, 8~14 均为首次从玄参中分离得到。

**关键词:** 玄参; 玄参属; 化学成分

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

## Chemical Constituents of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.

LI Yuan, SONG Bao-an, YANG Song\*, HU De-yu, JIN Lin-hong

National-Guizhou Joint Laboratory of Biomass Comprehensive Utilization, Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Center for R&D of Fine Chemicals, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract:** Fourteen compounds were isolated from the ethanol extract of Chinese herbal medicine *Scrophularia ningpoensis* Hemsl., which were identified as sugiol (1),  $\beta$ -sitosterol (2), lupaneol (3), ursolic acid (4), Rhamnose (5), daucosterol (6), sucrose (7), caffeic acid (8), oleic acid (9), 3-*O*-(6'-*O*-palmitoyl- $\beta$ -D-glucosyl)-spinasta-7, 22-diene (10), clematomanshurica saponin E (11),  $\alpha$ -caryphy (12),  $\alpha$ -cedrol (13), and scrophuloside A<sub>4</sub> (14) on the basis of physicochemical and spectroscopic evidences. Compounds 3, 5, and 8-14 were isolated from this plant for the first time.

**Key words:** *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.; *Scrophularia* L.; chemical constituents

玄参为玄参科(Scrophulariaceae)玄参属多年生草本植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)的根。玄参属(*Scrophularia* L.)是玄参科的第三个大属,世界上共有 200 种以上,分布于欧、亚大陆的温带,地中海地区尤多,美洲只有少数种,我国约有 40 种<sup>[1]</sup>。玄参又名重台、玄台、山当归、水萝卜等。全国各地均有分布,主要分布于安徽、浙江、四川、贵州等地。其味甘;苦;咸;性微寒。它主要以醒神、凉血、败毒、利咽等作用应用于临床。研究表明其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、保肝<sup>[2-4]</sup>、抗糖尿病、增强免疫功能、解热、抗血小板聚集、降血压、改善微循环及毛细血管通透性等作用。玄参主要含有环烯醚萜类<sup>[5]</sup>、苯丙素苷、糖类、肉桂酸、皂苷等,此外还含微量挥发

油、生物碱、氨基酸、L-天冬酰胺、甾醇、熊果酸、黄酮类、脂肪酸、生物碱等化学成分以及铜、锰、镉等多种微量元素。作者对玄参的根进行了化学成分研究,从中分离鉴定了 14 个化合物。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

日本电子 JOEL-ECX500 型 500 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标);GC-MS 6890/5973 气质联用仪(美国 Agilent 公司);LC-MS 1100/MSD 液质联用仪(美国 Agilent 公司);日本岛津红外光谱仪(SHIMADZU-IR Prestige-21);元素分析仪(Elementar Vario III);X-4 型数字显微熔点测定仪(温度未校正);KQ250E 型超声波清洗仪;WZZ-ZA 自动旋光仪(中国上海);薄层色谱硅胶和柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂);MCI 凝胶(美国罗门哈斯公司);D-101 大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司)。所用试剂均为分析纯,由天津市科密欧化学试剂开发

收稿日期:2010-03-22 接受日期:2010-05-11

基金项目:国家 973 计划(2010CB126105);贵州省优秀青年科技人才培养计划([2005]0515);贵州省重大科技专项(20076004)

\* 通讯作者 E-mail: jhxx.msm@gmail.com

中心及重庆川江化学试剂厂等提供。

实验所用的玄参采自贵州,经贵阳医学院药学院药用植物与生药教研室龙庆德教授鉴定为玄参科植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)的根,标本存于贵州大学精细化工研究与开发中心。

## 1.2 提取与分离

购买干燥的玄参 20 kg,切成片状。先用 80% 的工业酒精对玄参冷浸提取,再经石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得各层粗浸膏。用反复硅胶层析、薄层层析及 MCI 柱层析的方法对玄参氯仿(15 g)、乙酸乙酯层浸膏(21 g)进行分离纯化,用 D-101 大孔树脂柱层析及硅胶层析方法对正丁醇层(40 g)进行分离纯化。从氯仿层得到化合物 **1** (0.3359 g)、乙酸乙酯层得化合物 **2** (0.0053 g)、**3** (9.6759 g)、**4** (0.5825 g)、**6** (1.4102 g)、**8** (0.2420 g)、**10** (0.2171 g)、**11** (0.9518 g)、**12** (0.0172 g)、**13** (0.4096 g)和 **14** (0.3926 g),正丁醇层得到化合物 **5** (0.6534 g)、**7** (1.8705 g)和 **9** (0.1884 g)。

## 2 结构鉴定

**化合物 1** 无色针晶(氯仿),mp. 273 ~ 275 °C;紫外、磷钼酸显同一个圆形斑点;溶于氯仿。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 0.83 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-20), 0.88 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, H-16, 17), 0.90 ~ 1.25 (6H, m, H-1, 2, 3), 2.36 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, H-6a), 1.13 (1H, dd, *J* = 12.4, 3.1 Hz, H-6b), 3.64 ~ 3.67 (1H, m, H-15), 6.44 (1H, s, -OH), 6.47 (1H, s, H-11), 7.56 (1H, s, H-14); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 32.0 (C-1), 14.2 (C-2), 33.8 (C-3), 30.1 (C-4), 33.9 (C-5), 30.2 (C-6), 171.0 (C-7), 128.4 (C-8), 134.2 (C-9), 32.0 (C-10), 117.2 (C-11), 147.0 (C-12), 130.8 (C-13), 129.0 (C-14), 29.4 (C-15), 26.8 (C-16), 24.8 (C-17), 29.8 (C-18), 22.8 (C-19), 28.6 (C-20)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道的柳杉酚数据一致。

**化合物 2** 白色针状晶体(氯仿),mp. 132 ~ 134 °C;与标准样品进行薄层对照实验, *R<sub>f</sub>*值一致,且显色过程一致,鉴定该化合物为 β-谷甾醇(β-sitosterol)。

**化合物 3** 白色针状晶体(氯仿),mp. 181 ~ 183 °C;紫外荧光均不显色,磷钼酸显示为一点。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>max</sub> 3319 (-OH), 2941, 2849, 1645 (羰

基), 1454, 1377, 1043, 893; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ: 4.69 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 3.17 ~ 3.20 (1H, m, H-1), 2.36 ~ 2.38 (1H, m, H-19), 1.91 ~ 1.94 (2H, m, H-21), 1.65 ~ 1.68 (2H, m, H-2); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ: 38.8 (C-1), 79.0 (C-3), 27.5 (C-2), 40.1 (C-4), 55.4 (C-5), 18.4 (C-6), 34.4 (C-7), 40.9 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.0 (C-11), 25.2 (C-12), 38.1 (C-13), 42.9 (C-14), 27.5 (C-15), 35.7 (C-16), 42.9 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.1 (C-20), 29.9 (C-21), 40.0 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.6 (C-27), 18.1 (C-28), 109.4 (C-29), 19.4 (C-30)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道的羽扇豆醇(lupeol)一致。

**化合物 4** 白色无定型粉末(甲醇),mp. 253 ~ 256 °C;在碘缸、磷钼酸中显色,5%的硫酸显紫红色;溶于甲醇,氯仿。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>max</sub> 3431 (-OH), 2965, 2926, 2870, 1695 (羰基), 1456, 1386, 1030, 997; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ: 5.21 (1H, s, H-12), 3.12 ~ 3.15 (1H, m, H-3), 2.18 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-18), 1.10 (1H, s, H-27), 0.98 (1H, s, H-26), 0.94 (1H, s, H-25), 0.83 (1H, s, H-23), 0.76 (1H, s, H-24), 0.96 (3H, d, *J* = 4.0 Hz, H-29), 0.87 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-30); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) δ: 180.3 (C-28), 138.3 (C-13), 125.6 (C-12), 78.3 (C-3), 55.4 (C-5), 53.0 (C-18), 47.7 (C-9), 47.5 (C-17), 41.9 (C-14), 39.4 (C-8), 39.1 (C-19), 38.7 (C-4), 38.5 (C-20), 36.8 (C-22), 36.6 (C-10), 33.0 (C-7), 30.4 (C-1), 30.4 (C-21), 27.9 (C-23), 27.4 (C-15), 26.6 (C-2), 24.0 (C-16), 23.0 (C-11), 22.8 (C-27), 20.2 (C-30), 18.1 (C-6), 16.5 (C-26), 16.3 (C-29), 15.0 (C-25), 14.7 (C-24)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道的熊果酸数据一致。

**化合物 5** 无色块状晶体(甲醇),mp. 86 ~ 90 °C;溶于水、甲醇。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>max</sub> 3475 (-OH), 3250, 2972, 2938, 2575, 2425, 1670, 1449, 1379, 1287, 1225, 1123, 1074, 1036, 976, 908, 875, 831, 802, 711, 602; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) δ: 94.5 (C-1), 71.7 (C-2), 70.8 (C-3), 72.9 (C-4), 67.9 (C-5), 16.8 (C-6)。结合文献<sup>[9]</sup>推测为该化合物为鼠李糖(Rhamnose)。

**化合物 6** 白色无定型粉末(吡啶),与胡萝卜



苷标准样品进行薄层对照实验,  $R_f$  值一致, 两者混起点板也为一个点, 混合测熔点不下降, 鉴定为胡萝卜苷(daucosterol)。

**化合物 7** 无色颗粒状晶体(吡啶), mp. 195 ~ 196 °C; 紫外下不显色, 磷钼酸和 10% 的硫酸溶液中显色为一个圆形斑点; 溶于吡啶、甲醇、水。经与标准品进行薄层对照实验, 结合标准品混合熔点测定, 鉴定为蔗糖(sucrose)。

**化合物 8** 无色针晶(氯仿), mp. 103 ~ 105 °C; 紫外、磷钼酸显同一个圆形斑点; 溶于氯仿、丙酮。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3080, 3024, 1719, 1600;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7.51 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7), 7.10 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.94 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-6), 6.58 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.46 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 128.1 (C-1), 125.7 (C-2), 145.4 (C-3), 147.8 (C-4), 127.5 (C-5), 127.4 (C-6), 145.3 (C-7), 125.6 (C-8), 165.3 (C-9)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>数据一致, 故鉴定为咖啡酸(caffeic acid)。

**化合物 9** 白色粉末(氯仿), mp. 35 ~ 37 °C; 紫外为一个圆点; 溶于氯仿、氯甲。经与标准品进行薄层对照实验, 结合标准品混合熔点测定, 鉴定为油酸(oleic acid)。

**化合物 10** 无色块状晶体(氯仿), mp. 151 ~ 155 °C; 紫外、磷钼酸显色为同一点; 5% 硫酸乙醇溶液显黄色。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3005 (-OH), 2953, 2922 (饱和脂环氢), 2850, 1742 (羰基), 1462, 1377 (碳碳双键氢), 1173, 719;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.89 ~ 0.90 (2H, m, H-1), 2.18 ~ 2.19 (2H, m, H-2), 3.58 (1H, br, s, H-3), 1.53 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 1.12 ~ 1.13 (1H, m, H-6), 5.27 (2H, dd,  $J = 14.8, 8.4$  Hz, H-7), 1.17 ~ 1.18 (1H, m, H-8), 1.98 (1H, dd,  $J = 10.0, 5.2$  Hz, H-9), 1.54 ~ 1.60 (2H, m, H-11), 2.70 (1H, d,  $J = 12.4$  Hz, H-12), 2.22 ~ 2.23 (1H, m, H-14), 1.54 ~ 1.60 (2H, m, H-15), 2.20 ~ 2.21 (2H, m, H-16), 1.52 (1H,  $J = 8.4$  Hz, H-17), 0.70 (6H, s, H-18, 19), 2.73 (1H,  $J = 12.4$  Hz, H-20), 1.08 (3H,  $J = 5.6$  Hz, H-21), 5.30 (1H, dd,  $J = 15.2, 8.4$  Hz, H-22), 5.27 (1H, dd,  $J = 14.8, 8.4$  Hz, H-23), 0.89 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-24), 1.92 ~ 1.93 (1H, m, H-25), 0.75 (6H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-26, 27),

1.08 (3H,  $J = 5.6$  Hz, H-28), 0.81 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-29), 4.19 (1H, dd,  $J = 8.0, 6.0$  Hz, H-1'), 4.03 (4H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2' ~ 5'), 4.23 (1H, br, s, H-6' a), 4.05 (1H, br, s, H-6' b), 1.18 ~ 1.23 (28H, m, H-2'' ~ 15''), 0.68 (3H, t, H-16'');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 34.5 (C-1), 30.2 (C-2), 74.0 (C-3), 32.1 (C-4), 37.5 (C-5), 30.3 (C-6), 128.0 (C-7), 130.2 (C-8), 42.4 (C-9), 34.2 (C-10), 29.6 (C-11), 27.2 (C-12), 39.8 (C-13), 51.5 (C-14), 29.7 (C-15), 29.8 (C-16), 56.1 (C-17), 19.4 (C-18), 14.3 (C-19), 39.5 (C-20), 29.4 (C-21), 130.1 (C-22), 128.1 (C-23), 50.3 (C-24), 31.6 (C-25), 29.5 (C-26), 29.5 (C-27), 29.7 (C-28), 14.2 (C-29), 127.2 (C-1'), 62.2 (C-2'), 65.8 (C-3'), 60.2 (C-4'), 69.0 (C-5'), 56.6 (C-6'), 173.9 (C-1''), 19.8 ~ 29.3 (C-2'' ~ 15''), 14.2 (C-1'')。依据理化性质和波谱数据分析, 结合文献<sup>[11]</sup>确定该化合物为 3-O-(6'-O-palmitoyl- $\beta$ -D-glucosyl)-spinasta-7, 22-diene。

**化合物 11** 白色无定型粉末(丙酮), mp. 218 ~ 220 °C; 紫外不显色, 磷钼酸显一圆点, 硫酸乙醇显紫红色斑点, Liebermann-burchard 反应显阳性, Molish 反应显阳性; 溶于吡啶、丙酮。 $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 5.22 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, AraH-6), 4.40 (1H, dd,  $J = 6.0, 7.0$  Hz, AraH-2), 4.22 ~ 4.23 (1H, m, AraH-3), 4.22 ~ 4.23 (1H, m, AraH-4), 4.25 ~ 4.26 (1H, m, AraH-5), 3.76 ~ 3.77 (1H, m, AraH-6), 5.25 (1H, br, s, Rha'H-1), 4.41 (1H, br, s, Rha'H-2), 4.35 (1H, br, d,  $J = 9.5$  Hz, Rha'H-3), 4.22 (1H, dd,  $J = 9.5, 9.5$  Hz, Rha'H-4), 4.28 ~ 4.29 (1H, m, Rha'H-5), 1.57 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, Rha'H-6), 5.40 (1H, br, s, RhaH-1), 5.21 (1H, br, s, RhaH-2), 4.42 (1H, br, d,  $J = 9.5$  Hz, RhaH-3), 4.31 (1H, dd,  $J = 9.5, 9.5$  Hz, RhaH-4), 4.60 ~ 4.61 (1H, m, RhaH-5), 1.49 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, RhaH-6), 5.33 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, AllH-1), 4.01 (1H, br, d,  $J = 5.5$  Hz, AllH-2), 4.39 (1H, br, s, AllH-3), 3.98 ~ 3.99 (1H, m, AllH-4), 3.99 ~ 4.00 (1H, m, AllH-5), 3.96 ~ 3.97 (1H, m, AllH-6), 3.84 ~ 3.85 (1H, m, AllH-7), 5.23 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, GlcH-1), 3.78 (1H, dd,  $J = 9.0, 8.0$  Hz, GlcH-2), 3.96 ~ 3.97 (1H, m, GlcH-3), 3.84 ~ 3.85 (1H, m, GlcH-4), 3.76 ~ 3.77 (1H, m,

GlcH-5), 4.04 (1H, br. d,  $J = 12.0$  Hz, GlcH-6), 3.99 ~ 4.00 (1H, m, GlcH-7), 5.23 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc'H-1), 3.78 (1H, dd,  $J = 9.0, 8.0$  Hz, Glc'H-2), 3.76 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, Glc'H-3), 3.75 ~ 3.76 (1H, m, Glc'H-4), 3.73 ~ 3.74 (1H, m, Glc'H-5), 4.35 (1H, br. d,  $J = 10.0$  Hz, Glc'H-6), 3.99 ~ 4.00 (1H, m, Glc'H-7), 5.39 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc''H-1), 4.13 (1H, dd,  $J = 9.0, 8.0$  Hz, Glc''H-2), 3.76 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, Glc''H-3), 3.78 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, Glc''H-4), 3.69 ~ 3.70 (1H, m, Glc''H-5), 3.70 (1H, br. d,  $J = 10.5$  Hz, Glc''H-6), 3.61 (1H, dd,  $J = 10.5, 5.4$  Hz, Glc''H-7), 5.22 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, Glc'''H-1), 3.50 (1H, dd,  $J = 9.0, 7.5$  Hz, Glc'''H-2), 3.54 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, Glc'''H-3), 3.59 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, Glc'''H-4), 3.45 ~ 3.46 (1H, m, Glc'''H-5), 3.57 (1H, br. d,  $J = 11.5$  Hz, Glc'''H-6), 3.55 (1H, br. d,  $J = 11.5$  Hz, Glc'''H-7), 5.26 (1H, br. s, Rha''H-1), 3.57 (1H, br. s, Rha''H-2), 3.60 (1H, dd,  $J = 9.5, 3.0$  Hz, Rha''H-3), 3.59 (1H, dd,  $J = 9.5, 9.5$  Hz, Rha''H-3), 3.96 ~ 3.97 (1H, m, Rha''H-5), 1.69 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, Rha''H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 27.3 (C-1), 23.7 (C-2), 88.7 (C-3), 27.6 (C-4), 36.8 (C-5), 16.0 (C-6), 26.1 (C-7), 27.7 (C-8), 36.6 (C-9), 26.5 (C-10), 23.5 (C-11), 123.5 (C-12), 143.3 (C-13), 32.8 (C-14), 24.1 (C-15), 18.3 (C-16), 34.9 (C-17), 32.2 (C-18), 33.0 (C-19), 25.4 (C-20), 26.4 (C-21), 25.8 (C-22), 24.2 (C-23), 15.1 (C-24), 14.9 (C-25), 15.8 (C-26), 23.6 (C-27), 175.8 (C-28), 25.9 (C-29), 20.0 (C-30), 94.3 (AraC-1), 71.6 (AraC-2), 65.2 (AraC-3), 40.0 (AraC-4), 39.0 (AraC-5), 77.4 (RhaC-1), 71.9 (RhaC-2), 73.0 (RhaC-3), 53.6 (RhaC-4), 41.4 (RhaC-5), 16.1 (RhaC-6), 88.7 (AllC-1), 61.9 (AllC-2), 47.9 (AllC-3), 72.3 (AllC-4), 64.4 (AllC-5), 38.4 (AllC-6), 105.6 (GlcC-1), 66.2 (GlcC-2), 69.7 (GlcC-3), 72.9 (GlcC-4), 67.6 (GlcC-5), 38.6 (GlcC-6), 94.2 (Glc'C-1), 65.6 (Glc'C-2), 78.1 (Glc'C-3), 47.3 (Glc'C-4), 66.8 (Glc'C-5), 39.7 (Glc'C-6), 78.4 (Rha'C-1), 47.8 (Rha'C-2), 55.6 (Rha'C-3), 64.9 (Rha'C-4), 41.6 (Rha'C-5), 16.7 (Rha'C-6), 77.3 (Glc''C-1), 63.1 (Glc''C-2), 80.9

(Glc''C-3), 45.7 (Glc''C-4), 78.5 (Glc''C-5), 70.6 (Glc''C-6), 94.2 (Glc'''C-1), 66.3 (Glc'''C-2), 70.5 (Glc'''C-3), 72.5 (Glc'''C-4), 77.9 (Glc'''C-5), 37.0 (Glc'''C-6), 78.4 (Rha''C-1), 61.8 (Rha''C-2), 55.7 (Rha''C-3), 62.9 (Rha''C-4), 43.8 (Rha''C-5), 16.5 (Rha''C-6); 其氢谱、碳谱与 clematomanshurica saponin E<sup>[12]</sup> 值基本吻合, 鉴定为 clematomanshurica saponin E。

**化合物 12** 无色针晶(吡啶), mp. 108 ~ 110 °C; 紫外、磷钼酸显色为同一个圆形斑点; 溶于吡啶。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3065 (反式烯), 2957 (饱和烷基), 2918 (饱和脂环氢), 1684, 1628, 1418, 1287, 980, 768;  $^1\text{H}$  NMR (Pyridine- $d_5$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.84 (6H, s, H-13, 14), 0.85 ~ 0.87 (2H, m, H-10), 1.25 (3H, s, H-15), 1.30 (2H, s, H-6), 2.50 ~ 2.58 (4H, m, H-9, 11), 2.49 (3H, s, H-12), 6.92 ~ 7.35 (1H, m, H-7), 7.33 ~ 7.37 (1H, m, H-1), 7.62 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-4), 8.05 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (Pyridine- $d_5$ , 125 MHz)  $\delta$ : 127.5 (C-1), 142.4 (C-2), 119.3 (C-3), 167.7 (C-4), 33.2 (C-5), 30.4 (C-6), 126.7 (C-7), 128.5 (C-8), 28.3 (C-9), 28.0 (C-10), 28.1 (C-11), 21.2 (C-12), 25.8 (C-13), 27.9 (C-14), 24.0 (C-15)。以上理化性质和波谱数据与  $\alpha$ -caryphy 的文献<sup>[13]</sup> 数据一致, 故鉴定为  $\alpha$ -caryphy。

**化合物 13** 白色固体(氯仿), mp. 78 ~ 80 °C; 紫外、荧光、磷钼酸下均不显色; 溶于氯仿、吡啶。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3373, 3354, 3032, 2953, 2916, 1462, 1437, 1072, 1033, 916, 885;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.83 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-10), 1.10 (4H, s, H-11), 1.25 (3H, s, H-11), 1.25 (3H, s, H-12), 0.90 (3H, s, H-13);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 23.2 (C-1), 37.4 (C-2), 54.3 (C-3), 59.4 (C-3a), 32.0 (C-4), 33.7 (C-5), 72.5 (C-6), 61.5 (C-7), 57.3 (C-8), 59.6 (C-8a), 56.7 (C-9), 14.1 (C-10), 30.2 (C-11), 26.7 (C-12), 29.0 (C-13); 以上理化性质和波谱数据与雪松醇( $\alpha$ -cedrol)的文献数据<sup>[14]</sup> 一致, 故鉴定为雪松醇( $\alpha$ -cedrol)。

**化合物 14** 白色无定形粉末(甲醇), mp. 163 ~ 165 °C; 紫外、磷钼酸显同一个圆形斑点, 溶于氯仿、甲醇。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3392, 3381, 2932, 1701, 1630, 1595, 1514, 1449, 1431, 1273, 1159, 1132, 1066, 1028, 812;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$ :

4. 90 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-1), 6. 66 (1H, dd,  $J = 6.0, 2.0$  Hz, H-3), 5. 00 (1H, superimposed, H-4), 2. 79 ~ 2. 80 (1H, m, H-5), 4. 01 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, H-6), 3. 64 (1H, br. s, H-7), 2. 79 (1H, dd,  $J = 10.0, 7.5$  Hz, H-9), 3. 85 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, H-10), 4. 19 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, H-10), 4. 65 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 3. 29 (1H, superimposed, H-2'), 3. 41 (1H, dd,  $J = 9.0, 9.0$  Hz, H-3'), 3. 33 (1H, superimposed, H-4'), 3. 34 ~ 3. 35 (1H, m, H-5'), 3. 61 (1H, dd,  $J = 12.0, 6.0$  Hz, H-6'), 3. 98 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz, H-6'), 4. 90 (1H, superimposed, H-1''), 5. 19 (1H, dd,  $J = 3.0, 2.0$  Hz, H-2''), 5. 78 (1H, dd,  $J = 10.0, 3.0$  Hz, H-3''), 5. 14 (1H, dd,  $J = 10.0, 10.0$  Hz, H-4''), 4. 17 ~ 4. 18 (1H, m, H-5''), 1. 22 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6''), 2. 11 (3H, s, AcO-2''), 6. 35 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8'''), 7. 68 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7'''), 7. 34 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2''', 6'''), 6. 88 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3''', 5'''), 3. 78 (3H, s, MeO-4'''), 6. 36 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8'''), 7. 65 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7'''), 7. 14 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2''', 6'''), 6. 83 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3''', 5'''), 3. 83 (3H, s, MeO-4''');  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 101. 8 (C-1), 145. 8 (C-3), 110. 7 (C-4), 35. 2 (C-5), 81. 1 (C-6), 57. 2 (C-7), 68. 3 (C-8), 48. 9 (C-9), 65. 7 (C-10), 103. 7 (C-1'), 73. 4 (C-2'), 74. 7 (C-3'), 71. 2 (C-4'), 80. 6 (C-5'), 67. 8 (C-6'), 102. 7 (C-1''), 71. 0 (C-2''), 70. 8 (C-3''), 72. 4 (C-4''), 69. 3 (C-5''), 17. 4 (C-6''), 24. 2, 167. 3 (AcO-2''), 149. 4 (C-9'''), 113. 7 (C-8'''), 147. 0 (C-7'''), 123. 3 (C-1'''), 131. 6 (C-2''', 6'''), 115. 5 (C-3''', 5'''), 148. 4 (C-4'''), 55. 4 (MeO-4'''), 165. 8 (C-9'''), 111. 7 (C-8'''), 147. 1 (C-7'''), 120. 2 (C-1'''), 126. 3 (C-2''', 6'''), 116. 0 (C-3''', 5'''), 148. 1 (C-4'''). 以上数据与文献<sup>[15]</sup>数据一致,故鉴定为 Scrophuloside A<sub>4</sub>。

#### 参考文献

- Li YM(李医明), Jiang SH(蒋山好), Zhu DY(朱大元). Advances in research of chemical constituents and pharmacological effects of *Scrophularia* L.. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30:307-310.
- Houghton PJ, Hikino H. Anti-hepatotoxic activity of extracts

- and constituents of *Buddleia* species. *Planta Med*, 1989, 55 (2):123-126.
- Weng DM(翁东明), Li HT(李黄彤), Li YL(李亚伦), et al. Study on pharmacodynamics of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. oral liquid. *Strait Pharm J* (海峡药学), 1995, 7 (4):14-15.
- Huang X(黄雄), Huang Q(黄嫒). Progress in studying Chinese crude drug figwort root. *Guidance J TCM* (中医药导报), 2007, 13:103-105.
- Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences. *Flora of China* Vol. 67. Fascicule 2. Beijing: Science Press, 1997. 46.
- Ma HY(马红雁), Wang CH(王长虹), Yang L(杨莉), et al. Chemical constituents of *Senecio cannabinifolius* var. *integrifolius*. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009, 7:28-30.
- Li F(李昉), Zhong HM(钟惠民), Wang XJ(王现杰). Chemical Study of *Tetraena mongolica* Maxim. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18:948-950.
- Li YM(李医明), Jiang SH(蒋山好), Gao WY(高文运), et al. Liposoluble constituents from the roots of *Scrophularia ningpoensis*. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, 34:448-450.
- Feng WS(冯卫生), Wang YZ(王彦志), Zheng XK(郑晓珂). Structure Analysis of Chemical Components from Chinese Herbal Medicine. Beijing: Science Press, 2007. 96.
- Yang L(杨莉), Chen HX(陈海霞), Gao WY(高文远). Studies on the chemical constituents and its antitumor activities from *Euphorbia helioscopia* L.. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20:575-577.
- Meng XH(孟宪华). Studies on chemical constituents of the aerial parts of *N. carpesioides*. Lanzhou: Lanzhou University, MSC. 2009, 12-33.
- Feng WS(冯卫生), Wang YZ(王彦志), Zheng XK(郑晓珂). Structure Analysis of Chemical Components from Chinese Herbal Medicine. Beijing: Science Press, 2007. 412-423.
- Zhao BF(赵丙夫). Study on the chemical constituents in  $\text{CO}_2$ -SFE extract of *Alpinia officinarum* Hance. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, MSC. 2009, 15.
- Yao CS(姚春所), Shen YH(沈云亨), Xu YL(许云龙). The chemical constituents of *Coleus forskohill*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(2):1-6.
- Biswanath D, Sudhan D, Yoshihiro H. Naturally occurring iridoids. A review, Part 1. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55:159-222.

# 刺山柑化学成分研究

赵军<sup>1\*</sup>, 杨伟俊<sup>1</sup>, 任远<sup>2</sup>, 徐芳<sup>1</sup>, 徐建国<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004; <sup>2</sup>新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要:** 采用硅胶、聚酰胺和 Sephadex LH-20 等色谱方法从维吾尔药刺山柑中分离得到 11 个化学成分, 通过理化手段及波谱技术分别鉴定为正二十八烷(1)、 $\beta$ -胡萝卜苷(2)、正二十八烷醇(3)、正三十二烷酸(4)、正十六烷酸(5)、琥珀酸(6)、原儿茶酸(7)、4-羟基-5-甲基呋喃-3-羧酸(8)、山萘酚 3-O- $\beta$ -D-芸香糖苷(9)、芦丁(10)和水苏碱(11)。其中化合物 1、3 和 4 为首次从该属植物中分离得到。

**关键词:** 山柑属; 刺山柑; 化学成分; 黄酮; 水苏碱

中图分类号: Q946. .91; R284. 2

文献标识码: A

## Chemical Constituents of *Capparis spinosa* L.

ZHAO Jun<sup>1\*</sup>, YANG Wei-jun<sup>1</sup>, REN Yuan<sup>2</sup>, XU Fang<sup>1</sup>, XU Jian-guo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Xinjiang Key Laboratory for Research and Development of Uighur Medicines, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; <sup>2</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China.

**Abstract:** Eleven chemical compounds were isolated and purified from *Capparis spinosa* L. by extraction and different kinds of column chromatography. Their structures were determined on the basis of the physicochemical properties and spectral analysis as octacosane (1), daucosterol (2), 1-octacosanol (3), lacceroic acid (4), hexadecanoic acid (5), butanedioic acid (6), protocatechuric acid (7), 4-hydroxy-5-methylfuran-3-carboxylic acid (8), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (9), rutin (10) and stachydrine (11). Compounds 1, 3 and 4 were obtained from *Capparis* genus for the first time.

**Key words:** Capparis; *Capparis spinosa* L.; chemical constituents; flavonoid; stachydrine

刺山柑 *Capparis spinosa* L., 又名老鼠瓜、野西瓜、槌果藤等, 为白花菜科山柑属蔓生匍匐小灌木, 广泛分布于亚洲西部、欧洲、北美和大洋洲等地的荒漠戈壁之中, 在我国主要产于新疆和甘肃西部地区。该植物药用果实, 性温, 味辛、苦, 具有祛风、除湿、散寒和消肿止痛之功效, 用于风寒湿痹、脾胃寒痛和浮肿等病症的治疗, 收载于《维吾尔药志》等医药文献中<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明刺山柑果实提取物还具有抗氧化、抗菌、抗炎、降血糖和抗肝炎等多种生物活性<sup>[2]</sup>。因此, 为了深入开发和利用这一药用资源, 本文作者对刺山柑果实进行了化学成分研究, 从中分离得到了 11 个化合物, 分别为正二十八烷(1)、 $\beta$ -胡萝卜苷(2)、正二十八烷醇(3)、正三十二烷酸(4)、正十六烷酸(5)、琥珀酸(6)、原儿茶酸(7)、4-羟基-5-甲基呋喃-3-羧酸(8)、山萘酚 3-O- $\beta$ -

D-芸香糖苷(9)、芦丁(10)和水苏碱(11)。其中化合物 1、3 和 4 为首次从该属植物中分离得到。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

WRS-1A 数字显示熔点测定仪(温度未经校正); INOVA 600 型超导核磁共振仪(美国瓦里安公司); WHF-203B 暗箱式紫外分析仪(上海精科实业有限公司); AB-8 型大孔吸附树脂为天津南开大学生产; 柱色谱及薄层色谱用硅胶为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司生产; 所用试剂均为国产分析纯。

药材于 2008 年 7 月购自乌鲁木齐市二道桥维吾尔药材市场, 由新疆药物研究所张彦福研究员鉴定为刺山柑 *Capparis spinosa* L. 的干燥果实, 样品储存于新疆药物研究所。

### 1.2 提取与分离

刺山柑药材 26.0 kg, 分别以 95% 乙醇和 50% 乙醇各提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩至

收稿日期: 2010-06-30 接受日期: 2010-08-26

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技攻关项目(200933123)

\* 通讯作者 Tel: 86-991-2320227; E-mail: zhaojun21.cn@163.com

浸膏,浸膏以水混悬后,分别以石油醚、乙酸乙酯和饱和正丁醇萃取。取氯仿部位 210 g,硅胶拌样后上硅胶柱,以石油醚:氯仿:甲醇(1:0:0~0:1:1)梯度洗脱,其中石油醚:氯仿 8:2 洗脱部分,经反复硅胶柱层析,得到化合物 **1**(46 mg),氯仿:甲醇 10:1 洗脱部分,经反复硅胶柱层析,得到化合物 **2**(113 mg)和 **3**(29 mg)。取乙酸乙酯部位 114.5 g,硅胶拌样后上硅胶柱,以石油醚:乙酸乙酯:甲醇(95:5:0~0:50:50)梯度洗脱,再经硅胶、Sephadex LH-20 柱反复纯化,得到化合物 **4**(38 mg)、**5**(17 mg)、**6**(20 mg)、**7**(9 mg)和 **8**(23 mg)。正丁醇部位 600 g,以水混悬溶解后,上大孔吸附树脂,水乙醇梯度洗脱,其中 30% 洗脱部位经反复硅胶柱层析得到两黄色粉末,再经 Sephadex LH-20 柱分离纯化,得到化合物 **9**(67 mg)和 **10**(90 mg)。萃取后水液通过 732 型阳离子交换树脂,充分吸附除杂后,以 60% 乙醇(含 4% 氨水)溶液洗脱,洗脱液浓缩后再经 ODS RP-18 和 Sephadex LH-20 反复柱层析,得到化合物 **11**(142 mg)。

## 2 结构鉴定

**化合物 1** 白色粉末, mp. 57 ~ 60 °C, 10% 硫酸乙醇显色呈紫红色。EI-MS  $m/z$ : 394 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 0.86 (6H, m, 2 × CH<sub>3</sub>), 1.23 (52H, m, CH<sub>2</sub> × 26)。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[3]</sup>报道一致,故推断该化合物为正二十八烷。

**化合物 2** 白色粉末, mp. 254 ~ 256 °C, 10% 硫酸乙醇显色呈紫红色。<sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 600 MHz)  $\delta$ : 5.35 (H, brs, H-6), 0.96, 0.87-0.80, 0.66 (18H, 6 × CH<sub>3</sub>), 5.08 (1H,  $J$  = 7.8 Hz, Glc-1')。<sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz)  $\delta$ : 37.4 (C-1), 32.0 (C-2), 71.6 (C-3), 42.4 (C-4), 140.8 (C-5), 121.8 (C-6), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.8 (C-10), 21.2 (C-11), 39.9 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 28.5 (C-16), 56.2 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.3 (C-20), 18.9 (C-21), 34.1 (C-22), 26.4 (C-23), 46.0 (C-24), 29.4 (C-25), 19.9 (C-26), 19.1 (C-27), 23.3 (C-28), 12.1 (C-29), Glc: 102.6 (C-1'), 78.4 (C-2'), 78.5 (C-3'), 75.3 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.8 (C-6')。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[4]</sup>数据报道一致,再与  $\beta$ -胡萝卜苷共薄层,  $R_f$  一致,故推断该化合物为  $\beta$ -胡萝卜

苷。

**化合物 3** 白色粉末(甲醇), mp. 75 ~ 77 °C; 10% 硫酸乙醇呈色显紫红色。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 3.64 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, -CH<sub>2</sub>OH), 1.20 ~ 1.36 (52H, brs, n × CH<sub>2</sub>), 0.85 ~ 0.89 (3H, t, -CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 63.1 为直接与羟基相连的亚甲基碳信号, 32.8 为羟基  $\delta$  位的亚甲基碳信号。 $\delta$ 31.9 ~ 22.7 为一系列的亚甲基碳信号,  $\delta$ 14.1 为末端甲基信号。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[5]</sup>报道的正二十八烷醇一致,故推断该化合物为正二十八烷醇。

**化合物 4** 白色粉末, mp. 76 ~ 78 °C。EI-MS  $m/z$ : 480 [M]<sup>+</sup>, 465, 424, 410, 368, 129, 115, 并出现 111, 97, 85, 71, 57 等递减 14 的碎片峰, 以及 73, 129, 185 等相差 56 的含羧基的离子碎片峰 [(CH)<sub>n</sub>COOH]。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 3.49 (2H, t, CH<sub>2</sub>COOH), 1.22 ~ 1.33 (63H, brs, 31 × CH<sub>2</sub>), 0.85 ~ 0.89 (3H, t, -CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 177.5 (C = O), 39.1, 33.6, 31.9, 29.9-27.4, 24.7, 22.7, 14.1 (CH<sub>3</sub>); 符合饱和脂肪酸的一般裂解规律。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[6]</sup>报道一致,推断该化合物为正三十二烷酸。

**化合物 5** 白色粉末, mp. 49 ~ 52 °C。EI-MS  $m/z$ : 256 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 600 MHz)  $\delta$ : 0.87 (3H, brs, CH<sub>3</sub>), 1.32 (22H, m), 1.82 (2H, m), 2.54 (2H, t,  $J$  = 7.8 Hz), 3.64 (2H, t, CH<sub>2</sub>COOH)。 <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz)  $\delta$ : 175.9 (C = O), 34.8, 32.0, 30.1, 29.9-29.5, 25.6, 22.8, 14.1 (-CH<sub>3</sub>)。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[7]</sup>报道基本一致,故推断该化合物为正十六烷酸。

**化合物 6** 白色粉末, mp. 185 ~ 187 °C, 溴甲酚蓝反应阳性。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 2.56 (2H, m)。 <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ : 176.1 (C = O), 29.7 (CH<sub>2</sub>)。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[8]</sup>报道一致,再与琥珀酸对照品共薄层,  $R_f$  一致,故推断该化合物为琥珀酸。

**化合物 7** 无色针状结晶, mp. 154 ~ 156 °C, 1% 三氯化铁溶液显色呈黄绿色。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 7.43 (1H, d,  $J$  = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5), 7.42 (1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-2) 为芳环上质子信号。 <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)  $\delta$ : 115.1 (C-2), 117.7 (C-5), 123.2 (C-6), 123.9 (C-

1), 146.0 (C-3), 151.5 (C-4) 为芳环上的 6 个碳信号,  $\delta$  170.3 为羧基碳信号。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[9]</sup>报道一致, 故推断该化合物为原儿茶酸。

**化合物 8** 白色粉末, 1% 三氯化铁溶液显色呈黄绿色。EI-MS  $m/z$ : 142 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 7.95 (1H, s, H-2), 2.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 168.4 (COOH), 149.1 (C-4), 144.2 (C-3), 141.3 (C-5), 138.9 (C-2), 14.3 (CH<sub>3</sub>)。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[10]</sup>报道一致, 故推断该化合物为 4-羟基-5-甲基咪喃-3-羧酸。

**化合物 9** 淡黄色粉末, mp. 185 ~ 186 °C, 1% 三氯化铁水溶液反应呈黄绿色, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液显色呈黄色, 盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.55 (1H, s, 5-OH), 10.82 (1H, s, 7-OH), 10.10 (1H, s, 4'-OH), 7.97 (2H, d,  $J$  = 9.5 Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-3'5'), 6.19 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, H-6), 6.39 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, H-8), 5.30 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Glu-H-1), 4.36 (2H, d,  $J$  = 4.0 Hz, Rha-H-1), 0.94 (3H, m, rha-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 156.5 (C-2), 133.2 (C-3), 177.4 (C-4), 159.9 (C-5), 93.7 (C-6), 164.1 (C-7), 98.7 (C-8), 156.8 (C-9), 104.0 (C-10), 120.9 (C-1'), 130.8 (C-2', 6'), 115.1 (C-3', 5'), 159.9 (C-4'), 101.3 (C-1''-glu), 74.1 (C-2''), 76.3 (C-3''), 69.9 (C-4''), 75.7 (C-5''), 66.9 (C-6''), 100.7 (C-1'''-rha), 70.3 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 17.8 (C-6''')。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[11]</sup>报道的山萘酚-3-O-芦丁糖苷一致。

**化合物 10** 黄色针状结晶 (甲醇), mp. 188 ~ 190 °C, 1% 三氯化铁水溶液反应呈黄绿色, 盐酸镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 7.53 (1H, s, 2'-H), 7.52 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, 6'-H), 6.82 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, 5'-H), 6.37 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, 8-H), 6.18 (1H, d,  $J$  = 1.5 Hz, 6-H), 5.33 (1H, d,  $J$  = 7.0 Hz, Glc-H-1), 4.37 (1H, brs, Rha-H-1), 0.98 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, Rha-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 156.4 (C-2), 133.3 (C-3), 177.4 (C-4), 161.2 (C-5), 98.6 (C-6), 164.1 (C-7), 93.6 (C-8), 156.6 (C-9), 103.9 (C-10), 121.2 (C-1'), 115.2 (C-2'), 144.7 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.2 (C-5'), 121.6 (C-6'),

Glc: 100.7 (C-1''), 74.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.9 (C-4''), 74.1 (C-5''), 66.9 (C-6''), Rha: 101.2 (C-1'''), 70.4 (C-2'''), 70.5 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 17.6 (C-6''')。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[12]</sup>报道一致, 故推断该化合物为芦丁。

**化合物 11** 无色片状结晶 (甲醇), 1% 改良碘化铋钾显色呈桔红色; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 3.72 (1H, t,  $J$  = 9.6 Hz), 2.17 (1H, m), 2.10 (1H, m), 2.09 (2H, m), 3.35 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.15 (3H, s), 3.33 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ : 170.7 (C = O), 77.7 (C-2), 68.0 (C-5), 52.7, 46.4 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.6 (C-3), 19.8 (C-4)。以上波谱数据及理化性质与文献<sup>[13]</sup>报道一致, 故推断该化合物为水苏碱。

**致谢:** 核磁共振波谱由新疆医科大学分析测试中心待测, 质谱由中国医学科学院北京药物研究所质谱室代测。

#### 参考文献

- Liu YM (刘勇民). Pharmacography of Uighur, Part Two (维吾尔药志下册). Urumuqi: Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, 1999. 868.
- Ao MZ (敖明章), Gao YY (高莹莹), Yu LJ (余龙江). Advances in studies on constituents and their pharmacological activities of *Capparis spinosa*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 36: 463-468.
- Li CZ (李诚志), Zuo CX (左春旭), Yang SJ (杨尚军), et al. Studies on chemical constituents from leaves of *Nelumbo nucifera*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (Suppl. ): 50-52.
- Liu CX (刘超祥), Gao XQ (高雪芹), Jiang JH (蒋继宏), et al. Study on chemical constituents of root-bark of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Chem Ind Fore Prod* (林产化学与工业), 2009, 29: 100-102.
- Lu YN (陆亚男), Xu ZR (徐正仁), Cai XY (柴兴云), et al. Studies on chemical constituents of *Scolopia chinensis*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2008, 39: 1624-1626.
- Yang B (杨波), Ji Y (计莹), Yin XZ (殷学治), et al. Studies on the fat-soluble chemical constituents of *Carex siderosticta*. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18: 2202-2203.
- Yang XJ (杨晓军), Tu YH (涂院海). Studies on the chemical constituents of Shanxi *Artemisia argy*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 402-403.

# 龙芽草化学成分研究

武海波, 蓝晓聪, 王文蜀\*

中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

**摘要:** 从药用植物龙芽草(*Agrimonia pilosa* Ledeb)全草的95%乙醇提取物中分离得到4个化合物, 通过理化性质及波谱学方法分别鉴定为豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -二醇(1)、豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇(2)、豆甾-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -二醇(3)和 $\beta$ -谷甾醇(4)。化合物1~3均为首次从龙芽草中分离得到。

**关键词:** 蔷薇科; 龙芽草属; 龙芽草; 豆甾二醇; 谷甾醇

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Chemical Constituents from *Agrimonia pilosa* Ledeb

WU Hai-bo, LAN Xiao-cong, WANG Wen-shu\*

College of Life and Environment Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

**Abstract:** The 95% ethanol extract of the whole medicinal plants *Agrimonia pilosa* Ledeb was separated by silica gel column chromatography and thin layer chromatography to afford four compounds, which were identified as stigmast-5-ene-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -diol (1), stigmast-5-ene-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol (2), stigmastane-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diol (3) and  $\beta$ -sitosterol (4) on the basis of spectroscopic analysis and comparison with the reported data. Compounds 1-3 were isolated from *A. pilosa* for the first time.

**Key words:** Rosaceae; *Agrimonia*; *Agrimonia pilosa* Ledeb; stigmastane-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diol;  $\beta$ -sitosterol

龙芽草(*Agrimonia pilosa* Ledeb)又名仙鹤草, 为蔷薇科(Rosaceae)龙芽草属(*Agrimonia*)多年生草本植物。龙芽草属世界上有20余种, 欧洲中部以及苏联、蒙古、朝鲜、日本和越南北部均有分布, 我国约有4种, 南北各省区均产<sup>[1]</sup>。现代药理学研究证实, 龙芽草具有收敛止血、截疟、止痢、解毒等作用<sup>[2]</sup>。早期文献报道其主要成分有仙鹤草素、仙鹤草内酯、鞣质、甾醇、有机酸、酚性成分、皂苷、仙鹤草酚(A、B、C、D、E)等<sup>[3]</sup>。为研究和开发民族地区天然资源, 我们对产于四川凉山彝族自治州的龙芽草全草进行了较系统的化学成分研究。从中分离得到四个化合物, 利用核磁共振等现代波谱数据确定了化合物结构为豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -二醇(1)、豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇(2)、豆甾-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -二醇(3)和 $\beta$ -谷甾醇(4)。化合物1~3均为首次从龙芽草中分离得到。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

JA2003 电子天平(上海恒平仪器厂); RE52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); BT224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); WRR 熔点仪(上海精密仪器有限公司); JASCO V-550 紫外可见分光光度计(日本分光公司); Bruker-VERTEX 70 FT-IR 红外光谱仪; Bruker ARX 400 超导核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司); Agilent 6890N-5975N 质谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。95%乙醇, 氯仿, 丙酮, 石油醚, 甲醇, 乙酸乙酯(均分析纯, 北京化工厂); GF<sub>254</sub> 薄层色谱硅胶与200~300目柱色谱硅胶(青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20(Pharmacia); Acetone-d<sub>6</sub>(北京化工厂); 显色剂为10%硫酸-乙醇。

龙芽草(*Agrimonia pilosa* Ledeb)采自四川凉山, 由中科院植物研究所陈艺林教授鉴定, 标本存放于中央民族大学生命与环境科学学院。

### 1.2 提取与分离

龙芽草全草1.45 kg, 95%乙醇提取三次, 每次浸泡一周。提取液回收乙醇, 得浸膏50 g。50 g 硅

收稿日期: 2010-06-22 接受日期: 2010-08-09

基金项目: 中央民族大学“111 引智工程”项目资助 B08044; 中央民族大学“985”工程项目资助(MUC985-14, MUC98507-08); 北京市教委科技成果转化与产业化项目。

\* 通讯作者 Tel: 86-10-68932242; E-mail: wangwshu@gmail.com

胶拌匀浸膏, 1 kg 硅胶装柱, 以石油醚/乙酸乙酯溶剂系统经硅胶柱层析, 梯度由 30:1 至 1:1 至纯乙酸乙酯, 洗脱共得到 10 个馏分 (F1 ~ F10)。F4 静置后有针晶析出, 经 Sephadex LH-20 洗脱, 以氯仿/甲醇 (1:1) 为洗脱剂, 得到化合物 4 (43 mg); F8 经硅胶柱层析, 以氯仿/丙酮 (10:1) 为洗脱剂, 多次柱层析后薄层制备, 以石油醚/丙酮 (5:1) 为展开剂, 连续展三次, 得到化合物 1 (8.4 mg) 和 2 (49.1 mg); F9 经硅胶柱层析, 以氯仿/丙酮 (8:1) 为洗脱剂, 多次柱层析后薄层制备, 以石油醚/丙酮 (5:1) 为展开剂, 连续展三次, 得到化合物 3 (11.1 mg)。

## 2 结构鉴定

**化合物 1** 无色胶状物 (丙酮), 薄层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 10% 硫酸-乙醇显色加热氧化后显蓝色。ESI-MS  $m/z$ : 431 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 5.25 (1H, brs, H-6), 3.80 (1H, brs, H-7), 3.56 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 0.85 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-29), 0.84 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-26), 0.80 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 37.0 (C-1, CH<sub>2</sub>), 31.6 (C-2, CH<sub>2</sub>), 71.4 (C-3, CH), 41.7 (C-4, CH<sub>2</sub>), 143.5 (C-5, C), 125.4 (C-6, CH), 73.4 (C-7, CH), 40.9 (C-8, CH), 48.3 (C-9, CH), 36.4 (C-10, C), 21.1 (C-11, CH<sub>2</sub>), 39.5 (C-12, CH<sub>2</sub>), 42.9 (C-13, C), 55.3 (C-14, CH), 26.4 (C-15, CH<sub>2</sub>), 28.4 (C-16, CH<sub>2</sub>), 56.2 (C-17, CH), 11.9 (C-18, CH<sub>3</sub>), 19.1 (C-19, CH<sub>3</sub>), 36.0 (C-20, CH), 18.8 (C-21, CH<sub>3</sub>), 34.0 (C-22, CH<sub>2</sub>), 26.3 (C-23, CH<sub>2</sub>), 45.8 (C-24, CH), 29.2 (C-25, CH), 19.7 (C-26, CH<sub>3</sub>), 18.9 (C-27, CH<sub>3</sub>), 23.0 (C-28, CH<sub>2</sub>), 12.0 (C-29, CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[4]</sup>报导的豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -二醇基本一致。

**化合物 2** 无色胶状物 (丙酮), 薄层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 10% 硫酸-乙醇显色加热氧化后显蓝色。ESI-MS  $m/z$ : 431 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 5.55 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-6), 3.80 (1H, m, H-7), 3.54 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 0.88 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-29), 0.84 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-26), 0.81 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 37.0 (C-1, CH<sub>2</sub>), 31.4 (C-2, CH<sub>2</sub>), 71.4 (C-3, CH), 42.0 (C-

4, CH<sub>2</sub>), 143.8 (C-5, C), 123.9 (C-6, CH), 65.4 (C-7, CH), 37.5 (C-8, CH), 42.3 (C-9, CH), 37.4 (C-10, C), 21.7 (C-11, CH<sub>2</sub>), 39.2 (C-12, CH<sub>2</sub>), 42.2 (C-13, C), 49.4 (C-14, CH), 25.9 (C-15, CH<sub>2</sub>), 28.3 (C-16, CH<sub>2</sub>), 55.7 (C-17, CH), 11.7 (C-18, CH<sub>3</sub>), 18.3 (C-19, CH<sub>3</sub>), 36.1 (C-20, CH), 18.8 (C-21, CH<sub>3</sub>), 33.9 (C-22, CH<sub>2</sub>), 26.0 (C-23, CH<sub>2</sub>), 45.8 (C-24, CH), 29.1 (C-25, CH), 19.8 (C-26, CH<sub>3</sub>), 19.0 (C-27, CH<sub>3</sub>), 23.0 (C-28, CH<sub>2</sub>), 12.0 (C-29, CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[4]</sup>报导豆甾-5-烯-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -二醇基本一致。

**化合物 3** 无色胶状物 (丙酮), 薄层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 10% 硫酸-乙醇显色加热氧化后显蓝色。ESI-MS  $m/z$ : 433 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 3.67 (1H, m, H-6), 3.35 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21), 0.88 (3H, t,  $J = 6.3$  Hz, H-29), 0.85 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 37.3 (C-1, CH<sub>2</sub>), 32.3 (C-2, CH<sub>2</sub>), 71.3 (C-3, CH), 32.6 (C-4, CH<sub>2</sub>), 51.5 (C-5, CH), 69.5 (C-6, CH), 42.6 (C-7, CH<sub>2</sub>), 34.4 (C-8, CH), 54.0 (C-9, CH), 36.3 (C-10, C), 21.1 (C-11, CH<sub>2</sub>), 39.9 (C-12, CH<sub>2</sub>), 42.7 (C-13, C), 54.6 (C-14, CH), 23.3 (C-15, CH<sub>2</sub>), 28.4 (C-16, CH<sub>2</sub>), 56.2 (C-17, CH), 11.9 (C-18, CH<sub>3</sub>), 13.4 (C-19, CH<sub>3</sub>), 36.4 (C-20, CH), 19.0 (C-21, CH<sub>3</sub>), 34.0 (C-22, CH<sub>2</sub>), 25.3 (C-23, CH<sub>2</sub>), 45.8 (C-24, CH), 29.2 (C-25, CH), 19.9 (C-26, CH<sub>3</sub>), 18.8 (C-27, CH<sub>3</sub>), 23.0 (C-28, CH<sub>2</sub>), 11.9 (C-29, CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[5]</sup>报导的豆甾-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -二醇基本一致。

**化合物 4** 白色针晶 (氯仿), mp. 140 ~ 142 °C, 薄层检测在紫外灯 254 nm 下无荧光, 10% 硫酸-乙醇显色加热氧化后显紫红色。同  $\beta$ -谷甾醇标准品 TLC 对照, 混合点样后经多个展开系统展开均为 1 个斑点, 混合后测定熔点不降, 确定该化合物为  $\beta$ -谷甾醇。

## 参考文献

- 1 The Editorial Board of the Flora of China of Chinese Academy of Sciences (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 2005. 457. (下转第 65 页)



# 具有纤溶活性作用的海洋真菌代谢产物的分离与菌株鉴定

王 幸, 吴文惠, 孙立春, 陈志华, 张 洁, 包 斌\*

上海海洋大学食品学院, 上海 201306

**摘要:** 本文旨在分离具有纤溶活性作用的化合物和鉴定产生纤溶活性化合物的菌株 FG216 的种属分类。以马铃薯蔗糖培养基为种子培养基, 改良查氏培养基为发酵培养基对菌株进行发酵培养, 用甲醇作为提取溶剂, 通过半制备型高效液相色谱从真菌 FG216 的 1 L 发酵液中分离和精制了 12 mg 纤溶活性化合物, 该纤溶活性化合物在纤溶酶原和单链尿激酶性纤溶酶原激活剂相互活化反应体系中添加 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  活性最高。对 FG216 菌株 rDNA 的 ITS 基因 (ITS-5.8 S rDNA) 进行 PCR 扩增、测序, 从 GenBank 获取相似序列, 通过序列比对分析和系统发育分析表明菌株 FG216 与 *Stachybotrys longispora* 同源性最高。从分离的海洋微生物葡萄穗霉属菌株 FG216 分离得到的纤溶活性化合物具体促进纤溶酶原和单链尿激酶性纤溶酶原激活剂相互活化的作用。

**关键词:** 纤溶活性化合物; 分离; 高压液相色谱; 菌株鉴定; 葡萄穗霉属

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

## Isolation of Fibrinolytic Active Compound from Marine Fungi and Initial Identification of the Strain

WANG Xing, WU Wen-hui, SUN Li-chun, CHEN Zhi-hua, ZHANG Jie, BAO Bin\*

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** To isolate fibrinolytic active compounds from cultures of marine fungi FG216 and initial identify of the strain, czapek medium was choosed as fermentation medium. The active compounds with fibrinolytic activity measured by microplate reader were isolated from a culture broth and refined with marine fungi FG216 by using semi-preparative HPLC. In the reciprocal activation system of prourokinase and plasminogen, the activity was highest when the additive amount of fibrinolytic active compound was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The complete ITS sequence of FG216 strain was cloned and sequenced, and phylogenetic tree based on ITS-5.8 S rDNA sequences showed that FG216 strain has a high homology with *Stachybotrys longispora* on taxonomic level. Reciprocal activation of prourokinase and plasminogen was enhanced by the fibrinolytic active compound with the strain of marine fungi FG216.

**Key words:** fibrinolytic active compound; isolation; HPLC; strain identification; *Stachybotrys*

血栓性疾病如急性心肌梗塞、脑血栓、肺血栓等是严重威胁人类健康及生命的主要疾患之一。在西方国家, 因血栓性疾病带来的死亡已占人口死亡率的首位。目前, 溶栓疗法已是心肌梗塞和其它血栓性疾病的常规治疗方法<sup>[1]</sup>。因此, 溶栓药物的研究在国际上很受重视。现在使用的溶栓药物如链激酶 (Streptokinase, SK), 尿激酶 (Urokinase, UK), 组织型纤溶酶原激活剂 (Tissue-type plasminogen activator, t-PA) 等都存在半衰期短、产生再栓塞且价格昂

贵等明显不足, 而且它们对纤维蛋白无特异性, 产生血栓溶解的同时常伴有出血危险性。针对溶栓药物应用中出现的上述问题, 除了通过蛋白质工程、基因工程对原有溶栓药物进行各种结构和功能上的改造以开发新型的溶栓药物以外, 探索具有新型溶血栓作用机理的溶血栓化合物是心血管疾病研究的重要方向, 特别是从微生物代谢产物中研究和研究低分子纤溶促进化合物已成为探索新型纤溶疗法药物的重要途径<sup>[2-5]</sup>。

本实验采用溶剂提取法, 通过半制备型 HPLC, 利用活性跟踪法从筛选出的海洋微生物菌株 FG216 的发酵液中分离得到了具有纤溶活性的化合物, 体外检测了该化合物的纤溶活性, 采用分子生物学的方法对菌株 FG216 进行初步分类鉴定。

收稿日期: 2010-05-11 接受日期: 2010-09-15

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (10ZR1413800); 上海市重点学科建设项目 (J50704)

\* 通讯作者 E-mail: bbao@shou.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌种

菌株 FG216 分离自舟山群岛海域离岸 100 m 附近的上层海水,保藏于-80 °C 冰箱中。

### 1.1.2 培养基的组成和种类

菌株 FG216 保存在 25 °C 环境的马铃薯蔗糖斜面培养基<sup>[6]</sup> (Potato Sucrose Agar, PSA),活化 FG216 的种子培养基是不含有琼脂的 PSA 培养基,改良察氏培养基<sup>[6]</sup> (蔗糖 50 g,硝酸钠 3 g,磷酸氢二钾 0.1 g,硫酸镁 0.5 g,氯化钾 0.5 g,酵母提取物 1 g,氯化钴 0.0025 g,硫酸亚铁 0.015 g,氯化钙 0.0065 g,蒸馏水 1000 mL,pH 5.8) 做为发酵培养基。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的活化与种子培养

将冷冻保藏的菌种 FG216 于室温下解冻,取 50  $\mu$ L 接种于 PSA 斜面培养基上 25 °C 培养一周。将 PSA 斜面 FG216 菌株接种于含有 100 mL 种子培养液的 500 mL 的三角瓶中,25 °C,180 rpm 培养 3 d 即为种子培养液。

### 1.2.2 菌株发酵培养

取 FG216 种子培养液以 1% 的接种量分别添加到 4 个含有 250 mL 发酵液的 1000 mL 的三角瓶中,25 °C,180 rpm 发酵培养 5 d,在发酵培养 96 h 后加入培养液体积 1% 的赖氨酸。

### 1.2.3 纤溶活性化合物的提取与分离

FG216 发酵培养结束后,三角瓶中加入等体积的 100% 的甲醇,超声提取 15 min,在转速 10000 rpm 的条件下离心 15 min,过滤,弃去沉淀,上清液在 40 ~ 60 °C 的条件下减压浓缩至干,浓缩物真空干燥 12 h,残留物溶于少量甲醇,过滤弃去沉淀,收集上清液,再减压浓缩,真空干燥,所得残留物溶于少量甲醇,用于 HPLC 分离。

采用岛津 SCL-10 Avp HPLC 分离系统,样品在流速 10 mL/min,检测波长 265 nm 的条件下被色谱柱 Sepax HP-C<sub>18</sub> 柱 (21.2  $\times$  250 mm, 10  $\mu$ m) 两次精制,第一次流动相为甲醇:0.05 mol/L 乙酸铵 = 80:20,第二次流动相为乙腈:0.1% 甲酸 = 40:60,用 Sepax HP-C18 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m) 鉴定所得化合物的纯度。

采用活性跟踪法分离和纯化纤溶活性化合物。

### 1.2.4 纤溶活性的测定

采用发色底物法评定微生物代谢产物的纤溶促进作用,筛选纤溶活性最强的化合物<sup>[2]</sup>。在纤溶酶原 (Plasminogen, Plg)、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (single chain urokinase-type plasminogen activator, Pro-uPA)、牛血清白蛋白 (Bull Serum Albumin, BSA)、发色底物和待测样品构成的反应体系中,连续测定纤溶酶的生成引起的吸光度的变化以评定化合物的活性。于 96 孔圆底平板孔内注入纤溶酶原溶液、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂溶液、牛血清白蛋白和发色底物溶液各 10  $\mu$ L,其浓度分别为 0.1、0.1 mg/mL、500 nmol/mL 和 1 mmol/L,加入样品溶液 10  $\mu$ L 后成 50  $\mu$ L 反应体系。在 37 °C 于 405 nm 处连续 150 min 测定吸光度的变化以评定样品的纤溶活性。

### 1.2.5 菌株鉴定及系统进化分析

本实验采用改进的 CTAB 法<sup>[7]</sup> 对真菌 FG216 的基因组 DNA 进行提取,使用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 19 bp) 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 20 bp) 扩增真菌全长序列的 ITS,引物由捷瑞生物公司合成。PCR 反应产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, USA) 纯化符合预测长度的电泳条带,并将纯化后的产物连接于 pGEM-T 载体 (Promega 公司),操作按该公司说明书进行。连接产物转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞 (TianGene 公司) 进行克隆,经过蓝白斑筛选并用 M13F 和 M13R 引物 PCR 扩增检测阳性克隆,选取 3 个阳性克隆送华大基因公司进行测序。将测得的序列提交美国 NCBI 的 GenBank 获取对比指标靠前的 16 个相似序列,通过 BLAST 工具和 DNASTar 软件进行比对分析并以 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,分析菌株亲缘关系。

# 2 结果与分析

## 2.1 纤溶活性化合物的分离

斜面菌株 FG216 经种子培养 3 d 后,按 1% 的接种量接种于 4 个含有 250 mL 发酵培养液的三角瓶中,25 °C,180 rpm 的条件下发酵培养 5 d。发酵结束后,在培养液中加入等量的甲醇,经提取获得上清液,上清液减压浓缩得到浸膏,溶于甲醇,弃去不溶物,重复此过程一次,获得的样品被用于 HPLC 分

离。流程如图 1 所示。

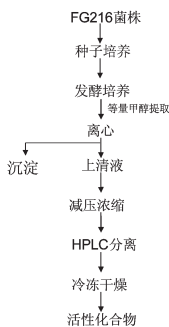


图 1 从 FG216 中分离纤溶活性化合物的流程

Fig. 1 Flow diagram of the isolation of fibrinolytic active compound from FG216

以甲醇和 0.05 mol/L 乙酸铵为流动相,使用 Sepax HP-C<sub>18</sub> 色谱柱对含有纤溶活性的甲醇提取物进行了分析,结果如图 2 所示。

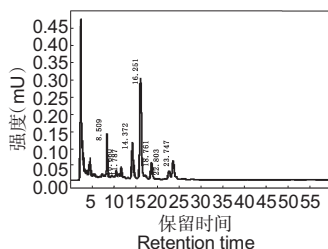


图 2 FG216 培养液甲醇提取物的 HPLC 分析图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of the sample extracted with methanol

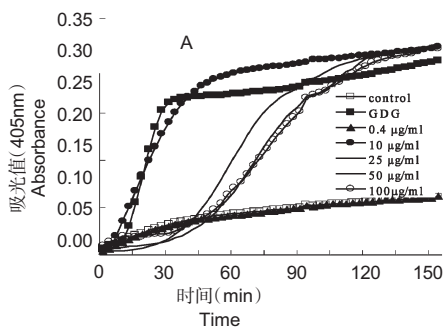


图 4 GDG 对 Plg 和 pro-uPA 反应体系的活性促进作用

Fig. 4 The activation produced by GDG on the system of Plg and pro-uPA

按照实验方法 1.2.4,反应体系中添加的化合物 FGFC1 的浓度分别为 0、0.4、10、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,以葡萄糖甘油二酯 (Glucosyldiacylglycerol, GDG) 为阳性对照,通过 150 min 的反应,能够

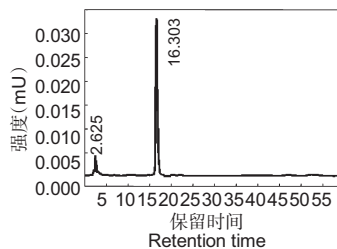


图 3 化合物 FGFC1 的 HPLC 图谱

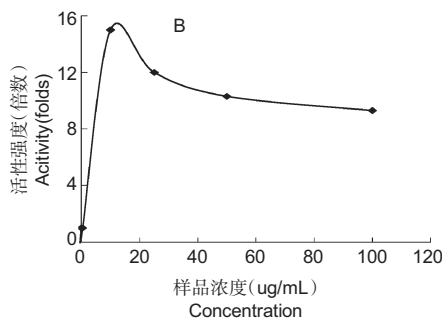
Fig. 3 HPLC chromatogram of compound FGFC1

从图 2 可以看到,FG216 培养液的甲醇提取物主要有 8 个峰,在这 8 个峰中,保留时间分别为 8.509、14.372、16.251 和 18.761 min 的四个峰具有较好的分离度,在下一步的分离中可能被纯化,其中峰 16.251 的分离组分具有最大的纤溶活性。

使用半制备型 Sepax HP-C<sub>18</sub> 逆相色谱柱以甲醇和 0.05 mol/L 乙酸铵为流动相进行第一次精制,再以乙腈和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行第二次精制,分离了 FG216 菌株代谢产物中的纤溶化合物 (图 3)。从 1L FG216 发酵培养液得到精制的纤溶化合物 (fibrinolytic compound) 为 24.9 mg,该化合物被称为 FGFC1。

## 2.2 化合物的体外纤溶活性

利用单链尿激酶型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原的相互活化作用,对化合物 FGFC1 的纤溶促进作用进行了分析。该物质的促进单链尿激酶型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原的相互活化作用被用随时间变化的吸光值来表示。



观察到添加化合物 FGFC1,纤溶酶原和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂反应体系的吸光度值被提高了 (图 4, A)。

反应体系添加 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的化合物 FGFC1,经

150 min 反应后,与对照相比吸光值基本上没有增加。随着化合物 FGFC1 浓度的不断提高,吸光值也在逐渐增加。当化合物 FGFC1 添加到一定浓度后,反应体系的吸光值随浓度的增加而降低,如图 4(B) 所示。

### 2.3 菌株 FG216 的鉴定

使用改进的 CTAB 法提取真菌 FG216 的基因组

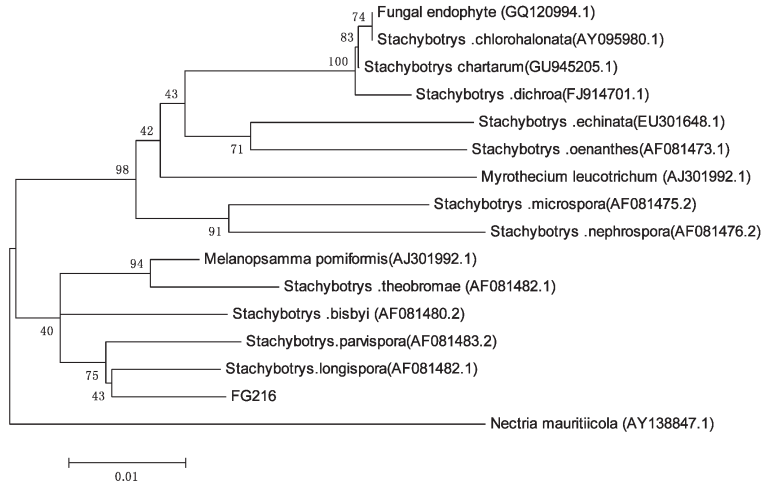


图 5 基于 ITS-5.8 S rDNA 区域序列的菌株 FG216 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on ITS-5.8 S rDNA sequences showing the positions of strain FG216 and related strains

利用 *Stachybotrys chartarum*, *S. dichroa*, *Fungal endophyte*, *S. chlorohalonata*, *S. oenanthes*, *S. echinata*, *Myrothecium leucotrichum*, *S. microspora*, *S. nephrospora*, *S. longispora*, *S. parvispora*, *Melanopsamma pomiformis*, *S. theobromae*, *S. bisbyi*, *S. elegans* 和 FG216 构建了系统发育树,发现 FG216 与 *S. longispora* 处于同一分支,表明两者亲缘关系最近。

### 3 结论

本实验以纤溶酶原和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂构成的相互活化反应为评价体系,探索了海洋真菌 FG216 的发酵液提取物中促进血栓纤溶的低分子化合物,并通过分子生物学的方法对菌株 FG216 的种属进行了鉴定。通过半制备型 HPLC 从 FG216 发酵液中精制得到了活性化合物 FGFC1,通过对化合物 FGFC1 的纤溶促进作用的研究,发现体外构筑的纤溶酶原和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂反应体系中,随着化合物 FGFC1 浓度的逐渐升高,反应体系的吸光度值也被提高了,而且其浓度在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时其活性达到最大。通过对 FG216 菌株 rDNA 的 ITS 基因 (ITS-5.8 s rDNA) 进行 PCR 扩增、测

DNA,其 rDNA-ITS PCR 产物经凝胶电泳能扩增出目的条带,扩增产物大小在 500 ~ 750 bp 之间,测序结果表明,其大小为 587 bp。DNA 序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,并与目前已发表的相关序列进行系统进化分析构建 N-J 系统发育树(图 5)。

序,DNA 序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,得到了较多的相似序列,系统进化树显示真菌 FG216 与 *Stachybotrys longispora* 同源性高。

海洋微生物生物活性物质的活性广泛而多样,但研究的最多的是抗癌方面的活性,其次是抗菌、抗病毒活性。近年来,抗心血管病(降压、降血脂等)、抗氧化、神经生长与功能调节等方面活性的报道也逐渐增多。但是从海洋微生物中筛选纤溶活性物质的研究较少,仅有零星的报道<sup>[8,9]</sup>。中国海洋大学的刘晨光等从一株海洋假单胞菌中分离制备出一种具有纤溶活性的海洋假单胞菌碱性蛋白酶(MPAP),MPAP 有直接降解纤维蛋白和纤维蛋白原的作用,而无纤溶酶活性,体内和体外实验均表明该酶具有较强的纤溶活性<sup>[10-13]</sup>。日本 Koyama K 等人从未知的海洋真菌(MPUC 046)中分离到一种新型的二萜类化合物 phomactin H,该化合物同已发现的 phomactin A-G 化合物一样,均属于血小板活化因子(PAF)拮抗剂,能抑制 PAF 诱导的血小板凝聚,同时推测此活性与化合物的某个特定骨架结构有关<sup>[14]</sup>。本实验中的到的活性化合物具有较强的纤溶促进作用,但是其纤溶活性作用机制以及活性化

合的结构还有待于进一步的研究。

### 参考文献

- 1 Jia N(贾楠), Mu GQ(牟光庆). Progress in separation and purification of fibrinolytic. *Food Sci Technol* (食品科技), 2007, 4:1-4.
  - 2 Wu WH(吴文惠), Bao B(包斌). Review of low molecular weight compounds from the microbial metabolites that enhancing fibrinolysis. *J Chin Med Res* (中华医学研究杂志), 2006, 6:1354-1359.
  - 3 Wu WH(吴文惠), Bao B(包斌). Study on a novel natural compound enhancing fibrinolysis. *Food Sci* (食品科学), 2005, 26(10):34-42.
  - 4 Tachikawa K, Hasumi K, Endo A. Enhancement of plasminogen binding and fibrinolysis by chlopeptin. *Thromb Res*, 1997, 87:571-576.
  - 5 Tachikawa K, Hasumi K, Endo A. Enhancement of plasminogen binding to U937 cells and fibrin by complestatin. *Thromb Haemost*, 1997, 77:137-142.
  - 6 Yang WB(杨文博). Microbiology Experiment(微生物学实验). Chemical Industry Press, 2004. 17.
  - 7 Zhang H(张红), Qing LH(秦莲花), Tan Q(谭琦), et al. Extract genomic DNA from *Lentinula edodes* using CTAB Method. *J Shanghai Univ, Nat Sci* (上海大学学报, 自科版), 2006, 12:547-550.
  - 8 Sumi H, Nakajima N, Mihara H. Fibrinolysis relating substances in marine creatures. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 102B:163-167.
  - 9 Landau NS, Gulikova OM, Egorov NS. Specific control over the synthesis of plasmin-like and plasminogen-activating proteinases in marine bacteria. *Mikrobiologiya*, 2000, 69:185-190.
  - 10 Wei X(魏香), Liu CG(刘晨光), Liu WS(刘万顺). Selection of ferment medium for the secretion of plasmin from a marine bacteria. *Mar Sci* (海洋科学), 2001, 25(2):1-3.
  - 11 Liu CG(刘晨光), Wei X(魏香), Liu WS(刘万顺). Study on characteristics of fibrinolytic enzyme from marine *Pseudomonas*. *J Ocean Univ Qingdao* (青岛海洋大学学报), 2001, 31:730-734.
  - 12 Liu CG(刘晨光), Wang P(王鹏), Liu CS(刘成圣), et al. Study on thrombolytic effect of a novel fibrinolytic enzyme from *Pseudomonas in vitro*. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2002, 23:34-35.
  - 13 Qu ZL(璩竹玲), Liu S(刘赛), Liu CG(刘晨光), et al. Study on the fibrinolytic activity and thrombolytic of MPAP. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2003, 94(4):26-29.
  - 14 Koyama K, Ishino M, Takatori K, et al. A novel diterpene from an unidentified marine-derived fungus. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45:6947-6948.
- 
- (上接第 135 页)
- 15 Miron T, et al. A method for continuous production of allicin using immobilized alliinase. *J Anal Biochem*, 2006, 351:152-154.
  - 16 Fujiwara M, et al. "Allithiamine", a newly found derivative of vitamin B1 III: On the allicin homologues in the plants of the *Allium species*. *J Biochem*, 1955, 42:591-601.
  - 17 Jager H. Quantitative bestimmung von allian in frischer knoblauch. *J Arch Pharm*, 1955, 288:145.
  - 18 Carson JF, Wong FF. A colour reaction for thiosulphinates. *Nature*, 1959, 183:1673.
  - 19 Schwimmer S, Mazelis M. Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion). *Arch Biochem Biophys*, 1963, 100:66-73.
  - 20 Nakata C, et al. An improved colorimetric determination of thiosulfinate. *J Anal Biochem*, 1970, 37:92-97.
  - 21 Saghri RA, et al. Determination of aliphatic mono- and disulfides in *Allium* by gas chromatography and their distribution in the common food species. *J Proc Amer Soc Hort Sci*, 1964, 84:386-398.
  - 22 Vermin G, et al. GC-MS computer analysis of volatile sulfur compounds in garlic essential oils. *Planta Med*, 1986, 52:96-101.
  - 23 Miething H. Allicin and oil in garlic bulbs HPLC quantitative determination. *Deut Apotheker-Zeitung*, 1985, 125:2049-2050.
  - 24 Voigt M, Wolf E. HPLC-bestimmung von knoblauchwirkstoffen in extrakten, pulver und fertigarzneimitteln. *Deut Apotheker-Zeitung*, 1986, 126:591-593.
  - 25 Diego M, et al. Validated liquid chromatographic method for quantitative determination of allicin in garlic powder and tablets. *J Sep Sci*, 2007, 30:2703-2707.
  - 26 European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 6. 0. Strasbourg: Council of Europe, 2006. 1651.
  - 27 Yuan YZ(袁耀佐), et al. High performance liquid chromatographic method for the determination of allicin using ethylparaben as substitute of allicin reference standard. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2008, 8:1083-1088.
  - 28 Miron T, et al. A spectrophotometric assay for allicin and alliinase activity: reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. *Anal Biochem*, 1998, 265:317-325.
  - 29 Eilat S, et al. Allicin. *Drugs Fut*, 1996, 21:1101-1111.

# *N,N,N*-三甲基壳聚糖甲基硫酸盐的合成及理化性质的测定

周 忠\*, 沈 巍, 王建新

江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122

**摘要:** 壳聚糖与甲醛、甲酸反应得到 *N,N*-二甲基壳聚糖, 然后以硫酸二甲酯为季铵化试剂反应得到 *N,N,N*-三甲基壳聚糖甲基硫酸盐(TMCMS), 用 IR、<sup>1</sup>H NMR 和元素分析对其结构进行了表征。元素分析结果表明其季铵化度为 74.6%, 差示扫描量热法和热重分析法结果表明其热稳定性比壳聚糖差, 但其水溶性明显优于壳聚糖, 25 °C 时在水中的溶解度可达 20 mg/mL, 浓度为 2 mg/mL 时在 pH 3 ~ 12 范围内无沉淀产生。

**关键词:** 壳聚糖; 硫酸二甲酯; *N,N,N*-三甲基壳聚糖甲基硫酸盐; 季铵盐; 合成

中图分类号: O631.1

文献标识码: A

## Synthesis and Physicochemical Properties of *N,N,N*-trimethyl Chitosan Methylsulfate

ZHOU Zhong\*, SHEN Wei, WANG Jian-xin

School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** *N,N,N*-trimethyl chitosan methylsulfate (TMCMS) was prepared by a two-step reaction. First, *N,N*-dimethyl chitosan (DMC) was synthesized by reaction of chitosan with formic acid and formaldehyde. Then, DMC reacted with dimethyl sulfate to yield TMCMS. It was characterized by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR and elemental analysis. Its average quaternization degree was 74.6% calculated according to elemental analysis results. Differential scanning calorimetry and thermogravimetry results demonstrated its thermal stability was lower than chitosan. However, its water-solubility was obviously better than chitosan, its solubility in water reached 20 mg/mL at 25 °C, and its 2 mg/mL solution was stable in a wider pH range (3-12).

**Key words:** chitosan; dimethyl sulfate; *N,N,N*-trimethyl chitosan methylsulfate; quaternary ammonium salt; synthesis

通过对壳聚糖(CTS)的 2-NH<sub>2</sub> 进行季铵化改性是制备水溶性壳聚糖衍生物的一种重要途径, 并且能赋予其抗菌、抗静电、保湿、絮凝等功能, 因此在食品、医药、化妆品和污水处理等领域的研究和应用越来越多<sup>[1-5]</sup>。

*N,N,N*-三甲基壳聚糖季铵盐(TMC)是研究最早的一种壳聚糖季铵盐。早在 1985 年, Muzzarelli 和 Tanfani 用壳聚糖与甲醛反应得到 Schiff 碱, 再经硼氢化钠还原得到 *N,N*-二甲基壳聚糖(DMC), 然后与碘甲烷反应制得 *N,N,N*-三甲基壳聚糖碘化铵(TMCI), 但不溶于水<sup>[6]</sup>。次年, Domard 等用壳聚糖与碘甲烷直接反应制得了 TMCI, 可溶于水, 再用 Cl<sup>-</sup>型阴离子交换树脂交换, 转化为 *N,N,N*-三甲基壳聚糖氯化铵(TMCCI), 稳定性比 TMCI 好<sup>[7]</sup>。之后,

一些改进的合成方法相继被报道, 尤其是近年来在提高季铵化度和减少壳聚糖上羟基的甲基化方面取得了很大进展<sup>[8-12]</sup>。2006 年, 本课题组通过 Esehweiler Clarke 反应制得 DMC, 再以 DMSO 和少量水为溶剂与碘甲烷反应制得了季铵化度为 80.3% 的 TMCI, 水溶性良好, 与之前的方法相比, 更简便, 合成成本更低<sup>[9]</sup>。本文在此研究基础上首次以安全性和价格相对较优的硫酸二甲酯代替碘甲烷作为季铵化试剂与 DMC 反应合成 *N,N,N*-三甲基壳聚糖甲基硫酸盐(TMCMS), 对其结构进行表征, 并测定其热稳定性和水溶性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司, 自测脱乙酰度为 91.6%, 黏均分子量为  $3.62 \times 10^5$ ); 硫酸二甲酯(分析纯, 上海金山化工厂); 透析袋(截留分子量 14000, 日本和光工业公司); 甲醛(37% ~

40%)、甲酸(88%)和1-甲基-2-吡咯烷酮等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

FTLA2000-104 红外分光光度计(美国 ABB 公司);Vario III 元素分析仪(德国 element 公司);UNITY INOVA400 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司);DSC 7 差示扫描量热(美国 Pekin Elmer 公司);WRT-3P 热重分析仪(上海精密科学仪器有限公司);双光束紫外可见分光光度计 TU-1901(北京普析通用仪器有限责任公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 DMC 的合成

4 g 壳聚糖,加入 200 mL 去离子水和 10 mL 甲酸,搅拌升温至 70 °C。当壳聚糖完全溶解时,加入 8 mL 甲醛,搅拌,反应 5 h。用 15% 氢氧化钠调溶液 pH

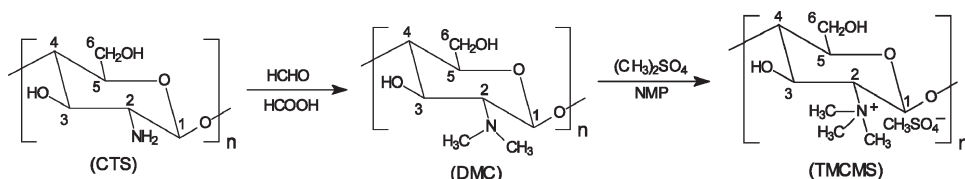


图 1 TMCMS 的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of TMCMS

### 1.2.3 IR、<sup>1</sup>H NMR 和元素分析

样品用 KBr 压片后进行红外图谱测定。目标产物溶于 D<sub>2</sub>O 后测定其<sup>1</sup>H NMR 图谱。用元素分析仪测定目标产物中 C、H、N 和 S 含量,并计算出季铵化度。

### 1.2.4 热分析

差示扫描量热分析(DSC)和热重分析(TG)的温度范围为 35 ~ 400 °C,升温速率为 10 °C/min。

### 1.2.5 水溶性及 pH 的影响

称取 0.2 g TMCMS 加入 10 mL 去离子水,25 °C,振荡 2 h,离心得到不溶物干燥并称重,计算溶解度<sup>[13]</sup>。

pH 对水溶性的影响通过其透光率进行评价:用 1% 的 HAc 分别配制 2 mg/mL 的壳聚糖和 TMCMS 溶液,分别滴加 1.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值,以去离子水为参比,用 1 cm 厚的石英比色皿于 600 nm 处用紫外分光光度计测其透光率。当透光率 < 90% 时认为不能溶解<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产物结构表征

壳聚糖、DMC 和 TMCMS 的红外图谱如图 2 所

值至 11 左右,析出大量凝胶状固体,抽滤,用去离子水洗涤至中性,用乙醚在索氏提取器中提取 48 h,最后产物于真空干燥箱中 50 °C 干燥,得到 4.2 g 产物。

### 1.2.2 TMCMS 的合成

2 g DMC 加入 40 mL 1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP),45 °C 溶胀过夜。滴加 3.5 mL 硫酸二甲酯,45 °C 反应 18 h。冷至室温后倒入 4 倍体积的无水乙醇中,沉析 3 h 后抽滤,乙醇洗涤,于真空干燥箱中 50 °C 干燥得固体。重新加入 200 mL 去离子水,搅拌 1 h 后抽滤,除去水不溶物。水溶液置于透析袋(截留分子量 14000)中,在去离子水中透析 48 h,每 12 h 换水,倒入 2 倍体积的丙酮中沉析 3 h 后抽滤,丙酮洗涤,于真空干燥箱中 50 °C 干燥,得到 2.1 g 产物。合成路线如图 1 所示。

示。在壳聚糖的红外图谱中,1602 cm<sup>-1</sup> 是伯胺的 N-H 弯曲振动吸收峰,但在 DMC 的图谱该峰消失并被 1650 cm<sup>-1</sup> 处乙酰基上的 C=O 伸缩振动吸收峰所覆盖,同时在 1375 cm<sup>-1</sup> 和 1459 cm<sup>-1</sup> 处出现两个吸收峰,这是壳聚糖 2-NH<sub>2</sub> 发生二甲基化后由甲基上的 C-H 弯曲振动所产生。与 DMC 相比,TMCMS 的红外图谱最大的不同就是在 1250 cm<sup>-1</sup> 出现的新的吸收峰,这是 CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 中 S=O 的伸缩振动产生。

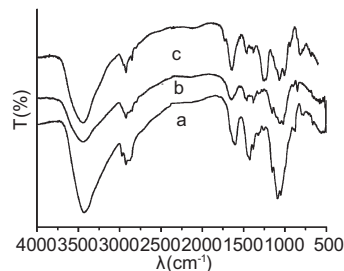


图 2 壳聚糖(a)、DMC(b)和 TMCMS(c)的红外图谱

Fig. 2 FT-IR spectra of CTS (a), DMC (b) and TMCMS (c)

TMCMS 的<sup>1</sup>H NMR 图谱如图 3 所示。与文献<sup>[10]</sup>中壳聚糖的<sup>1</sup>H NMR 图谱相比,有两个主要变化:(1)δ3.32 对应的是季铵基团的甲基上的 H;(2)

83.73 对应的是  $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$  基团上的 H。此外, 82.80 对应的是 *N,N*-二甲基上的 H, 83.50 ~ 4.50 对应的是壳聚糖的 C3 ~ C6 上的 H, 84.70 是溶剂  $\text{D}_2\text{O}$  上残留的 H 的化学位移, 85.43 对应的是壳聚糖 C1 上的 H, 而 C2 上 H 的峰被季铵基团的甲基上的 H 峰所覆盖。

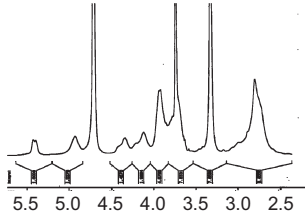


图3 TMCMS 的<sup>1</sup>H NMR 图谱

Fig. 3 <sup>1</sup>H NMR spectrum of TMCMS

元素分析结果见表 1。需要说明的是, 本文中壳聚糖的脱乙酰度为 91.6%, 这是用酸碱滴定法测得的, 是指壳聚糖中脱乙酰基的糖残基的质量百分含量。如果换算成自由氨基中的 N 占总 N 原子数的百分含量则为 93.2%。根据 TMCMS 的元素分析结果可以计算出 S 和 N 原子数之比为 0.695, 如果以壳聚糖的自由氨基为基数, 则可计算出 TMCMS 的季铵化度为 74.6%。

表 1 TMCMS 的元素分析结果

Table 1 The elemental analysis results of TMCMS

| w (mg) | N%    | C%    | S%    | H%    |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 1.189  | 3.796 | 28.79 | 6.066 | 5.706 |
| 2.042  | 3.809 | 28.93 | 5.940 | 5.471 |
| 0.916  | 3.921 | 29.04 | 6.303 | 5.753 |
| 平均     | 3.842 | 28.92 | 6.103 | 5.977 |

## 2.2 热分析

壳聚糖、DMC 和 TMCMS 的 DSC 图谱如图 4 所示。壳聚糖在 70 °C 附近有一吸热峰, 在 309 °C 有一放热峰。前者是失去结晶水, 在 DMC 和 TMCMS 的图谱中也有相似的峰, 分别在 97 °C 和 83 °C。后者应该是壳聚糖的热分解峰, DMC 和 TMCMS 的热分解峰分别在 360 °C 和 223 °C。这说明壳聚糖的 2-NH<sub>2</sub> 上引入两个甲基后热稳定性提高了, 但是转变成季铵盐后热稳定性明显下降, 这可归因于季铵盐基团削弱了壳聚糖分子内和分子间的氢键, 使其结晶度下降<sup>[15]</sup>。

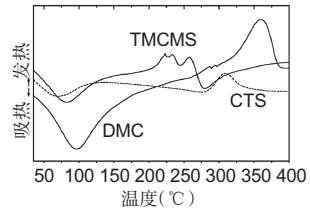


图 4 壳聚糖、DMC 和 TMCMS 的 DSC 图谱

Fig. 4 DSC curves of CTS, DMC and TMCMS

壳聚糖、DMC 和 TMCMS 的 TG 图谱如图 5 所示。当温度分别升至 308、325 °C 和 266 °C 时, 它们的快速失重, 这是聚合物解聚的过程。结果表明与壳聚糖相比, DMC 的热稳定性提高了, 但 TMCMS 的稳定性下降了, 这与上述 DSC 分析结果一致, 原因也相同<sup>[15]</sup>。

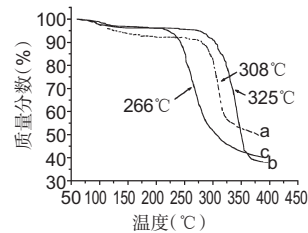


图 5 壳聚糖、DMC 和 TMCMS 的 TG 图谱

Fig. 5 TG curves of CTS (a), DMC (b) and TMCMS (c)

## 2.3 水溶性及 pH 的影响

0.2 g TMCMS 在 10 mL 水中全溶, 形成了透明的黏性的水溶液。pH 值对壳聚糖和 TMCMS 水溶性的影响如图 6 所示。在 pH 3 ~ 12 范围内, 2 mg/mL 的 TMCMS 溶液的透光率在 90% 以上, 表明其处于溶解状态, 而 2 mg/mL 壳聚糖溶液在碱性条件下则出现了沉淀。由此可见, TMCMS 水溶性明显优于壳聚糖, 除了季铵盐基团本身的亲水性外, 这在很大程度上应归因于季铵盐基团减少了壳聚糖分子内和分子间的氢键, 破坏了其致密的晶体结构。

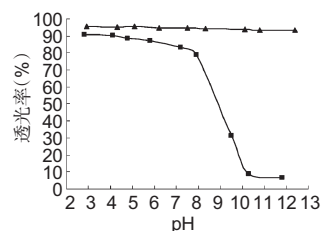


图 6 pH 对壳聚糖(■)和 TMCMS(▲)水溶性的影响

Fig. 6 Transparency of CTS (■) and TMCMS (▲) in different pH aqueous solution



### 3 结论

硫酸二甲酯和碘甲烷都是常用的胺类和醇类的甲基化试剂,但在制备 *N,N,N*-三甲基壳聚糖季铵盐的研究中一直以碘甲烷为主,而应用硫酸二甲酯的研究报道仅有一篇<sup>[10]</sup>。该文献以硫酸二甲酯为甲基化试剂与壳聚糖一步反应制得了 *N,N,N*-三甲基壳聚糖季铵盐。由于硫酸二甲酯还作为反应的主要溶剂,所以用量很大,1 g 壳聚糖需用 16 mL 硫酸二甲酯,而反应体系中少量水的存在也会导致部分硫酸二甲酯的水解。此外,反应体系中添加了 NaOH,所以壳聚糖上的羟基也发生了部分甲基化。而本文则先以廉价的甲醛和甲酸为甲基化试剂与壳聚糖反应制得 *N,N*-二甲基壳聚糖,然后以硫酸二甲酯为季铵化试剂制得了 *N,N,N*-三甲基壳聚糖甲基硫酸盐,因此极大降低了硫酸二甲酯的用量,也避免了羟基的甲基化,季铵化度也高于该文献的 52.5%。而相对于碘甲烷而言,硫酸二甲酯毒性低、价格便宜,反应条件宽松易控,作为季铵化试剂具有一定优势,这也为制备其他类型的 *N*-甲基-*N*-二烷基壳聚糖季铵盐提供了一种新的合成途径。

#### 参考文献

- 1 Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*, 2006, 31: 603-632.
- 2 Jia ZS, Shen DF, Xu WL. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res*, 2001, 333: 1-6.
- 3 Guo ZY, Xing RG, Liu S, et al. Synthesis and hydroxyl radicals scavenging activity of quaternized carboxymethyl chitosan. *Carbohydr Polym*, 2008, 73: 173-177.
- 4 Fan M(樊木), Xiao L(肖玲), Du YM(杜予民). Effect of molecular structure on moisture absorption and retention capacity of 2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chi-

tosan. *J Wuhan Univ, Nat Sci Ed*(武汉大学学报,理学版), 2003, 49: 205-208.

- 5 Zhang YJ(张亚静), Zhu RF(朱瑞芬), Li Y(李颖). Study on effect of chitosan quaternary ammonium on flocculation of paper-making sewage. *J Ningbo Coll*, 2001, 2: 41-45.
- 6 Muzzarelli RAA, Tanfani F. The *N*-permethylation of chitosan and the preparation of *N*-trimethyl chitosan iodide. *Carbohydr Polym*, 1985, 5: 297-307.
- 7 Domard A, Rinaudo M, Terrassin C. New method for the quaternization of chitosan. *Int J Biol Macromol*, 1986, 8: 105-107.
- 8 Polnok A, Borchard G, Verhoef JC, et al. Influence of methylation process on the degree of quaternization of *N*-trimethyl chitosan chloride. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57: 77-83.
- 9 Shen W(沈巍), Wang JX(王建新), Zhao CY(赵成英). Synthesis and antioxidative activity of quaternized chitosan. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19: 465-469.
- 10 Britto D, Assis OBG. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydr Polym*, 2007, 69: 305-310.
- 11 Verheul RJ, Amidi M, Wal S, et al. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of *O*-methyl free *N,N,N*-trimethylated chitosan. *Biomaterials*, 2008, 29: 3642-3649.
- 12 Rúnarsson ÖV, Holappa J, Jónsdóttir S, et al. *N*-selective 'one pot' synthesis of highly *N*-substituted trimethyl chitosan (TMC). *Carbohydr Polym*, 2008, 74: 740-744.
- 13 Qin CQ, Xiao Q, Li HR, et al. Calorimetric studies of the action of chitosan-*N*-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. *Int J Biol Macromol*, 2004, 34: 121-126.
- 14 Mao SR, Shuai XT, Unger F, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials*, 2005, 26: 6343-6356.
- 15 Xie YJ, Liu XF, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydr Polym*, 2007, 69: 142-147.

(上接第 56 页)

- 2 *Pharmacopoeia commission of the People's Republic of China. Chinese Pharmacopoeia*, 2000 Ed (中国药典 2000 版). Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 76.
- 3 Zhao Y(赵莹), Liu JP(刘金平), Li PY(李平亚). Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Agrimonia pilosa Ledeb*. *Special Wild Econom Anim Plant*

Res (特产研究), 2001, 1: 50-54.

- 4 Della GM, Monaco P. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J Nat Prod*, 1990, 53: 1430-1435.
- 5 Mao SL(毛士龙), Sang SM(桑圣民), et al. Steroid constituents from *Euonymus mupinensis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2000, 12(5): 14-16.

## 宽叶独行菜中脂肪酸的 GC-MS 分析

于瑞涛, 赵晓辉, 梅丽娟, 邵 贇, 陶燕铎\*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

**摘要:** 采用气质联用技术对宽叶独行菜中脂肪酸成分进行了分析, 从其乙醇提取物的石油醚萃取部分共分离得到 20 个组分, 采用面积归一化法测定了各组分的含量, 其中棕榈酸(hexadecanoic acid) 53.980%, 硬脂酸(octadecanoic acid) 17.063%, 二十二烷酸(docosanoic acid) 4.769%, 二十四烷酸(tetracosanoic acid) 3.363%, 二十八烷酸(octacosanoic acid) 2.773%, 花生酸(eicosanoic acid) 2.719%, 十五烷酸(pentadecanoic acid) 2.476%, 十七烷酸(heptadecanoic acid) 2.291%。此外, 三十烷酸(triacontanoic acid), 十四烷酸(tetradecanoic acid), 二十三烷酸(tricosanoic acid) 和二十六烷酸(hexacosanoic acid) 的含量均已超过了 1%。

**关键词:** 宽叶独行菜法; 脂肪酸; 气质联用

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

GC-MS Analysis of Fatty Acid from *Lepidium latifolium* L.

YU Rui-tao, ZHAO Xiao-hui, MEI Li-juan, SHAO Yun, TAO Yan-duo\*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

**Abstract:** Constituents eluted with petroleum ether of *Lepidium latifolium* L. were analyzed by capillary GC-MS method. The relative content of each component was calculated by area normalization and 20 constituents were separated and identified. The main chemical components were hexadecanoic (53.980%), octadecanoic acid (17.063%), docosanoic acid (4.769%), eicosanoic acid (3.363%), octacosanoic acid (2.773%), eicosanoic acid (2.719%), pentadecanoic acid (2.476%), and heptadecanoic acid (2.291%). In addition, the contents of triacontanoic acid, tetradecanoic acid, tricosanoic acid and hexacosanoic were also more than 1%. All fatty acid are saturated fatty acid.

**Key words:** *Lepidium latifolium* L.; fatty acid; gas chromatography-mass spectrometry

宽叶独行菜(*Lepidium latifolium* L.) 系十字花科植物。多年生草本, 产于青海省大部分地区。生于海拔 1800 ~ 3800 m 的荒地, 水边及农田附近, 分布于东北、华北、西北及西藏等地。全草入药, 主治菌痢、肠炎<sup>[1]</sup>。对于宽叶独行菜的研究只见于矿质元素, 蛋白质和氨基酸分析报道<sup>[2]</sup>。对于宽叶独行菜小分子化学成分研究尚未见报道。本文对宽叶独行菜乙醇提取物的石油醚萃取部分中脂肪酸进行了 GC-MS 分析。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器及分析条件

分析仪器: GC6890N/MSD5973N 联用仪。测试条件: GC 汽化室温度 250 °C, 美国 J&W. HP-5 (30 m

× 0.25 mm × 0.25 μm) 弹性石英毛细管柱, 以 4 °C/min 的升温速率由 80 °C 程序升温至 290 °C, 恒温 30 min, 载气为 99.999% 高纯氦。MSD 离子源为 EI 源, 离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV; 使用美国 NIST02L 谱库。

## 1.2 材料及样品的制备

宽叶独行菜于 2008 年 8 月采自青海省海西蒙古族藏族自治州诺木洪农场, 经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为十字花科植物宽叶独行菜。取宽叶独行菜地上部分 1 Kg 用 80% 的乙醇提取 3 次, 每次 2 小时, 回收乙醇, 加入适量水, 用石油醚萃取数次至石油醚层接近无色, 浓缩后用适量硅胶(200 ~ 300 目) 拌样, 经硅胶柱用石油醚洗脱。收集石油醚部分, 回收溶剂, 即得白色油状样品。

## 2 结果与讨论

收稿日期: 2010-03-09 接受日期: 2011-06-30

基金项目: 科技部国家科技支撑计划(2007BAI45B00)

\* 通讯作者 E-mail: yuruitao521@163.com

## 2.1 结果

对石油醚洗脱部分(非烃酯化馏分)进行了成分分析,从中分离得到 20 个组分(图 1),主要为脂肪酸。样品经  $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{-OH}$  甲酯化处理,其脂肪酸均以甲酯形式检测出。采用面积归一化法测定了各组分的百分含量,并用气相色谱-质谱联用技术对其做了分析。从表 1 可以看出,宽叶独行菜石油醚洗脱部分中棕榈酸(hexadecanoic acid)含量极高,可达 53.980%。其次为硬脂酸(octadecanoic acid) 17.063%,二十二烷酸(docosanoic acid) 4.769%,二十四烷酸(tetracosanoic acid) 3.363%,二十八烷酸(octacosanoic acid) 2.773%,花生酸(eicosanoic acid) 2.719%,十五烷酸(pentadecanoic acid) 2.476%,以及十七烷酸(heptadecanoic acid)

2.291%。此外,三十烷酸(triacontanoic acid),十四烷酸(tetradecanoic acid),二十三烷酸(tricosanoic acid)和二十六烷酸(hexacosanoic acid)的含量均超过 1%。所有的脂肪酸均为饱和脂肪酸。

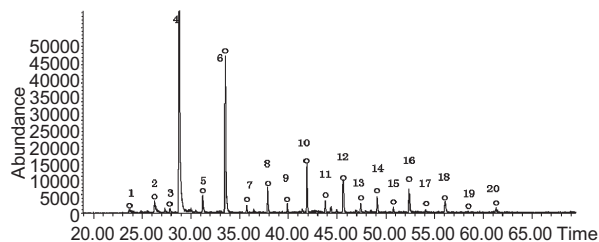


图 1 宽叶独行菜中脂肪酸总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of fatty acid in *Lepidium latifolium* L.

表 1 宽叶独行菜中脂肪酸成分分析结果

Table 1 Analysis of fatty acid in *Lepidium latifolium* L.

| 峰号<br>Peak | 分子式<br>Molecular formula               | 分子量<br>Molecular weight | 成分名称<br>Compound                           | 保留时间<br>Rt /min | 含量<br>Content |
|------------|--|-------------------------|--|-----------------|---------------|
| 1          | $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ | 242                     | 十四烷酸甲酯 Tetradecanoic acid methyl ester     | 23.704          | 1.082%        |
| 2          | $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ | 256                     | 十五烷酸甲酯 Pentadecanoic acid methyl ester     | 26.274          | 2.476%        |
| 3          | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ | 270                     | 异十六烷酸甲酯 Iso-Hexadecanoic acid methyl ester | 27.862          | 0.712%        |
| 4          | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ | 270                     | 十六烷酸(棕榈酸)甲酯 Hexadecanoic acid methyl ester | 28.781          | 53.980%       |
| 5          | $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ | 284                     | 十七烷酸甲酯 Heptadecanoic acid methyl ester     | 31.204          | 2.291%        |
| 6          | $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$ | 298                     | 十八烷酸(硬脂酸)甲酯 Octadecanoic acid methyl ester | 33.516          | 17.063%       |
| 7          | $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ | 312                     | 十九烷酸甲酯 Nonadecanoic acid, methyl ester     | 35.744          | 0.665%        |
| 8          | $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2$ | 326                     | 二十烷酸(花生酸)甲酯 Eicosanoic acid methyl ester   | 37.868          | 2.719%        |
| 9          | $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ | 340                     | 二十一烷酸甲酯 Heneicosanoic methyl ester         | 39.916          | 0.809%        |
| 10         | $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$ | 354                     | 二十二烷酸甲酯 Docosanoic acid methyl ester       | 41.886          | 4.769%        |
| 11         | $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ | 368                     | 二十三烷酸甲酯 Tricosanoic acid methyl ester      | 43.808          | 1.043%        |
| 12         | $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_2$ | 382                     | 二十四烷酸甲酯 Tetracosanoic acid methyl ester    | 45.633          | 3.363%        |
| 13         | $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$ | 396                     | 二十五烷酸甲酯 Pentacosanoic acid methyl ester    | 47.415          | 0.970%        |
| 14         | $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_2$ | 410                     | 二十六烷酸甲酯 Hexacosanoic acid methyl ester     | 49.121          | 1.515%        |
| 15         | $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$ | 424                     | 二十七烷酸甲酯 Heptacosanoic acid methyl ester    | 50.793          | 0.433%        |
| 16         | $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}_2$ | 438                     | 二十八烷酸甲酯 Octacosanoic acid methyl ester     | 52.401          | 2.773%        |
| 17         | $\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_2$ | 452                     | 二十九烷酸甲酯 Nonacosanoic acid methyl ester     | 54.107          | 0.359%        |
| 18         | $\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2$ | 466                     | 三十烷酸甲酯 Triacontanoic acid methyl ester     | 56.092          | 1.789%        |
| 19         | $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$ | 480                     | 三十一烷酸甲酯 Hentriacontanoic acid methyl ester | 58.418          | 0.299%        |
| 20         | $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}_2$ | 494                     | 三十二烷酸甲酯 Dotriacontanoic acid methyl ester  | 61.336          | 0.891%        |

## 2.2 讨论

棕榈酸目前主要用于生产聚氧乙烯山梨糖醇酐棕榈酸酯和山梨糖醇酐棕榈酸酯。与亲油性的乳化

剂复配,几乎可用作所有的化妆品、医药品的乳化剂。因毒性小,可用作医药、化妆品、颜料等增溶剂、乳化聚合的稳定剂。棕榈酸除用作棕榈酸异丙酯、

甲酯、丁酯、氯化物、酰胺等原料外,还用作医药品的原料。其中用量大的棕榈酸异丙酯作为化妆品的油相原料,用作头油、婴儿油的基料,口红的溶剂,还用于雪花膏,化妆水、发膏,其甲酯用作酯、酰胺的原料,其丁酯用作润滑油添加剂、表面活性剂的原料,它的氯化物用作有机合成原料,酰胺用作化妆品、PVC 的增滑剂<sup>[3]</sup>。本文研究发现宽叶独行菜中含有大量的棕榈酸成分,为宽叶独行菜的进一步开发和利用奠定一定的理论基础。

#### 参考文献

- 1 Northwest Plateau of Biology Institute, Chinese academy sciences(中国科学院西北高原生物研究所). *Flora of Qinghai Economy*(青海经济植物志). Xining: Qinghai People's Press, 1987. 227-229.
- 2 Zhang XH(张晓峰), Hu BL(胡伯林). Study on chemical constituents of *Lepidium latifolium* L. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*(西北植物学报), 1994, 14:329-333.
- 3 Wang RM(王若曼). Palmitic acid. *Dalian Chem Ind*(大连化工), 1991, 1:21.

---

## 成都普瑞法科技开发有限公司

本公司专业从事高含量提取物,高纯度中药/提取物单体和天然产物医药中间体的生产,定制和生产工艺开发。致力于研究开发高纯度药用植物化学成分的最新分离纯化方法,结合成都在西南地区的资源和科研优势,依托四川大学等科研院校,为客户提供全方位的优质服务。

本公司提供符合中国药典(CP)、美国药典(USP)和欧洲药典(EP)要求的中药对照品或植物药有效成分对照品(工作标准品),可以按客户要求提供全套标定数据和鉴定、鉴别数据。本公司接受中药注射剂再评价的药学研究和质量研究工作,定制分离中药注射剂指纹图谱中的指定成分。

我们实验室目前已拥有包括4套 Varian SD1 在内的7套制备液相色谱系统,一套超声波索氏提取浓缩机组,包括2套 Waters 在内的10套分析液相色谱系统,其中有6个 DAD 检测器,有最适合检测天然产物的 ELSD 检测器和 Corona-CAD 检测器各一个,还有其他相应配套的分析检测设备,是目前国内同行业中装备最好的实验室之一,随时欢迎新老客户光临参观考察。

凭着优异的品质和良好的服务,目前我们的客户已遍布全球十几个国家和地区,包括 Sigma、Chromadex、USP、雀巢研发中心等著名大公司和一些欧美著名大学和研发机构。

我们致力于为客户提供专业优质的服务、高质量的产品和有竞争力的价格。

详情欢迎登录公司网站 <http://www.biopurify.cn/>

# 七种植物籽油中脂肪酸成分的比较分析

曾映旭<sup>1,2</sup>, 赵晨曦<sup>1\*</sup>, 王小梅<sup>1</sup>, 吴天泉<sup>1</sup>, 刘琳琪<sup>1</sup>, 梁逸曾<sup>2</sup>

<sup>1</sup>长沙学院生物工程与环境科学系, 长沙 410003; <sup>2</sup>中南大学化学化工学院, 长沙 410083

**摘要:** 为寻求新的食用油资源, 发展了一种快速可靠的气相色谱-质谱联用方法, 用于植物籽油中脂肪酸成分的定性鉴定和含量测定。所建立的方法成功用于葡萄籽、南瓜籽和猕猴桃籽等七种植物籽油中的棕榈酸、十八烷酸、油酸、亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸的定性定量分析。结果表明, 刺葡萄籽油、普通葡萄籽油、国外葡萄籽油、南瓜籽油、枸杞籽油和西番莲籽油均具有相似的脂肪酸谱, 尽管其中它们所含上述五种脂肪酸含量不同, 由于均存在人体所必需的饱和与不饱和脂肪酸, 故可以用作替代食用油。猕猴桃籽油因为其存在高含量的  $\alpha$ -亚麻酸成分, 可能是更好的食用油和营养油资源。本文首次对枸杞籽油、西番莲籽油和猕猴桃籽油脂肪酸成分进行绝对含量分析, 为新的食用油资源的开发提供了重要的依据。

**关键词:** 植物籽油; 脂肪酸; 气相色谱-质谱法; 衍生化

中图分类号: Q547; O656.3

文献标识码: A

## Comparative Analysis of Fatty Acid Composition in Seven Plant Seed Oils

ZENG Ying-xu<sup>1,2</sup>, ZHAO Chen-xi<sup>1\*</sup>, WANG Xiao-mei<sup>1</sup>, WU Tian-quan<sup>1</sup>, LIU Lin-qi<sup>1</sup>, LIANG Yi-zeng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering and Environmental Science, Changsha University, Changsha 410003, China;

<sup>2</sup>Research Center of Modernization of Chinese Herbal Medicine, College of Chemistry and Chemical Engineering,

Central South University, Changsha 410083, China

**Abstract:** To find new edible oil sources, a rapid and reliable gas chromatography mass spectrometry method for fatty acid identification and quantitation was developed. The proposed method was then used to quantitation of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid in seven different plant seed oils. The fatty acid profiles of spine grape seed, grape seed, foreign grape seed, pumpkin seed, barberry wolfberry fruit seed and passion flower seed oils are similar with different contents of the five fatty acids, indicating they can be alternative sources of edible oil due to the presence of all saturated and unsaturated fatty acids required for human health. Yangtao kiwifruit seed oil may be much better alternative source of edible and nutritional oil because of a high content of  $\alpha$ -linolenic acid. This is the first research on the absolute content analysis of fatty acid composition of barberry wolfberry fruit seed oil, passion flower seed oil and yangtao kiwifruit seed oil which provides an important and scientific basis for new edible oil resource exploitation.

**Key words:** plant seed oil; fatty acid; gas chromatography-mass spectrometry; derivatization

## Introduction

China is a large country in vegetable oil consumption. Soybean, rapeseed, peanut, sesame seed, and cottonseed are main resources of edible vegetable oil in China. But at present, nearly 60% of the total vegetable oil consumption needs to be imported because of the shortage

of the above-mentioned resources. Thus, seeking new vegetable oil resources is a hotspot in the edible vegetable oil market of China as well as the whole world [1,2].

Grape seed (*Vitis vinifera* L.) is a worldwide well known oil seed crop containing 8%-15% oil. Matthaus stated that the production of oil from grape seeds could result in interesting edible oils with a comparable health benefit as olive oil. Grape seed oil is an extensive and important alternative edible oil resource with essential fatty acids. Therefore it is recognized that its intake may be beneficial to prevent heart and circulatory

Received June 30, 2010; Accepted September 15, 2010

Foundation Item: This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81173533) and scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (No. 11A017).

\* Corresponding author: Tel: 86-731-84261424; E-mail: czxh003@163.com

ry problems [3]. While the main interest in grape seed oil lies in its high content of unsaturated fatty acids such as linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid [4]. For example, linoleic acid is the precursor of certain substances of physiological regulation. It can reduce blood cholesterol concentrations and the risk of many cardiovascular and cerebrovascular diseases (CCD), such as coronary artery disease, atherosclerosis, cerebral thrombosis, myocardial infarction, etc.  $\alpha$ -Linolenic acid is the precursor of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Likewise, it can lower blood-lipid and blood pressure, inhibit platelet aggregation, and reduce thrombosis. As is well known, linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, and arachidonic acid are three essential fatty acids that cannot be synthesized in the body. They can only be ingested from food. These fatty acids are of prime importance for health, and a number of abnormalities in polyunsaturated fatty acid (PUFA) profiles due to malnutrition or diseases have been reported [5]. From the nutritional and therapeutic point of view, the content of fatty acids (FAs) in grape seed oil is a key factor for their quality evaluation because of their important roles as metabolites and intermediates in biological processes [6-8].

Apart from grape seed oil, it was reported that some other vegetable seed oils such as sorghum [9], pumpkin seed [10,11], and sunflower seed [12] with essential fatty acids can also be used as alternative edible oil resources. In fact, vegetable seeds with essential fatty acids are so many more than these. For example, barberry wolfberry fruit seed, passion flower seed, and yangtao kiwifruit seed widely exist. Extraction and percentage composition analysis of the these three seed oils shows that they are promising alternative edible oil resources [13-18]. However, as to our knowledge, there is few report on the absolute amount analysis of their fatty acids so far.

The main objective of the present work is to develop a qualitative and quantitative method for the analysis of essential fatty acids in vegetable oil in order to seek new edible oil resources. This was done by comparative analysis of their fatty acids using supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction and derivatization gas

chromatography mass spectrometry (GC-MS) method.

## Experimental

### Samples and reagents

Plant seed samples analyzed in this study were provided by Guangdong Academy of Agricultural Sciences, including grape (*Vitis vinifera* L.) seed, spine grape (*Vitis davidii* Foex.) seed, foreign grape (*Vitis vinifera* L.) seed, barberry wolfberry fruit (*Lycium barbarum* L.) seed, passion flower (*Passiflora incarnata* L.) seed, pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed and yangtao kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) seed. They were identified by Professor Yang Guoping, who is working in The Third Hospital of Xiangya Medical College of Central South University, where the specimens were deposited.

All the plant seeds were crushed by a portable high speed grinder (Wenling LinDa Machinery Co. Ltd., Zhejiang, China) before extracting. The free fatty acid standards (palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid, 99 + %) and the internal standard (heptadecanoic acid, 99 + %) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC grade methanol was from Hanbang Science and Technology Corporation (Jiangsu, P. R. China). Sulphuric acid and n-hexane were both supplied by Damao Chemical Reagent Factory (Tianjin, P. R. China). All other chemicals were of analytical reagent grade. Double-distilled water was deionized using Auto-double evaporator of Shensheng Science and Technology Corporation (Shanghai, P. R. China).

### Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction

Plant seed oil extraction was conducted in a HA231-50-06 semi-batch flow extraction apparatus produced by Nantong Hua'an Supercritical carbon dioxide extraction Corporation (Jiangsu, P. R. China). The extraction capacity was 1000 mL and a maximum flow rate of CO<sub>2</sub> was 50 Kg/h. The SC-CO<sub>2</sub> extraction conditions were as follows: extraction pressure: 30 MPa, separation temperature: 45 °C, extraction time: 70 min. In all experiments, 100 g samples of powdered seeds were placed in the extractor cylinder, and filter mesh screens were placed at both ends of the cylinder to prevent any

carry over of particles. The cylinder was placed into the temperature-controlled chamber, and great care was taken to ensure that the air can purge through the filter before the extraction. The SC-CO<sub>2</sub> was pumped at a constant flow rate and directed to the bottom of the extractor for up-flow configuration. The supercritical phase from the extractor was passed through the valves, into which the pressure was throttled gradually and serially via two separators. The oil was collected every 15 min from the two separators and the CO<sub>2</sub> was cooled and recycled into the system. Successive collected samples were weighed and treated.

### Derivatization of Sample

Direct transesterification of FAs is recommended in FA analysis<sup>[19]</sup>. In the present work, a direct derivatization method, which can esterify both the lipid-bound and free fatty acids (FFAs), was developed mainly based on the literature<sup>[20]</sup> with minor revision. The derivatization approach is as follows: Equal volumes (10  $\mu$ L) of heptadecanoic acid (C17:0) internal standard (3 mg/mL in n-hexane; stored at -40  $^{\circ}$ C) was added to 0.5  $\mu$ L of each sample. After that, 2.0 mL of 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>OH was added, vortex-mixed for 30 s and reacted at 80  $^{\circ}$ C water bath for 60 min. Then, the lipids were extracted with 2.0 mL of n-hexane twice using a vortex mixer for 30 s. Samples containing the fatty acid methyl esters were blown to dryness under nitrogen, dissolved in 1.0 mL of n-hexane, and stored at 4  $^{\circ}$ C away from light until GC analysis.

### Gas chromatography mass spectrometry

Analyses were carried out in a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph fitted with a DB-23 capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i. d., film thickness 0.25  $\mu$ m), interfaced with an Hewlett-Packard mass selective detector 5973N (Agilent Technologies, USA) operated by HP Enhanced ChemStation software, G1701DA MSD ChemStation Rev. D.00.00.38. Oven temperature program: 80  $^{\circ}$ C to 175  $^{\circ}$ C, at 25  $^{\circ}$ C/min, then programmed to 220  $^{\circ}$ C, at 4  $^{\circ}$ C/min, and held for 5 min at 220  $^{\circ}$ C; injector temperature: 250  $^{\circ}$ C; carrier gas: helium, adjusted to a column velocity of flow 1.0 mL/min, splitting ratio 20:1, interface temperature: 250  $^{\circ}$ C, standard electronic impact (EI) MS source temperature: 230  $^{\circ}$ C;

MS quadrupole temperature: 150  $^{\circ}$ C, mass scan range: 30-500 units, scan velocity: 3.12 scans/s. The identification of fatty acid methyl esters (FAMES) was carried out by searching in NIST 02 mass database as well as the mass spectrum and retention time of authentic compound.

### Validation of the analytical method

The standard stock solutions of fatty acids (palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and  $\alpha$ -linolenic acid) and internal standard stock solution of heptadecanoic acid (C17:0) were prepared in n-hexane. The working solutions were obtained by further dilution with n-hexane. All solutions were stored at 4  $^{\circ}$ C away from light before analysis. Accuracy was assessed using standard addition method at three different (low, median and high) concentration levels of standard compounds by replicate measurements ( $n = 6$ ). In order to determine the accuracy of the method, Sample 7 was spiked with a known amount of the five standard fatty acid compounds, processed under the proposed transesterification process and analyzed using the specified GC-MS method. The recovery rates were obtained by the ratios of the found contents to the sum of original and added contents.

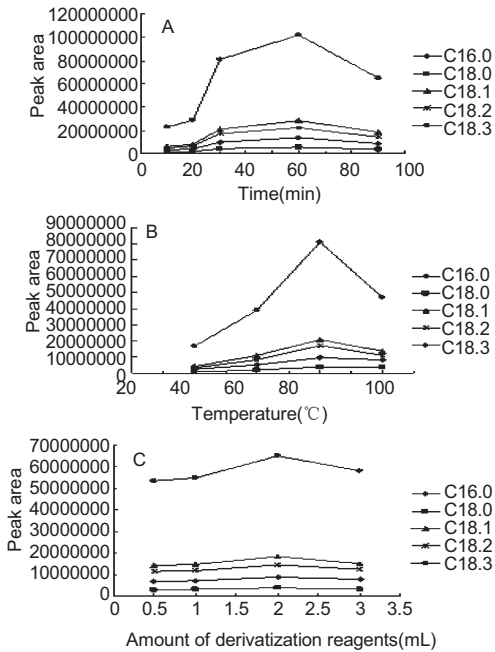
The analytical precision (each,  $n = 6$ ) were evaluated by analysis of all the samples at different times during the same day. The concentration of each sample was determined using calibration standards prepared on the same day.

## Results and Discussion

### Optimization of the derivatization procedure and GC-MS analysis

The derivatization procedure of fatty acids was determined mainly based on the literature<sup>[20]</sup>. But three factors such as derivatization temperature, derivatization time, and the amount of derivatization reagent were optimized by single factor test to obtain higher precision. Yangtao kiwifruit seed oil (Sample 7) is taken as an example to illustrate the derivatization condition optimization result obtained. Fig. 1 shows the concentration of fatty acid methyl esters (FAMES) obtained at different derivatization time (10, 20, 30, 60, 90 min), tempera-

ture (40,60,80,100 °C) and amount of derivatization reagent (0.5,1.0,2.0,3.0mL).



**Fig. 1** The derivatization profiles for fatty acids in Sample 7

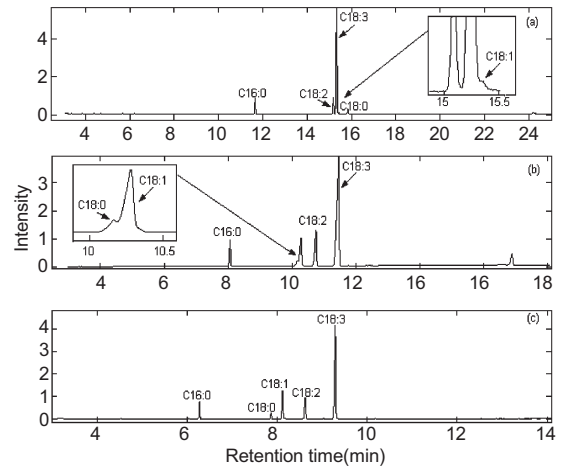
(a) The derivatization time profiles; (b) The derivatization temperature profiles; (c) The amount of derivatization reagents profiles.

From Fig. 1, one can find that the concentration of FAMES were usually increased with the increase of derivatization time, temperature and amount of derivatization reagent. But that of  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester was decreased obviously when the derivatization time last longer than 60 min or the derivatization temperature was higher than 80 °C. This may be because of the decomposition of  $\alpha$ -linolenic acid methyl ester<sup>[21]</sup>. Thus the optimum derivatization time, temperature and amount of derivatization reagent can be determined to be 60 min, 80 °C and 2 mL, respectively. And all the subsequent experiments were carried out using 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1% v/v) solution at 80 °C for 60 min.

**Table 1** Calibration curves, correlation coefficient, linear ranges and detection limits of the fatty acids

| Fatty acids                    | Calibration curve      | Correlation coefficient/R | Linear range (ng/mL) | LOD <sup>a</sup> (ng/mL) |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| Palmitic acid, 16:0            | $y = 62.387x - 0.0670$ | 0.9999                    | 4.50-900             | 9.0                      |
| Stearic acid, 18:0             | $y = 68.252x - 0.9732$ | 0.9999                    | 4.52-904             | 9.0                      |
| Oleic acid, 18:1               | $y = 56.572x + 0.1035$ | 0.9997                    | 4.55-910             | 9.1                      |
| Linoleic acid, 18:2            | $y = 54.799x + 0.8852$ | 0.9997                    | 4.51-902             | 9.0                      |
| $\alpha$ -Linolenic acid, 18:3 | $y = 49.923x - 0.5381$ | 0.9997                    | 4.57-914             | 9.1                      |

Note: y and x represent peak area and concentration in ng/mL of fatty acid; LOD: limit of detect.



**Fig. 2** GC-MS profiles of Sample 7 using different columns

(a) HP-5; oven temperature program: 150 °C to 280 °C, at 4 °C/min; FFAP; oven temperature program: 80 °C to 150 °C, at 15 °C/min, then programmed to 180 °C, at 3 °C/min, and held for 2 min at 180 °C, heated at 15 °C/min to 220 °C, then held for 5 min at 220 °C; (b) DB-23; oven temperature program: 80 °C to 175 °C, at 25 °C/min, then programmed to 220 °C, at 4 °C/min, and held for 5 min at 220 °C.

To improve the separation of the FAMES, three capillary columns (HP-5, FFAP and DB-23) were employed and Sample 7 was also taken as an example to illustrate the process. Fig. 2 shows the separation results in the three cases, from which it is shown that when a DB-23 column was used, the best resolution was obtained within a few minutes (Fig. 2 (c)). Therefore, DB-23 column was selected for the GC-MS analysis of the FAMES of plant seed oils.

### Method validation

The regression equations, correlation coefficients (R), linear ranges and limits of detection (LOD) of the five fatty acids were listed in Table 1. Good linear relationships ( $R = 0.9997$  to  $0.9999$ ) between peak areas and the concentrations, wide linear ranges and low LODs



**Table 2 Recoveries of fatty acids determined by standard addition method ( $n = 6$ )**

| Fatty acids              | Original concentration (ng/mL) | Added concentration (ng/mL) | Detected concentration (ng/mL) | Recovery (%) | RSD (%) |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------|---------|
| Palmitic acid            | 27.2                           | 9.00                        | 33.5                           | 92.5         | 4.1     |
|                          | 27.2                           | 27.0                        | 51.3                           | 94.6         | 3.4     |
|                          | 27.2                           | 45.0                        | 72.0                           | 98.4         | 2.2     |
| Stearic acid             | 24.9                           | 9.04                        | 31.7                           | 93.4         | 3.1     |
|                          | 24.9                           | 27.1                        | 49.8                           | 95.8         | 4.6     |
|                          | 24.9                           | 45.2                        | 65.6                           | 93.6         | 2.8     |
| Oleic acid               | 49.0                           | 9.10                        | 55.7                           | 95.9         | 2.6     |
|                          | 49.0                           | 45.5                        | 90.0                           | 95.2         | 3.8     |
|                          | 49.0                           | 91.0                        | 137.1                          | 97.9         | 4.3     |
| Linoleic acids           | 18.5                           | 9.02                        | 25.15                          | 91.4         | 5.6     |
|                          | 18.5                           | 45.1                        | 60.6                           | 95.3         | 2.8     |
|                          | 18.5                           | 90.2                        | 105.1                          | 96.7         | 3.5     |
| $\alpha$ -linolenic acid | 74.5                           | 45.7                        | 114.0                          | 94.8         | 4.2     |
|                          | 74.5                           | 91.4                        | 161.2                          | 97.2         | 3.1     |
|                          | 74.5                           | 182.8                       | 244.7                          | 95.1         | 2.7     |

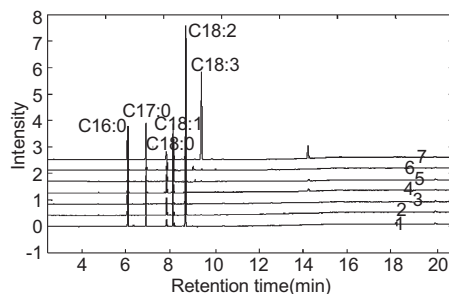
Note: Recovery (%) = [Detected concentration / (Original concentration + Added concentration)]  $\times$  100

were exhibited. The recoveries (in %) of the five fatty acids from Sample 7 were detected by standard addition method at low, median and high concentrations. The recovery percents were in the ranges of 91.4% to 98.4% as listed in Table 2. These values were within the limits of acceptable variability for the analyte concentration of these kinds of samples.

### Identification and content comparative analysis of fatty acids in plant seed oils

The seven different plant seed oils described above were analyzed by the proposed method. The chromatograms of the FAMES profiles obtained are shown in Fig. 3. The major fatty acids were identified by comparison of their mass spectra with NIST02 mass database through G1701DA mass spectrum ChemStation and as well as by comparison of their mass spectra and retention times with those of the injecting authentic components at the same conditions. The five common peaks in the seven plant seed oils were identified to be palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and  $\alpha$ -linolenic (C18:3) acid. They are essential fatty acids for health. The relative amounts of unsaturated fatty acids (UFAs) and saturated fatty acids (SFAs) in the plant seed oils were presented on

the basis of free fatty acids according to peak area normalization method (Table 3). From Table 3, it can be seen that, the total relative amounts of UFAs and SFAs were in the ranges of 53.9% to 74.1% and 11.1% to 23.0%, respectively. The distribution of fatty acid composition was quite similar except yangtao kiwifruit seed oil. Yangtao kiwifruit seed oil has a high percentage of  $\alpha$ -linolenic acid (43.7%) and a low content of linoleic acid (10.1%) as well as adequate content of oleic acid (14.2%), palmitic acid (7.4%), and stearic acid (3.3%). Meanwhile,  $\alpha$ -linolenic acid was not detected in other samples except passion flower seed (0.5%) and pumpkin seed (0.6%) with extremely

**Fig. 3 GC-MS profiles of the seven seed oils**

1. Spine grape seed; 2. Grape seed; 3. Foreign grape seed; 4. Barbary wolfberry fruit seed; 5. Passion flower seed; 6. Pumpkin seed; 7. Yangtao kiwifruit seed.

**Table 3 Fatty acid identified and their relative amount of different seed oils**

| Sample ID | SFAs (%) <sup>a</sup> |              |       | UFAs (%) <sup>a</sup> |               |                          |       |
|-----------|-----------------------|--------------|-------|-----------------------|---------------|--------------------------|-------|
|           | Palmitic acid         | Stearic acid | Total | Oleic acid            | Linoleic acid | $\alpha$ -Linolenic acid | Total |
| 1         | 11.7                  | 3.8          | 15.5  | 11.9                  | 43.7          | ndb                      | 55.6  |
| 2         | 10.4                  | 4.7          | 15.1  | 11.5                  | 56.5          | nd                       | 68.0  |
| 3         | 7.4                   | 3.7          | 11.1  | 17.5                  | 44.2          | nd                       | 61.7  |
| 4         | 17.2                  | 5.8          | 23.0  | 19.7                  | 34.2          | nd                       | 53.9  |
| 5         | 12.6                  | 3.3          | 15.9  | 12.5                  | 58.0          | 0.5                      | 71.0  |
| 6         | 8.7                   | 4.1          | 12.8  | 21.8                  | 51.7          | 0.6                      | 74.1  |
| 7         | 7.4                   | 3.3          | 11.7  | 14.2                  | 10.1          | 43.7                     | 68.0  |

1. Spine grape seed;2. Grape seed;3. Foreign grape seed;4. Barbary wolfberry fruit seed;5. Passion flower seed;6. Pumpkin seed;7. Yangtao kiwifruit seed. a: The amount of UFAs and SFAs in oil on the basis of free fatty acids; b: Not detected.

low percentages of  $\alpha$ -linolenic acid. As for Samples 1 to 6, linoleic acid was shown to be the most important component ranged from 34.2% to 58%, followed by oleic acid (11.5%-21.8%) and palmitic acid (7.4%-17.2%), though some minor difference exists between the percentages of the major fatty acids from each other.

To evaluate their quality, the comparison of absolute content of fatty acids in different plant seed oils seems more reasonable and important. Thus our developed quantitation method was used to determine the contents of the fatty acids in the seven different plant seed oils quantitatively. Table 4 shows the summary results obtained by using the calibration curve of each investigated compound. From Table 4, it is found that the differ-

ences of contents of palmitic acid, stearic acid, and oleic acid among the seven samples were not obvious. But the contents of linoleic acid ranged from 75 to 628 milligram per milliliter of oil, the maximum difference was about 8 times. The highest content of linoleic acid was detected in the passion flower seed oil (Sample 5). While  $\alpha$ -linolenic acid was not detected from Samples 1 to 4 and its content in Samples 5 and 6 was actually very low. The highest content of  $\alpha$ -linolenic acid was observed in the yangtao kiwifruit seed (Sample 7), in which the content of  $\alpha$ -linolenic acid (0.294 g/mL) was much higher than linoleic acid (75 mg/mL). The relative standard deviations (RSDs) listed in Table 4 were less than 5.0% except for that (5.8%) of  $\alpha$ -linolenic acid in Sample 6 because of its low content.

**Table 4 Contents of fatty acids in the seven seed oils**

| Sample ID | Palmitic acid (g/mL)       | RSD (%) | Stearic acid (g/mL) | RSD (%) | Oleic acid (g/mL) | RSD (%) | Linoleic acid (g/mL)       | RSD (%) | $\alpha$ -linolenic acid (g/mL) | RSD (%) |
|-----------|----------------------------|---------|---------------------|---------|-------------------|---------|----------------------------|---------|---------------------------------|---------|
| 1         | 0.195 ± 0.039 <sup>a</sup> | 3.8     | 0.119 ± 0.016       | 1.2     | 0.162 ± 0.023     | 1.3     | 0.269 ± 0.081 <sup>a</sup> | 3.0     | nd <sup>b</sup>                 | nd      |
| 2         | 0.186 ± 0.034              | 1.7     | 0.138 ± 0.035       | 2.4     | 0.150 ± 0.056     | 3.5     | 0.529 ± 0.040              | 0.7     | nd                              | nd      |
| 3         | 0.114 ± 0.023              | 2.0     | 0.110 ± 0.020       | 1.8     | 0.231 ± 0.025     | 0.9     | 0.251 ± 0.021              | 0.8     | nd                              | nd      |
| 4         | 0.285 ± 0.026              | 0.8     | 0.198 ± 0.027       | 1.2     | 0.250 ± 0.042     | 1.5     | 0.330 ± 0.051              | 1.5     | nd                              | nd      |
| 5         | 0.207 ± 0.031              | 1.3     | 0.103 ± 0.024       | 2.2     | 0.169 ± 0.029     | 1.5     | 0.628 ± 0.051              | 0.8     | 0.004 ± 0.001                   | 1.9     |
| 6         | 0.132 ± 0.044              | 3.2     | 0.125 ± 0.013       | 1.0     | 0.263 ± 0.051     | 1.7     | 0.467 ± 0.084              | 1.8     | 0.005 ± 0.004                   | 5.8     |
| 7         | 0.110 ± 0.032              | 2.8     | 0.100 ± 0.023       | 2.2     | 0.198 ± 0.039     | 1.9     | 0.075 ± 0.021              | 2.8     | 0.294 ± 0.028                   | 0.9     |

1. Spine grape seed;2. Grape seed;3. Foreign grape seed;4. Barbary wolfberry fruit seed;5. Passion flower seed;6. Pumpkin seed;7. Yangtao kiwifruit seed. <sup>a</sup>Data presented are in means ± standard deviation,  $n = 6$ ; <sup>b</sup>not detected.

## Conclusion

This is the first research on the fatty acid compositions of barbary wolfberry fruit seed oil, passion flower seed

oil, and yangtao kiwifruit seed oil, which provides an important and useful scientific basis for new edible oil resource exploitation.

(1) A derivative gas chromatography mass spectrometry

try method was developed for fatty acid analysis in plant seed oil after optimizing of derivative and chromatographic conditions. The method was validated to be precise and reliable with low detecting limit and wide linear range having high correlation coefficients ranging from 0.9997 to 0.9999 of palmitic, stearic, oleic, linoleic acid, and  $\alpha$ -linolenic acid.

(2) Seven different plant seed oils including spine grape seed, grape seed, foreign grape seed, pumpkin seed, barberry wolfberry fruit seed, passion flower seed, and yangtao kiwifruit seed oils were analyzed. Their total relative amounts of unsaturated fatty acids and saturated fatty acids were in the ranges of 53.9% to 74.1% and 11.1% to 23.0%, respectively. The contents of palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid in the first six samples ranged from 0.114 to 0.285 g/mL, 0.110 to 0.198 g/mL, 0.150 to 0.263 g/mL, and 0.251 to 0.628 g/mL, respectively.

(3) The first six plant seed oils can be used to be alternative sources of edible oil due to the presence of all saturated and unsaturated fatty acids required for human health. Being different from the others, yangtao kiwifruit seed oil has high content of  $\alpha$ -linolenic acid (0.294 g/mL) and relative low content of linoleic acid (0.075 g/mL) and certain saturated fatty acids, it may be much better alternative source of edible and nutritional oil because  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid are two main functional constituents.

**Acknowledgement** This work was supported by National Natural Science Foundation of China (81173533) and scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (11A017). The authors are grateful to Professor Yang Guoping from The Third Hospital of Xiangya Medical College of Central South University for the plant seed samples

## References

- Cao Y, Suo YR. Extraction of *Microula sikkimensis* seed oil and simultaneous analysis of saturated and unsaturated fatty acids by fluorescence detection with reversed-phase HPLC. *J Food Compos Anal*, 2010, 23:100-106.
- Orhan I, Deliorman OD, Ozeclik B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food Chem*, 2009, 115:701-705.
- Pardo JE, Fernandez E, Rubio M, *et al.* Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Eur J Lipid Sci Technol*, 2009, 111:188-193.
- Silva TLD, Bernardo E, Nobre B, *et al.* Extraction of Victoria and red globe grape seed oils using supercritical carbon dioxide with and without ethanoL. *J Food Lipids*, 2008, 15:356-369.
- Holman RT. Control of polyunsaturated acids in tissue lipids. *J Am Coll Nutr*, 1986, 5:183-211.
- Tranchida P, Donato P, Dugo P, *et al.* Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids. *Trends Anal Chem*, 2007, 26:191-205.
- Basconcello LS, Mccarry BE. Comparison of three GC/MS methodologies for the analysis of fatty acids in *Sinorhizobium meliloti*: Development of a micro-scale, one-vial method. *J Chromatogr B*, 2008, 871:22-31.
- Isbell TA, Mund MS, Evangelista RL, *et al.* Method for analysis of fatty acid distribution and oil content on a single *Lesquerella fendleri* seed. *Indus Crops Prod*, 2008, 28:231-236.
- Mehmood S, Orhan I, Ahsan Z, *et al.* Fatty acid composition of seed oil of different Sorghum bicolor varieties. *Food Chem*, 2008, 109:855-859.
- Applequist WL, Avula B, Schaneberg BT, *et al.* Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in a common (shared) garden. *J Food Compos Anal*, 2006, 19:606-611.
- Fruhwrith GO, Hermetter A. Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2008, 110:637-644.
- Kanya TCS, Rao LJ, Sastry MCS. Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chem*, 2007, 101:1552-1557.
- Pan TA, Liu DH, Mao ZY, *et al.* Studies on the extraction of oil from wolfberry seeds with supercritical CO<sub>2</sub>. *J Ningxia Univ, Nat Sci*, 2000, 21(2):156-158.
- Chen QX, Wu NY, Gao JP, *et al.* Extraction of Lycium seed oil and analysis of its composition. *China Oils Fats*, 2000, 25(2):53-55.
- Ouyang JW, Xiong XY, Wang HX, *et al.* Oil extract from passionflower seed by supercritical CO<sub>2</sub> and its composition analysis. *Acta Horticult Sin*, 2007, 34:239-241.
- Liu SC, Zhang CH, Deng CJ, *et al.* Extraction of *Passiflora* seed oil by supercritical carbon dioxide and analysis of its properties. *Chem Indus Forest Prod*, 2008, 28(6):70-74.

# 梨花中熊果苷的高效液相色谱分析

李 媛, 乔进春, 张玉星, 何童森, 吕明霞, 张 飞, 崔 同\*

河北农业大学食品科技学院, 保定 071000

**摘要:** 采用高效液相色谱法对不同时期、不同品种的梨花中熊果苷的含量进行了分析, 色谱柱为 Hypersil BDS  $C_{18}$  (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为甲醇: 水 (6: 94), 加入甲酸 0.05%, 检测波长 280 nm。结果表明: 熊果苷在 0.01 ~ 5.00  $\mu$ g 范围内线性关系良好 ( $r = 0.9999$ ), 平均加标回收率为 97.7%。不同生长期的鸭梨梨花中熊果苷的含量一般在 10 mg/g 以上, 尤以花芽萌动期时含量最高, 达到 35.7 mg/g (鲜重计)。不同品种的 9 份梨花样品中, 熊果苷含量在 3.5 ~ 10.5 mg/g 之间。

**关键词:** 梨花; 熊果苷; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Quantification of Arbutin from Pear Blossoms by HPLC

LI Yuan, QIAO Jin-chun, ZHANG Yu-xing, HE Tong-sen, LV Ming-xia, ZHANG Fei, CUI Tong\*

College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000

**Abstract:** The contents of arbutin in pear blossoms of different periods and different varieties were detected using the HPLC method with Hypersil BDS  $C_{18}$  column (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), the mobile phase methanol : water (6 : 94, with 0.05% formic acid), and the detection wavelength 280 nm. The results showed that the calibration curve was linear in the range of 0.01 ~ 5.00  $\mu$ g ( $r = 0.9999$ ) and the average recovery was 97.7%. The content of arbutin in Yali pear blossom during the florescence was above 10 mg/g (fresh weight) in most cases, especially in blossom bud germination period, reaching a maximum of 35.7 mg/g. In the nine pear blossom samples from different varieties, the contents of arbutin were range between 3.5 mg/g to 10.5 mg/g.

**Key words:** pear flower; arbutin; HPLC

梨是蔷薇科 (Rosaceae)、梨亚科 (Pomaceae)、梨属 (*Pyrus* L.) 植物<sup>[1]</sup>。我国是梨属植物的原产地, 也是世界第一产梨大国, 种质资源十分丰富, 全国南北各地均有分布和栽培<sup>[2]</sup>, 河北省的栽培面积居全国首位<sup>[3]</sup>。

在我国古代不仅有以梨果实入药的悠久历史, 而且还发现梨花也具有奇特的疗效, 据明朝《本草通玄》<sup>[4]</sup> 记载, 梨花有润肺、化痰、止咳和解酒等功效, 民间还发现梨花有肌肤美白效果, 据李时珍的《本草纲目》<sup>[5]</sup> 记载, “梨花可去面黑粉滓”。本研究组曾对东方梨植物的生理活性物质进行长期研究, 发现梨花中有高浓度的熊果苷 (arbutin), 是梨花美白肌肤作用的代表性活性因子<sup>[6]</sup>。熊果苷, 化学名称为对羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷, 它可在体内释放氢醌, 一种强力酪氨酸氧化酶抑制剂, 可抑制皮肤黑色素合成, 而且还具有止咳、尿路消炎等作用<sup>[7]</sup>。

自 90 年代以来, 它取代了曲酸和抗坏血酸成为市场最流行的化妆品美白剂, 在高档美白化妆品领域有广泛的应用<sup>[8]</sup>。

与其他植物资源相比, 梨花生长期短, 受环境污染的机会少, 具有更好的安全性。然而, 目前为止除本研究组的报道<sup>[6,9]</sup> 之外, 尚未发现梨花中熊果苷含量分析方法及存在分布方面的任何其他报道。为此, 本研究拟开发一种用于梨花中熊果苷进行定量分析的高效液相色谱 (HPLC) 分析方法, 并对生长期梨花中熊果苷的含量进行动态分析, 同时对梨属植物代表性物种的鲜花进行比较, 以便揭示梨花中熊果苷的存在规律, 为这种潜在生物资源的开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

用于熊果苷含量动态变化分析的梨花样品为属于白梨 (*P. bretschneideri*) 的鸭梨; 用于不同品种梨花

中熊果苷含量比较的样品包括:白梨的鸭梨、雪花梨,砂梨(*P. pyrifolia*)的黄金梨,西洋梨(*P. communis*)的红安久、红茄梨,野生种杜梨(*P. betulaefolia*),以及黄冠梨(雪花梨×新世纪梨)、绿宝石(早酥梨×新世纪梨)和八月红(早巴梨×早酥梨)。以上样品均采自河北农业大学(西校区)标本园。

熊果苷标准品购于美国 Sigma 公司;色谱流动相用甲醇为色谱纯,水为去离子重蒸馏水。其余试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪;Agilent 1200 型可变波长检测器;Agilent Chemstation 色谱工作站。RE-5210 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),TB-215D 微量分析天平(德国赛多利斯股份有限公司),SK5200H 超声振动仪(上海波龙电子设备有限公司),SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 梨花样品的处理

准确称取鲜梨花样品 2.00 g,放入研钵中,加少量的石英砂和 7 mL 95% 的乙醇研磨,为防止氧化褐变加入磷酸 1 滴,研磨成匀浆状后用 80% 乙醇移至

25 mL 容量瓶中,在超声波振荡器中振荡提取 10 min 后用 80% 乙醇定容,于离心机上 4000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.2 mL 于试管中,50 ℃ 水浴真空抽干乙醇后用 2 mL 流动相回溶,经 0.45 μm 滤膜过滤,准备上样测定。

### 1.3.2 HPLC 分析条件<sup>[9]</sup>

色谱柱:Hypersil BDS C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm,5 μm);色谱柱温度:35 ℃;流动相:甲醇:水 = 6:94 (v/v),加入 0.05% 甲酸;流速:0.8 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 HPLC 分析方法的评价

#### 2.1.1 方法的回归方程、精密度及检出线

准确称取熊果苷标准品 50 mg 置于 10 mL 容量瓶中用甲醇定容,得到 5 mg/mL 的贮备液。分别吸取贮备液,用流动相稀释,配成系列浓度的标准溶液。按 1.3.2 中的色谱条件进样分析,以峰面积(Y, mv)和进样量(X, μg)求出线性回归方程、相关系数和线性范围;准确吸取 0.05 mg/mL 熊果苷标准液 10 μL 平行进样 5 次,统计色谱峰面积,计算相对标准偏差以评价方法的精密度;最低检出限以 3 倍信噪比所对应的进样量求得,结果列于表 1。

表 1 熊果苷的标准曲线、检出限和相对标准偏差

Table 1 The standard curve, detection limit and relative standard deviation of arbutin

| 回归方程<br>Standard curve | 相关系数<br>Correlation coefficient | 线性范围(ng)<br>Linear range | 最低检出限(ng)<br>Detection limit | 相对标准偏差<br>RSD (%) |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------|
| $Y = 503.89X - 0.93$   | 0.9999                          | 10-5000                  | 1                            | 0.55              |

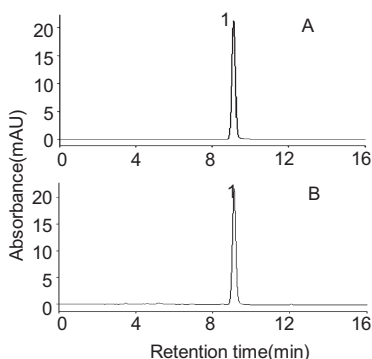


图 1 熊果苷标准品(A)和绿宝石梨花样品(B)(采于 2010 年 4 月 25 日)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard of arbutin (A) and tested sample (B)

#### 2.1.2 加标回收率的测定

参照未加标样品中熊果苷的含量水平,精确称

取 7.00 mg 熊果苷标准品加入到 2.00 g 梨花样品中,按 1.3.1 所述样品处理方法进行操作,平行做 5 份,并对加标样品按 1.3.2 中的色谱条件进行分析。与未加标样品含量比较,计算每份样品的加标回收率,并统计结果。结果表明,熊果苷的平均回收率为 97.7%,相对标准偏差为 1.68%。

从图 1 可以看到,在选定的分析条件下,熊果苷在 10 min 内实现了良好分离。从方法评价的结果来看,此方法具有较好的灵敏度、精密度和准确度,可用于梨花样品中熊果苷的分析检测。

### 2.2 梨花中熊果苷含量分析

#### 2.2.1 梨花生长期熊果苷的含量

从 2010 年 4 月 1 日开始采集鸭梨的花芽、花蕾和花朵等不同生长期的样品,采样间隔为 3 d。按照上述 1.3 的方法对样品中的熊果苷进行了动态含量

分析,结果见图2。

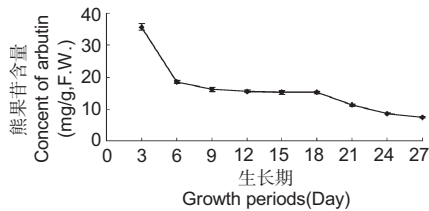


图2 梨花生长期熊果苷的含量变化 ( $n=5$ )

Fig. 2 Changes in content of pear blossom during the different growth periods ( $n=5$ )

由图2可以看出,不同生长期的梨花中熊果苷的含量均相当高,一般在10 mg/g以上,尤以花芽萌动期时(第3 d的样品)含量最高,达到35.7 mg/g(鲜重计),此后随着花芽的不断生长,鲜重增加,熊果苷含量逐渐降低。经过花芽开绽期(第6和9 d的样品)、花序露出期(第12 d的样品)和花序伸长期(第15、18和21 d的样品),熊果苷的含量从18.6 mg/g降到11.3 mg/g;进入花期(第24和27 d的样品)之后,含量降至10 mg/g以下。

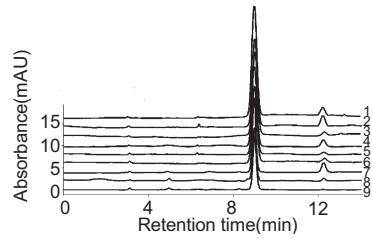
### 2.2.2 不同品种梨花中熊果苷含量的比较

由于梨的不同品种花期有所不同,我们分别在各品种的盛花期进行采样和分析。其中雪花梨、黄金梨和红安久,采样时间是2010年4月24日;鸭梨、黄冠梨和绿宝石,采样时间是2010年4月25日;杜梨、八月红,采样时间是2010年4月29日;红茄梨采样时间是2010年5月1日。按照上述1.3的方法,对以上9个品种的梨花中熊果苷含量进行分析比较,HPLC色谱图和含量测定结果分别见图3和图4。

由图4可以看出,这9个品种的梨花中熊果苷的含量存在较大差异。其中东方梨系的梨花中熊果苷含量较高,又以白梨的雪花梨梨花中熊果苷的含量最高,达10.7 mg/g,而杜梨(野生梨)和红茄梨(西洋梨)的梨花中熊果苷含量最低,约为3.4 mg/g。

## 3 讨论

熊果苷是一种天然的皮肤美白剂,以往曾报道其存在于熊果、越桔、岩白菜、鹿衔草等中草药中。本研究组发现在梨花中有高含量的熊果苷,但由于其中同时也含有其他植物多酚类成分如绿原酸等<sup>[6,9]</sup>,因此不宜采用分光光度法进行定量分析。本项研究开发了一种简便的等度淋洗高效液相色谱法,可以使熊果苷与梨花中的其他多酚类物质很好



图中:1.雪花梨 2.黄冠梨 3.黄金梨 4.鸭梨 5.绿宝石 6.红安久 7.八月红 8.红茄梨 9.杜梨

1. Xuehuali pear 2. Huangguanli pear 3. Whangkeumbae pear 4. Yali pear 5. Lvbaoshi pear 6. Red Dānju 7. Bayuehong pear 8. Starkrimson 9. *Pyrus betulaeifolia* Bunge

图3 9种梨花样品的色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of pear flower samples from 9 cultivars

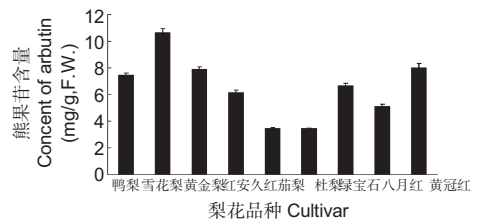


图4 不同品种梨花中熊果苷的含量 ( $n=5$ )

Fig. 4 Comparison of arbutin content in pear flowers among species and cultivars ( $n=5$ )

的分离,以便获得可靠的含量分析结果。试验结果表明,这种方法具有良好的精密度和准确度。采用此方法对梨花样品进行了实际分析,结果表明,不同种和品种的9份梨花样品中,熊果苷含量在3.5~10.5 mg/g之间。在花芽到开花的生长过程中,伴随梨花的膨大开放,鲜样中熊果苷的浓度由30 mg/g以上逐渐下降到10 mg/g左右。在梨的春季栽培管理中,经常会根据果树营养分配的需要实施疏花疏果的管理,以往疏掉的花朵都是被当作废物丢弃。另外,为了生产人工授粉用的梨花粉,每年梨的产区都会采集大量的梨花生产花粉,其中的花萼、花瓣也都是被丢弃的,我们的结果表明,这些梨花都可以作为提取化妆品美白剂熊果苷的天然原料,因而为这种潜在生物资源的开发利用提供了重要的科学依据。

### 参考文献

- 1 Laiyang Agricultural University of Shandong(山东省莱阳农业大学). Pear(梨). Beijing: Science Press, 1978. 1.

# 多糖的甲基化方法及图谱解析

李波\*, 芦菲

河南科技学院食品学院, 新乡 453003

**摘要:** 本文对微量多糖的甲基化方法进行了研究。0.1 mg 多糖样品用 0.3 mL 二甲亚砜溶解后, 加入 10 mg 氢氧化钠粉末, 室温下超声 20 min。冰浴冷却后加入 0.1 mL 碘甲烷, 18~20 °C 下超声 20 min, 再加入 0.1 mL 碘甲烷, 超声 20 min。加入 1 mL 含 4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的水, 终止甲基化反应。反应液用 0.5 mL 氯仿提取 4 次, 氯仿提取液用 0.5 mL 水处理 5 次。氯仿相用无水硫酸钠脱水后, 氮气吹干。该法简便易行, 甲基化程度高, 适用于易溶(或难溶)于水和二甲亚砜的多糖。此外, 本文对部分甲基化的糖醇乙酯衍生物的质谱图解析进行了阐述, 并对特殊糖类样品的甲基化方法进行了说明。

**关键词:** 多糖; 甲基化; 方法; 图谱解析; 变形链球菌; 鸡腿菇

中图分类号: Q539

文献标识码: A

## Method and Analysis of Methylation of Polysaccharides

LI Bo\*, LU Fei

School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** Methylation of trace polysaccharide was studied. Polysaccharide sample (0.1 mg) was dissolved in 0.3 mL dimethyl sulfoxide, followed by adding 10 mg powdered NaOH and sonicating for 20 min. After cooling on ice, 0.1 mL  $\text{CH}_3\text{I}$  was added and sonicated for 20 min at 18-20 °C. After cooling,  $\text{CH}_3\text{I}$  was added again and sonicated for 20 min. Water (1 mL) containing 4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  was added to stop the methylation reaction. The methylated solution was extracted four times with 0.5 mL chloroform, followed by extracted five times with 0.5 mL water. The chloroform fraction was mixed with anhydrous sodium sulfate to remove the residue water and dried with  $\text{N}_2$ . The method was simple and easy. The methylation degree of the product was high for polysaccharides soluble or insoluble in water and DMSO. In addition, the resolution of partially methylated alditol acetate was explained and the methylation methods for special carbohydrates were also illuminated.

**Key words:** polysaccharide; methylation; method; spectrum elucidation; *Streptococcus mutans*; *Coprinus comatus*

甲基化分析是研究糖类结构的重要化学方法, 它广泛用于寡糖和多糖中单糖残基间连接位置的确定。其主要过程是: 将多糖中游离羟基全部甲基化, 然后水解得到部分甲基化的单糖, 将这些单糖还原和乙酰化, 最后用 GC/MS 测定部分甲基化衍生物的种类和数量, 就能推测出单糖残基的连接方式<sup>[1]</sup>。

多糖的甲基化方法经历了多年的发展变革, 逐渐趋于简单合理。1964 年, Hakomari<sup>[2]</sup> 以甲基亚砷酰负离子( $\text{CH}_3\text{SOCH}_2$ ) 为强碱, 碘甲烷为甲基供体。1984 年, Ciucanu 和 Kerek<sup>[3]</sup> 用 NaOH 代替  $\text{CH}_3\text{SOCH}_2$  作为强碱, 由于省去了制备  $\text{CH}_3\text{SOCH}_2$  的复杂步骤, 因而大大简化了操作。1993 年, Needs

和 Selvendran<sup>[4]</sup> 对 Ciucanu 法进行了改进, 先加入 NaOH 使糖的羟基充分解离后, 再加入碘甲烷使羟基迅速甲基化, 减少了多糖氧化降解的可能性。对于难溶于二甲亚砜(DMSO) 易溶于水的水多糖, 可将其先用少量水溶解, 再转溶于 DMSO, 然后用 3A 分子筛脱除其中的水分, 再进行甲基化反应<sup>[5]</sup>, 但该方法多糖用量较多。本文对微量多糖的甲基化方法进行了研究, 对甲基化产物的图谱解析等难点问题进行了探讨, 旨在为多糖工作者提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

EPS159 是变形链球菌(*Streptococcus mutans*) 的菌株 UA159 产生的胞外多糖(exopolysaccharide, EPS), 其制备方法为: UA159 用肉汤培养基加 20%

蔗糖在 37 °C 厌氧条件下培养过夜,用 4% 三氯乙酸除去培养液中的细胞碎片、蛋白质等。离心后,上清液中加入 2 倍体积的乙醇以沉淀出 EPS。EPS 经离心、复溶、透析除去单糖和寡糖后,再用乙醇进行沉淀,冻干得到多糖样品。单糖组成分析显示,该样品仅含葡萄糖,离子交换色谱和凝胶过滤色谱显示为单一对称峰,表明其纯度较高。

F11 和 F32 是鸡腿菇(*Coprinus comatus*)水溶性多糖分离纯化后的 2 个级分,其制备方法为:鸡腿菇经脱脂、热水提取得水溶性粗多糖,粗多糖经离子交换 DEAE Sepharose CL-6B 柱分离,得到一中性洗脱级分 F1 和一氯化钠洗脱级分 F3。F1、F3 分别经凝胶过滤 Sepharose CL-6B 柱分离,得到级分 F11 和 F32。二者的凝胶过滤色谱显示为单一对称峰,说明其纯度较高。

DMSO、NaOH、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  等试剂:分析纯,Merck 公司产品。碘甲烷( $\text{CH}_3\text{I}$ ):纯度 99%,Acros Organics 公司产品。氘代硼氢化钠( $\text{NaBD}_4$ ):98 atom% D, Aldrich 公司产品。GC/MS: QP2010 Plus, 日本岛津公司。

## 1.2 甲基化反应

脱盐后的干燥多糖样品(0.1 mg)放入反应管内,加入 0.3 mL 无水 DMSO,充入氮气,超声波浴 30 min,尽量溶解样品。加入约 10 mg 新鲜磨制的氢氧化钠粉末,充入氮气,超声 20 min。冰浴冷却至样液凝固,充入氮气,加入 0.1 mL  $\text{CH}_3\text{I}$ ,超声 20 ~ 30 min,期间控制超声波水浴的温度为 18 ~ 20 °C。冰浴冷却至样液凝固,充入氮气,再加入 0.1 mL  $\text{CH}_3\text{I}$ ,超声 20 ~ 30 min,期间控制超声波水浴的温度为 18 ~ 20 °C。加入 1 mL 含 4 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  的水,终止甲基化反应。向反应液中加入 0.5 mL 氯仿,旋涡振荡混合,静置数分钟待分层后,吸出下层氯仿相。重复此操作,反应液用 0.5 mL 氯仿提取 4 次。合并氯仿相,加入 0.5 mL 水,旋涡振荡混合,离心(3000 r/min, 5 min),除去水相。重复此操作,氯仿相用 0.5 mL 水处理 5 次。向氯仿相加入少量无水硫酸钠,充分混合,以除去残留的水分。将少量棉花塞入玻璃滴管粗细交界处,用氯仿洗涤 1 次,然后将脱水后的氯仿相液体从滴管宽口处加入,经棉花过滤,收集滤液。残留物加入少量氯仿进行洗涤,洗液也经棉花过滤。合并滤液,用氮气吹干,或减压蒸发至干。

## 1.3 水解

加入 0.5 mL 2 mol/L 三氟乙酸,120 °C 反应 2 h。冷却至室温,用氮气吹干。加入 0.1 mL 甲醇,用氮气吹干。

## 1.4 还原

加入 0.5 mL 新配的 10 mg/mL  $\text{NaBD}_4$ ,室温反应 2 h,期间振荡数次。逐滴加入 4 mol/L 乙酸中和,pH 试纸检测。加入 0.1 mL 甲醇,氮气吹干,重复 2 次。

## 1.5 乙酰化

加入 0.5 mL 新配制的吡啶/乙酸酐(1:1),120 °C 反应 30 min。冷却至室温,氮气吹干。加入 0.5 mL 甲醇,氮气吹干(或加入 1 滴甲苯,氮气吹干,重复 2 次)。加入 2 mL 二氯甲烷,旋涡振荡,离心,取上清液,用氮气适当吹浓后,进行 GC/MS 分析。

## 1.6 GC/MS 分析

GC/MS 条件:色谱柱为 EC-1 column (30 m × 0.25 mm),起始温度 140 °C,以 8 °C/min 升温至 250 °C。载气为氦气,EI 源,离子化电势 70 eV。进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

# 2 结果与讨论

## 2.1 EPS159 的甲基化分析

EPS159 是由 *Streptococcus mutans* UA159 产生的胞外多糖,为  $\alpha$ -Glucan,难溶于水和二甲亚砜。甲基化分析结果(表 1)显示,EPS159 含有 4 种连接方式。分支点数量[ $\rightarrow 3,6$  Glcp(1 $\rightarrow$ )]与端基[Glcp(1 $\rightarrow$ )]数量相同,表明多糖的甲基化反应比较完全。甲基化产物的红外光谱显示,3450  $\text{cm}^{-1}$  处的羟基峰消失,表明甲基化程度很高。

对于难溶于二甲亚砜的多糖,可以通过延长样品溶解时间、提高溶解温度、超声波辅助溶解等手段来提高样品的溶解度。Aires 等采用 2 次甲基化反应循环以达到完全甲基化的目的,即一次甲基化反应后的产物用氯仿提取后,蒸发至干,再进行第二次甲基化反应<sup>[6]</sup>。Kim 等先用无水甘油溶解样品,干燥后再进行甲基化反应,PMAA(部分甲基化的糖醇乙酯衍生物,partially methylated alditol acetates)的回收率显著提高,甲基化效果很好<sup>[7]</sup>。本文将 EPS159 样品加入二甲亚砜后,超声波溶解 1 h,然后进行甲基化反应,即可达到完全甲基化。这表明,尽管 EPS159 溶解度很低,但总有少量多糖可以溶解,这些可溶部分能够被完全甲基化。采用 2 次甲基化



循环,其结果与表 1 基本相同。

表 1 EPS159 的甲基化分析结果

Table 1 Methylation result of EPS159

| 部分甲基化的糖醇<br>乙酰酯 PMAA         | 连接方式<br>Linkage type       | 峰面积(%)<br>Peak area |
|------------------------------|----------------------------|---------------------|
| 2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc | Glc <sub>p</sub> (1→       | 14                  |
| 2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc   | →3) Glc <sub>p</sub> (1→   | 18                  |
| 2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc   | →6) Glc <sub>p</sub> (1→   | 54                  |
| 2,4-Me <sub>2</sub> -Glc     | →3,6) Glc <sub>p</sub> (1→ | 14                  |

## 2.2 F11 和 F32 的甲基化分析

F11 是  $\alpha$ -Glucan, F32 是  $\alpha$ -fucogalactan, 二者是鸡腿菇水溶性多糖经分离纯化后的 2 个级分。F11 和 F32 易溶于水和二甲亚砜, 样品中加入二甲亚砜用超声波处理 30 min 后即能达到完全溶解。甲基化分析结果(表 2 和 3)显示, 二者糖苷键类型中的分支数量与端基数量基本相同, 表明甲基化比较完全。

表 2 F11 的甲基化分析结果

Table 2 Methylation result of F11

| 部分甲基化的糖醇<br>乙酰酯 PMAA         | 连接方式<br>Linkage type       | 峰面积(%)<br>Peak area |
|------------------------------|----------------------------|---------------------|
| 2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc | Glc <sub>p</sub> (1→       | 11                  |
| 2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc   | →4) Glc <sub>p</sub> (1→   | 79                  |
| 2,3-Me <sub>2</sub> -Glc     | →4,6) Glc <sub>p</sub> (1→ | 10                  |

表 3 F32 的甲基化分析结果

Table 3 Methylation result of F32

| 部分甲基化的糖醇<br>乙酰酯 PMAA       | 连接方式<br>Linkage type       | 峰面积(%)<br>Peak area |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| 2,3,4-Me <sub>3</sub> -Fuc | Fuc <sub>p</sub> (1→       | 15                  |
| 2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal | →6) Gal <sub>p</sub> (1→   | 70                  |
| 3,4-Me <sub>2</sub> -Gal   | →2,6) Gal <sub>p</sub> (1→ | 15                  |

三种多糖样品的甲基化分析结果显示, 对于易溶于(或难溶于)水和二甲亚砜的多糖, 按照本文的方法均能获得甲基化程度比较完全的产物。

## 2.3 甲基化产物的图谱解析

甲基化反应后, 产物经水解、还原、乙酰化, 得到部分甲基化的糖醇乙酰酯衍生物, 然后进行 GC/MS 分析, 通过对 GC 峰的质谱图进行解析, 即可知道糖苷键的连接方式。PMAA 的质谱图解析是甲基化分析的难点之一。通常可以采取三种方法: 一是从

GC/MS 的谱库进行检索, 根据谱库数据与样品的匹配度进行解析, 但这种方法有时误差较大; 二是与标准的 PMAA 谱图进行比对, 根据质谱图的质荷比( $m/z$ )和丰度确定样品峰, 但标准 PMAA 图谱不易获得, 且可能会有少许误差; 三是根据 PMAA 的电离规律进行解析, 这种方法比较科学可靠, 但有一定难度。所以, 初学者最好将三种方法结合起来使用。

PMAA 在 EI 电离时所形成的初级离子具有规律性: 1) 两个甲基化的碳原子之间最容易断裂(图 1a), 由此所形成的离子丰度也较高; 2) 当断裂发生在甲基化碳原子和乙酰化碳原子之间时, 含甲基化碳原子的阳离子片段优先形成(图 1b); 3) 发生在两个乙酰化碳原子之间的断裂几率较低, 所以由此形成的离子丰度也很低(图 1c)。-CH<sub>3</sub>OH( $m/z$  32)、-CH<sub>2</sub>CO( $m/z$  42)、-HOAc( $m/z$  60)等基团会从初级离子上脱离, 形成次级离子, 并产生相应的离子丰度<sup>[8]</sup>。

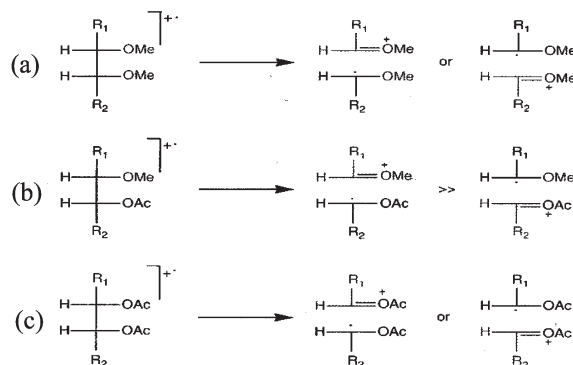


图 1 PMAA 在 EI 电离时的选择性

Fig. 1 Selection of EI ionization for PMAA

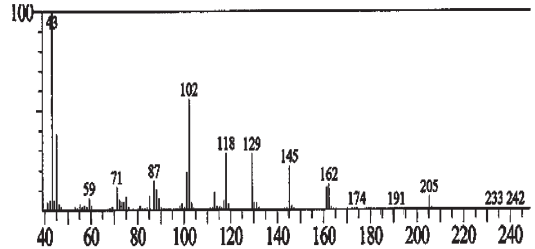
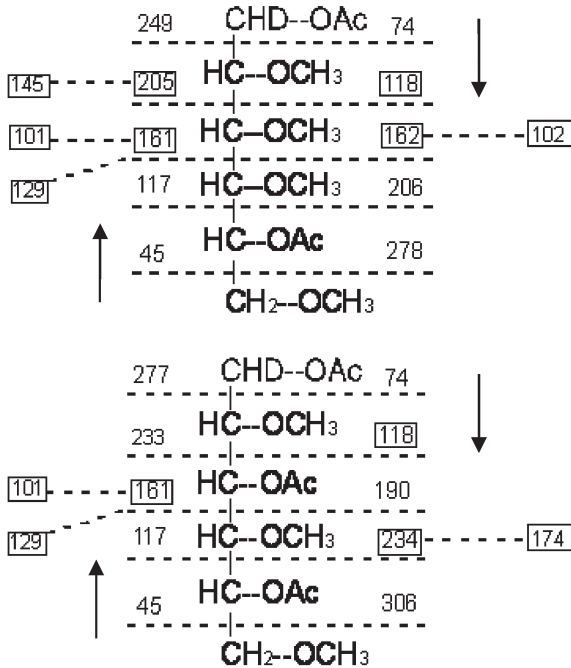
以 Hex(1→和→3)Hex(1→为例, 解释说明 PMAA 的电离规律及质谱图解析。Hex(1→的 PMAA 为 1,5-Ac<sub>2</sub>-2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Hex, 分子量为 323。两个甲基化的碳原子之间, 即 C2 和 C3、C3 和 C4 之间易于发生断裂, 所以  $m/z$  118、162、161、205 的丰度较高(图 2a)。初级离子片段会继续电离, 形成次级离子。如初级离子 205 脱落 HOAc( $m/z$  60), 产生 145 次级离子; 初级离子 161 脱落 HOAc 或 CH<sub>3</sub>OH( $m/z$  32), 产生 101 或 129 次级离子; 162 脱落 HOAc 产生 102 次级离子, 所以  $m/z$  102、145、101、129 也有较高的丰度。次级离子片段还会继续电离, 如次级离子 101 脱落 CHOH( $m/z$  30), 产生  $m/z$  71 三级离子; 次级离子 129 脱落 CH<sub>2</sub>CO( $m/z$  42), 产生  $m/z$  87 三级离子。所以, 1,5-Ac<sub>2</sub>-2,3,4,

6-Me<sub>4</sub>-Hex 的质谱图中 71、87、101、102、118、129、145、161、162、205 的丰度较高,可作为特征峰进行识别和解析。

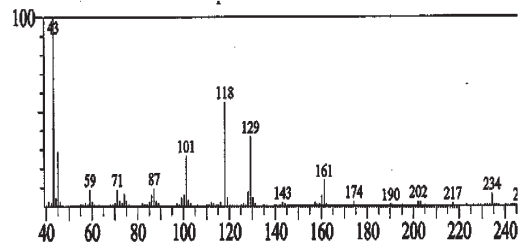
→3) Hex(1→的 PMAA 为 1,3,5-Ac<sub>3</sub>-2,4,6-Me<sub>3</sub>-Hex,分子量为 351,其电离情况可参考 Hex(1→,其特征峰为 71、87、101、118、129、161、174、234

(图 2b)。

用 NaBD<sub>4</sub> 进行还原的好处在于可以区分 C1 和 C6,尤其当 C6 发生乙酰化时,CHD-OAc 的质量比 CH<sub>2</sub>-OAc 大 1。如果用 NaBH<sub>4</sub> 作还原剂,则包含 CHD-OAc 的离子片段的质量数相应减 1。



(a)



(b)

图 2 Hex(1→ (a) 和→3)Hex(1→ (b) 的 PMAA 的电离情况及质谱图

Fig. 2 Ionization and mass spectra of PMAA of (a) Hex(1→ and (b) Hex(1→

## 2.4 甲基化方法的解释说明

甲基化反应时,多糖样品的用量可低至 0.1 mg。若样品溶解度较低,可适当增加其用量。二甲亚砜采用分析纯试剂即可,无需专门制备。固体氢氧化钠在临用前用研钵磨成粉末状即可,但速度要快,因氢氧化钠粉末很容易吸潮。

充入氮气的目的是为了防止多糖发生氧化反应。因碘甲烷容易挥发,所以应先充氮,再加碘甲烷。加入碘甲烷后,至少反应 20 min,期间可通过加冰块来控制超声波浴的温度在 18~20 ℃。若温度较高,则碘甲烷易挥发;若温度较低,则 DMSO 易发生凝固。一般加入 2 次碘甲烷(即 2 次甲基化反应)即可达到完全甲基化,亦可根据情况增加甲基化反应次数和时间。

加入无水硫酸钠的目的是除去氯仿相中残留的水分。因硫酸钠易结块,故可分 2~3 次加入,每次加入量 10~20 mg,加入后剧烈振荡使其与液体充

分混合。

水解反应和乙酰化反应在螺口的反应管进行,120 ℃可通过电加热恒温装置或烘箱中获得,注意拧紧反应管的盖子。还原反应后,加入甲醇的目的是为了除去 NaBD<sub>4</sub>。氮气吹干时,加入甲醇的目的是为了完全除去水分。

## 2.5 特殊多糖和寡糖样品的甲基化分析

对于含糖醛酸的多糖,可通过比较羧基还原前后的甲基化结果来判断糖醛酸残基的连接方式。羧基还原可在甲基化反应之前进行,也可在甲基化反应后进行<sup>[9]</sup>。若用氘代试剂进行还原,则很容易通过质谱图识别中性糖残基是天然存在的,还是来自羧基还原的。

有些多糖本身含有甲基,它们可以 PMAA 的 GC/MS 分析进行识别,而且这些天然甲基在糖残基中的位置也可通过甲基化分析(采用氘代的碘甲烷作甲基化试剂)予以确认。

还原性寡糖应先转化为非还原性衍生物(如糖醇)再进行甲基化反应,因为还原糖在强碱性条件下会发生降解反应和构象变化,导致复杂的甲基化结果。

含有天门冬酰胺(glycosyl-asparagine)或者羟基脯氨酸(glycosyl-hydroxy-proline)连接的糖肽(glycopeptides)用 Hakomori 法可被甲基化,而含丝氨酸(glycosyl-serine)和苏氨酸(glycosyl-threonine)连接的糖肽在碱性条件下会发生脱落,游离的还原糖残基进一步发生降解。因此,这些糖肽应先用碱性硼氢化钠降解后再进行甲基化反应。

#### 参考文献

- 1 Dong Q(董群), Fang JN(方积年). Development of methylation methods of oligosaccharides and polysaccharides. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1995, 7: 60-65.
- 2 Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem*, 1964, 55: 205-208.
- 3 Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the perm-

ethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res*, 1984, 131: 209-217.

- 4 Needs PW, Selvendran RR. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr Res*, 1993, 245: 1-10.
- 5 Li B(李波), Xu SY(许时婴). Methylation of polysaccharides undissolved in dimethyl sulfoxide. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2004, 16: 207-209.
- 6 Aires CP, Koo H, Sasaki GL, *et al.* A procedure for characterizing glucans synthesized by purified enzymes of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46: 551-554.
- 7 Kim JS, Reuhs BL, Michon F, *et al.* Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 1061-1064.
- 8 Kamerling JP. *Comprehensive glycoscience: from chemistry to systems biology*. 1st Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.
- 9 A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. <http://www.stenutz.eu/yellow/applic.html>

(上接第 78 页)

- 2 Zhang S(张素). Studies on processing characteristics and quality control of different pear varieties. Shandong: Shandong agriculture university (山东农业大学), MSc. 2008.
- 3 Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (中华人民共和国农业部). China Agriculture Statistical Report in 2007 (中国农业统计资料 2007). Beijing: China Agriculture Press, 2008. 72.
- 4 Li ZZ(李中梓). *Bencao Tongxuan* (本草通玄). Shanghai: Shanghai Classics Publishing House, 1996.
- 5 Li SZ(李时珍). *Bencao Gangmu*, Vol. 5 (本草纲目第五册). Beijing: Commercial Press, 1930. 64.

- 6 Cui T, Nakamura K, Ma L, *et al.* Analyses of arbutin and chlorogenic acid - the major phenolic constituents in oriental pear. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 3882-3887.
- 7 Harborne JB, Baxter H. *Phytochemical dictionary*. London and Washington: Taylor and Francis Press, 1993. 475.
- 8 Maeda K, Fukuda M. Depigmenting action of arbutin in vitro and its effectiveness on humans. *Fragrance J*, 1995, 23: 127-132.
- 9 Ma L(马良). Analysis of major constituents in easter pear by High-perform liquid chromatography. Hebei: Agricultural University of Hebei (河北农业大学), MSc. 2004.

# 绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌的生长抑制研究

姜涛, 李岚, 杜阳, 臧师竹, 谢耀光, 刘宗楠, 辛毅\*

大连医科大学生物技术系, 大连 116044

**摘要:** 采用乙酸乙酯在中性条件下萃取绿茶, 得到含有表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)的粗提物。通过纸片琼脂扩散法和细菌生长曲线来评价绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌的抑菌效果, 利用透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)观察其对耻垢分枝杆菌细胞壁结构的影响。结果显示, 绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌生长产生明显抑制作用, 且抑菌作用随着浓度的升高逐渐加强; 经绿茶粗提物处理的耻垢分枝杆菌细胞壁呈现膨出、变形等形态学变化。因此, 绿茶粗提物具有抑制耻垢分枝杆菌生长的功能, 其作用机制可能与其主要成分 EGCG 影响细胞壁肽聚糖的生物合成有关。

**关键词:** 绿茶粗提物; EGCG; 耻垢分枝杆菌; 抑菌作用

**中图分类号:** R284.2

**文献标识码:** A

## Inhibitory Effect of Crude Extract from Green Tea on *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155

JIANG Tao, LI Lan, DU Yang, ZANG Shi-zhu, XIE Yao-guang, LIU Zhong-nan, XIN Yi\*

Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

**Abstract:** Crude green tea extract containing epigallocatechin gallate (EGCG) was prepared by ethyl acetate extraction under neutral condition. Inhibitory effect from crude extract against *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 was determined by both disk agar diffusion method and growth curve. The changes of structure of cell wall were observed by transmission electron microscopy (TEM). Crude extract showed significant growth inhibition of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 from both approaches, and the inhibitions were dose-dependent. The changes of cell wall structure were confirmed by TEM. The inhibitory effect of crude tea extract against *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 was detected in this study, and it was postulated that EGCG, a known biologically active compound in green tea, might played a major role against *Mycobacterium* causing inhibition of biosynthesis of peptidoglycan in the cell wall.

**Key words:** green tea extraction; EGCG; *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155; bactriostasis

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是人类结核病(Tuberculosis, TB)的主要致病菌。近年来,随着环境污染和艾滋病的传播,以及结核分枝杆菌耐药性的增强,结核病有愈演愈烈的趋势,因此,开发新一代抗结核药物已迫在眉睫。结核分枝杆菌细胞壁较厚,其核心结构为肽聚糖-聚阿拉伯糖半乳糖-分枝菌酸复合物,其中肽聚糖是维持细胞形态和细胞壁结构的主要成分<sup>[1,2]</sup>。本研究采用与结核分枝杆菌具有相似的遗传学特性、生长快速、但无传染性的耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155)作为模式菌研究绿茶粗提物的抑菌作用。

绿茶粗提物由茶多酚、咖啡碱、芳香油等成分组成。表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶中的主要成分,也是茶多酚中含量最多的单体物质。目前,国内外大量研究表明,EGCG具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老和抑菌等多种功能<sup>[3-5]</sup>。绿茶粗提物的抑菌作用早在1906年就被英国学者McNaught发现,但直到20世纪80年代才开始被系统研究,并先后有报道EGCG在体外对幽门螺旋杆菌、溶血性链球菌等多种治病菌具有抑菌效果<sup>[6-8]</sup>。EGCG对具有特殊细胞壁结构、一般药物很难到达作用靶点的结核分枝杆菌作用如何,目前国内尚无报道。本实验利用富含EGCG的绿茶粗提物作用于耻垢分枝杆菌,通过抑菌效果和最小抑菌浓度的评估,确定绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌的抑菌作用,利用透射电镜观察EGCG标准品对细胞壁

收稿日期:2011-02-11 接受日期:2011-07-11

基金项目:国家自然科学基金项目(30970647);辽宁省大学生“挑战杯”科技活动项目

\* 通讯作者 86-411-86110295; E-mail: jimxin0295@163.com

结构的影响,进一步探讨绿茶粗提物的抑菌机制,为开发绿茶药用功能及新型天然抗结核药物奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌培养

*M. smegmais* mc<sup>2</sup>155 细菌按 1:100 接种于含 0.05% Tween 80 的 LB 液体培养基,在 37 °C,140 rpm/min 条件下培养 48 h,达到对数生长期。

### 1.2 实验材料与仪器

绿茶(珍眉)产自陕西省商南县;EGCG 标准品购自浙江乾盛康药业有限公司;细菌培养试剂均来自 Oxoid 公司;无水乙醇;乙酸乙酯;三氯甲烷等有机试剂均为国产分析纯试剂;主要实验仪器包括 Binary HPLC Pump 高压液相色谱仪(JEOL)、JEM-2000EX 透射电镜(JEOL)、Thermo Scientific MK3 型酶标仪(Thermo)、低温真空冷冻干燥机(北京博医康)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 绿茶粗提物的制备

绿茶经 60 °C 恒温干燥后研磨成均匀粉末,称重。将绿茶干粉以物料比 1:5 加入 75% 乙醇,在 80 °C 水浴浸泡一小时,过滤后收集浸提液,剩余绿茶浸出物在相同条件下重复浸泡两次,过滤并收集浸提液。将三次浸提液用旋转蒸发浓缩至原体积 1/3,加入 5 倍体积氯仿萃取一次,保留水相,再加入 5 倍体积乙酸乙酯萃取一次,保留乙酸乙酯相。将萃取液低温冷冻干燥成干粉,即得绿茶粗提物<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 HPLC 检测绿茶粗提物中 EGCG 的含量

绿茶粗提物以去离子水充分溶解后配成 1 mg/mL 检测液。EGCG 标准品以去离子水充分溶解后配制成 0.2 mg/mL 的标准液,使用前以 0.22 μm 滤膜过滤除菌,利用 Hypersill BDS C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分析绿茶粗提物中 EGCG 的含量和纯度。以 2% 乙酸为流动相 A,以乙腈为流动相 B,参照表 1 程序进行梯度洗脱,检测波长为 280 nm,柱温为 35 °C,流速 0.8 mL/min。取 EGCG 标准品溶液和绿茶粗提物溶液 10 μL 分别注入色谱柱,记录并分析色谱图。

#### 1.3.3 抑菌圈实验

采用纸片琼脂扩散法(K-B法)观察绿茶粗提物对 *M. smegmais* mc<sup>2</sup>155 的抑菌作用。一线抗结核药乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)为抑菌实验的阳性

表 1 绿茶粗提物的 HPLC 梯度洗脱程序

Table 1 The elution gradient of the HPLC for green tea extraction

| 时间/Time (min) | A (%) | B (%) |
|---------------|-------|-------|
| 0             | 95    | 5     |
| 20            | 70    | 30    |
| 40            | 30    | 70    |
| 50            | 0     | 100   |
| 55            | 0     | 100   |
| 56            | 95    | 5     |
| 70            | 95    | 5     |

对照,生理盐水和 100 μg/mL 氨苄青霉素为阴性对照,以 EGCG 标准品为抑菌效果评估对照。将绿茶粗提物用生理盐水配置成 200 mg/mL 储存液,经 0.22 μm 滤器过滤除菌后保存备用。分别用生理盐水将滤菌后的绿茶粗提物稀释成浓度为 5、6、7、8、15、20、25、30、50、100 mg/mL 系列工作液,于 EP 管中保存。将 1 mL 生理盐水和 1 mL 48 μg/mL EMB 过滤除菌后放入 EP 管中保存,分别记为 a、b 和 c,并将每个 EP 管中放入灭菌后的滤纸片,4 °C 保存。将 *M. smegmais* mc<sup>2</sup>155 菌液用 LB 液体培养基按 1:200 稀释,取 20 μL 滴于平板上,用涂布棒涂抹均匀。将第一个平板上放入 5 mg/mL 和 6 mg/mL 的绿茶粗提物浸泡过的滤纸片分别记为 1、2,并放入一个生理盐水、48 μg/mL EMB 浸泡的滤纸片,分别记为 a、b。将第二个平板上放入 7 mg/mL 和 8 mg/mL 的绿茶粗提物分别记为 3、4,并放入一个生理盐水、48 μg/mL EMB 浸泡的滤纸片,分别记为 a、b,以此类推,直到放完最后一个滤纸片;将最后一个平板上分别放入 100 μg/mL 氨苄青霉素和 500 μg/mL EGCG 浸泡的滤纸片分别标记为 c 和 d。以上平板经室温放置 15 min 后再倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 48 h,测量抑菌圈直径,上述实验重复 3 次。

#### 1.3.4 绿茶粗提物最低抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentrations, MIC)的测定

在 3 mL 的 LB 液体培养基中(含 0.05% Tween 80)加入不同终浓度的绿茶粗提物,分别为 200、250、300、350、400、450 μg/mL 和 500 μg/mL,9 号管中加入 400 μg/mL 的绿茶粗提物。并在 1~8 号试管中,以 1:100 接种 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 菌液,利用酶标仪在 589 nm 下测量各管初始吸光度值,培养 12 h 后,再测量 A<sub>589</sub> 以判断绿茶粗提物的 MIC 值。本实验以 EGCG 标准品为实验对照处理 mc<sup>2</sup>155 菌

液,使其终浓度达到 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,与上述同样处理后测定  $A_{580}$  以判断 EGCG 的抑菌作用。

1.3.5 透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)观察菌体的细胞壁结构

将野生型  $mc^2155$  菌体接种于含 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG 的 20 mL LB 液体培养基中培养 48 h 后,4000 g 离心 10 min,弃上清收集菌体,用 0.01 M 的 PBS 重悬洗涤细胞,离心,重复操作两次。将 1 mL 2.5% 的戊二醛加入细胞沉淀中,4  $^{\circ}\text{C}$  放置过夜,1% 四氧化锇固定、PBS 漂洗、不同浓度乙醇脱水、2% 醋酸双氧铀染色 30 min,双蒸水洗脱至少 50 次,柠檬酸铅处理 20 min,环氧树脂包埋、超薄切片后透射电镜下

观察细胞的超微结构变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 成功获得富含 EGCG 的绿茶粗提物

HPLC 结果显示,EGCG 标准品保留时间为 12.264 min(图 1A),绿茶粗提物出现三个峰,其中第二个峰的保留时间为 12.123 min(图 1B)可以确定绿茶粗提物中该峰为 EGCG,其样品中 EGCG 浓度为 0.09 mg/mL,含量占绿茶粗提物的 9%。该结果确认利用该萃取方法能够有效制备富含 EGCG 的绿茶粗提物。

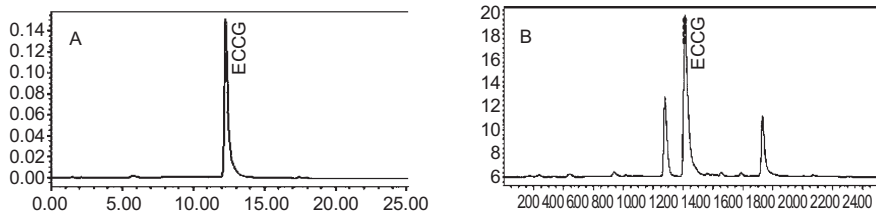


图 1 绿茶粗提物的 HPLC 分析(A、EGCG 标准品;B、绿茶粗提物)

Fig. 1 HPLC analysis on green tea extract (A. EGCG;B. green tea extract)

### 2.2 纸片琼脂扩散法对绿茶粗提物的抑菌作用测定

利用纸片琼脂扩散法检测绿茶粗提物对 *M. smegmatis*  $mc^2155$  的抑菌作用,实验结果如图 2 所示。生理盐水对照组(a)与氨基青霉素对照(c)无抑菌圈产生,抗结核药物 EMB(b)与 EGCG 标准品对照(d)均出现抑菌圈现象;观察并测量不同浓度

绿茶粗提物所产生的抑菌圈直径,发现随着绿茶粗提物浓度增大,抑菌圈直径逐渐增大(图 2-B)。在纸片琼脂扩散法实验中,生理盐水作为溶解绿茶粗提物的溶剂,无抑菌现象;而绿茶粗提物以及其标准品 EGCG 均对 *M. smegmatis*  $mc^2155$  具有明显抑菌作用。所以,该抑菌作用很可能是绿茶粗提物主要成

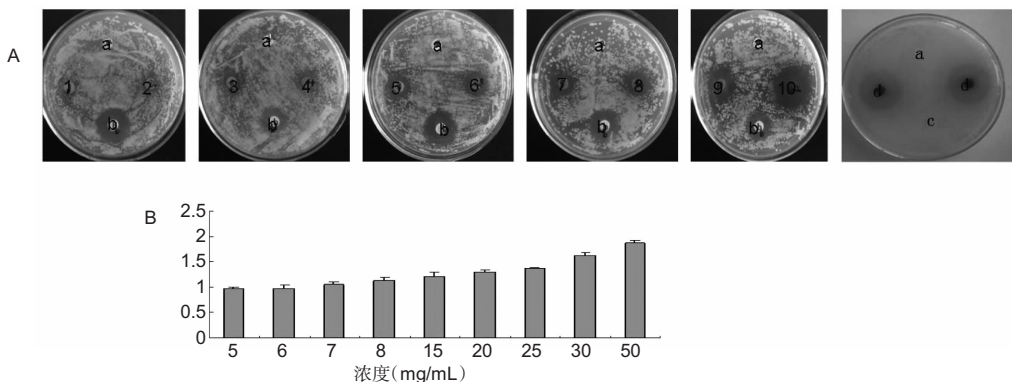


图 2 不同浓度绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌的抑菌作用

Fig. 2 Measurement of inhibitory effect of green tea extract by disk agar diffusion method

A、不同化合物(a. 生理盐水;b. 48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  乙胺丁醇;c. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨基青霉素;d. 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG;1-10. 不同浓度的绿茶粗提物)浸泡的滤纸片与含 *M. smegmatis*  $mc^2155$  的琼脂平板共同孵育后的抑菌作用效果;B、不同浓度绿茶粗提物的抑菌圈直径比较。A. Effect of different compounds applied to a disk on an agar plate with *M. smegmatis*  $mc^2155$ ; a. physiological saline; b. 48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EMB; c. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin; d. 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG; d. green tea extract. B. Diameters of inhibitory zone from different concentration of green tea extract.

分 EGCG 所致。另外, EMB(乙胺丁醇)在本实验中作为阳性对照亦产生明显抑菌现象, 而氨基青霉素(广谱抗菌药)则无抑菌现象发生, 也进一步证明只有特定抗结核药物才能对 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 产生抑菌作用。

### 2.3 绿茶粗提物对 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 的最小抑菌浓度

用不同浓度绿茶粗提物作用 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 菌液, 12 h 后检测 MIC。由于不同浓度绿茶粗提物自身颜色变化对 A<sub>589</sub> 有一定干扰, 本实验采用自身对照法检测其抑菌效果。实验结果如图 3 所示, 随着绿茶粗提物浓度继续增大, 吸光度逐渐降低。当粗提物浓度大于 400 μg/mL 时, 菌体生长被抑制, MIC = 400 μg/mL。

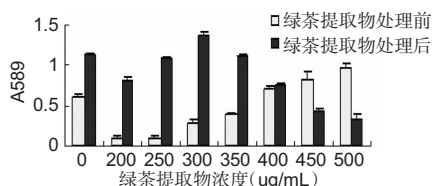


图3 绿茶粗提物对耻垢分枝杆菌的最小抑菌浓度

Fig. 3 MIC of green tea extract on *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

### 2.4 EGCG 处理后 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 细胞形态学

EGCG 处理 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 菌液 24 h 后, 收集细菌。TEM 观察结果表明: 野生型 mc<sup>2</sup>155 细胞壁完整, 厚薄均匀, 细胞质均匀、致密; EGCG 处理的 mc<sup>2</sup>155 细胞壁呈现膨出、变形等形态学变化, 细胞质出现疏密不均现象(图 4)。

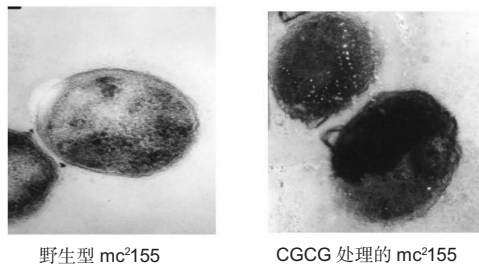


图4 透射电镜观察 EGCG 处理后耻垢分枝杆菌细胞壁形态变化

Fig. 4 Morphological changes of mc<sup>2</sup>155 cell under TEM after EGCG treatment

## 3 讨论

近年来研究表明, 来源于绿茶的天然活性抗氧化剂表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对多种细

菌具有明显抑制作用, 推测其抑菌机理可能有以下几方面: 1) 绿茶提取物中主要成分 EGCG 破坏了细胞膜脂质双分子层导致细菌生长抑制<sup>[10]</sup>; 2) EGCG 抑制二氢叶酸还原酶, 脂肪酸合成酶等 NADPH 依赖的还原酶活性<sup>[11]</sup>; 3) 绿茶粗提物中水溶性物质影响细菌自溶素的释放, 从而引起菌体细胞壁增厚和细菌聚集增强等效应。同时发现, 绿茶粗提物中 ECG 成分在亚抑制浓度时能刺激细胞壁脂磷壁酸的释放, 从而增加对内环酰胺类抗生素的敏感性<sup>[12]</sup>, 但 EGCG 或其他绿茶粗提物中主要成分对耻垢分枝杆菌的抑菌作用未见报道。

耻垢分枝杆菌与结核分枝杆菌具有相似的细胞壁结构, 从内至外分别由肽聚糖、聚阿拉伯半乳糖和分枝菌酸构成。其中肽聚糖(peptidoglycan)是一种由聚糖与短肽相连组成的多糖复合物, 广泛存在于包括分枝杆菌在内的大多数细菌中, 是构成细菌细胞壁的基本骨架成分。据文献报道: 细菌形态的维持与肽聚糖结构的完整性密切相关<sup>[13]</sup>。结核分枝杆菌细胞壁的完整性是其赖以生存的主要屏障, 肽聚糖与细菌形态的维持以及细菌自溶等代谢活动密切相关。本研究结果显示, EGCG 处理后的耻垢分枝杆菌细胞壁结构和菌体形态发生明显改变, 因此我们推测 EGCG 与耻垢分枝杆菌细胞质膜蛋白特异性结合后影响了细胞壁肽聚糖的代谢, 从而产生抑菌作用。

肽聚糖代谢包括肽聚糖水解和肽聚糖合成代谢。其中肽聚糖水解酶(peptidoglycan hydrolases, PGHs)是目前新药研发的主要靶点之一, 微生物在处于不适于合成代谢以维持其生长条件下, 激活自溶素, 启动自溶程序而使细胞壁肽聚糖广泛水解, 即而发生自溶。很多自溶素能与青霉素等具有 β-内酰胺环的抗生素相结合, 故又被称为青霉素结合蛋白(Penicillin binding proteins, PBPs)。在结核分枝杆菌中已发现或被预测的 PBPs 达 9 种蛋白之多, 它们均属于质膜蛋白, EGCG 的抑菌机制很可能与这类青霉素结合蛋白密切相关, 但仍需而进一步实验证实该推论。

本研究确认了绿茶粗提物能明显抑制耻垢分枝杆菌的生长, 以及 EGCG 处理后的菌体细胞壁出现扭曲变形等现象, 该结果为进一步探讨绿茶粗提物的抑菌机制和开发绿茶药用功能提供了实验依据。

### 参考文献

1 Lee RE, Brennan PJ, Besra GS, et al. *Mycobacterium tubercu-*

- losis cell envelope. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 215: 1-27.
- 2 Huang KC, Mukhopadhyay R, Wen B, *et al.* Cell shape and cell-wall organization in Gram-Negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 19282-19287.
  - 3 Hertog M, Feskens E, Hollman P, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 1993, 342: 1007-1011.
  - 4 Keli S, Hertog M, Feskens E, *et al.* Flavonoids, antioxidant vitamins and risk of stroke. *Arch Int Med*, 1995, 154: 637-642.
  - 5 Bell SJ, Goodrick GK. A functional food product for the management of weight. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2002, 42: 163-178.
  - 6 Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, *et al.* Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 1737-1742.
  - 7 Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T, *et al.* Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem*, 1989, 53: 2307-2311.
  - 8 Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res*, 1998, 21: 348-352.
  - 9 Zhu JC (朱俊晨), Xu K (许葵). A studies on extracting conditions of tea natural antioxidants. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2001, 22(2): 22-23.
  - 10 Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T, *et al.* Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1147: 132-136.
  - 11 Navarro-Martínez MD, Navarro-Perán E, Cabezas-Herrera J, *et al.* Antifolate activity of epigallocatechin against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 2914-2920.
  - 12 Stapleton PD, Shah S, Hamilton-Miller JMT, *et al.* Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acylcatechins. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24: 374-380.
  - 13 Horii T, Ichiyama S, Ohta M, *et al.* Relationship between morphological changes and endotoxin release induced by carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 1999, 48: 309-315.

(上接第 123 页)

- 49 Zhao FL (赵丰丽), *et al.* Study on antiallergic activity of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels leaves extracts with different solvent. *Sci Technol Food Indus* (食品工业科技), 2009, (1): 110-112.
- 50 Adebajo AC, *et al.* Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: Anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective and antioxidant effects. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122: 10-19.
- 51 Liu XM (刘序铭), *et al.* Antifungal activity of the methanol extract of *Clausena lansium*. *Plant Prot* (植物保护), 2008, (2): 64-66.
- 52 Liu XM (刘序铭), Wan SQ (万树青). The content of (*E*)-*N*-2-phenylethylcinnamide in different organ of *Clausena lansium* and the activity to colletotrchum musae. *Agrochemicals* (农药), 2008, (1): 15-16.
- 53 Liu YX (刘艳霞), *et al.* Inhibitory effects of clausenamamide alkaloid on seven fruit pathogenic fungi. *Plant Prot* (植物保护), 2009, 35(5): 53-56.
- 54 Chakraborty A, *et al.* Carbazole alkaloid with antimicrobial activity from *Clausena heptaphylla*. *Phytochemistry*, 1995, 38: 787-789.
- 55 Chakraborty A, *et al.* Clausenol and Clausenine-Two Carbazole Alkaloids from *Clausena anisata*. *Phytochemistry*, 1995, 40: 295-298.
- 56 Tada Y, *et al.* Coumarins and  $\gamma$ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*; antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochem*, 2002, 59: 649-654.
- 57 Wan SQ (万树青), *et al.* Study on the allelopathy of photoactivity of 3 plant extracts against 5 tested plants. *Weed Sci* (杂草科学), 2004, (1): 5-9.
- 58 Lu HB (卢海博), *et al.* Study on herbicidal activity of methanol extract from *Clausena lansium*. *Weed Sci* (杂草科学), 2005, (2): 11-13.
- 59 Lu HB (卢海博), Wan SQ (万树青). Study on allelopathy activity of the methanol extract from *Clausena lansium*. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2005, (4): 67-69.
- 60 Wan SQ (万树青), Zheng DR (郑大睿). Study on the photoactivated toxicity of several plant extracts to *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach). *Plant Prot* (植物保护), 2005, 31 (6): 55-57.
- 61 Ma FN (马伏宁), *et al.* Active ingredients of seed extracts of *Clausena lansium* and nematocidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 2009, (1): 23-26.



# 罗氏乳杆菌无细胞上清培养液移除胆固醇能力的研究

于瑞莉<sup>1</sup>, 郭本恒<sup>1,2\*</sup>, 张 灏<sup>1</sup>, 吴正钧<sup>2</sup>, 王荫榆<sup>2</sup>

<sup>1</sup>江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122;

<sup>2</sup>光明乳业股份有限公司技术中心乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436

**摘要:** 本文探讨了罗氏乳杆菌 DSM122460 无细胞上清培养液 (Cell-Free Supernatant, CFS) 移除胆固醇的能力。采用邻苯二甲醛法测定 DSM122460 和对照菌株 ST-III 发酵过程中及其 CFS 对胆固醇的移除能力, 并研究不同 CFS 浓度下的移除能力。并采用 HPLC 法测定 CFS 对照、热处理组和 pH7.0 组的胆盐水解酶活力, 同时测定其移除胆固醇能力。结果显示, DSM122460 不仅在发酵过程中具有较高的移除胆固醇能力, 其 CFS 也表现出较高的移除能力, CFS 中含有除胆盐水解酶以外的可移除胆固醇的蛋白类成分。这提示可能存在一种乳酸菌移除胆固醇的新机制。

**关键词:** 罗氏乳杆菌; CFS; 移除胆固醇; BSH; HPLC

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

## Cholesterol-Reducing Activity in a Cell-Free Supernatant of *Lactobacillus reuteri*

YU Rui-li<sup>1</sup>, GUO Ben-heng<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, WU Zheng-jun<sup>2</sup>, WANG Yin-yu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China

**Abstract:** The cholesterol removal ability of cell-free supernatant (CFS) produced by growth of *Lactobacillus reuteri* DSM122460 in MRS broth was investigated. The cholesterol removal ability of *L. reuteri* train DSM122460 as well as *L. plantarum* strain ST-III during growth in MRS and the resulted CFS was assayed by o-phthalaldehyde method, respectively. In order to elucidate the correlation between BSH activity and the cholesterol removal ability of the *Lactobacillus* strains, BSH roles in cholesterol removal were measured by heat treatment and pH adjustment. The remaining BSH activities after various treatments were measured by HPLC. The results showed that *L. reuteri* strain DSM122460 not only had a high ability to remove cholesterol during its growth in MRS broth, it also demonstrated high cholesterol reduction activity in the CFS. Beside the BSH, it was speculated there may be another effective component in the CFS with the ability to remove cholesterol. It suggested that there might be a new mechanism underlying cholesterol reduction by lactic acid bacteria.

**Key words:** *Lactobacillus reuteri*; CFS; cholesterol reduction; BSH; HPLC

人体血清中胆固醇含量过高容易引发高血压, 冠心病等心脑血管疾病。国内外的研究表明, 乳酸菌具有较强的移除胆固醇作用。虽然有大量研究发现乳酸菌在体内外具有移除胆固醇的益生功能, 但作用机理尚未定论, 只是提出几种假说: (1) 以 Gilliland<sup>[1]</sup>为代表的同化理论者认为乳酸菌细胞直接吸收胆固醇的同化作用; (2) Klaver 和 Vander Meer 认为乳酸菌产生胆盐水解酶 (Bile salt hydrolyase,

BSH) 将结合胆盐分解为游离胆盐, 在酸性 (pH < 6.0) 条件下游离胆盐溶解度降低而与胆固醇发生共同沉淀作用<sup>[2]</sup>; (3) 其他机理。

Taranto<sup>[3]</sup> 认为罗氏乳杆菌具有较强的移除胆固醇能力, 并进行了深入研究。Younghoon Kim<sup>[4]</sup> 发现嗜酸乳杆菌的 CFS 有较好的移除胆固醇能力。本文从 CFS 的角度研究了罗氏乳杆菌移除胆固醇能力, 发现它在无菌体参与和 BSH 失活的条件下仍有移除胆固醇的能力, 这表明罗氏乳杆菌 CFS 中可能含有移除胆固醇的新有效成分。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期: 2010-09-28 接受日期: 2011-02-28

基金项目: 上海市科技委员会乳业生物工程技术创新研究中心 (09DZ2251400); 上海市科技委员会乳业生物技术国家重点实验室筹建 (10dz2221100)

\* 通讯作者 E-mail: guobheng@brightdairy.com

### 1.1.1 菌株来源、化学试剂与培养基

菌株来源:罗氏乳杆菌 DSM122460(台湾大学赠送)和植物乳杆菌 ST-III(光明乳业技术中心保藏)。菌株使用前按 1% 的接种量接种到 MRS 肉汤,在 37 °C 培养 12 h,传代两次进行活化,实验菌株在实验过程中 4 °C 冰箱保存。

邻苯二甲醛、牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司,胆固醇、卵磷脂等其他试剂为国产常规生化纯和分析纯试剂。

MRS 培养基:购自德国 Merck 公司。

MRS-THIO 液体培养基:在 MRS 液体培养基中加入 0.2% 巯基乙酸钠(THIO)。

胆固醇培养基:MRS-THIO 培养基加入一定浓度的胆固醇源。

### 1.1.2 仪器设备

Avanti J30I 高速冷冻离心机:Beckman Coulter 公司;EmusiFlxe-C3 高压细胞破碎仪:加拿大 AVES-TIN(奥威斯汀)公司;PHS-25 型 PH 计:奥立龙公司;CE7250 型紫外分光光度计:BIO-AQUARIUS 公司;Waters 600 高相液相色谱:美国 Waters 公司;JY92-III 超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司;Heidolph2 旋转蒸发器:德国 Heidolph 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 卵磷脂-胆固醇胶束的制备

根据 Razin<sup>[5]</sup> 等提供的方法制备胆固醇胶束,胆固醇胶束作为胆固醇培养基中的胆固醇源。具体的方法如下:准确称取 22 mg 卵磷脂和 10 mg 胆固醇(卵磷脂和胆固醇摩尔比为 1.0:0.9)于具塞试管,加入 CHCl<sub>3</sub> 溶剂 2 mL,超声波振荡溶解。N<sub>2</sub> 流吹干溶剂,加入 10 mL 无菌水。试管放入冰浴,通 N<sub>2</sub> 条件下超声波(130 W,20 kHz)处理 15 min,停止 5 min 保持温度平衡,循环三次;所得的溶液于 4 °C,38,000 × g 离心 20 min,所得的上清液即为卵磷脂-胆固醇胶束溶液。经 0.45 μm 膜过滤作为胆固醇源待用,4 °C 保存,2~3 d 内使用,作为胆固醇源用于以下的实验。

### 1.2.2 胆固醇的测定

按照改良邻苯二甲醛法<sup>[6]</sup>测定胆固醇浓度:准确吸取 0.5 mL 待测胆固醇溶液于具塞试管,加入 1.5 mL 95% 的乙醇溶液剧烈混匀,加入 1 mL 50% 的 KOH 溶液剧烈混匀,60 °C 水浴皂化 10 min,不时振荡试管。冷却至室温,加入 2.5 mL 正己烷剧烈混

匀,加入 1.5 mL 无菌水剧烈混匀,静置 10 min 分层。准确吸取正己烷层 1 mL 于另一洁净试管,60 °C N<sub>2</sub> 流吹干溶剂,加入 2 mL 0.01 mg/mL 邻苯二甲醛(冰醋酸)溶液剧烈混匀,室温放置 10 min,边振荡边加入 2 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 充分混匀。冷却至室温,550 nm 处测定吸光度。根据胆固醇标准曲线<sup>[7]</sup> 计算出胆固醇的含量。

### 1.2.3 菌体发酵过程中对胆固醇的移除作用

将种子液 1% 接种于含 0.2% 牛磺胆酸钠的胆固醇培养基中,放置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,发酵液经 12000 g,4 °C,离心 10 min 得到上清液。未接种的含 0.2% 牛磺胆酸钠的胆固醇培养基做阳性对照,含 0.2% 牛磺胆酸钠的 MRS-THIO 培养基作为空白对照。按照方法 1.2.2 测定未接种培养基和上清液的胆固醇浓度,根据胆固醇标准曲线计算出胆固醇含量,胆固醇移除率的计算公式为:

$$\text{胆固醇移除率}(\%) = \frac{\text{未接种培养基中胆固醇浓度} - \text{上清液中胆固醇浓度}}{\text{未接种培养基中胆固醇浓度}} \times 100\%$$

### 1.2.4 CFS 移除胆固醇能力<sup>[4]</sup>

菌株 DSM122460 在 MRS 培养基中 37 °C 培养 24 h 后,12000 g,4 °C 离心 10 min,收集上清液,0.45 μm 膜过滤后即得到 CFS, - 80 °C 保存待用。发酵液离心后的菌体沉淀用 pH7.0 磷酸盐缓冲液洗涤两次,用发酵液 1/10 体积的磷酸盐缓冲液将菌体沉淀制成悬浮液,经超高压细胞破碎仪破碎细胞,离心后收集细胞裂解物,0.45 μm 膜过滤后, - 80 °C 保存备用。将胆固醇胶束、THIO 和牛磺胆酸钠加入到 CFS 或细胞裂解物中,使其终浓度分别为 100 μg/mL、0.2% (w/v) 和 0.2% (w/v)。然后置于 37 °C 恒温培养箱,保温 18 h,反应前对照组置于 - 80 °C 冰箱暂存,邻苯二甲醛法测反应前后胆固醇浓度。CFS 移除胆固醇能力通过反应前后胆固醇的移除率体现。

为了研究 CFS 不同浓度的移除胆固醇能力,用新鲜 MRS 培养基将 CFS 稀释为原有浓度的 75%,50%,25%。

### 1.2.5 BSH 对胆固醇移除作用的影响

BSH 的活力通过 HPLC 法测定反应液中牛磺胆酸钠(Sodium taurocholate,TC)的减少量。

将充分恢复活力的供试菌株,按 1% 接种量接种于 MRS 培养基中,37 °C 恒温培养箱培养 24 h,

10000 g, 4 °C 离心 10 min, 上清液经过无菌过滤后, CFS 分成 A、B、C 三份, 测其 pH 值。其中, A 先经过 90 °C, 15 min 热处理, 然后 A、B、C 上清培养液按照上清培养液: 甲醇 = 2: 1 的比例缓慢加入预冷的甲醇, 4 °C 放置 1 h, 10000 g, 4 °C 离心 10 min。A、B 用 2 mL NaAc-EDTA 缓冲液 (1 mM EDTA, 50 mM 醋酸钠) 溶解沉淀, 缓冲液 pH 值和上清液 pH 相同, C 用 2 mL pH 为 7.0 的缓冲液溶解, 考马斯亮蓝法测其蛋白浓度。

**酶反应:** 将 A、B、C 配成蛋白浓度相同的粗酶液, 取粗酶液 500  $\mu$ L 加入到含有 0.04 mol/L 牛磺胆酸钠的螺口管中, 37 °C 水浴 30 min, 反应结束后加入 500  $\mu$ L 流动相终止反应, 缓冲液做空白对照。

**HPLC 色谱条件:** Waters Delta 600 HPLC 系统, 高压二元泵、PDA 检测器、在线脱气机; Nova-PakC18 (4  $\mu$ m, 3.9 mm  $\times$  150 mm), 检测波长 205 nm, 进样量为 15  $\mu$ L。峰面积计算用 Millennium Software V3.2, 牛磺胆酸的流速 1.0 mL/min, 所用有机溶剂均为色谱纯。

**流动相 A:** 1000 mL 甲醇和 1.2 mL 冰乙酸混合用 5 mol/L 的 NaOH 调其 pH 值为 5.6, **流动相 B:** 1000 mL 去离子水和 1.2 mL 冰乙酸混合用 5 mol/L 的 NaOH 调其 pH 值为 5.6, 通过 0.45  $\mu$ m 聚丙烯过滤器抽滤。

#### 1.2.6 CFS 中有效成分的初步鉴定

为了探究 CFS 中发挥移除胆固醇作用的物质, 通过乙醇抽提多糖, 乙酸乙酯萃取脂类和硫酸铵沉淀蛋白的办法进行初步鉴定。在此基础上, 用 12% 三氯乙酸和 0.5% 十二烷基硫酸钠 (dodecyl sulfate, sodium salt, SDS) 处理 CFS 进一步研究有效成分的性质。

**乙醇抽提多糖方法如下:** 向 CFS 中加入 95% 乙醇, 使其终体积为 75%, 4 °C 静置过夜, 9000 rpm 离心 10 min, 弃去上清, 蒸馏水溶解沉淀, 置于 -20 °C 保存待用。

**乙酸乙酯抽提步骤:** 按照 CFS 与乙酸乙酯为 3: 1 的关系向 CFS 中加入乙酸乙酯, 倒入分液漏斗中, 充分混匀, 静置待分层, 萃取三次。收集上层液体, 旋转蒸发掉乙酸乙酯后, 蒸馏水溶解剩余物质, 置于 -20 °C 保存待用。

向 CFS 中加入硫酸铵使其饱和度为 60%, 4 °C 静置过夜后, 12000 g 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水溶解后 4 °C 透析两天。

CFS 中加入三氯乙酸和 SDS 使其终含量为 12% 和 0.5%, 4 °C 静置 12 h, 离心, 弃去沉淀, 上清液 4 °C 透析两天。

#### 1.3 数据统计与分析

文中数据为三次平行测定值的平均值, 经 one-way ANOVA 分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, Origin 软件 (Origin 7.5, 美国 Origin Lab 公司) 进行数据绘图。

## 2 结果

### 2.1 菌体发酵过程、CFS 和细胞裂解物移除胆固醇能力的比较

罗氏乳杆菌和植物乳杆菌都是目前具有较高移除胆固醇能力的乳酸菌。其中 ST-III 的移除胆固醇的机理认为主要是同化作用和沉淀作用共同起作用, 同化作用占主要作用<sup>[8]</sup>。如图 1 所示, 同样在菌体发酵过程中具有较高降低胆固醇能力的乳酸菌, ST-III 只在发酵过程时表现出较高的胆固醇移除能力, 移除率为 67.6%, 其 CFS 移除胆固醇能力相对较弱, 只有 9.14%。而 DSM122460 除了在菌体发酵过程中具有很高的胆固醇移除能力, 在无细胞存在时的 CFS 中也有较高的胆固醇移除能力, 移除率为 68.57%。另外, 对 DSM122460 和 ST-III 进行细胞破碎后得到的细胞裂解物按照方法 1.2.4 测定移除胆固醇能力, 发现两者的细胞裂解物基本上不表现移除胆固醇的能力。

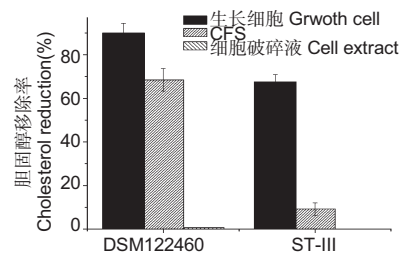


图 1 *L. reuteri* DSM122460 和 *L. plantarum* ST-III 的生长细胞、CFS 和细胞裂解物在含有 0.2% 的牛磺胆酸钠的胆固醇培养基中移除胆固醇能力比较

Fig. 1 Cholesterol removal by Growth (black bars), the Cell-Free Supernatant (CFS, grey bars) and cell extract (pattern bars) in an MRS-THIO Broth Supplemented with 0.2% Sodium Taurocholate, plus cholesterol Micells of *L. reuteri* DSM122460 and *L. plantarum* ST-III

用新鲜 MRS 液体培养基对 CFS 进行梯度稀释,

按照方法 2.1.4 保温。结果显示 CFS 的胆固醇移除能力随着浓度的减少而降低,如图 1 所示。

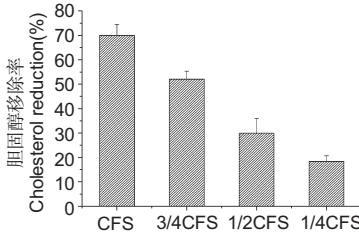


图 2 *L. reuteri* DSM122460 不同浓度 CFS 对移除胆固醇能力的影响

Fig. 2 The effects on Cholesterol Removal by CFS of *L. reuteri* DSM122460 at different concentrations

## 2.2 BSH 对移除胆固醇能力的影响

自从发现乳酸菌在肠道中可使结合胆盐分解为游离胆盐以来,BSH 被认为在乳酸菌移除胆固醇方面起着关键作用。BSH 将结合胆盐水解为游离胆盐后,游离胆盐需要在酸性条件下(pH < 6.0)才能

和胆固醇发生共沉淀作用,从而起到移除胆固醇的能力。M. P. Taranto<sup>[4]</sup>报道罗氏乳杆菌 BSH 为胞内酶,相对分子量为 80 KDa,最适 pH 为 5.2,最适温度为 42 ℃。本文为了研究 BSH 对罗氏乳杆菌的 CFS 移除胆固醇能力的影响,将 CFS 经过加热处理(90 ℃、15 min)和调节体系 pH 值(pH7.0),再观察其移除胆固醇能力的变化,从而推断 BSH 对 *Lb. reuteri* DSM122460 CFS 移除胆固醇能力的影响。

DSM122460 发酵后 CFS 的 pH 值为 4.4,CFS 经过甲醇沉淀提取粗酶液,粗酶液经缓冲液溶解与 TC 反应后用 HPLC 分析残余 TC 的含量,结果如表 1 所示,TC 标准品的出峰时间在 6.7 min 左右出峰,样品组中 6.7 min 左右出的峰是 TC 组分。

TC 浓度的计算公式:空白对照中 TC 标准品的浓度/样品中的 TC 浓度 = TC 标样的峰面积/样品中 TC 的峰面积。BSH 的酶活单位:1U =  $\frac{(\text{空白对照 TC} - \text{样品 TC}_{\text{nmol}})}{T(\text{min})}$

表 1 牛磺胆酸钠含量检测结果

Table 1 The result of the detected sodium taurocholate

|                       | 出峰时间<br>Peak time (min) | 峰面积<br>Area (%) | TC<br>(mmol/L) | BSH 活力<br>BSH activity (U) |
|-----------------------|-------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| TC 空白对照 TC control    | 6.63 ± 0.08             | 19.34 ± 0.19    | 40.00          | -                          |
| A: CFS 对照 CFS control | 6.55 ± 0.07             | 6.04 ± 0.36     | 12.49 ± 0.74   | 458.5 ± 12.3               |
| B: 热处理 Heat treatment | 6.27 ± 0.10             | 14.09 ± 0.89    | 29.14 ± 1.84   | 181.0 ± 28.7               |
| C: pH7.0              | 6.35 ± 0.14             | 13.32 ± 0.43    | 27.54 ± 0.98   | 207.6 ± 16.4               |

CFS 对照组和经过处理的 CFS 其 BSH 活力和移除胆固醇能力的比较如图 3 所示,CFS 对照组同

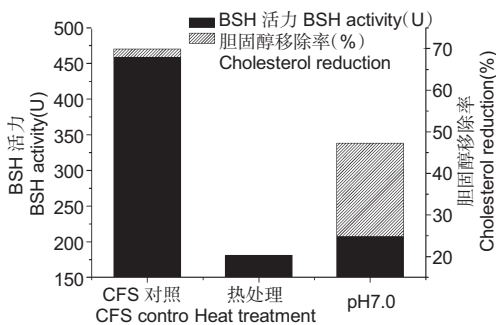


图 3 经过热处理、pH 处理和未处理 CFS 的 BSH 活力和移除胆固醇能力比较

Fig. 3 Effects of Heat, pH Treatment and CFS control on the Cholesterol Reduction (black bars) and BSH Activities (grey bars) of a Cell-Free Supernatant (CFS)

时具有较强移除胆固醇能力和强度相当的 BSH 活力。将 pH 调为 7.0 后,CFS 具有较低的 BSH 活力,此时虽然还有 BSH 活性,但是因为只有在酸性条件下,游离胆盐才能和胆固醇共同沉淀下来,理论上讲 pH7.0 时通过共沉淀作用移除胆固醇的能力应该比较低,但是图 3 中显示 pH7.0 时移除胆固醇的能力仍能保持在 CFS 对照组的 70% 左右;而经过热处理(90 ℃、15 min)的 CFS 尽管残留了较低 BSH 活力,但其胆固醇移除能力几乎丧失殆尽。

## 2.3 CFS 有效成分的初步鉴定

CFS 乙醇抽提物有 20% 的移除胆固醇能力,乙酸乙酯萃取物只有百分之几的移除能力,硫酸铵沉淀后有 45% 的移除能力。另外,CFS 经过 12% 三氯乙酸或 0.5% SDS 除去蛋白后,基本上没有移除胆固醇能力。

### 3 讨论

本实验从 CFS 的角度研究罗氏乳杆菌移除胆固醇的能力。实验结果发现罗氏乳杆菌 DSM122460 和植物乳杆菌 ST-III 在发酵过程都具有较好的移除胆固醇能力,但是就对 CFS 而言,罗氏乳杆菌 DSM122460 的移除胆固醇能力要明显强于 ST-III,可达到 68.57% 左右。进一步对 CFS 进行梯度稀释后,结果表明 CFS 的移除胆固醇能力随浓度的降低而降低,证明 CFS 中含有可移除胆固醇的有效成分。

但是罗氏乳杆菌中的 BSH 在体外移除胆固醇的过程中起着非常重要的作用,所以必须排除 CFS 中 BSH 的影响。经过热处理可使 BSH 失去活力,将 CFS 调 pH 为 7.0 时由其起作用的游离胆酸和胆固醇的沉淀作用不容易发生,也可以排除 BSH 的影响。结果显示经过热处理的 CFS 具有较低的 BSH 活性和移除胆固醇能力,pH 为 7.0 的 CFS 在具有较低 BSH 活性的情况下仍然具有较高的移除胆固醇能力,可以表明 CFS 中除了 BSH 以外还有可以移除胆固醇的有效成分。CFS 经过盐析后的蛋白沉淀有较高的移除胆固醇能力,但经过 SDS 和三氯乙酸除蛋白后,基本没有移除胆固醇的能力,既可证明 CFS 中此有效成分为蛋白质类。

后续工作将致力于研究此有效成分的分离,进一步纯化并提取出该物质,并分析其移除胆固醇的作用机理。

### 参考文献

- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49:377-381.
- Klaver FR, Vander Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59:1120-1124.
- Taranto MP, Sesma F, De Valdez GF. Bile salt hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol Lett*, 1997, 19:845-847.
- Kim Y, Whang JY, Whang KY, et al. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72:1483-1490.
- Razin S, Kutner S, Efrati H, et al. Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 598:628-640.
- Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res*, 1973, 14:364-366.
- Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci*, 1990, 3:905-911.
- Liu J(刘娟), Wang YY(王荫榆), Wu ZJ(吴正钧), et al. Study on mechanism of cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* ST-III Strain. *Ind Microbiol* (工业微生物), 2008, 38(5):71-91.
- Wang XG, Wang HR, Hu XJ. Extraction and analysis of *Actinidia chinensis* seed oil. *China Oils Fats*, 2004, 29(5):58-60.
- Zhang YS, Zhao YW. Comparison of four extraction methods on Chinese gooseberry seed oil yield. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2007, 22:76-78.
- Susana PA, Cabrita ARJ, Antonio JMF, et al. Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2008, 1209:212-219.
- Mulder C, Schouten JA, Poppensnijders C. Determination of free fatty acids: A comparative study of the enzymatic versus the gas chromatographic and the colorimetric method. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1983, 21:823-827.
- Juarez M, Polvillo O, Conto M, et al. Comparison of four extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. *J Chromatogr A*, 2008, 1190:327-332.

(上接第 75 页)

# 外源咖啡酸和阿魏酸对黑莓汁中花色苷的辅色研究

彭常安<sup>1</sup>, 卢锋波<sup>2</sup>, 袁 晔<sup>2</sup>, 唐小媛<sup>2</sup>, 韩永斌<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>芜湖职业技术学院生物工程系, 芜湖 241006;

<sup>2</sup>南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放试验室, 南京 210095

**摘要:** 为增强黑莓汁中花色苷的稳定, 添加适量咖啡酸和阿魏酸到黑莓清汁中, 采用可见吸收光谱和高效液相色谱-质谱研究其对黑莓花色苷的辅色作用。研究表明: 黑莓汁中添加咖啡酸和阿魏酸显著增加了花色苷的最大吸收值( $A_{\lambda_{\max}}$ ), 最大吸收波长( $\lambda_{\max}$ )红移, 说明咖啡酸和阿魏酸对黑莓汁中花色苷产生了辅色作用, 辅色效应随时间的延长和咖啡酸、阿魏酸浓度的增加显著增强。HPLC-DAD-MS 分析发现, 咖啡酸辅色产生了两种新的花色苷衍生物(矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚和矢车菊-3-*O*-草酸酐酰葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚), 阿魏酸辅色产生了三种新的花色苷衍生物(矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚、矢车菊-3-*O*-草酸酐酰葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚和矢车菊-3-*O*-阿拉伯糖苷-4-乙炔基愈创木酚), 这些衍生物均为羟苯基-吡喃花色苷。

**关键词:** 黑莓汁; 花色苷; 咖啡酸; 阿魏酸; 辅色

中图分类号: R284. 2

文献标识码: A

## Copigmentation Effects of Exogenous Caffeic Acid and Ferulic Acid on Anthocyanins in Blackberry Juice

PENG Chang-an<sup>1</sup>, LU Feng-bo<sup>2</sup>, YUAN Ye<sup>2</sup>, TANG Xiao-yuan<sup>2</sup>, HAN Yong-bin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Department Wuhu Vocational & Technical College, Wuhu 241006, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** To enhance the stability of anthocyanins in blackberry juice, the co-pigmentation effects of exogenous caffeic acid and ferulic acid on anthocyanins in blackberry juice were investigated using visible absorption spectra and HPLC-DAD-MS. The results showed that both caffeic acid and ferulic acid could significantly increase the absorption intensity ( $A_{\lambda_{\max}}$ ) and its wavelength ( $\lambda_{\max}$ ) of anthocyanins in blackberry juice. These phenomena suggested occurrence of copigmentation effects of caffeic acid and ferulic acid on anthocyanins in blackberry juice. The co-pigmentation intensity depended on duration and concentrations of caffeic acid and ferulic acid. Two new anthocyanin derivatives (cyanidin-3-glucoside-4-vinylcatechol and cyanidin-3-dioxalylglucoside-4-vinylcatechol) and three new anthocyanin derivatives (cyanidin-3-glucoside-4-vinylguaiacol, cyanidin-3-dioxalylglucoside-4-vinylguaiacol and cyanidin-3-glucoside-arabinoside-4-vinylguaiacol) were observed in blackberry juice with HPLC-DAD-MS analysis by adding caffeic acid and ferulic acid, respectively.

**Key words:** blackberry juice; anthocyanin; caffeic acid; ferulic acid; co-pigmentation

辅色作用作为改善富含花色苷食品颜色稳定性的有效手段<sup>[1,2]</sup>, 近年来已成为研究热点。阿魏酸、香豆酸、芥子酸等酚酸类成分是重要的辅色素, 在富含花色苷的植物中, 通过酯键与花色苷酰基化后存在于液泡中<sup>[3-5]</sup>。在红葡萄酒陈酿过程中这些酚酸

成分与花色苷反应形成乙炔基吡喃花色苷, 而非酰化花色苷, 有效防止了水分子对花色苷母核的亲核攻击, 从而提高花色苷的稳定性<sup>[6]</sup>; Gris 等<sup>[7]</sup>的研究表明赤霞珠葡萄提取物中花色苷的稳定性受温度、光线和 pH 值等的影响, 但咖啡酸辅色可使其稳定性增加。

黑莓 (*Rubus* spp.) 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus* L.) 植物, 花色苷含量较高, 主要有矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷、矢车菊-3-*O*-阿拉伯糖苷、矢车菊-

收稿日期: 2011-01-19 接受日期: 2011-06-24

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK 2009649); 国家科技服务企业项目 (2009GJC10019); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

\* 通讯作者 Tel: 86-25-84396293; E-mail: hanyongbin@njau.edu.cn

3-*O*-丙二酸酐葡萄糖苷和矢车菊-3-*O*-草酸酐葡萄糖苷等,其中矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷含量高达70%以上<sup>[8,9]</sup>。虽然黑莓中酚酸类含量较丰富<sup>[10,11]</sup>,但黑莓及其加工品的色泽却很不稳定,在加工和贮藏过程中极易变色。本文首次研究了添加咖啡酸和阿魏酸对黑莓汁中花色苷的辅色作用,并采用 HPLC-DAD-MS 鉴定了辅色所产生的花色苷衍生物。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

黑莓 (*Rubus* spp.) 冻果:江苏新得利食品有限公司;咖啡酸和阿魏酸(色谱纯):Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2803 紫外可见分光光度计(美国尤尼克公司);pH 计(Thermo Orion 868, Orion, USA);Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent, USA)。

### 1.2 黑莓清汁的制备

黑莓冻果经 4 °C 隔夜解冻,榨汁机中打浆,2810 × g 离心 15 min,上清液再经 14800 × g 离心 15 min 得到澄清黑莓汁,于 -16 °C 冻藏备用。

### 1.3 咖啡酸和阿魏酸的辅色

用无水乙醇配制浓度为 10 mg/mL 的咖啡酸和阿魏酸溶液,分别吸取 100 μL 和 200 μL 上述辅色剂溶液、2 mL 黑莓汁,用 pH 3.2 的柠檬酸-磷酸氢二钠溶液定容至 10 mL,得到最大吸收值 ( $A_{\lambda_{\max}}$ ) 为 0.9、酒精度在 1 ~ 2°、咖啡酸和阿魏酸浓度为 100 或 200 mg/L 的黑莓汁。将该溶液于 85 °C 灭菌 15 min 后,迅速冰水冷却,于 4 °C 避光放置 30 天,16 °C 放置 30 天后 4 °C 放置。

### 1.4 花色苷及其衍生物 HPLC-DAD-MS 分析

采用 Agilent SB-C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm) 柱进行 HPLC 分析,温度 35 °C,流速为 0.6 mL/min,200 ~ 600 nm 全扫描。洗脱液为乙腈(B)和 0.5% 甲酸(A) (v:v),洗脱梯度为 0 ~ 10 min,10% ~ 25% B; 10 ~ 25 min,25% ~ 30% B。电喷雾质谱毛细管温度 195 °C 电压 4 kV,分别以正负离子两种模式,雾化压力为 2.33 × 10<sup>5</sup> Pa,氮气流速分别为 6 和 1.2 mL/min。

### 1.5 统计与分析

采实验设 3 次重复,结果取平均值,用 SAS 9.1.3 软件进行多重比较分析(显著性水平为 0.05)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 咖啡酸与花色苷的辅色

#### 2.1.1 可见吸收光谱的变化

辅色剂对花色苷的辅色效应通常表现为对花色苷的可见吸收光谱图的影响,即最大吸收波长的移动 ( $\Delta\lambda_{\max}$ ) 和颜色增强效应 - 最大吸收值的增加 ( $\Delta A_{\lambda_{\max}}$ )<sup>[12]</sup>。由图 1 可知,在黑莓汁体系下,咖啡酸的添加对花色苷的可见吸收光谱产生了显著影响。与对照组相比,60 d 时,添加咖啡酸 100 mg/L、200 mg/L 的花色苷溶液  $\lambda_{\max}$  分别右移了 3 nm 和 5 nm,  $A_{\lambda_{\max}}$  分别增加了 10.81% 和 58.38%; 这表明咖啡酸与花色苷发生了分子间辅色作用,辅色效应随咖啡酸浓度的增加显著增强 ( $P < 0.05$ ); 100 d 后,咖啡酸处理组的  $A_{\lambda_{\max}}$  分别增加了 33.34% 和

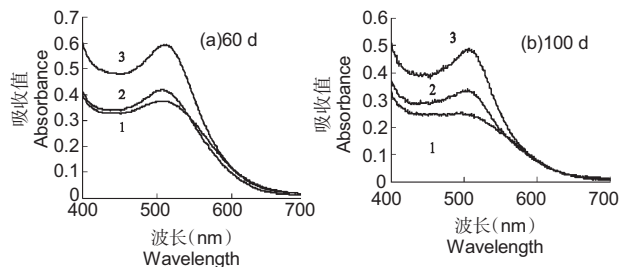
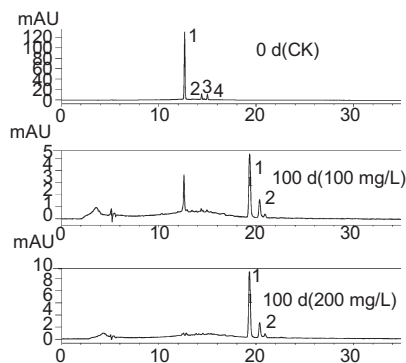


图 1 黑莓汁中咖啡酸辅色后花色苷的吸收光谱图

Fig. 1 Absorption spectra of anthocyanins copigmented with caffeic acid in blackberry juice

1: 对照 (control); 2: 100 mg/L; 3: 200 mg/L



(上) 未加咖啡酸; (中) 添加 100 mg/L 咖啡酸辅色 100 d 后; (下) 添加 200 mg/L 咖啡酸辅色 100 d 后 Above: control; Middle: 100 days, added caffeic acid concentration 100 mg/L; Bottom: 100 days, added caffeic acid concentration 200 mg/L

图 2 咖啡酸辅色后花色苷的液相图谱

Fig. 2 Chromatogram of anthocyanins co-pigmented with caffeic acid

94.53%, 辅色组间  $A_{\lambda_{\max}}$  差异显著 ( $P < 0.05$ )。可见, 在黑莓汁体系下, 咖啡酸的辅色作用随咖啡酸浓度的增加而增强。

### 2.1.2 花色苷组成的变化

由图 2 可知, 咖啡酸辅色后对花色苷组成产生了影响。100 d 时, 辅色组中检测到了大量的两种花色苷衍生物: 峰 1' 和峰 2'。

## 2.2 阿魏酸与花色苷的辅色

### 2.2.1 可见吸收光谱的变化

由图 3 可知, 在黑莓汁体系下, 阿魏酸的添加对花色苷的可见吸收光谱产生了显著影响。与对照组相比, 60 d 时, 咖啡酸处理组  $\lambda_{\max}$  分别右移 5 nm 和 6 nm,  $A_{\lambda_{\max}}$  分别增加了 32.43% 和 45.95%, 表明阿魏酸与花色苷发生了较强的分子间辅色作用, 辅色作用随阿魏酸浓度的增加而增强 ( $P < 0.05$ ); 辅色 100 d 后, 辅色组  $A_{\lambda_{\max}}$  分别增加了 72.75% 和 106.52%,

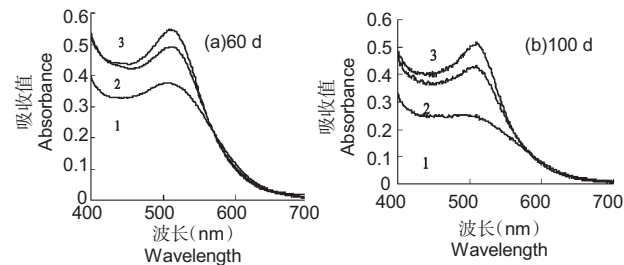


图 3 黑莓汁中阿魏酸辅色后花色苷的吸收光谱图

Fig. 3 Absorption spectra of anthocyanins copigmented with ferulic acid in blackberry juice

1: 对照 (control); 2: 100 mg/L; 3: 200 mg/L

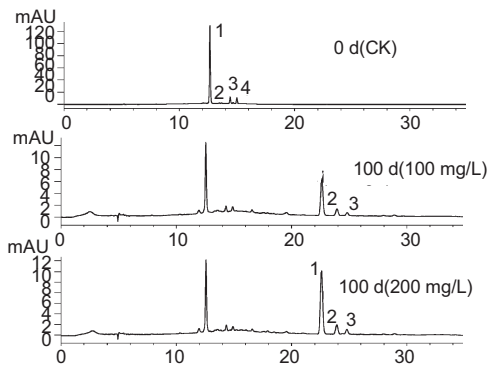


图 4 阿魏酸辅色后花色苷的液相图谱

Fig. 4 Chromatogram of anthocyanins co-pigmented with ferulic acid

(上) 未加阿魏酸; (中) 添加 100 mg/L 阿魏酸辅色 100 d 后; (下) 添加 200 mg/L 阿魏酸辅色 100 d 后 Above: control; Middle: 100 days, added ferulic acid concentration 100 mg/L; Bottom: 100 days, added ferulic acid concentration 200 mg/L

辅色组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。可见, 在黑莓汁体系下, 阿魏酸与花色苷的辅色反应较为缓慢, 在 60 d 时辅色已明显发生, 60 ~ 100 d 时, 辅色反应仍在继续, 辅色强度随阿魏酸浓度的增加而增强。

### 2.2.2 花色苷组成的变化

阿魏酸辅色后花色苷组成发生了变化 (图 4), 100 d 时, 辅色组中检测到了大量的三种花色苷衍生物: 峰 1''、峰 2'' 和峰 3''。

## 2.3 花色苷衍生物结构解析

据王卫东等报道<sup>[13]</sup>, 黑莓花色苷各组分为矢车菊-3-O-葡萄糖苷 ( $[M]^+$  为  $m/z$  449)、矢车菊-3-O-阿拉伯糖苷 ( $[M]^+$  为  $m/z$  419)、矢车菊-3-O-丙二酸酐葡萄糖苷 ( $[M]^+$  为  $m/z$  535) 和矢车菊-3-O-草酸酐葡萄糖苷 ( $[M]^+$  为  $m/z$  593)。采用 HPLC-PDA-MS 技术对辅色后花色苷衍生物进行分析, 经咖啡酸辅色后的花色苷衍生物主要有两种, 其分子量如表 1 所示, 峰 1' ( $[M]^+$  为  $m/z$  581) 和峰 2' ( $[M]^+$  为  $m/z$  725) 分子量符合:  $MW_c$  (咖啡酸辅色的花色苷衍生物分子量) =  $MW_A$  (某花色苷分子量) +  $MW_B$  (咖啡酸分子量 180) - (44 + 1 × 4); 同时, Rentszcha 等<sup>[6]</sup> 研究认为酚酸 (阿魏酸、咖啡酸等) 可在花色苷的 C-4 和 C-5 位发生加成反应形成吡喃型花色苷。据此可推测峰 1' 和峰 2' 分别为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和矢车菊-3-O-草酸酐葡萄糖苷与咖啡酸在 C-4 和 C-5 位发生加成反应后形成的花色苷衍生物 (图 5)。

经阿魏酸辅色后的花色苷衍生物主要有三种, 其分子量如表 1 所示, 峰 1'' ( $[M]^+$  为  $m/z$  595)、峰 2'' ( $[M]^+$  为  $m/z$  739) 和峰 3'' ( $[M]^+$  为  $m/z$  565), 分子量符合:  $MW_c$  (阿魏酸辅色的花色苷衍生物分子量) =  $MW_A$  (某花色苷分子量) +  $MW_B$  (阿魏酸分

表 1 咖啡酸或阿魏酸辅色后的黑莓花色苷衍生物

Table 1 Blackberry anthocyanins derivatives co-pigmented with caffeic acid or ferulic acid

| 峰<br>Peak | 分子量<br>Molecular<br>weight | 花色苷衍生物<br>Anthocyanins derivatives |
|-----------|----------------------------|------------------------------------|
| 1'        | 581                        | 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚             |
| 2'        | 725                        | 矢车菊-3-O-草酸酐葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚           |
| 1''       | 595                        | 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚            |
| 2''       | 739                        | 矢车菊-3-O-草酸酐葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚          |
| 3''       | 565                        | 矢车菊-3-O-阿拉伯糖苷-4-乙炔基愈创木酚            |



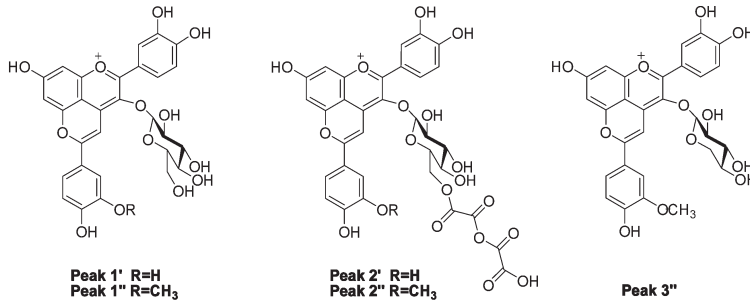


图5 咖啡酸或阿魏酸辅色形成的花色苷衍生物结构式

Fig. 5 Structures of blackberry anthocyanin derivatives co-pigmented with caffeic acid or ferulic acid

子量 194) - (44 + 1 × 4)。据此可推测峰 1''、峰 2'' 和峰 3'' 分别为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊-3-O-草酸酐酰葡萄糖苷和矢车菊-3-O-阿拉伯糖苷和阿魏酸在 C-4 和 C-5 位发生加成反应后形成的花色苷衍生物(图 5)。

综上,黑莓汁中咖啡酸和阿魏酸对花色苷产生了辅色作用,显著增加了花色苷的最大吸收值;咖啡酸辅色和阿魏酸辅色分别产生了两种和三种花色苷衍生物;其中,咖啡酸辅色产生的花色苷衍生物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚加成物和矢车菊-3-O-草酸酐酰葡萄糖苷-4-乙炔基儿茶酚加成物;阿魏酸产生的花色苷衍生物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚加成物、矢车菊-3-O-草酸酐酰葡萄糖苷-4-乙炔基愈创木酚加成物和矢车菊-3-O-阿拉伯糖苷-4-乙炔基愈创木酚加成物。黑莓汁中花色苷易发生降解,导致黑莓汁颜色变为暗红。以上试验结果表明,添加适量咖啡酸和阿魏酸的能提高花色苷的稳定性,从而较大程度地保持黑莓汁的颜色和营养成分。

#### 参考文献

- 1 Kirca A, Özkan M, Cemeroglu B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chem*, 2006, 97: 598-605.
- 2 Bordignon-Luiz MT, Gauche C, Gris EF, *et al.* Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT*, 2007, 40: 594-599.
- 3 Mazza G, Brouillard R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 1990, 29:

1097-1102.

- 4 Yawadio R, Morita N. Color enhancing effect of carboxylic acids on anthocyanins. *Food Chem*, 2007, 105: 421-427.
- 5 Cabrita L. Analysis and stability of anthocyanins. University of Bergen, Department of Chemistry, Bergen, 1999.
- 6 Rentscha M, Schwarz M, Winterhalter P. Pyranoanthocyanins-an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends Food Sci Technol*, 2007, 18: 526-534.
- 7 Gris EF, Ferreira EA, Falcão LD. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chem*, 2007, 100: 1289-1296.
- 8 Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, *et al.* Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem*, 2007, 102: 777-783.
- 9 Dai J, Patel JD, Mumper RJ. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Med Food*, 2007, 10: 258-265.
- 10 Siriwoharn T, Wrolstad RE. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *J Food Sci*, 2004, 69: 233-240.
- 11 Cihat T, Esra S, Cevdet D, *et al.* Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars. *Food Anal Methods*, 2010, 3: 144-153.
- 12 Brouillard R. Anthocyanins as Food Colors. London: Academic Press, 1982, 1-38.
- 13 Wang WD (王卫东), Li C (李超), Xu SY (许时婴). High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for the analysis of anthocyanins in blackberry fruit. *Food Sci (食品科学)*, 2009, 30: 230-234.

# 大豆寡糖对断奶环江香猪生长性能和营养物质代谢的影响

周笑犁<sup>1</sup>, 傅德智<sup>1</sup>, 孔祥峰<sup>1,2\*</sup>, 宋小燕<sup>1</sup>, 耿梅梅<sup>1</sup>, 印遇龙<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国科学院亚热带农业生态研究所, 中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南省畜禽健康养殖工程技术研究中心, 长沙 410125; <sup>2</sup>中国科学院环江喀斯特农业生态试验站, 环江 547100

**摘要:** 为了探讨大豆寡糖(SBOS)作为抗生素替代物对断奶仔猪生长性能的影响及其作用机制, 饲养试验选用21日龄断奶的环江香猪12头, 随机分为2组, 每组6头, 分别饲喂添加0.5% SBOS日粮和抗生素对照日粮, 试验期为14 d。记录每天的采食量, 分别于试验开始和结束时称取空腹体重并采集血液, 肝素抗凝离心分离血浆, 测定生化参数和游离氨基酸水平。消化试验选用10头环江香猪, 随机分为2组, 处理同饲养试验。预试期4 d, 正试期3 d, 收集粪样, 指示剂法测定干物质、粗蛋白和粗脂肪的消化率。结果表明, 与抗生素对照组相比, SBOS组仔猪平均日采食量、日增重和料重比均无显著变化; 血浆尿素氮和血氨含量显著下降, 总蛋白含量显著升高( $P < 0.05$ ); 血浆甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸和蛋氨酸的含量均显著升高( $P < 0.05$ ); 粗蛋白和粗脂肪消化率有提高趋势。提示SBOS可替代抗生素用于断奶仔猪日粮。

**关键词:** 大豆寡糖; 血液生化指标; 营养物质代谢

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Effects of Soybean Oligosaccharides on Growth Performance and Nutrient Metabolism in Weanling Huanjiang Mini-pigs

ZHOU Xiao-li<sup>1</sup>, FU De-zhi<sup>1</sup>, KONG Xiang-feng<sup>1,2\*</sup>, SONG Xiao-yan<sup>1</sup>, GENG Mei-mei<sup>1</sup>, YIN Yu-long<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory for Agro-ecological Processes in Subtropical Region and Hunan Engineering and Research Center of Animal and Poultry Science, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; <sup>2</sup>Huanjiang Observation and Research Station for Karst Ecosystems, Chinese Academy of Sciences, Huanjiang 547100, China

**Abstract:** This study was conducted to investigate the effects of soybean oligosaccharides (SBOS) as antibiotic alternatives on growth performance and its mechanism in weaned piglets. Twelve Huanjiang mini-piglets weaned at 21 d of age were randomly allocated into two groups with six replicates in the feeding trial. The piglets were fed with a antibiotic- or 0.5% SBOS-supplemented diet for 14 days. Feed intake per piglet was recorded daily, and the body weight was got at the beginning or end of this trail, as well as collecting the blood. The plasma were separated by centrifugation and used for measuring biochemical parameters and contents of free amino acids. Ten Huanjiang mini-pigs were randomly allocated into two groups as same as the feeding trial in the digestion trial. After 4 d pretrial and 3 d official test, the feces were collected to determine the digestibility of dry matter, crude protein and crude fat by indicator method. The results showed that the average daily feed intake, average daily gain and feed/gain in piglets fed SBOS-supplemented diet didn't compared with the control group; dietary supplementing SBOS decreased ( $P < 0.05$ ) the plasma contents of urea nitrogen and ammonia, while increased ( $P < 0.05$ ) the plasma content of total protein, compared with the control group; the plasma contents of glycine, histidine, lysine, arginine, and methionine in piglets fed SBOS-supplemented diet increased ( $P < 0.05$ ), as well as the apparent digestibility of crude protein and fat ( $P > 0.05$ ), in comparison with the control group. These findings suggested that SBOS as an antibiotic alternative could be used in the diet of weaned piglets.

**Key words:** soybean oligosaccharides; blood biochemical parameters; nutrient metabolism

收稿日期: 2010-12-20 接受日期: 2011-03-22

基金项目: 中国科学院亚热带农业生态研究所青年人才领域前沿项目 (ISACX-LYQY-QN-0703); 国家星火计划项目 (2007EA790004)

\* 通讯作者 E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

抗生素作为饲料添加剂在饲料工业中的应用已经有几十年的历史, 饲料中添加抗生素已成为提高养殖效益的“有效手段”。但近几年的研究发现, 在畜禽饲料中使用抗生素作为促生长剂会使病原菌产

生耐药性,耐药病原菌还有可能在动物产品中残留,甚至污染环境<sup>[1]</sup>。抗生素的使用遭到越来越多的反对,各国已立法禁止某些抗生素的使用。随着人们生活与消费水平的提高以及对健康的重视,寻找安全有效的抗生素替代品已势在必行<sup>[2]</sup>。大豆寡糖(SBOS)是大豆等豆科作物种子中含有的可溶性糖类的总称,属于 $\alpha$ -半乳糖苷类,主要由水苏糖、棉籽糖和蔗糖组成。因其不能被动物自身分泌的酶消化,但能被肠道中的有益菌利用,从而起到调节肠道微生物区系的作用,同时具有免疫佐剂和抗原特性,可增强机体免疫功能<sup>[3]</sup>。本试验测定了SBOS对断奶环江香猪生长性能及营养物质代谢的影响,旨在为开发绿色环保型饲料添加剂提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物、饲养管理及分组

饲养试验于2009年6月在广西环江东兴镇某养猪场进行。选用21日龄断奶的环江香猪12头,随机分成2组,每组6头。按中国地方猪营养需要量<sup>[4]</sup>并结合NRC(1998)营养需要量<sup>[5]</sup>配制基础日粮。对照组在基础日粮中添加抗生素,试验组在基础日粮中添加0.5% SBOS(含量大于85%)。日粮中加入2倍水后,调成粥状饲喂。日喂3次,自由采食和饮水。预试期对试猪进行驱虫、防疫。预试结束后,逐头称取空腹体重,作为试猪的初始重。正试期为14 d。

消化试验选用10头35日龄的环江香猪,随机分为2组,处理同饲养试验。在试验日粮中添加0.1%的TiO<sub>2</sub>作为指示剂。预试期4 d,正试期3 d。自由采食和饮水,记录每天喂料量。

### 1.2 生长性能测定

试验开始时分别称取试猪个体重;试验期间,记录每栏试猪的采食量。在饲养试验结束后,逐头称取试猪空腹体重,计算平均日增重、平均日采食量和料重比<sup>[6]</sup>。

### 1.3 血浆生化参数测定

饲养试验结束后,每头试猪前腔静脉采血10 mL,肝素抗凝,3000 r/min离心10 min分离血浆,用CX4型全自动生化分析仪(Beckman公司产品)测定血浆葡萄糖、总蛋白、白蛋白、尿素氮、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、血氨、甘油三酯和胆固醇的含量及碱性磷酸酶的活性<sup>[6]</sup>。测定方法按照试剂盒(由北京利德曼公司提供)说明进行。

### 1.4 血浆游离氨基酸含量测定

每毫升血浆中加入7.5%的三氯乙酸2.5 mL,混匀后4℃、15000 r/min离心15 min,取上清液,用L-8800型全自动氨基酸分析仪(日立公司)测定其中游离氨基酸的含量<sup>[7]</sup>。

### 1.5 营养物质消化率测定

消化试验于正试期每天7:00和14:00收集粪样,4℃保存,将每头试猪的粪样混合均匀,按10%取样,称重后于65℃烘干,置室温条件下回潮24 h,称重、粉碎,分装于样品袋中备用。用氧化钛指示剂法测定干物质、粗蛋白和粗脂肪的消化率<sup>[7]</sup>。

### 1.6 数据处理与分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS软件进行非配对t-检验。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 SBOS对断奶环江香猪生长性能的影响

由表1可见,试验开始时,SBOS组和对照组仔猪初始平均体重相近;饲喂14 d后两组试猪的末重、平均日增重、平均日采食量和料重比差异均不显著。

表1 日粮添加大豆寡糖对断奶环江香猪生长性能的影响( $n=6$ )

Table 1 Effect of dietary supplementation with soybean oligosaccharides on growth performance in weanling Huanjiang mini-pig ( $n=6$ )

| 项目<br>Item            | 对照组<br>Control | 0.5%大豆寡糖组<br>0.5% SBOS |
|-----------------------|----------------|------------------------|
| 初重 Initial weight(kg) | 3.15 ± 0.39    | 3.23 ± 0.34            |
| 末重 Final Weight(kg)   | 4.26 ± 0.68    | 3.70 ± 0.68            |
| 平均日增重 ADG(g)          | 78.85 ± 23.34  | 54.45 ± 15.28          |
| 平均日采食量 ADFI(g)        | 175.90 ± 30.79 | 121.10 ± 26.96         |
| 料重比 F:G               | 2.31 ± 0.35    | 2.70 ± 0.99            |

### 2.2 SBOS对断奶环江香猪血浆生化参数的影响

由表2可见,与对照组相比,SBOS组血氨、甘油三酯和尿素氮含量显著降低( $P < 0.05$ ),总蛋白含量显著升高( $P < 0.05$ ),白蛋白浓度及碱性磷酸酶活性也略有增加。

### 2.3 SBOS对断奶环江香猪血浆游离氨基酸含量的影响

由表3可见,与对照组相比,SBOS组血浆谷氨酸、半胱氨酸和丝氨酸的含量均显著降低( $P < 0.05$ ),甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸和蛋氨酸的

含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 其它氨基酸含量两组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 2 日粮添加大豆寡糖对断奶环江香猪血浆生化参数的影响 ( $n = 6$ )

Table 2 Effect of dietary supplementation with soybean oligo-saccharides on plasma biochemical parameters in weanling Huanjiang mini-pig ( $n = 6$ )

| 项目<br>Item          | 对照组<br>Control | 0.5% 大豆寡糖组<br>0.5% SBOS |
|---------------------|----------------|-------------------------|
| 葡萄糖 GLU (mmol/L)    | 6.97 ± 0.35    | 6.66 ± 0.61             |
| 碱性磷酸酶 ALP (U/L)     | 302.3 ± 77.7   | 342.6 ± 117.1           |
| 低密度脂蛋白 LDL (mmol/L) | 0.82 ± 0.09    | 0.82 ± 0.22             |
| 高密度脂蛋白 HDL (mmol/L) | 0.96 ± 0.17    | 0.88 ± 0.21             |
| 血氨 AMM (μmol/L)     | 86.13 ± 0.76   | 84.86 ± 0.73 *          |
| 甘油三酯 TG (mmol/L)    | 0.64 ± 0.07    | 0.51 ± 0.04 *           |
| 总蛋白 TP (g/L)        | 58.30 ± 2.50   | 63.88 ± 1.95 *          |
| 白蛋白 ALB (g/L)       | 32.08 ± 3.13   | 34.54 ± 1.39            |
| 胆固醇 CHO (mmol/L)    | 2.05 ± 0.12    | 2.06 ± 0.32             |
| 尿素氮 UN (mmol/L)     | 3.77 ± 0.41    | 3.21 ± 0.59 *           |

注: \* 表示同行数据差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Note: \* means values in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ), the same as follows.

表 3 日粮添加大豆寡糖对断奶环江香猪血浆游离氨基酸含量的影响 (nmol/mL,  $n = 6$ )

Table 3 Effect of dietary supplementation with soybean oligo-saccharides on plasma contents of free amino acids in weanling Huanjiang mini-pig ( $n = 6$ )

| 项目<br>Item | 对照组<br>Control | 0.5% 大豆寡糖组<br>0.5% SBOS |
|------------|----------------|-------------------------|
| 苯丙氨酸 Phe   | 115.42 ± 12.10 | 130.12 ± 7.98           |
| 酪氨酸 Tyr    | 138.22 ± 16.63 | 171.34 ± 14.37          |
| 亮氨酸 Leu    | 229.55 ± 45.74 | 266.18 ± 32.91          |
| 异亮氨酸 Ile   | 196.02 ± 31.27 | 218.02 ± 20.52          |
| 缬氨酸 Val    | 293.72 ± 61.72 | 396.35 ± 49.30          |
| 丙氨酸 Ala    | 863.91 ± 88.23 | 732.98 ± 35.25          |
| 甘氨酸 Gly    | 1458.7 ± 37.19 | 1582.3 ± 35.36 *        |
| 天冬氨酸 Asp   | 46.54 ± 3.16   | 46.55 ± 2.76            |
| 谷氨酸 Glu    | 537.29 ± 18.44 | 450.77 ± 77.35 *        |
| 半胱氨酸 Cys   | 49.20 ± 4.50   | 34.90 ± 1.44 *          |
| 组氨酸 His    | 120.40 ± 9.33  | 157.00 ± 12.6 *         |
| 赖氨酸 Lys    | 230.48 ± 11.19 | 281.197 ± 14.31 *       |
| 精氨酸 Arg    | 121.49 ± 19.82 | 178.83 ± 15.17 *        |
| 苏氨酸 Thr    | 217.23 ± 10.93 | 198.26 ± 7.42           |
| 丝氨酸 Ser    | 1117.6 ± 85.55 | 783.6 ± 242.41 *        |

|                          |                 |                 |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| 蛋氨酸 Met                  | 49.87 ± 5.27    | 80.87 ± 6.61 *  |
| 总氨基酸<br>Total amino acid | 5787.6 ± 835.58 | 5709.3 ± 398.57 |

## 2.4 SBOS 对断奶环江香猪营养物质消化率的影响

由表 4 可见, 与对照组比较, SBOS 组粗蛋白和粗脂肪的消化率虽然略有升高但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 4 日粮添加大豆寡糖对断奶环江香猪营养物质消化率的影响 ( $n = 5$ )

Table 4 Effect of dietary supplementation with soybean oligo-saccharides on nutrient digestibility in weanling Huanjiang mini-pig ( $n = 5$ )

| 项目<br>Item        | 对照组<br>Control | 0.5% 大豆寡糖组<br>0.5% SBOS |
|-------------------|----------------|-------------------------|
| 粗蛋白 Crude protein | 42.72 ± 5.50   | 43.21 ± 1.87            |
| 粗脂肪 Crude fat     | 53.60 ± 5.92   | 56.45 ± 5.44            |
| 干物质 Dry matter    | 71.75 ± 3.44   | 69.24 ± 2.08            |

## 3 讨论

我国小型猪资源丰富, 自 20 世纪 80 年代以来, 就开始了对小型猪资源调查和实验动物化培育研究。但小型猪的基础研究仍较为薄弱, 缺乏其遗传学标准、营养学标准和环境标准等, 而国内外也缺乏相应标准可以参照, 这在很大程度上影响了小型猪的标准化进程。鉴于环江香猪的饲养管理仍较为粗放, 从而导致日粮中营养成份不够全面, 猪的生长发育较缓慢。若要大力发展香猪生产, 首先要解决香猪饲料营养问题<sup>[8]</sup>。故本试验测定了 SBOS 对断奶环江香猪生长性能及营养物质代谢的影响, 旨在为开发绿色环保型饲料添加剂提供理论依据。

关于寡糖对动物生产性能的影响, 国内外已进行了不少研究, 但结果不尽一致。傅国栋等<sup>[9]</sup>的研究结果表明, 寡糖组仔猪的生长性能从饲喂第 3 周开始有显著差异。虞泽鹏等<sup>[10]</sup>报道, 益生菌对断奶仔猪体重的影响不明显, 但有改善胃肠道功能的趋势。但也有人报道, 添加 0.3% 果寡糖 + 0.15% 甘露寡糖, 日增重和饲料转化率比对照组显著提高, 比添加单一寡聚糖的效果更明显<sup>[11]</sup>。在本试验中, 添加 SBOS 14 d 后, 断奶仔猪的生长性能也没有提高。其原因可能是由于寡糖类物质对肠道微生物群落平衡的改善作用不一定是反映在生长性能上, 但饲喂

较长时间可能会有较好的饲料转化率。有人报道,日粮中添加寡糖可提高仔猪对营养物质的消化和利用,增强新陈代谢,促进血液循环。本研究结果显示,SBOS也可在一定程度上提高断奶仔猪粗蛋白和粗脂肪的表观消化率。

血液尿素氮是蛋白质代谢的终产物,其浓度受饲料中蛋白质含量与品质的影响。该浓度主要反映氨基酸在动物体内的代谢情况,过量的氨基酸在体内进行脱氨基作用会增加血液尿素氮的浓度;氨基酸平衡状况良好时,血液尿素氮浓度下降<sup>[6]</sup>。总蛋白主要反映蛋白质在体内的合成情况。本研究结果表明,SBOS组血浆尿素氮浓度的显著降低,说明仔猪对日粮蛋白质的利用情况比对照组好;总蛋白浓度的升高,也表明仔猪对日粮蛋白质的消化吸收作用加强,有助于组织蛋白质的合成。仔猪生长速度加快、代谢增强时,血液中需要相对较多的带极性基团的白蛋白运输合成体组织的原料<sup>[12]</sup>,本研究中血清白蛋白浓度有所提高与此相符。血清胆固醇和甘油三酯含量是高脂血症的重要指标。SBOS可显著降低甘油三酯的含量,一定程度上说明其对脂肪代谢具有一定的调节作用,这对防治高脂血症等疾病有一定的意义。

血液中的游离氨基酸常被作为机体氨基酸库,用以研究体内蛋白质代谢状况,估测动物的氨基酸需要量<sup>[13]</sup>。在本试验中,SBOS可显著改变断奶仔猪血浆中氨基酸的含量和组成,从而为仔猪阶段的蛋白质沉积和机体的快速生长发育提供了必需的物质来源。

综上所述,日粮中添加SBOS虽然对断奶环江香猪的生长性能没有显著影响,但可以降低血氨和尿素氮水平,改善蛋白质和脂质代谢,还能提高机体中一些必需氨基酸的含量。SBOS作为一种绿色环保型饲料添加剂,可有效替代抗生素应用于仔猪饲料中。

#### 参考文献

1 Wu X(吴信),Kong XF(孔祥峰),Li TJ(李铁军),*et al.* Research advances of antibiotics substitutes. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2006,18(suppl):131-136.

- 2 Yin YL(印遇龙),Kong XF(孔祥峰),Li TJ(李铁军). Major problems in our livestock and poultry production and countermeasure in the coming century. *Feed Ind*(饲料工业),2007,28(14):1-5.
- 3 Yang SM(杨曙明). Use of oligosaccharides as a new feed additive in animal feeding;a review. *J Anim Nutr*(动物营养学报),1999,11:1-9.
- 4 Ministry of Agriculture in China. Agricultural industry standards of the people's republic of China NY/T65-2004. Pig feeding standards,2004.
- 5 NRC. Nutrient Requirements of Swine(10 Ed). Washington DC:Nail Acad Press. 1998.
- 6 Kong XF(孔祥峰),Yin YL(印遇龙),Huang RL(黄瑞林),*et al.* Effects of dietary additive of Chinese herbal ultra-fine powder on growth performance and serum biochemical parameters in early-weaned piglets. *Chin J Vet Sci*(中国兽医学报),2008,28:184-188.
- 7 Kong XF, Yin YL, He QH, *et al.* Dietary supplementation with Chinese herbal powder enhances ileal digestibilities and serum concentrations of amino acids in young pigs. *Amino acids*,2009,37:573-582.
- 8 Wu C(吴琛),Liu JF(刘俊锋),Kong XF(孔祥峰),*et al.* Effects of dietary supplementation of arginine activator additive on meat quality and anti-oxidant function in Huanjiang mini-pigs. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2011,23:901-904.
- 9 Fu GD(傅国栋),Xue HQ(薛惠琴),Hang YQ(杭怡琼). Effects of oligosaccharides on growth performance of the piglets. *Anim Husb & Vet Med*(畜牧与兽医),2003,35(3):1-3.
- 10 Yu ZP(虞泽鹏),Xie QL(谢启轮),Tang J(唐举),*et al.* Effect of EM on the performance of weaned piglets. *Anim Sci & Anim Med*(动物科学与动物医学),2002,19(3):49-50.
- 11 Zou ZH(邹志恒),Song QL(宋琼莉),Wen H(文虹). FOS + MOS on growth performance of piglets. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报),2004,16(2):60-63.
- 12 Luo HM(罗洪明). Different protein levels on performance, blood biochemical indexes and immune function of early weaned piglets. Sichuan: Sichuan agricultural university, MSC. 2005.
- 13 Kong XF, Wu GY, Yin YL. Roles of phytochemicals in amino acid nutrition. *Front Biosci*,2011,S3:372-384.

# 黄原胶降解及其抗氧化性能研究

孙涛\*, 熊小英, 魏颖隽, 谢晶, 薛斌

上海海洋大学食品学院, 上海 201306

**摘要:** 酸性条件下对黄原胶进行氧化降解, 透析得到两种黄原胶寡糖, 对产物进行 FT-IR 表征, GPC 法测定两种寡糖的分子量分别为 7500、10100。考察两种产物对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  和过氧化氢的清除活性以及还原能力, 结果表明 10100-XG 较 7500-XG 具有更强的抗氧化性能。这可能与黄原胶寡糖活性羟基数目有关。

**关键词:** 黄原胶; 氧化降解; 抗氧化性能

中图分类号: R285; Q539; TS202.3

文献标识码: A

## Degradation and Antioxidant Activity of Xanthan Gum

SUN Tao\*, XIONG Xiao-ying, WEI Ying-juan, XIE Jing, XUE Bin

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

**Abstract:** Two xanthan oligosaccharides were prepared by oxidative degradation in acidic condition. The products were characterized by FT-IR, and the molecular weight of the products determined by GPC method was 7500 and 10100, respectively. The antioxidant activities of the xanthan oligosaccharides were investigated by the scavenging of superoxide anion, hydrogen peroxide and reducing power. The result indicated that 10100-XG exhibited higher antioxidant activity than 7500-XG. It may be related to the the content of hydroxyl groups.

**Key words:** xanthan; oxidative degradation; antioxidant activity

生物体内自由基处于不断产生与清除的动态平衡中。一旦自由基产生过量或者机体清除自由基的能力减弱, 就会造成自由基的代谢失衡。许多疾病与自由基的代谢失衡导致的生物大分子损伤有关, 其中活性氧如超氧阴离子自由基与癌症、糖尿病、心脑血管疾病等密切相关<sup>[1]</sup>。因此研究和寻找外源性自由基清除剂保持机体自由基代谢平衡具有重要意义。目前, 已发现多种微生物多糖具有抗氧化活性。黄原胶在 1952 年首先由美国农业部从野油菜假单胞分离得到, 因其优良的理化性能而被广泛关注<sup>[2]</sup>。目前国内外对于黄原胶的研究主要集中在发酵提取及理化性能方面, 对其生物活性的研究较少。

黄原胶分子量大, 溶解性能差, 刚性双螺旋结构将活性基团包围在内部<sup>[3]</sup>, 限制了其生物活性, 故需对其进行改性, 其中降解是改性的重要手段之

一<sup>[4]</sup>, 降解后的黄原胶具有一定生物活性<sup>[5]</sup>。本文采用氧化手段对黄原胶进行降解, 考察两种不同分子量黄原胶寡糖的抗氧化活性, 以期为黄原胶进一步开发研究提供思路。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

黄原胶(食品级, 上海联合食品添加剂有限公司); 鲁米诺、DPPH(Sigma 公司); 其余试剂(均为分析纯, 上海化学试剂公司); 抗氧化测试所需溶液, 由二次蒸馏水配制。

WFZ UV2000 型紫外分光光度计(上海合利仪器有限公司); Delta 320 型 pH 计(梅特勒—托利多仪分析仪器上海有限公司); IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈科技有限公司); JB90-D 型强力电动搅拌机, METTLER AE200 型电子分析天平, JI80-2B 型台式离心机。

### 1.2 黄原胶降解产物制备

将 36 g 黄原胶(XG)溶于 2000 mL 浓度为 0.4 mol/L 的 HCl 溶液中, 向其中加入 50 mL 30%  $H_2O_2$ , 于 80 °C 下降解 5d, 冷却, 用 0.2 mol/L NaOH

收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2011-03-03

基金项目: 上海市生物医药和农业科技领域重点科技项目(08391911500); 2009 年上海市优秀学科带头人计划(09XD1402000); 上海市教委重点学科建设项目(J50704)

\* 通讯作者 Tel: 86-21-61900363; E-mail: taosun@shou.edu.cn

调节溶液 pH 至 7, 先通过微孔过滤器过滤 (0.45  $\mu\text{m}$ ), 然后在蒸馏水中透析 (7000, 14000) 6 d, 冷冻干燥后分别得到两种黄原胶寡糖 (A, B) 各约 1.0 g。

### 1.3 测试表征

红外光谱在 EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪上进行, 采用 KBr 压片法制样, 测定波数范围为 400 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 0.8  $\text{cm}^{-1}$ 。

采用 GPC 法测定黄原胶降解产物的相对平均分子量及其分布。GPC 测试条件如下: 柱子: TOSOH BIOSEP G4000SWXL; 流动相: 0.2 M 醋酸钠溶液; 色谱仪: Waters 515 型凝胶色谱仪; 检测器: Waters 2410 示差折光检测器; 进样量: 50  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。标准物质为: 葡聚糖, 分子量分别为 473000、188000、76900、43200、10500。

### 1.4 抗氧化性能测定

#### 1.4.1 对超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除

采用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系来检测  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [6], 配制 pH = 10.20 的 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲溶液。并以此缓冲液作为溶剂配制  $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L 的鲁米诺溶液以及不同浓度的样品溶液, 用  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的盐酸配制浓度为 0.1 mol/L 的邻苯三酚储备液, 使用前用去离子水稀释至浓度为  $1 \times 10^{-4}$  mol/L。用流动注射化学发光分析仪依次测定从稀到浓的样品溶液 (缓冲液为空白溶液), 读出峰面积, 试验重复三次。并按下式计算样品溶液对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除率: 清除率 =  $(A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%$ 。式中:  $A_0$ —空白溶液峰面积  $A_i$ —样品溶液峰面积

#### 1.4.2 对过氧化氢的清除

配制 pH = 7.20 的 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液。取 7 支比色管, 分别加入浓度为 0.1 mol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 (磷酸盐缓冲液配)、不同浓度样品溶液各 2.0 mL。充分摇匀后于 33  $^{\circ}\text{C}$  避光静置半小时, 在 230 nm 处测量吸光度  $A_i$ 。空白组以去离子水代替样品溶液测定  $A_0$ , 对照组以磷酸盐缓冲溶液代替  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液测定  $A_j$ 。试验重复三次, 并按下式计算样品溶液对过氧化氢的清除率: 清除率 =  $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

式中:  $A_0$ —空白组吸光度  $A_i$ —不同浓度样品溶液吸光度  $A_j$ —对照组吸光度

#### 1.4.3 还原能力的测定

还原能力测定根据文献 [7] 进行并稍做改动, 具体操作为取 8 支比色管, 分别加入 pH = 6.60 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液、1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL, 然

后向每根管其中加入不同浓度样品溶液 2.0 mL。充分混匀后于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min, 取出后立即置于冰水中冷却, 然后加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后 2000 r/min 下离心 10 min, 另取 8 支比色管, 取离心后上层清液 2.0 mL 并加入去离子水 2.5 mL 和重新配制的 0.1% 的三氯化铁溶液 0.5 mL, 静置十分钟, 以去离子水为空白对照, 于 700 nm 处测定吸光度。吸光度的增强表明还原能力的增强。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原料黄原胶及其寡糖的结构表征

图 1 是原料黄原胶 (XG) 以及黄原胶寡糖 (A、B) 的红外光谱图。由图可知, 酸性条件下氧化降解得到的两种分子量寡糖均保留了黄原胶的特征吸收峰 [8], 即 2920  $\text{cm}^{-1}$  处  $-\text{CH}_2$  伸缩振动吸收峰; 1623  $\text{cm}^{-1}$  处丙酮酸酯中  $-\text{C}=\text{O}$  伸缩振动吸收峰; 1418  $\text{cm}^{-1}$  处羧酸盐中  $-\text{C}-\text{O}$  伸缩振动吸收峰及 894  $\text{cm}^{-1}$  处  $\beta$ -吡喃糖环中  $\text{C}1-\text{H}$  弯曲振动吸收峰, 这表明降解后的黄原胶基本结构单元未被破坏。XG 的  $-\text{OH}$  伸缩振动吸收峰出现在 3436  $\text{cm}^{-1}$  处, 而 A 和 B 的伸缩振动吸收峰分别出现在 3408  $\text{cm}^{-1}$  和 3417  $\text{cm}^{-1}$  处, 表明降解后的黄原胶寡糖形成了更多的分子内或分子间氢键, 这可能是由于降解使得更多羟基暴露出来 [9]。

GPC 测试结果表明: 两种黄原胶寡糖 A、B 相对分子量分别为 7500 和 10100。

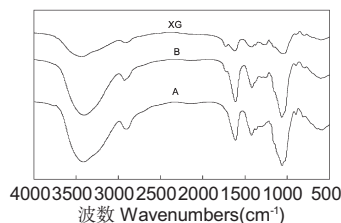


图 1 原料黄原胶及其寡糖的红外光谱图

Fig. 1 IR spectra of the xanthan polysaccharide and oligosaccharides

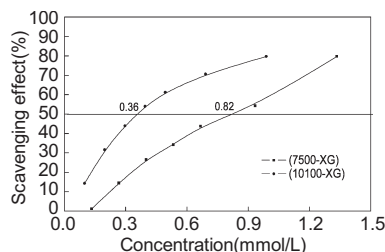


图 2 黄原胶寡糖对超氧阴离子  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除

Fig. 2  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging abilities of xanthan oligosaccharides

## 2.2 抗氧化性能测定

### 2.2.1 对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 清除

超氧阴离子自由基是所有活性氧自由基中的第一个自由基,它具有重要的生物功能和与多种疾病有密切关系。图2描述了不同分子量的黄原胶寡糖(7500-XG和10100-XG)对超氧阴离子  $O_2^{\cdot-}$  清除效果。它们对超氧阴离子  $O_2^{\cdot-}$  的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强,其半抑制浓度  $IC_{50}$  (对自由基清除率为50%时所需要的自由基清除剂浓度)分别为0.82和0.36 mmol/L。即对超氧阴离子清除能力为:10100-XG > 7500-XG。在该体系中,抗坏血酸对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  的半抑制浓度  $IC_{50}$  为0.191 mmol/L。

### 2.2.2 对过氧化氢的清除

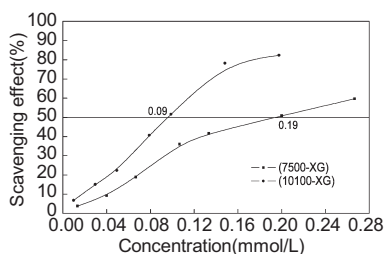


图3 黄原胶寡糖对过氧化氢的清除

Fig. 3  $H_2O_2$  scavenging abilities of xanthan oligosaccharides

过氧化氢按结构划分不属于自由基范畴,但在人体内的损伤作用和自由基类似,并能够形成毒性最大的羟基自由基,引发细胞膜中的不饱和脂肪酸发生过氧化反应,从而产生危害,因此在自由基损伤研究中过氧化氢也被算作一种自由基<sup>[10]</sup>。图3描述了两种不同相对分子质量的黄原胶(7500-XG和10100-XG)对过氧化氢的清除效果。它们对过氧化氢的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强,其对于过氧化氢的半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为0.19和0.09 mmol/L。即对过氧化氢的清除能力为:10100-XG > 7500-XG。在该体系中,抗坏血酸对过氧化氢半抑制浓度  $IC_{50}$  为0.0030 mmol/L。

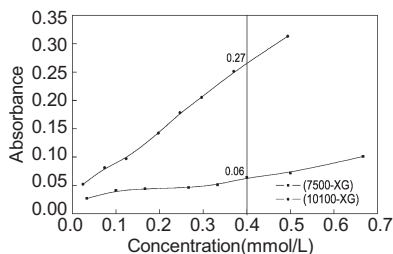


图4 黄原胶寡糖的还原能力

Fig. 4 Reducing power of xanthan oligosaccharides

### 2.2.3 还原能力的测定

还原能力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标。研究表明抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系<sup>[11]</sup>。图4描述了不同分子量黄原胶寡糖(7500-XG和10100-XG)的还原能力。由图可知,随着浓度的增加,样品的吸光值也随之增加,还原能力逐渐增强。在0.4 mmol/L时,其吸光度分别为0.06和0.27,即还原能力为:10100-XG > 7500-XG。在相同体系下,抗坏血酸浓度为0.4 mmol/L时,吸光度为1.06。

综上所述,两种黄原胶寡糖对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  和过氧化氢的清除活性以及还原能力的强弱为:10100-XG > 7500-XG。黄原胶结构中含所有大量羟基可能是其具有抗氧化活性的主要因素<sup>[12]</sup>。黄原胶结构单元的分子量是900,其中含有11个羟基。黄原胶的降解主要由主链葡萄糖链断裂引起,羟基含量基本保持不变<sup>[13]</sup>。故一个7500-XG分子平均含有92个羟基,而一个10100-XG分子平均含有123个羟基。由此可知,10100-XG的羟基含量较高,这可能是导致其对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  和过氧化氢的清除活性以及还原能力较强的主要原因,相关机理还有待进一步研究。

## 3 结论

在酸性条件下氧化降解黄原胶,经过透析,筛选出两种不同分子量的寡糖,抗氧化性能测试表明,10100-XG > 7500-XG,这可能与黄原胶寡糖分子羟基含量有关。本研究为黄原胶寡糖进一步的改性接枝提供依据,为黄原胶的功能化应用研究提供有益的参考。

### 参考文献

- Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 675-684.
- Jansson PE, Kenne L, Lindberg B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Polym*, 1975, 45: 275-282.
- Guo R (郭瑞), Ding EY (丁恩勇). Structure performance and applications of xanthan gum. *Chin Surfact Deterg Cosmet* (日用化学工业), 2006, 36(2): 42-45.
- Jiang LL (江丽丽), Zhang Q (张庆), Xu SA (徐世艾). Review of research on xanthan gum degradation. *Microbiol* (微生物学通报), 2008, 35: 1292-1296.



## 海金沙草多糖的提取及抗氧化活性

肖怀秋\*, 李玉珍

湖南化工职业技术学院应用化学系, 株洲 412004

**摘要:** 用响应面优化技术研究了提取时间、固液比、提取温度等对海金沙草粗多糖提取的定量影响, 获得了提取工艺的最优工艺参数: 提取时间为 123.3 min, 固液比 (s/w) 为 1: 20.9, 提取温度为 49.9 °C, 二阶多项式曲线回归模型预测多糖产量为 12.466%, 多糖提取验证试验结果 (提取率) 为  $12.85 \pm 0.18\%$  ( $n=3$ ), 比模型预测稍高。多糖经纯化并进行体外抗氧化活性研究 (以维生素 C 为对照品), 结果发现, 多糖产物对超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 和羟基氧自由基 ( $\cdot OH$ ) 具有较好的清除作用。

**关键词:** 海金沙草; 多糖; 超氧阴离子 (SOAFR); 羟基氧自由基 (HOFR); 氧自由基 (OFRs); 响应面法 (RSM)

**中图分类号:** R284.2; R285.5

**文献标识码:** A

## Extraction and Antioxidation of Polysaccharides from *Lygodium japonicum* (Thumb.) Sw

XIAO Huai-qi\*, LI Yu-zhen

Applied Chemistry Department of Hunan Chemical Industry College, Zhuzhou 412004, China

**Abstract:** The quantitative effects of extraction time (ETm), the ratio of sample to water (S/W), and extraction temperature (ETp) on polysaccharide extraction rate from *Lygodium japonicum* (Thumb.) Sw were investigated using response surface methodology (RSM), and the optimum extraction parameters were determined; ETm of 123.3 min, S/W of 1: 20.9 (w/v) and ETp of 49.9 °C. The predicted PS extraction rate reached 12.466%, and the result of verification experiment is  $12.85 \pm 0.18\%$  ( $n=3$ ). The antioxidant activities of the purified PS *in vitro* were evaluated and compared to standard antioxidant as Vitamin C. The results indicated that the purified PS showed strong antioxidant activities against  $O_2^{\cdot -}$  and  $\cdot OH$ .

**Key words:** *Lygodium japonicum* (Thumb.) Sw; polysaccharide (PS); superoxide anion free radical; hydroxyl free oxygen free radicals (OFRs); response surface methodology (RSM)

## Introduction

In recent years, some bioactive polysaccharide (PS) isolated from natural sources have attracted much attention in the field of biochemistry and pharmacology. They exhibit various biological activities<sup>[1]</sup>, such as strong antioxidant properties, and can be explored as a novel potential antioxidant<sup>[2]</sup>.

Fern is a sporous plant with fascicular, and now exists approximately 12,000 species around the globe. In China, there is about 61 families, 223 genus, 2600 species, there exist around 300 species may be selected for the purpose of medicine usage<sup>[3]</sup>. *Lygodium japonicum*

(Thumb.) SW, one of the most valued traditional Chinese medicines (TCMs), can be found in hillside, forest, bosk, and lawn in the Yangtze River drainage region and several southern provinces in China. The whole plant and mature spore of this plant have been used for the treatment of pneumonia, acute gastroenteritis, dysentery, urinary tract infection, skin eczema, nephritis dropsy, urine calculus, and so on<sup>[4]</sup>.

Currently, many works mainly centralized in its curative effects<sup>[5]</sup>, but less on the extraction parameters optimization using response surface methodology (RSM) and the function mechanism for supporting its versatile bioactivity, such as antioxidant activity. In this study, a RSM based on a three-factor-three-level Box-Bohnken Design (BBD) was employed to identify and optimize the critical, and significant extraction conditions that

will maximize the production of PS. And meanwhile, antioxidant activities *in vitro* against  $O_2^{\cdot -}$  and  $\cdot OH$  of purified PS were also investigated.

## Materials and Methods

### Plant materials and chemicals

Aerial part of *L. japonicum* was collected from Jiulang Mountain located in Zhuzhou city, Hunan Province and identified by LI Lan who graduated from Hunan University of Chinese medicine. The collection was naturally dried, and ground into powder. Vitamin C was purchased from Nanjing Jianchen Ltd., Co.. And all other chemicals and reagents were of analytical grade.

### Extraction and preparation of crude PS

*L. japonicum* was weighed (approx. 5.0 g) and dipped in proper amount of double distilled water, and extracted at a certain temperature for a period, and the resulting suspension was centrifuged (4000 g for 30 min), the resulting supernatant was then membrane-filtered (0.45  $\mu m$ , Millipore), the filtered aqueous solutions were cooled, and then, vacuum freeze-drying at  $-14^\circ C$ , giving a final volume of about 50 mL. Three volumes of anhydrous alcohol were added to this concentrate, the resulting mixture was placed in a refrigerator at  $-4^\circ C$  overnight. The resulting precipitate was separated by centrifugation, washed exhaustively using 96% alcohol, dissolved in deionized water, and prepared for further purification.

### Purification of crude PS

Trichloroacetic acid (TCA) was added to the crude PS solution to denature and precipitate protein, and dialyzed using dialysis bag at  $-4^\circ C$  overnight. Trace pigment was absorbed using activated charcoal. One hundred milligrams of crude PS was dissolved in distilled water and the resulting solution was membrane-filtered (0.45  $\mu m$ ) and applied to a DEAE-52 cellulose column (1.6  $\times$  40 cm). The column was eluted firstly with deionized water, and then successively with 0.5 mol/L KCl at a flow rate of 30 mL/h (data omitted). PS concentration in each fraction was monitored by the phenol-sulfuric acid method<sup>[6]</sup>, and then, purified PS was gained and collected for further investigations.

### Extraction parameters optimization of PS using

### RSM

The experimental design employed in the present study was a Box-Bohnken Design with three affected factors, i. e., extraction time (ETm), the ratio of sample to water (S/W) and extraction temperature (ETp). The experimental plan consisted of 17 trails and the value of the independent response was the mean of the triplicate. The second-order polynomial coefficients were calculated and analyzed using the 'Design expert' (Version 7.0.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) statistical package. Statistical analysis of the fitted model was employed to evaluate the analysis of variance (ANOVA).

### Determination of OFR scavenging activities in vitro

Sample solutions with different concentrations (0 ~ 300  $\mu g/mL$ ) were prepared for antioxidant appraisal.

### Determination of $O_2^{\cdot -}$

The ability of the purified PS to scavenge  $O_2^{\cdot -}$  was determined according to the method represented by Nishikimi<sup>[7]</sup>. The scavenging effect was calculated using the following equation.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

### Determination of $\cdot OH$

Measurement of  $\cdot OH$  scavenging activity of purified PS was investigated based on the approach described by Chung<sup>[8]</sup> with some modifications. The reaction mixture consisted of 0.1 mL of 10 mM  $FeSO_4$ , 0.1 mL of 10 mM EDTA, 0.5 mL of 10 mM  $\alpha$ -deoxyribose, 0.9 mL of sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 1.0 mL of various concentrations of PS sample and standard were thoroughly mixed in a tube separately. Hydrogen peroxide (0.2 mL, 10 mM) was then added and the reaction mixture was incubated at  $37^\circ C$  for 1 h. One milliliter of 2.8% TCA and 1.0 mL of 1.0% thiobarbituric acid (TBA) were added to the test tubes and boiled for 15 min. After cooling the mixture, the absorbance was measured at 532 nm. Sodium phosphate buffer (pH 7.4) instead of sample was used as blank. The scavenging activity was evaluated as the inhibition rate of  $\alpha$ -deoxyribose oxidation by  $\cdot OH$ . The scavenging effect was determined using the formula described by Ren<sup>[9]</sup>.

## Statistics

All the data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the triplicate. The values were regarded to be significantly different when  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

### Optimization of extraction parameters

In RSM, a prior knowledge to understand performance of the process and process variables under investigation is necessary for achieving a more realistic model<sup>[10]</sup>. Preliminary trials [(Plackett - Burman design, PBD) and (steepest ascent design, SAD)] indicated that the range of ETm (90 ~ 150 min), S/W (1:10 ~ 1:30, w/v) and ETp (45 °C ~ 55 °C) is beneficial for PS extraction. The range and levels of the three independent variables are presented in Table 1.

**Table 1** Level and code of variables chosen for Box-Bohnken Design

| Variables | Symbols |       | Coded levels |      |      |
|-----------|---------|-------|--------------|------|------|
|           | Uncoded | Coden | -1           | 0    | 1    |
| ETm/min   | $X_1$   | $x_1$ | 90           | 120  | 150  |
| S/W(w/v)  | $X_2$   | $x_2$ | 1:10         | 1:20 | 1:30 |
| ETp/°C    | $X_3$   | $x_3$ | 45           | 50   | 55   |

The design matrix of the variables in coded format is presented in Table 2. Each run was repeated in triplicate, and thus the values list in Table 2 were the average value of the triplicate, and meanwhile, the predicted values of the response were obtained from quadratic model fitting techniques and also be displayed in Table 2.

**Table 2** Box-Bohnken Design matrix along with the experimental and predicted values

| Run order | ETm ( $x_1$ ) | S/W ( $x_2$ ) | ETp ( $x_3$ ) | PS extraction rate (%) |                 |
|-----------|---------------|---------------|---------------|------------------------|-----------------|
|           |               |               |               | Experimental value     | Predicted value |
| 1         | -1            | 0             | -1            | 8.545                  | 8.23            |
| 2         | 1             | 1             | 0             | 9.849                  | 9.83            |
| 3         | 0             | 1             | 1             | 7.81                   | 7.52            |
| 4         | 1             | 0             | -1            | 9.12                   | 9.16            |
| 5         | 1             | -1            | 0             | 9.396                  | 9.06            |
| 6         | -1            | 1             | 0             | 8.682                  | 9.01            |
| 7         | 0             | -1            | 1             | 9.183                  | 9.20            |
| 8         | 1             | 0             | 1             | 8.583                  | 8.90            |

|    |    |    |    |        |       |
|----|----|----|----|--------|-------|
| 9  | 0  | 0  | 0  | 12.413 | 12.85 |
| 10 | 0  | -1 | -1 | 6.611  | 6.90  |
| 11 | -1 | -1 | 0  | 8.611  | 8.63  |
| 12 | 0  | 0  | 0  | 12.317 | 12.85 |
| 13 | 0  | 0  | 0  | 12.216 | 12.85 |
| 14 | 0  | 0  | 0  | 12.312 | 12.85 |
| 15 | 0  | 1  | -1 | 9.743  | 9.73  |
| 16 | -1 | 0  | 1  | 8.627  | 8.59  |
| 17 | 0  | 0  | 0  | 12.825 | 12.85 |

It can be seen from Table 2, there is a considerable variation for PS extraction rate depending on the extraction conditions. The replication at the central point conditions resulted in higher the PS extraction rate than at other levels. The predicted value ( $y$ ) can be fitted and described as:

$$y = 12.85 + 0.31x_1 + 0.29x_2 + 0.023x_3 + 0.095x_1x_2 - 0.15x_1x_3 - 1.13x_2x_3 - 1.45x_1^2 - 1.83x_2^2 - 2.25x_3^2 \quad (1)$$

Where  $y$  is the predicted value, and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the coded value of the tested variables.

The statistical significance of the fitted Eq. (1) was checked by F-test, and the ANOVA for quadratic model is summarized in Table 3.

**Table 3** ANOVA for the fitted quadratic polynomial model

| Source          | Sum of squares | $d_f$ | Mean square | $F$ -value | Probability ( $p$ ) > $F$ |
|-----------------|----------------|-------|-------------|------------|---------------------------|
| Model           | 55.87          | 9     | 6.21        | 52.96      | <0.0001                   |
| Lack-of-fit     | 0.59           | 3     | 0.20        | 3.47       | 0.1305                    |
| Pure error      | 0.23           | 4     | 0.057       |            |                           |
| Corrected total | 56.69          | 16    |             |            |                           |

$$R^2 = 0.9855, \text{Adj. } R^2 = 0.9669, \text{ and } R = 0.9943$$

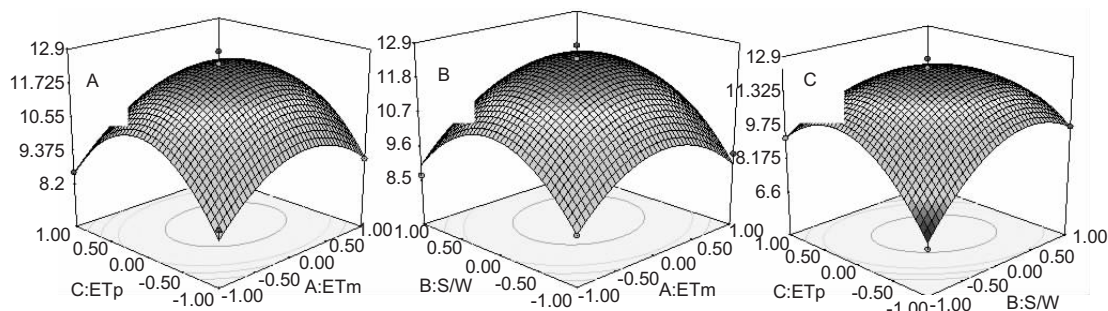
The value of *Adj. R*<sup>2</sup> (0.9669) suggests that 96.69% of total variation is attributed to the independent variables and only 3.31% of the total variation can not be explained effectively by this model. The value of *R* (0.9943) indicates good agreement between the predicted and experimental value. The value of lack-of-fit for quadratic regression Eq. (1) is not significant ( $p = 0.1305$ ), which indicates that the model equation was adequate for predicting the response under any combination of values of the variables. The coefficient estimates of Eq. (1), along with the corresponding  $p$ -value are presented in Table 4.

**Table 4 Results of regression analysis of a full second-order polynomial model**

| Model term  | Coefficient estimate | Standard error | Sum of Squares | Mean square | F-value | Probability ( $p$ ) > $F$ |
|-------------|----------------------|----------------|----------------|-------------|---------|---------------------------|
| Intercept   | 12.85                | 0.15           |                |             |         |                           |
| $x_1$ (ETm) | 0.31                 | 0.12           | 0.77           | 0.77        | 6.57    | 0.0373                    |
| $x_2$ (S/W) | 0.29                 | 0.12           | 0.65           | 0.65        | 5.56    | 0.0505                    |
| $x_3$ (ETp) | 0.023                | 0.12           | 0.004          | 0.004       | 0.036   | 0.8547                    |
| $x_1x_2$    | 0.095                | 0.17           | 0.036          | 0.036       | 0.31    | 0.5943                    |
| $x_1x_3$    | -0.15                | 0.17           | 0.096          | 0.096       | 0.82    | 0.3961                    |
| $x_2x_3$    | -1.13                | 0.17           | 5.07           | 5.07        | 43.28   | 0.0003                    |
| $x_1^2$     | -1.45                | 0.17           | 8.85           | 8.85        | 75.52   | <0.0001                   |
| $x_2^2$     | -1.83                | 0.17           | 14.13          | 14.13       | 120.56  | <0.0001                   |
| $x_3^2$     | -2.25                | 0.17           | 21.27          | 21.27       | 181.48  | <0.0001                   |

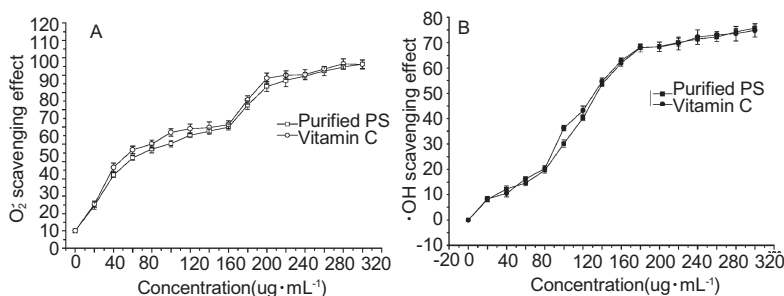
The  $p$ -values can be obtained from Table 4 that  $x_1$  is significant ( $P < 0.05$ ),  $x_1^2, x_2^2, x_3^2$  are extremely significant ( $P < 0.01$ ), nevertheless,  $x_2, x_3, x_1x_2, x_1x_3$  and

$x_2x_3$  are not significant ( $P > 0.05$ ). The 3D surface plot of the graphical description for the regression equation is presented in Fig. 1-A, 1-B and 1-C.

**Fig. 1 Response surface plot of effects of ETp and ETm, S/W and ETm, and ETp and S/W on PS extraction rate**

The main task of response surface is to hunt efficiently for the optimum values of the variables for maximizing the response. Elliptical contours are obtained when there is a perfect interaction between the independent variables [11]. The optimal predicted value was obtained by fitted model as approximately 12.446%. By solving the inverse matrix (from Eq. (1)), the optimum value

of the tested variables in coded format are  $x_1 = 0.11, x_2 = 0.09$  and  $x_3 = -0.02$ , in uncoded (natural) units are ETm of 123.3 min, S/W of 1:20.9 (w/v) and ETp of 49.9 °C, respectively. Under these conditions, the crude PS extraction rate of verification experiment is 12.85%  $\pm$  0.18% ( $n = 3$ ), slightly greater than that obtained from the plot analysis.

**Fig. 2  $O_2^-$  and  $\cdot OH$  scavenging capacity of the purified PS and Vitamin C**

## Scavenging activity of the purified PS to $O_2^{\cdot -}$ and $\cdot OH$

The  $O_2^{\cdot -}$  and  $\cdot OH$  scavenging capacities of the purified PS and standard vitamin C are shown in Fig. 2-A and Fig. 2-B, respectively.

Fig. 2-A illustrates that the purified PS was capable of scavenging  $O_2^{\cdot -}$  in a concentration- dependent manner ( linear regression equation is  $y = 5.9838x + 0.081$ ,  $R^2 = 0.9449$ ), which is similar with the results reported by Li X<sup>[3]</sup>. The 50% of  $O_2^{\cdot -}$  inhibition concentration ( $IC_{50\%} - O_2^{\cdot -}$ ) of purified PS and Vitamin C are 83.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 62.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The inhibition percentage of  $O_2^{\cdot -}$  generation by 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses of the purified PS and Vitamin C was found as 96.26% and 96.14%, respectively. The results demonstrated that the purified PS exhibits strong  $O_2^{\cdot -}$  scavenging activity, and could bear comparison with that of Vitamin C. The  $\cdot OH$  scavenging activity of purified PS and Vitamin C are presented in Fig. 2-B, the inhibition percentage of different purified PS concentrations on  $\cdot OH$  scavenging can be formulated as a linear regression equation  $y = 5.5912x - 1.2655$  ( $R^2 = 0.9207$ ). Results illustrated that the purified PS possesses a strong  $\cdot OH$  scavenging capacity. 50% of  $\cdot OH$  inhibition concentration ( $IC_{50\%} - \cdot OH$ ) for PS and Vitamin C are 91.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 66.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The percentage inhibition of  $\cdot OH$  generation by 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses of the purified PS and Vitamin C was found as 75.63% and 74.82%, respectively.

## Conclusion

In this study, a RSM based on a Box-Bohnken Design was applied for optimization of crude PS extraction. The optimum conditions were determined as ETm of 123.3 min, S/W of 1:20.9 (w/v) and ETp of 49.9  $^{\circ}\text{C}$ , the predicted value and verification experimental value of PS extraction rate are 12.446% and 12.850%, respectively. The antioxidant evaluation of purified PS *in vitro* revealed that PS possesses strong  $O_2^{\cdot -}$  and  $\cdot OH$  scavenging activity, which may be comparable to vitamin C. Through our investigations, it may be rational

to assure that PS from *L. japonicum* can be used as an effective OFRs scavenger and play its curative role in traditional medicine due to the mechanism of antioxidant ability in it.

## References

- 1 Yang L, Zhang LM. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydr Polym*, 2009, 3: 349-361.
- 2 Zou C, Du Y, Li Y, *et al.* Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro*. *Carbohydr Polym*, 2008, 2: 322-331.
- 3 Li X, Zhou A, Han Y. Antioxidation and antimicroorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum in vitro*. *Carbohydr Polym*, 2006, 66: 34-42.
- 4 Wynne G, Mander L, Oyama N, *et al.* An antheridiogen, 13-hydroxy-GA<sub>73</sub> methyl ester (GA<sub>109</sub>), from the fern *Lygodium circinnatum*. *Phytochemistry*, 1998, 7: 1177-1182.
- 5 Orellana C. Ferns and gastric cancer in the Venezuelan Andes. *The Lancet Oncol*, 2001, 3: 125.
- 6 Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, 350-356.
- 7 Nishikimi M, Appaji Rao N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 2: 849-854.
- 8 Chung S, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 1: 118-123.
- 9 Ren J, Zhao M, Shi J, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem*, 2008, 2: 727-736.
- 10 Xu H, Sun LP, Shi YZ *et al.* Optimization of cultivation conditions for extracellular polysaccharide and mycelium biomass by *Morchella esculenta* As51620. *Biochem Eng J*, 2008, 1: 66-73.
- 11 Muralidhar R, Chirumamila R, Marchant R *et al.* A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochem Eng J*, 2001, 1: 17-23.

# 发酵液中多拉菌素的提取和萃取条件研究

邹泽先<sup>1,2</sup>, 陈 新<sup>1</sup>, 张晓琳<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>武汉工业学院, 武汉 430023; <sup>2</sup>国家粮食局科学研究院, 北京 100037

**摘要:**采用单因素实验, 分别研究提取试剂、发酵液放置时间、pH 值和温度对发酵液中多拉菌素提取效果的影响; 然后以乙酸乙酯为萃取试剂, 研究萃取次数及萃取体积对多拉菌素萃取效果的影响。结果显示, 甲醇为最佳提取试剂; 发酵液在 pH 为 3~11、温度为 20~80 °C 的条件下放置 144 h, 多拉菌素均能稳定存在, 提取得到的多拉菌素的质量浓度没有显著变化; 浓缩提取液液经 2 倍体积乙酸乙酯萃取 2 次即可。该条件下多拉菌素的质量浓度和萃取率分别为 151.78 μg/mL 和 98.00%。

**关键词:**多拉菌素; 发酵液; 萃取条件

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Extraction Conditions of Doramectin in Fermentation Broth of *Streptomyces avermitilis*

ZOU Ze-xian<sup>1,2</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-lin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; <sup>2</sup>Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China

**Abstract:** The optimal extraction conditions of doramectin in fermentation broth of *Streptomyces avermitilis* were investigated by parallel experiments. Factors including distribution ratio of doramectin in fermentation broth (hyphae or supernatant), extractants, extraction times, storage time, pH and temperature on extraction results were investigated with one-factor experiments. Meanwhile, the optimal extraction times and extracting volume were optimized based on using ethyl acetate. The optimal extraction conditions of doramectin in fermentation broth of *Streptomyces avermitilis* were obtained as follows: the optimal extraction solvent was methanol, and doramectin in fermentation broth could be stored for at least 144 h within the conditions of pH from 3 to 11 and temperature from 20 to 80 °C. Using ethyl acetate to extract doramectin, twice was the optimal extracting time, and the twice volume of ethyl acetate and concentrated extract was the best extraction proportion. Under the optimal extraction conditions, the concentration of doramectin and its extraction rate were 151.78 μg/mL and 98.00%, respectively.

**Key words:** doramectin; fermentation broth; extraction condition

多拉菌素(doramectin)为20世纪90年代研制开发的新一代大环内酯类抗寄生虫药,是以环己烷羧酸(cyclohexanecarboxylic acid)为前体,通过基因重组的阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)新菌株发酵而成的一种阿维菌素类抗生素<sup>[1,2]</sup>。经近20年的研究,它被认为是目前阿维菌素族中最优秀的抗寄生虫药物之一,为内外兼杀剂,对线虫、节肢动物均有良好的驱杀效果<sup>[3]</sup>,其在动物体内的代谢具有血药浓度高、半衰期长、消除缓慢的特点<sup>[2]</sup>,是目前具有开发潜力的兽用抗寄生虫药物之一<sup>[4]</sup>。

多拉菌素的优良性能使得其在养殖业及宠物业上应用较为广泛,但我国国内对于多拉菌素的研发则还只是处于初级阶段<sup>[5]</sup>,目前多拉菌素的国内外文献报道多集中在其药代动力学研究和残留检测等方面<sup>[6]</sup>,包括以SPE固相萃取柱建立高通量的检测方法<sup>[7]</sup>,以及以LC-MS快速分离并定量检测微量残留药物的方法<sup>[8]</sup>,但有关多拉菌素提取及分离、纯化方面则未见系统研究报道。本文旨在对多拉菌素发酵液的分离纯化方面进行探索研究,为后续研究提供理论依据。

## 1 材料、仪器与方法

### 1.1 材料与常用仪器

#### 1.1.1 菌种

菌种 *Streptomyces avermitilis* XJ-8-115, 由国家粮

收稿日期: 2011-02-17 接受日期: 2011-08-31

基金项目: 国家“863”计划高技术研究发展计划资助项目“生物兽药新产品研究和创制”(2006AA10A208-1)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-81763841; E-mail: zxl@chinagrain.org

食局科学研究院筛选保藏。

### 1.1.2 材料

多拉菌素发酵液(国家粮食局科学研究院提供);多拉菌素标准品购自 Sigma,纯度 97.8%;甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、异丙醇盐酸及氢氧化钠均为分析纯,由北京化工厂生产;甲醇、乙腈为色谱纯,Merck 公司生产。

### 1.1.3 培养基

种子培养基:可溶性淀粉 30 g/L,酵母提取物 2 g/L,大豆蛋白 2 g/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mg/L,pH 7.0~7.2,250 mL 三角瓶装样量为 50 mL。

发酵培养基:可溶性淀粉 70 g/L,酵母膏 16 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.5 g/L,KCl<sub>4</sub> g/L,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mg/L,pH 7.0~7.2,250 mL 三角瓶装样量为 50 mL。

培养基的灭菌条件是 121 °C 灭菌 30 min。

### 1.1.4 仪器

高效液相色谱仪(2487 检测器,515 泵,717 进样器,美国 waters 公司);UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计(美国 Unico 公司);Eppendorf 5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);Delta 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);SPY50 双层培养摇床(上海市离心机械研究所);SHB-III 型水循环多用真空泵。

## 1.2 多拉菌素发酵提取液的浓缩提取液的制备

取 1L 多拉菌素发酵液,加入 3 倍的甲醇(V/V),震荡摇匀,室温下提取 12 h,减压抽滤得到上清液,减压浓缩至原体积的 1/3~1/4,即得到多拉菌素发酵液的浓缩提取液。

## 1.3 多拉菌素的标准曲线的绘制

准确称取多拉菌素标准品 0.0250 g,置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度线,配制成质量浓度为 500 μg/mL 的多拉菌素标准母液,然后再依次稀释成质量浓度分别为 300、200、100、50、20、10、5 μg/mL 的多拉菌素标准溶液,将多拉菌素标准溶液在以下色谱条件下进样检测。色谱柱:Agilent Nucleosil 100—5 C<sub>18</sub>,3.5 μm,250 mm×4.0 mm;流动相:甲醇—乙腈水溶液(V<sub>甲醇</sub>:V<sub>乙腈</sub>:V<sub>水</sub>)=45:45:10;流速:1.0 mL/min;进样量 10 μL;检测波长:245 nm;柱温:25 °C。以多拉菌素标准溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

## 1.4 不同因素对多拉菌素发酵液提取效果的影响

### 1.4.1 不同的提取试剂

取 5 组 50 mL 的多拉菌素发酵液,加入 3 倍体

积的不同有机溶剂:甲醇、乙醇、乙腈、丙酮及异丙醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度,考察不同的提取试剂对多拉菌素提取效果的影响。各组设置 3 个重复。

### 1.4.2 发酵液 pH

取 7 份 50 mL 的多拉菌素发酵液,分别用 6 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 3、5、原始对照(pH 为 6.36)、7、9、11、13,避光 4 °C 放置 8 h,再调各组溶液的 pH 至中性,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组均设 3 个重复,考察 pH 对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

### 1.4.3 发酵液的放置时间

取 15 组 50 mL 的多拉菌素发酵液,分别避光 4 °C 放置 2、4、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组均设 3 个重复,考察不同放置时间对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

### 1.4.4 不同温度

以具塞三角瓶分别取 7 组 50 mL 多拉菌素发酵液,分别置于不同温度的水浴锅:20、30、40、50、60、70、80 °C,放置水浴锅中 8 h 后,加入 3 倍体积的甲醇,震荡摇匀并于室温提取 12 h 后,减压抽滤得到上清液,再取上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定各组溶液中多拉菌素的质量浓度。各组设定 3 个重复,考察温度对多拉菌素发酵液提取效果的影响。

## 1.5 不同因素对多拉菌素浓缩提取液的萃取效果的影响

### 1.5.1 萃取次数

取 50 mL 的多拉菌素发酵液的浓缩提取液,加入等体积的乙酸乙酯,分别萃取 1、2、3 次,合并每次的有机相,有机相经减压浓缩干燥后加入 50 mL 的甲醇至完全溶解,取样经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定其中多拉菌素的质量浓度,每组重复 3 次。考察不同萃取次数对多拉菌素的萃取效

果的影响。

### 1.5.2 萃取试剂的体积

取 6 组 50 mL 的多拉菌素发酵液的浓缩提取液,加入不同体积的乙酸乙酯萃取,使  $V_{\text{浓缩提取液}}$ :

$V_{\text{乙酸乙酯}}$  分别为 1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,取有机相减压浓缩干燥后加入 50 mL 的甲醇至完全溶解,取样经 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,HPLC 分别测定其中多拉菌素的质量浓度。每组设定 3 个重复,考察不同萃取体积对多拉菌素的萃取效果的影响。

### 1.6 发酵液中多拉菌素质量浓度的测定

“1.4”及“1.5”项下各实验中多拉菌素的质量浓度的测定,均以“1.3”中多拉菌素的标准曲线求得,即以 HPLC 测定得到多拉菌素的峰面积,再由标准曲线得出其质量浓度。

### 1.7 多拉菌素的萃取率的计算

萃取率 = (萃取溶剂中多拉菌素的总量/提取液中多拉菌素的总量)  $\times 100\%$

### 1.8 数据处理

数据均采用 Originlab 8.0 软件进行分析和统计,每一个系数的显著性通过 Student  $t$  检验和  $P$  值来衡量。

## 2 结果与分析

### 2.1 多拉菌素标准曲线的绘制

以多拉菌素标准液的质量浓度与峰面积为横纵坐标绘制标准曲线,得到其回归方程:  $Y \times 10^{-4} = 1.7623X - 0.4938$ ,线性相关系数为 0.9998。该标准曲线显示多拉菌素在线性范围 5 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内具有良好的线性关系。根据此标准曲线能准确地得到多拉菌素的实际质量浓度。

### 2.2 不同因素对发酵液中多拉菌素提取效果的影响

#### 2.2.1 不同的提取试剂

实验表明不同的提取试剂效果差异显著,以乙腈及甲醇的提取效果较好,它们提取得到多拉菌素的质量浓度分别为 147.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 142.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,但两者差异不显著 ( $P > 0.05$ );同时,甲醇的成本及毒性均较乙腈低。故提取试剂选择甲醇。

#### 2.2.2 发酵液 pH

图 1 所示即为发酵液 pH 对多拉菌素提取效果的影响。由图可以看出,在 pH 为 3 ~ 11 范围内,多拉菌素比较稳定;但当发酵液 pH 为 13 时,多拉菌素已经无法被检测出。这可能是由于在强碱性条件下,多拉菌素的结构发生改变,使得多拉菌素发生降

解或变为其它未知物质,而不能被检测出。多拉菌素在 pH 为 3 ~ 11 范围内均较稳定,提取效果良好,故提取发酵液时不需要调节 pH 值。

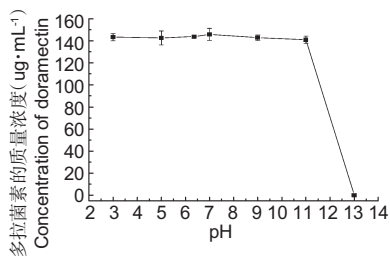


图 1 发酵液 pH 对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 1 Effects of pH on the extraction results of doramectin

#### 2.2.3 发酵液的放置时间

发酵液放置时间对多拉菌素提取效果的影响见图 2。从图 2 可以看出,在 2 ~ 144 h 内,发酵提取液中测得的多拉菌素的含量是趋于稳定的。所以,多拉菌素发酵液在避光条件下,放置一周是可行的。

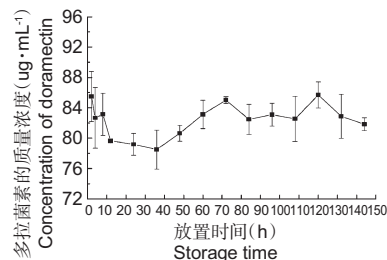


图 2 发酵液放置时间对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 2 Effects of storage time on the extraction results of doramectin

#### 2.2.4 不同温度

图 3 所示即为温度对多拉菌素提取效果的影响。如图所示,在 20 ~ 80  $^{\circ}\text{C}$  条件下,均能提取得到多拉菌素,且提取液中多拉菌素的质量无显著性差异 ( $P > 0.05$ );且温度的升高,有利于蛋白等杂质沉淀。故在 20 ~ 80  $^{\circ}\text{C}$  均能提取出多拉菌素,其在 20 ~ 80  $^{\circ}\text{C}$  条件下稳定,选定多拉菌素的提取温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

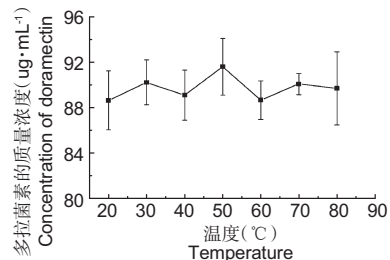


图 3 温度对多拉菌素提取效果的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the extraction results of doramectin



## 2.3 不同因素对多拉菌素萃取效果的影响

### 2.3.1 萃取次数

随着萃取次数的增加,萃取率也增大。萃取1次仅能达到89.41%,萃取2次可达98%,萃取2次和萃取3次的效果则没有明显的差异( $P > 0.05$ )。故从成本及试剂回收的角度,选择乙酸乙酯对多拉菌素的浓缩提取液萃取2次即可。

### 2.3.2 萃取试剂的体积

随着设定比例中乙酸乙酯与浓缩提取液体积比的增大,萃取率也随之增大。在实验过程中,当萃取剂体积小于发酵液体积时,有明显的乳化现象,待静置较长时间分层后,测得萃取率为65.57%;当比例增大至2:1时,萃取率增大至96.71%,与更大萃取体积得到的萃取率差异不显著( $P > 0.05$ ),所以综合考虑选择 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{多拉菌素浓缩提取液}}$ 为2:1。

## 3 讨论

本实验考察了多因素对多拉菌素提取及萃取效果的影响。结果显示,在对提取试剂优化实验中,得到更为廉价和低毒的甲醇作为提取试剂。多拉菌素在设定的温度、放置时间及pH为3~11的范围内均较稳定。萃取实验中以乙酸乙酯为萃取剂,优化得出其与多拉菌素浓缩提取液的体积比例为2:1,萃取2次即可。

本实验中发现,发酵液中多拉菌素在pH为3~11时稳定存在。在pH值为13时,检测不到多拉菌素,故推测多拉菌素发生变化,降解至其它物质而不能被检测到。提取试剂实验中,乙腈极性较甲醇大,提取效果优于甲醇;但是乙腈成本及毒性也都较甲

醇高,且两者提取所得多拉菌素的质量浓度差异不显著( $P > 0.05$ );故选择甲醇做完提取试剂。本文选择3倍浸提试剂提取菌体,是由预实验完成并在本文验证,菌丝体经3倍甲醇浸提2次即可浸提完全。

### 参考文献

- Mckellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbermycins. *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19:331-351.
  - Mckellar QA. Developments in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anthelmintic drugs. *J Vet Pharmacol Ther*, 1997, 20(suppl. 1):10-19.
  - Hu HB(扈洪波), Zhu BL(朱蓓蕾), Li JS(李俊锁). Progress in research of avermectins. *Chin J Anim Vet Sci*(畜牧兽医学报), 1999, (6):520-529.
  - Fang CL(房春林), Yang GY(杨光友), Gu XB(古小彬). Progress in research of doramectin. *China Anim Husb Vet Med*(中国畜牧兽医), 2006, 33:55-57.
  - Zhou XZ(周绪正), Zhang JY(张继瑜), Li JS(李金善), et al. Effects and application methods of doramectin. *China Rural Sci Technol*(中国农村科技), 2005, 11:37-38.
  - Gao YH(高玉红), Gu ZC(郭照成), Liu FY(刘方悦), et al. Research advancement and application of doramectin. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大学学报), 2009, 40:141-144.
  - Harrison AC, Walker DK. Automated 96-well solid phase extraction for the determination of doramectin in cattle plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, (16):777-783.
  - Hernando MD, Su'arez-Barcena JM, Bueno MJM, et al. Fast separation liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *J Chromatogr A*, 2007, (1155):62-73.
- (上接第104页)
- He XY(何晓燕), Zhang LY(张利英), Bai XF(白雪芳), et al. Bioactivity of oligosaccharide produced by depolymerisation of xanthan with xanthan-degrading enzyme. *Microbiol*(微生物学通报), 2005, 32(3):87-90.
  - Yao Q(姚倩), Sun T(孙涛), Xu YX(徐轶霞). Preparation of chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2008, 20:530-533.
  - Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*, 1995, 43:27-32.
  - Su L, Ji WK, Lan WZ, et al. Chemical modification of xanthan gum to increase dissolution rate. *Carbohydr Polym*, 2003, 53:497-499.
  - Zhu HW(朱淮武). Spectral Analysis for the Structure of Organic Compounds(有机分子结构波谱解析). Beijing: Chemical Industry Press, 2008. 50-51.
  - Tian YL(田益玲), Chen GH(陈冠华), Wei XY(魏显有). Determination of eliminating ration of Chinese traditional medicines for hydrogen peroxide by fluorescence spectrophotometry. *J Anal Chem*, 2002, 30:183-185.
  - Duh PD, Du PC, Yen GC. Action of methanolic extract of mung bean bulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37:1055-1059.
  - XQ Zha, JH Wang, XF Yang, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydr Polym*, 2009, 78:570-575.
  - Christensen BE, Myhr MH, Smidsrød O. Degradation of double-stranded xanthan by hydrogen peroxide in the presence of ferrous ions. *Carbohydr Polym*, 1995, 280:85-99.

# 响应面设计法优化仙鹤草总多酚的超声提取工艺

徐秀泉<sup>1\*</sup>,李峰<sup>2</sup>,汤建<sup>1</sup>,许源<sup>1</sup>

<sup>1</sup>江苏大学药学院,镇江 212013;<sup>2</sup>江苏大学附属医院,镇江 212001

**摘要:**在单因素实验的基础上,采用响应面分析法对影响超声辅助提取仙鹤草总多酚得率的主要因素(超声温度、料液比和乙醇浓度)进行优化,建立了影响因素与总多酚之间的函数关系。获得最佳工艺条件为:71%乙醇,料液比 1:24,超声提取温度 60℃,提取时间 20 min。在此最佳条件下,总多酚得率为 3.56%,试验结果与模型预测值相符。

**关键词:**仙鹤草;总多酚;超声提取;响应面设计法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

## Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. by Response Surface Methodology

XU Xiu-quan<sup>1\*</sup>, LI Feng<sup>2</sup>, TANG Jian<sup>1</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

<sup>2</sup>Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) was used to optimize ultrasonic-assisted extraction for total polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. based on single-factor experiment. The main factors extraction temperature, liquid-material ratio and ethanol concentration were determined. The relationship between influencing factors and response values was established. The optimum extraction conditions were as follows: the extracting solvent was 71% ethanol, solid-liquid ratio was 1:24, extracting temperature was 60℃, and extracting time was 20 min. Under these conditions, the maximal yield of total polyphenols reached 3.56%, which was well matched with the predicted content.

**Key words:** *Agrimonia pilosa* Ledeb.; total polyphenols; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

植物多酚是植物次生代谢产物中的重要类型之一,主要由黄酮、单宁等物质构成,因其具有显著的抗氧化、抗癌、抗炎及抗突变活性而引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。仙鹤草为蔷薇科龙芽草属植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的全草,在我国具有悠久的药用历史,主要用于治疗衄血、咯血、尿血、便血、崩漏等各种出血证<sup>[2]</sup>。其中酚类物质为仙鹤草酚 A~E,山萘酚、槲皮素及其苷类是其抗氧化、抗炎、抗肿瘤的主要有效成分<sup>[3,4]</sup>,因此研究仙鹤草多酚化合物的提取工艺对仙鹤草的深入开发利用具有重要的意义。

近年来,陈优生<sup>[5]</sup>等采用正交设计法优化了仙鹤草总黄酮的提取工艺,赵立芳<sup>[6]</sup>等采用单因素实验法考察了影响仙鹤草鞣质提取得率的主要因素,

为中药材仙鹤草的利用提供了实验基础,但采用超声提取仙鹤草中有效成分的工艺还未见报道。超声波具有强大的传质作用和空化作用,使溶剂分子迅速渗透到组织细胞中,与溶质充分接触,可以显著提高有效成分的提取率,广泛用于多酚等化合物的提取过程中<sup>[7,8]</sup>。本文在单因素预试验的基础上,采用响应面设计方法优化仙鹤草总多酚超声提取工艺参数,为更好地开发该传统中药提供实验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

仙鹤草购自江苏镇江九泰医药有限公司,干燥、粉碎过 16 目筛备用。

试验试剂:没食子酸, Folin-Ciocaltean 试剂购自 Sigma 公司,药用乙醇购自国药集团。

### 1.2 仪器与设备

UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DHG-9145 鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公

收稿日期:2011-03-18 接受日期:2011-06-24

基金项目:镇江市社会发展项目(SH2010033)

\*通讯作者 Tel:86-511-85038403;E-mail:xxq781026@sohu.com

司);KQ-250DB 型超声波仪(昆明市超声仪器有限公司);BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 标准曲线的绘制

精密称取没食子酸对照品 25.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加乙醇适量溶解,定容至刻度,摇匀,取上述溶液 2.5 mL 定容至 25 mL 溶液即得  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  没食子酸标准溶液。分别精密量取该标准溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,分别加入福林酚试剂 0.5 mL,振摇 1 min,再加入 20% 碳酸钠溶液 2 mL,摇匀,加溶剂至刻度,在室温放置 2 小时。以相应的试剂溶液为空白,按分光光度法,在 750 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得  $Y = 0.0147X - 0.0017, R^2 = 0.9994$ ,结果表明没食子酸在浓度  $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

#### 1.3.2 仙鹤草总多酚的提取及含量测定

准确称取 1.000 g 仙鹤草粉末,加入一定体积分数的乙醇溶液 20 mL,在一定温度超声提取规定时间,离心后按照标准曲线项下测定样品吸光度,计算多酚得率。

## 2 结果与分析

### 2.1 响应面实验设计

#### 2.1.1 响应面试验安排及试验结果

根据中心组合设计原理,结合响应面分析方法,综合单因素预试验结果,固定提取时间 20 min,以料液比、乙醇浓度、超声温度三个因素为自变量,总多酚的提取得率为响应值,设计 3 因素 3 水平共 17 个实验点的响应面分析实验。对提取温度、料液比、乙醇浓度作如下变化: $X_1 = (x_1 - 50)/10, X_2 = (x_2 - 20)/50, X_3 = (x_3 - 60)/20$ ,因素水平分析选取见表 1。实验方案与结果见表 2,其中 12 个为析因实验,5 个为中心实验。

表 1 响应面因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of RSM test

| 因素<br>Factor             | 代码<br>Code | 编码水平 Level |    |    |
|--------------------------|------------|------------|----|----|
|                          |            | - 1        | 0  | 1  |
| 提取温度<br>Temperature (°C) | $x_1$      | 40         | 50 | 60 |

| 料液比<br>Solid-liquid ratio (g/mL) | $x_2$ | 1:15 | 1:20 | 1:25 |
|----------------------------------|-------|------|------|------|
| 乙醇浓度<br>Concentration (%)        | $x_3$ | 40   | 60   | 80   |

表 2 响应面分析试验结果

Table 2 Design and results of RSM test

| 试验号<br>No. | 编码值 Unicode |       |       | 总多酚得率<br>Polyphenols yield (%) |
|------------|-------------|-------|-------|--------------------------------|
|            | $X_1$       | $X_2$ | $X_3$ |                                |
| 1          | - 1         | - 1   | 0     | 2.43                           |
| 2          | - 1         | 1     | 0     | 3.14                           |
| 3          | - 1         | 0     | 1     | 2.80                           |
| 4          | - 1         | 0     | - 1   | 2.75                           |
| 5          | 1           | - 1   | 0     | 3.01                           |
| 6          | 1           | 1     | 0     | 3.58                           |
| 7          | 1           | 0     | - 1   | 3.12                           |
| 8          | 1           | 0     | 1     | 3.36                           |
| 9          | 0           | 1     | - 1   | 2.92                           |
| 10         | 0           | 1     | 1     | 3.42                           |
| 11         | 0           | - 1   | 1     | 2.75                           |
| 12         | 0           | - 1   | - 1   | 2.60                           |
| 13         | 0           | 0     | 0     | 3.29                           |
| 14         | 0           | 0     | 0     | 3.34                           |
| 15         | 0           | 0     | 0     | 3.30                           |
| 16         | 0           | 0     | 0     | 3.31                           |
| 17         | 0           | 0     | 0     | 3.36                           |

#### 2.1.2 建立模型方程与显著性检验

应用 Design-Expert 7.1.6 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,得到超声温度( $X_1$ )、料液比( $X_2$ )、乙醇浓度( $X_3$ )与仙鹤草总多酚之间的二次多项回归方程:

$$Y = 3.32 + 0.24 X_1 + 0.28X_2 + 0.12X_3 - 0.035 X_1 X_2 + 0.048 X_1 X_3 + 0.088X_2 X_3 - 0.09X_1^2 - 0.18 X_2^2 - 0.21 X_3^2$$

对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

表 3 仙鹤草总多酚提取率方差分析结果

Table 3 AVONA of total polyphenols extraction rate of *Agrimonia pilosa* Ledeb.

| 方差来源<br>Source | 平方和<br>SS | 自由度<br>V | 均方和<br>MS | F 值<br>F | 显著性水平<br>$P > F$ |
|----------------|-----------|----------|-----------|----------|------------------|
| $X_1$          | 0.48      | 1        | 0.48      | 106.90   | $< 0.0001$ ***   |
| $X_2$          | 0.64      | 1        | 0.64      | 144.86   | $< 0.0001$ ***   |

|                 |       |    |                  |       |             |
|-----------------|-------|----|------------------|-------|-------------|
| $X_3$           | 0.11  | 1  | 0.11             | 24.84 | 0.0016 **   |
| $X_1 X_2$       | 0.005 | 1  | 0.005            | 1.10  | 0.7328      |
| $X_1 X_3$       | 0.009 | 1  | 0.009            | 2.03  | 0.1973      |
| $X_2 X_3$       | 0.031 | 1  | 0.031            | 6.89  | 0.0342 *    |
| $X_1^2$         | 0.04  | 1  | 0.04             | 9.00  | 0.0199 *    |
| $X_2^2$         | 0.14  | 1  | 0.14             | 31.54 | 0.0008 **   |
| $X_3^2$         | 0.19  | 1  | 0.19             | 43.77 | 0.0003 **   |
| 残差 Residual     | 0.031 | 7  | 0.004            |       |             |
| 失拟项 Lack of Fit | 0.028 | 3  | 0.009            | 10.87 | 0.0215      |
| 误差 Pure Error   | 0.003 | 4  | 0.0008           |       |             |
| 总离差 Cor Total   | 1.72  | 16 |                  |       |             |
| 模型 Model        | 1.69  | 9  | 0.19             | 42.19 | <0.0001 *** |
| 模型的确定系数 0.9809  |       |    | 模型的调整确定系数 0.9586 |       |             |

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

由表3回归方差显著性检验表明,一次项超声提取时间、温度对总多酚得率的线性效应极显著,乙醇浓度对多酚得率的线性效应显著;二次项料液比、乙醇浓度对总多酚提取率的曲面效应极显著;比较各因子间交互作用不显著。在本实验设计范围内回归方程显著性检测  $P = 0.0001$ ,极显著,模型的确定系数为0.9809,说明该模型能解释98.09%响应值的变化,即该模型与实际实验拟合良好,试验误差小,证明应用响应曲面法优化的提取工艺提取仙鹤草总多酚是可行的。

### 2.1.3 响应曲面分析

根据回归方程,做出响应面和等高线,考察拟合响应面的形状,分析超声温度、料液比和乙醇浓度对仙鹤草总多酚提取率的影响,如图1~3所示。等高线的形状可反应交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。从图1~3中

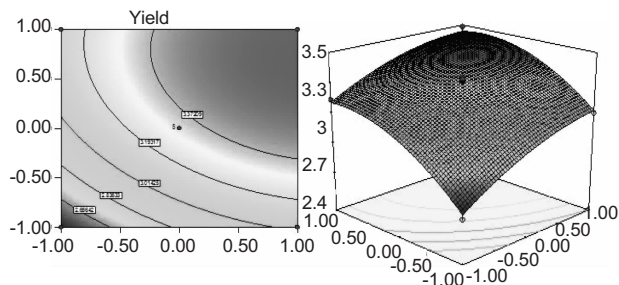


图1 超声温度和料液比对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 1 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of extraction temperature and material-liquid ratio on extraction rate

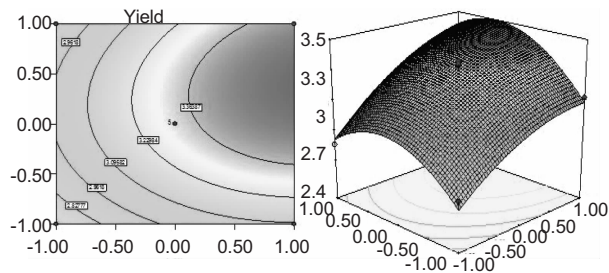


图2 超声温度和乙醇浓度对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 2 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of extraction temperature and ethanol concentration on extraction rate

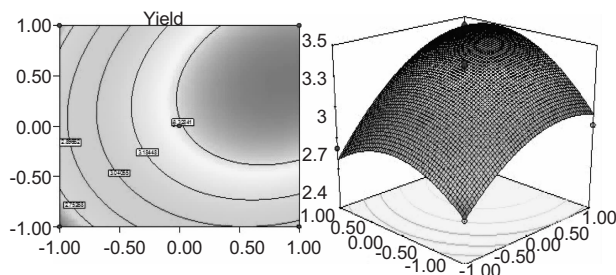


图3 料液比和乙醇浓度对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of material-liquid ratio and ethanol concentration on extraction rate

可以看出,各因素间的交互作用不显著。从等高线图可以看出极值条件应在圆心处,三因素对仙鹤草总多酚的提取都有显著的影响,超声提取温度的影响最为显著,随温度提高,总多酚得率随之增大,表现为等高线更为陡峭;料液比和乙醇浓度次之,表现为等高线曲线较平滑。

### 2.1.4 提取工艺条件的确定

为验证仙鹤草总多酚超声提取模型方程的适用性,对回归方程求导,并令其等于零,可以得到曲面的最大点,即三个主要因素的最佳水平值,分别为: $X_1 = 1$ 、 $X_2 = 0.81$ 、 $X_3 = 0.55$ ,转换后得到提取的最佳条件为:71%乙醇,料液比1:24,超声提取温度60℃,提取时间20 min,预测仙鹤草总多酚得率为3.61%。按照最佳试验条件重复试验3次,计算多酚得率,求其平均值为3.56%,实际与预测的多酚得率较为接近,充分验证了所建模型的正确性,说明响应面分析方法适用于仙鹤草总多酚的超声提取工艺的优化。

### 3 结论

采用响应面分析法对超声辅助提取仙鹤草总多酚的工艺条件进行优化,获得最佳提取工艺条件:71%乙醇,料液比1:24,超声提取温度60℃,提取时间20min,在此条件下仙鹤草总多酚得率为3.56%。超声提取方法简单,具有提取效率高、时间短、无需加热等优点,是一种较理想的提取仙鹤草多酚的方法。

#### 参考文献

- 1 Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products; antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99: 191-203.
- 2 Pan Y(潘娅), Liu HX(刘红霞), Zhuang YL(庄玉磊), et al. Studies on isolation and identification of flavonoids in herbs of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 2925-2928.

- 3 Chun HH, Xiao WJ, Ying MP, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res*, 2010, 19: 448-461.
- 4 Taira J, Nanbu H, Ueda K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb. on LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Food Chem*, 2009, 115: 1221-1227.
- 5 Chen YS(陈永生), Zhang K(张焜), Wang X(王希). Optimization of extract technology of flavonoids in *Agrimonia pilosa* by orthogonal design test. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 14: 1389-1390.
- 6 Zhao LF(赵立芳), Zhang XL(张新利). Extracting tannin from *Herba Agrimoniae*. *J Baoji Coll Arts Sci* (宝鸡文理学院学报), 2000, 20: 196-197.
- 7 Ma YQ, Chen JC, Liu DH. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts; Effect of ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 2009, 16: 57-62.
- 8 Wang J, Sun BG, Cao YP. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*, 2008, 106: 804-810.

(上接第131页)

- 40 Džubák P, et al. New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 3793-3810.
- 41 Li SS(李绍顺), et al. Total synthesis of 2R,3R(+)-silybin as an antihepatotoxic natural product. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1997, 7: 107-111.
- 42 She XG, et al. Total synthesis of (+)-Sinaiticin. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 4567-4570.
- 43 Gu WX, et al. First asymmetric synthesis of chiral 1,4-benzodioxane lignans. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41: 6079-6082.
- 44 Stermitz FR, et al. Synergy in a medicinal plant; antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrocarpin, a multidrug pump inhibitor. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1433-1437.
- 45 Stermitz FR, et al. 5'-Methoxyhydrocarpin-D and pheophorbide A; berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant staphylococcus aureus. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1146-1149.
- 46 Stermitz FR, et al. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump

- inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia* (sensu strictu) species. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 793-798.
- 47 Guz NR, Stermitz FR. Synthesis and structures of regioisomeric hydrocarpin-type flavonolignans. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1140-1145.
- 48 Guz NR, et al. Flavonolignan and flavone Inhibitors of a staphylococcus aureus multidrug resistance pump; structure-activity relationships. *J Med Chem*, 2001, 44: 261-268.
- 49 Yang LX, et al. Synthesis and antioxidant evaluation of novel silybin analogues. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2006, 21: 399-404.
- 50 Gong JX, et al. Synthesis and antioxidant properties of novel silybin analogues. *Chin Chem Lett*, 2006, 17: 465-468.
- 51 Saller R, et al. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 2001, 61: 2035-2063.
- 52 Jacobs BP, et al. Milk thistle for the treatment of liver disease; a systematic review and meta-analysis. *Am J Med*, 2002, 113: 506-515.
- 53 Gazak R, et al. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 315-338.

# 黄皮的化学成分及生物活性研究进展

张瑞明<sup>1,2</sup>, 万树青<sup>1\*</sup>, 赵冬香<sup>2</sup>

<sup>1</sup>农药与化学生物学教育部重点实验室 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广州 510642;

<sup>2</sup>中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 儋州 571737

**摘要:** 黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels 是广泛分布于我国南方的一种特产果树, 含有生物碱类、香豆素类、挥发油类、黄酮类等多种化学成分, 具有抗氧化、保肝、降血糖以及杀虫、抑菌和除草等多方面的生物活性。本文就黄皮的化学成分及其生物活性的研究现状进行了综述。

**关键词:** 黄皮; 化学成分; 生物活性; 药理作用

中图分类号: Q946.8; R285.5

文献标识码: A

## Advances in Chemical Constituents and Biological Activities of *Clausena lansium*

ZHANG Rui-ming<sup>1,2</sup>, WAN Shu-qing<sup>1\*</sup>, ZHAO Dong-xiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; <sup>2</sup>Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou, 571737, China

**Abstract:** Wampee (*Clausena lansium* Lour. Skeels) is a special fruit tree widely distributed in South China. The major chemical constituents are alkaloids, coumarins, essential oils and flavonoids, which showed a variety of biological activities such as antioxidant, hepatoprotective, hypoglycemic as well as insecticidal, antimicrobial and herbicidal activities. Advances in the chemical constituents and biological activities of *Clausena lansium* were briefly reviewed.

**Key words:** *Clausena lansium*; chemical constituents; biological activities; pharmacological effects

黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels 属芸香科黄皮属 (*Clausena*) 植物, 别名黄批、黄弹、黄皮子、黄弹子、黄檀子、黄坛子等<sup>[1]</sup>。黄皮是原产于我国热带以及亚热带地区的一种特产果树, 在我国至少有 1500 年的栽培历史。国内主要分布于广东、广西、福建、台湾、云南、海南等地。在国外, 印度、越南、泰国、斯里兰卡、马来西亚等东南亚国家以及美国的佛罗里达州等地均有栽种<sup>[2]</sup>。

黄皮具有很高的药用价值, 黄皮的果、叶、根、种子均能入药。黄皮的果实有行气、消食、化痰之功效, 主治食积胀满, 脘腹疼痛, 疝痛, 痰饮, 咳喘<sup>[3]</sup>。根、叶及种子也可治腹痛、胃痛、感冒发热等症。20 世纪 80 年代, 杨明河等<sup>[4-6]</sup>报道, 从黄皮叶片中分离得到黄皮酰胺类化合物, 并发现该类化合物具有较大的药理活性。此后, 对黄皮活性成分的分离以及

药理作用的研究在医药界得到广泛的关注。近年来, 也有黄皮提取物对一些植物病原菌、农业害虫及杂草具有较高生物活性的报道。鉴于黄皮具有独特的活性物质及药理价值, 本文就其化学成分和药理活性研究加以综述, 以供进一步研究和参考。

## 1 黄皮的化学成分

### 1.1 生物碱

#### 1.1.1 黄皮酰胺类

黄皮酰胺类化合物是黄皮中具有较强生理活性的一类重要生物碱。杨明河等<sup>[4-6]</sup>从黄皮叶中分离得到三个酰胺类化合物: 黄皮酰胺 (Clausenamide)、新黄皮酰胺 (Neoclausenamide) 和桥环黄皮酰胺 (Cycloclausenamide), 其结构式如图 1:

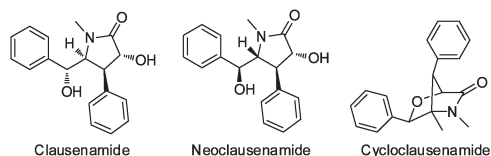


图 1 黄皮中的黄皮酰胺类化合物 (1~3)<sup>[4-6]</sup>

Fig. 1 Clausenamides (1-3) isolated from *Clausena lansium*<sup>[4,5]</sup>

收稿日期: 2009-12-28 接受日期: 2010-04-08

基金项目: 农业部热带农林有害生物入侵监测与控制重点开放实验室开放课题基金项目 (MACKL0902); 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目 (2008hzs1J008)

\* 通讯作者 Tel: 86-20-85285813; E-mail: wanshuqing@scau.edu.cn

其中,黄皮酰胺为吡咯烷酮类化合物,目前已完成其 16 个光学活性异构体的合成和拆分,并通过对其一对对映体(-)黄皮酰胺和(+)黄皮酰胺的深入研究发现,其代谢转化、药理作用等均具有立体选择性,即(-)黄皮酰胺是优映体,具有显著的保肝、促智、抗神经细胞凋亡等作用,而(+)黄皮酰胺为劣映体<sup>[7]</sup>。

### 1.1.2 肉桂酰胺类

黄皮中的肉桂酰胺类生物碱结构较简单,为苯丙烯酰胺类衍生物。迄今从黄皮中分离得到的肉桂酰胺类生物碱如图 2:

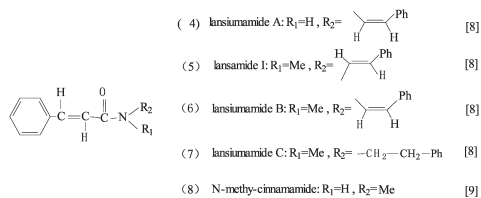


图 2 黄皮中的肉桂酰胺类化合物(4~8)

Fig. 2 Cinnamamides (4-8) isolated from *Clausena lansium*

### 1.1.3 咔唑类

咔唑类生物碱在黄皮中普遍存在,现将从该植物中分离得到的咔唑类生物碱整理归纳如表 1:

表 1 黄皮中的咔唑类生物碱

Table 1 Carbazole alkaloids isolated from *Clausena lansium*

| 编号<br>No. | 化合物<br>Compound  | 器官<br>Organ | 参考文献<br>Ref. |
|-----------|--|-------------|--------------|
| 9         | 3-Formyl-6-methoxycarbazole                              | 根           | 10           |
| 10        | Methyl 6-methoxycarbazole-3-carboxylate                  | 根           | 10           |
| 11        | 3-Formyl-1,6-dimethoxycarbazole                          | 根           | 10           |
| 12        | 3-Formyl carbazole                                       | 根、茎         | 10,12        |
| 13        | Methyl carbazole-3-carboxylate                           | 根、茎         | 10,12        |
| 14        | Murrayanine  | 根           | 10           |
| 15        | Glycozoline  | 根           | 10           |
| 16        | Indizoline   | 根、茎         | 10,12        |
| 17        | 2,7-Dihydroxy-3-formyl-1-(3-methyl-2'-butenyl) carbazole | 根           | 11           |
| 18        | Clausine-A   | 茎           | 12           |
| 19        | Clausoline-K   | 茎           | 12           |
| 20        | Heptaphylline  | 茎           | 12           |

## 1.2 香豆素类

香豆素类化合物广泛存在于黄皮中,目前从该植物中分离到的香豆素类化合物有<sup>[11-16]</sup>:chalepen-

sin (21), chalepin (22), dehydroindicolactone (23), wampetin (24), indicolactone (25), 2',3'-epoxyanisolactone (26), anisolactone (27), gravelliferone (28), angustifoline (8-羟基呋喃香豆素,29), imperatorin (欧前胡素,30)和 8-hydroxypsoralen (8-羟基补骨脂素,31)。

### 1.3 挥发油

黄皮含有的挥发油是多种类型成分的混合物,但其大多数属于萜类化合物及其衍生物,少数为脂肪族和芳香族化合物。唐闻宁等<sup>[17]</sup>从海口黄皮果挥发油中分离鉴定出 43 种成分,主要为萜品烯-4-醇(32)、桉萜(33)、 $\gamma$ -松油烯(34)、 $\alpha$ -松油烯(35)等。李瑞珍等<sup>[18]</sup>从广州黄皮果挥发油中鉴定出 64 种成分,主要为 4-甲基-1-(1-甲基)-3-环己烯-1-醇(36)、3,7,7-三甲基-二环<sup>[4.1.0]</sup>己-2-烯(37)等。张建和等<sup>[19]</sup>对黄皮果核挥发油成分进行了分析,大多数成分为萜类化合物,主要为 $\beta$ -蒎烯(38)和柠檬烯(39)。罗辉等<sup>[20]</sup>对黄皮叶挥发油成分进行了分离鉴定,大多数成分为萜类及其衍生物,主要为倍半萜烯和倍半萜醇。

### 1.4 黄酮类

黄皮中含有的黄酮是一类重要的天然抗氧化剂生理活性物质,它具有多种功能,如抗肿瘤作用;对血管的防护作用;较强的抗氧化活性和抗真菌活性等<sup>[21]</sup>。钟秋平等<sup>[22]</sup>以芦丁为标准品测得黄皮果中总黄酮的含量,为 0.91 mg/mL。并在此基础上,通过颜色反应和荧光鉴别对黄酮的种类进行了鉴别,确定黄皮果 95% 甲醇提取液中黄酮的种类主要为:双氢黄酮、查尔酮和黄酮醇等。

### 1.5 其它

戴宏芬等<sup>[23]</sup>报道黄皮果肉中含有酚酸类的绿原酸(chlorogenic acid,40)和黄烷醇类的表儿茶素(epicatechin,41)。张永明等<sup>[24]</sup>研究发现,黄皮果中还含有丰富的氨基酸,其种类至少有 16 种。其中 7 种必需氨基酸(分别是苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸),3 种半必需氨基酸(组氨酸、精氨酸、酪氨酸)。李升锋等<sup>[25]</sup>对无核黄皮的营养成分进行了分析检测,结果表明:无核黄皮含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、氨基酸、多糖等多种营养成分。

## 2 药理活性

## 2.1 清除自由基、抗氧化活性

黄皮抗氧化作用的主要活性物质有黄皮酰胺、香豆素、黄酮和酚类等。刘云等<sup>[26]</sup>研究表明,黄皮酰胺 50 ~ 100 mg/kg 能明显抑制由酒精中毒诱发的肝脂质过氧化反应,明显提高肝脑组织胞浆液内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性,从而起到清除自由基,保护细胞免受损伤的作用。Lin TJ 等<sup>[27]</sup>报道,黄皮酰胺可明显抑制铁-半胱氨酸体系引起的大鼠脑、心、肝和睾丸微粒体脂质过氧化,对氧自由基具有很好的清除作用。实验表明,黄皮酰胺对氧自由基的直接捕捉作用是其抗脂质过氧化作用的机理之一。Prasad KN 等<sup>[16]</sup>研究发现黄皮中的香豆素类化合物:8-羟基补骨脂素,具有很好的抗氧化活性,对 DPPH 自由基和过氧化物阴离子表现出了很好的清除活性。

黄皮果肉中含有的大量营养成分,有些本身就是很好的抗氧化剂。如果肉中富含的维生素 C 和维生素 E 就是两种极其有效的抗氧化剂,可保护细胞膜免受自由基的危害,预防过氧化脂质的产生,维持细胞的完整和正常功能,与发育、抗衰老有密切关系<sup>[25]</sup>。

## 2.2 保肝作用

大量研究证明黄皮叶及其含有的黄皮酰胺类化合物具有良好的肝保护作用。魏怀玲等<sup>[28]</sup>报道,黄皮叶氯仿提取物对小鼠因注射 CCl<sub>4</sub>、扑热息痛、硫代己酰胺所致的肝损伤均有明显保护作用,使血清谷丙转氨酶(SGPT)活性降低,肝脏病理损害减轻,并能增强肝脏的解毒功能。药理试验表明,从黄皮叶中分离得到的黄皮酰胺、新黄皮酰胺和桥环黄皮酰胺均对 CCl<sub>4</sub> 中毒的小鼠有降低 SGPT 活性的作用,其中桥环黄皮酰胺的作用尤为显著<sup>[5]</sup>。Liu GT 等<sup>[29]</sup>和 Wu YQ 等<sup>[30]</sup>研究结果表明,黄皮酰胺类化合物有抗肝细胞损伤作用,对正常小鼠肝药酶有调节作用,它们可诱导或抑制肝微粒体细胞色素 P450 含量及其酶活性,或可增加肝谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量,均可增强肝胞浆液中谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione Stransferase, GST)的活性。此外,黄皮酰胺类化合物对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)引起的大鼠肝细胞非程序性 DNA 合成(UDS)的损伤具有保护作用<sup>[31]</sup>。

## 2.3 增强记忆、促智作用

乙酰胆碱(Ach)是维持高级神经功能的一种很重要的神经介质,目前认为主要与记忆、思维和智能

状况有关。而胆碱乙酰转移酶(ChAT)和乙酰胆碱酯酶(AchE)的活性直接影响 Ach 水平,从而调节胆碱能系统的状态<sup>[7]</sup>。药效学研究表明,(-)黄皮酰胺能够提高小鼠大脑皮层和海马细胞的胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性<sup>[32]</sup>,并能抗樟柳碱引起的乙酰胆碱含量的降低。(-)黄皮酰胺通过促进胆碱能神经元发育、促乙酰胆碱(Ach)释放、增加 ChAT 的活性及抑制乙酰胆碱酯酶(AchE)的活性,来调节胆碱能系统,发挥促智作用<sup>[7]</sup>。

海马神经元及突触的可塑性变化可能是学习记忆的神经生物学基础,LTP 就是这种可塑性变化的典型代表,某些学习记忆的形成和保持与海马 LTP 有关<sup>[33]</sup>。细胞外电生理研究证明,(-)黄皮酰胺能增强大鼠海马齿状回颗粒细胞层由低频刺激所诱发的群峰电位(PS)和由强刺激诱发的长时程增强(LTP)<sup>[34]</sup>。在自然衰老的大鼠模型中,长期灌胃给予(-)黄皮酰胺可显著提高衰老大鼠的空间学习记忆和被动学习记忆能力<sup>[35]</sup>。孔晓龙等<sup>[36]</sup>报道,黄皮酰胺对  $\beta$ -淀粉样多肽 25 ~ 35 片段诱导的大鼠学习记忆功能障碍具有明显的改善作用,其对糖尿病导致的学习记忆障碍大鼠在行为学上也具有一定的保护作用<sup>[37]</sup>。这些结果表明,黄皮酰胺具有较好的增智益脑、增强记忆的作用。

## 2.4 抗细胞凋亡的作用

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡,是不同于细胞坏死的一种主动性死亡,它是一个基因控制的过程,这就需要多种基因及蛋白的活化参与。Bcl-2 是分子量为 26 kD 的细胞内膜蛋白,该蛋白定位于内质网、线粒体和核膜,它能抑制多种因素诱发的细胞凋亡<sup>[38]</sup>。GSK-3 $\beta$  是一种凋亡蛋白,处于凋亡通路中的交叉点。胡金凤等<sup>[39]</sup>研究发现,(-)黄皮酰胺可通过抑制去血清所致 PC12 细胞 GSK-3 $\beta$  的表达,增加 Bcl-2/Bax 比值而阻断去血清所致神经细胞的凋亡。刘勇军等<sup>[40]</sup>报道,(-)黄皮酰胺可剂量依赖性地对抗硝普钠的神经毒性作用,其机制可能与增加抗凋亡基因 bcl-2 的表达,降低促凋亡基因 bax 表达,增高 Bcl-2/Bax 的比值有关。蒋祝昌等<sup>[41]</sup>研究发现,(-)黄皮酰胺在脑缺血-再灌注早期即有脑保护作用,(-)黄皮酰胺抗凋亡机制也与 bcl-2 蛋白表达增加有关,也是通过 bcl-2 起作用的。

## 2.5 降血糖、调血脂作用

熊曼琪等<sup>[42]</sup>实验结果表明黄皮叶水提物对链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)造成的实验大鼠的糖



尿病具有一定的抑制作用。据申竹芳等<sup>[43]</sup>报道,从黄皮叶中分离得到的黄皮香豆精能降低正常小鼠和四氧嘧啶高血糖小鼠的血糖,也能对抗肾上腺素的升血糖作用,但对血乳酸的浓度则无影响,因此认为黄皮香豆精的降血糖作用既不同于双胍类,也不同于磺酰脲类。丁怡等<sup>[44]</sup>报道,香豆精类化合物:indicolactone, 2', 3'-epoxyanisolactone 和 anisolactone 均具有一定的降血糖活性。现代实验已发现植物药中降糖成分有帖类、肽和氨基酸类、黄酮类、多糖类和香豆精类等,故黄皮叶中所含的香豆精类可能是其降血糖作用的有效成分<sup>[42]</sup>。此外,覃国忠等<sup>[45]</sup>在采用喂养法人为造成大鼠的高胆固醇血症病理模型上进行实验,发现黄皮叶对降低三酸甘油脂的作用极其显著,并能有效的降低血清中总胆固醇和 $\beta$ -脂蛋白含量,实验证实了黄皮叶具有降血脂作用。

## 2.6 抗肿瘤、抗 HIV 活性

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的全身免疫缺陷性疾病。黄皮具有很好的抑制 HIV 的活性,其主要的活性物质为香豆素类、黄酮等化合物。Ng TB 等<sup>[46]</sup>报道,黄皮种子提取物对 HIV-1 病毒的逆转录酶具有一定的抑制作用。Sancho 等<sup>[47]</sup>通过研究发现化合物 imperatorin 对 HIV-1 型病毒的复制具有抑制作用。

黄皮含有的香豆素类化合物还具有一定的抗肿瘤的活性, Giovanni A 等<sup>[48]</sup>报道,欧前胡素具有细胞毒性,且仅对生长细胞有凋亡作用,作用于细胞周期中的 G<sub>1</sub>/S 转化期。该化合物有潜力开发成为对肿瘤细胞具有选择性毒性的药物。Prasad KN 等<sup>[16]</sup>报道,从黄皮中分离得到的 8-羟基补骨脂素对人体胃癌细胞株 SGC-7901、人体肝癌细胞株 HepG-2 和人体肺腺癌细胞株 A-549 具有很强的抑制活性。

## 2.7 其他活性

赵丰丽等<sup>[49]</sup>研究发现,黄皮具有一定的抗过敏活性,其叶水提纯化物的抗过敏活性随剂量增加,抗过敏活性显著提高,其抗过敏活性的主要成分为酚类和黄酮。Adebajo AC 等<sup>[50]</sup>报道,从黄皮茎皮中分离得到的 imperatorin 和 3-formyl carbazole 有明显的抗滴虫活性。刘云等<sup>[24]</sup>报道,黄皮酰胺具有缓解血管痉挛,增加脑血流量的作用,其在 10<sup>-5</sup> mol/L 浓度时可明显抑制由 5-羟色胺、前列腺素和花生四烯酸引起的血管收缩。

# 3 农用生物活性

## 3.1 抑菌活性

黄皮中的酰胺类化合物具有很好的抑菌活性,刘序铭等<sup>[51]</sup>报道,黄皮植株甲醇提取物对香蕉炭疽病菌和辣椒炭疽病菌等有一定的抑制活性。其中黄皮果核甲醇提取物对香蕉炭疽病菌菌丝生长的抑制率达到 88.83%。后经活性追踪,确定(E)-N-(2-苯乙基)肉桂酰胺为主要抑菌活性成分<sup>[52]</sup>。刘艳霞等<sup>[53]</sup>对从黄皮果核中分离纯化得到的新肉桂酰胺类化合物 Lansiumamide B 的抑菌活性进行研究发现,该化合物在 0.8 mg/mL 浓度下,对芒果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)的菌丝生长抑制率分别为 83.33% 和 60.78%,表现出了很好的抑菌活性。除黄皮酰胺类化合物外,黄皮中的呋唑类生物碱、香豆素类化合物也具有很好的抑菌活性。Chakraborty A 等<sup>[54,55]</sup>发现呋唑类生物碱不仅对革兰氏阴性、阳性菌有良好的抑制活性,同时对真菌也有明显的抑制活性。Tada Y 等<sup>[56]</sup>报道,欧前胡素对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌有一定的抗菌活性。

## 3.2 除草活性

黄皮的茎叶和果核内存有化感物质黄皮素内酯,该类化合物对稗草等多种农田恶性杂草具有优良的抑制活性。万树青等<sup>[57]</sup>报道,黄皮果核甲醇提取物在 1% 时,对油菜、稗草、含羞草等受试植物的根长抑制率均在 50% 左右。卢海博等<sup>[58,59]</sup>进一步测定了黄皮提取物对稗草和油菜的光活化抑制活性,黄皮果核提取物在 8 mg/ml 的处理浓度下,经紫外光(波长 365 nm)照射 2 h 后,对稗草的根、茎、鲜重的抑制率分别为 87.84%、60.38%、18.40%,非光照处理为 77.99%、45.71%、14.44%;而黄皮叶甲醇提取物在浓度为 4 mg/mL 时,采用紫外光照处理,测得对油菜根长、茎长和鲜重抑制率分别达 99.17%、99.20% 和 72.42%,高于非光照组的 97.18%、82.07%、69.35%,表现出了一定的光活化除草活性。

## 3.3 杀虫活性

万树青等<sup>[60]</sup>在研究几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性时,发现黄皮种子甲醇提取物和石油醚提取物对萝卜蚜具有一定的杀灭作用。其中,黄皮种子甲醇提取物在浓度 1~5 mg/mL 的浓

度范围内,对萝卜蚜的死亡率为60%~90%。马伏宁等<sup>[61]</sup>研究发现黄皮种子甲醇提取物对松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)具有很高的毒杀活性,在1 mg/mL浓度下处理72 h的校正死亡率为100%。且从黄皮种子中分离、纯化获得一黄色晶体,经核磁共振检测分析为Lansiumamide B。该化合物处理松材线虫24、48、72 h的LC<sub>50</sub>值分别为8.38、6.36、5.38 mg/L,表现出了很好的毒杀活性。

## 4 展望

黄皮是我国南方的一种常见树种,资源丰富,化学成分结构多样,医疗功效显著,具有明显的降血糖、保肝、抗氧化、抗细胞凋亡等多方面的药理作用。目前,国内外虽然对黄皮的研究给予了广泛的关注,但研究最多的还是关于黄皮酰胺在保肝、促智、抑菌等方面的活性研究,显然综合性的研究还没有得到应有的重视,以黄皮富含的香豆素类化合物为例,其良好的抗氧化作用和降血糖活性都有可能开发成有效的临床治疗药物,而此类化合物在抗艾滋和抗肿瘤方面的活性也有其特色,具有潜在的药用开发价值。因此有必要对黄皮含有的各类化合物进行深入地系统研究,以期发现活性更好、毒性更小的化合物,为肝病、糖尿病、艾滋病等疾病的治疗开拓新的思路,为新型药剂的开发开辟一条新的途径。总之,该植物的综合开发利用有着广阔的前景,有待于今后进一步的深入研究。

### 参考文献

- Huang XS(黄雪松), Luo LJ(罗丽君). Determination of the clausenaminade in the fruit and seed of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2006, 27: 172-173.
- Feng ZG(冯贞国), et al. The development and strategy for *Clausena lansium* in Fujian. *Fujian Fruits* (福建果树). 2005, (3): 34-35.
- New Medical College of Jiangsu (江苏新医学院). Dictionary of Traditional Chinese Medicine, Vol 2 (中药大辞典, 2卷). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1977. 2049.
- Yang MH(杨明河), et al. Isolation and structural elucidation of clausenamide from the leaves of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 22: 33-40.
- Yang MH(杨明河), et al. Studies on the chemical constituents of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels II. The isolation and structural elucidation Neoclausenamide and Cyclausenamide. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1987, 45: 1170-1184.
- Yang MH, et al. Three novel cyclic amides from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 1988, 27: 445-450.
- Xue W(薛薇), et al. Advances in the study of chiral clausenamide. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2008, 17: 268-271.
- Lin JH. Cinnamamide derivatives from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 1989, 28: 621-622.
- Lu XX(卢晓旭), Huang XS(黄雪松). Identification of N-methy-cinnamamide in the stone of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fruit. *China Condiment* (中国调味品), 2008, (7): 40-42.
- Li WS, et al. Carbazole alkaloids from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 1991, 30: 343-346.
- Kumar V, Vallipuram K, Adebajo AC, et al. 2,7-Dihydroxy-3-formyl-1-(3-methyl-2'-butenyl) carbazole from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 1995, 40: 1563-1565.
- Li F(李芳), et al. Chemical Composition of *Clausena lansium*. *Sci Technol Rev* (科技导报), 2009, (10): 82-84.
- Kong YC, et al. Dehydroindicolactone, a new coumarin from *Clausena lansium*. *Fitoterapia*, 1983, 54: 47.
- Khan NU, et al. A furocoumarin from *clausena wampi*. *Phytochemistry*, 1983, 22: 2624-2625.
- Vijai L, et al. Monoterpenoid furanocoumarin lactones from *clausena anisata*. *Phytochemistry*, 1984, 23: 2629.
- Prasad KN, et al. Antioxidant and Anticancer Activities of 8-hydroxypsoralen isolated from Wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) Peel. *Food Chem*, 2010, 118: 62-66.
- Tang WN(唐闻宁), et al. Study on chemical constituents of volatile oil from fructus clausenae lanii. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(2): 26-28.
- Li RZ(李瑞珍), et al. Analysis of chemical constituents of the essential oil from the fruits of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. *J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2007, 23: 141-143.
- Zhang JH(张建和), et al. Study on chemical constituents of the essential oils from stones of *Clausena lansium*. *J Chin Med Mat* (中药材), 1997, 20: 518-519.
- Luo H(罗辉), et al. Study on chemical composition of the essential oils from leaves of *Clausena lansium*. *J Chin Med Mat* (中药材), 1998, 21: 405-406.
- Zhang YZ(张云竹), et al. Research on the ultrasonic wave withdraws of total flavonoid from Wampi. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2009, 30(8): 66-68.

- 22 Zhang QP(钟秋平), Lin MF(林美芳). Determination of contents of flavones and identification of flavones species in *Fructus clausenae* Lanii. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28: 411-413.
- 23 Dai HF(戴宏芬), et al. Determination of chlorogenic acid, epicatechin and rutin in wampee and wax myrtle flesh by HPLC. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2008, 27: 445-449.
- 24 Zhang YM(张永明), et al. Study on amino acids from the fruit of *Clausena lansium*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2006, 29: 921-923.
- 25 Li SF(李升锋), et al. Nutrition composition of seedless wampee. *Food Sci Technol* (食品科技), 2005, (6): 96-98.
- 26 Liu Y(刘云), et al. Anti-lipid Peroxidation and Cerebral Protective Effects of Clausenamide. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1991, 26: 166-170.
- 27 Lin TJ, et al. Anti-lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging activity of Clausenamide. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 1992, 6 (2): 97-102.
- 28 Wei HL(魏怀玲), et al. Protective action of Clausenamide lansium against experimental liver injury in mice and its toxicity. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1996, 12(4): 18-20.
- 29 Liu GT, et al. Hepatoprotective action of nine constituents isolated from the leaves of *Clausena lansium* in mice. *Drug Dev Res*, 1996, 39: 174-178.
- 30 Wu YQ, et al. Different effects of nine clausenamide enantiomers on liver glutathione biosynthesis and glutathione S-transferase activity in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 1024-1028.
- 31 Wu YQ(吴宇群), Liu GT(刘耕陶). Protective effect of enantiomers of clausenamides on aflatoxin B<sub>1</sub>-induced damage of unscheduled DNA synthesis of isolated rat hepatocytes. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2006, 20: 393-398.
- 32 Duan WZ, Zhang JT. Effects of (-), (+) clausenamide on central N-methyl-D-aspartate receptors in rodents. *Acta Pharm Sin*, 1997, 32: 259-263.
- 33 Liu SL(刘少林), et al. Effects of clausenamide on synaptic transmission of the dentate gyrus in freely-moving rats. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, 34: 325-328.
- 34 Zhang JT(张均田), et al. Antidementia effects of (-) clausenamide. *Herald Med* (医药导报), 2001, 20: 403-404.
- 35 Cheng Y(程勇), Zhang JT(张均田). The Improving effect of clausenamide to learning and memory of ageing rats. *Chin Pharmacol* (中国药理通讯), 2004, 21 (2): 24.
- 36 Kong XL(孔晓龙), et al. The affection of clausenamide to learning and memory dysfunction of rats induced by  $\beta$ -amyloid peptide fragment 25-35. *Acta Acad medic Gangxi* (广西医科大学学报), 2003, 20: 673-674.
- 37 Hou RL(侯软玲), et al. Impact on behavior and blood glucose of Clausenamide to rats with learning and memory dysfunction induced by diabetic. *Acta Acad medic Gangxi* (广西医科大学学报), 2008, 25: 883-885.
- 38 Tamatani M, et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 1999, 274: 8531-8538.
- 39 Hu JF(胡金凤), et al. Inhibitory effect of (-) clausenamide on apoptosis of PC12 cells induced by serum deprivation and its related mechanism. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2009, 20: 1-4.
- 40 Liu YJ(刘勇军), Zhu QF(祝其锋). Effect of (-) clausenamide on apoptosis of cultured hippocampal neurons induced by nitric oxide-donor SNP. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2006, 26: 936-938.
- 41 Jiang ZC(蒋祝昌), et al. Effect of clausenamide on the expression of Bcl-2 protein and apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion in renovascular hypertensive rats. *Chin Criti Care Med* (中国危重病急救医学), 2005, 17: 289-292.
- 42 Xiong MQ(熊曼琪), et al. The hypoglycemic effect of folium clausenae lansii, herbadesmodii microphylli and radix aucklandiae in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Guangzhou Coll Tradit Chin Med* (广州中医学院学报), 1994, 11: 41-44.
- 43 Shen ZF(申竹芳), et al. The hypoglycemic effect of clausenamide coumarin. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1989, 24: 391-392.
- 44 Ding Y(丁怡), et al. Furan coumarin lactone in leaves of *Clausena lansium*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(12): 7-9.
- 45 Qin GZ(覃国忠), Liao MY(廖曼云). A study on hypolipidemic effect of leaves of *Clausena lansium*. *Guihaia* (广西植物), 1987, 7: 185-188.
- 46 Ng TB, et al. A homodimeric sporamin-type trypsin inhibitor with antiproliferative, HIV reverse transcriptase-inhibitory and antifungal activities from wampee (*Clausena lansium*) seeds. *Biol Chem*, 2003, 384: 289-293.
- 47 Sancho R, et al. Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279: 37349-37359.
- 48 Giovanni A, et al. Coumarins from *Opopanax chironium* New Dihydrofurano-coumarins and Differential Induction of Apoptosis by and Hraclenin. *J Nat Prod*, 2004, 67: 532-536.

# 水飞蓟宾及其类似物的化学修饰研究进展

刘伟<sup>1</sup>, 余燕影<sup>2</sup>, 曹树稳<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; <sup>2</sup>南昌大学化学系, 南昌 330031

**摘要:**以天然黄酮类化合物为活性先导物, 研究其化学结构与生物活性的关系, 进而进行化学修饰研究, 是目前创新药物的一条重要思路。药用植物水飞蓟用来治疗肝胆疾病已有 2000 多年的历史, 水飞蓟宾作为水飞蓟素的主要活性成分具有保肝、抗炎和抗癌等活性而备受人们关注, 但由于水飞蓟宾极低的溶解性极大地限制了其生物利用度。为此, 国内外学者通过化学和物理等方法对其进行修饰和改造, 并取得了一定的成果。本文就近 10 年来水飞蓟宾及其类似物的化学修饰研究进行综述。

**关键词:**水飞蓟宾; 类似物; 化学修饰; 构效关系

中图分类号: O629.9; O621.3

文献标识码: A

## Advances in Chemical Modification of Silybin and Its Analogues

LIU Wei<sup>1</sup>, YU Yan-ying<sup>2</sup>, CAO Shu-wen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China

**Abstract:** On the basis of flavonoid lead compounds with biological activity, studying the relationship between structures and bioavailability and modifying their structures is an important means of innovation of new drugs. *Silybum marianum* (L.) Gaertn. has been used for more than 2000 years to treat liver and gallbladder disorders. Silybin, derived from the milk thistle plant, has received considerable attention due to its hepatoprotective, anti-inflammatory and anticancer effects, however, the bioavailability and therapeutic efficiency of silybin is rather limited by its very low solubility. To solve this problem, silybin is modified or altered via various chemical and physical methods by domestic and foreign scholars, and have obtained a certain achievement. In this paper, the chemical modification of silybin and its analogues in recent years are reviewed.

**Key words:** silybin; analogues; chemical modification; structure-activity relationships

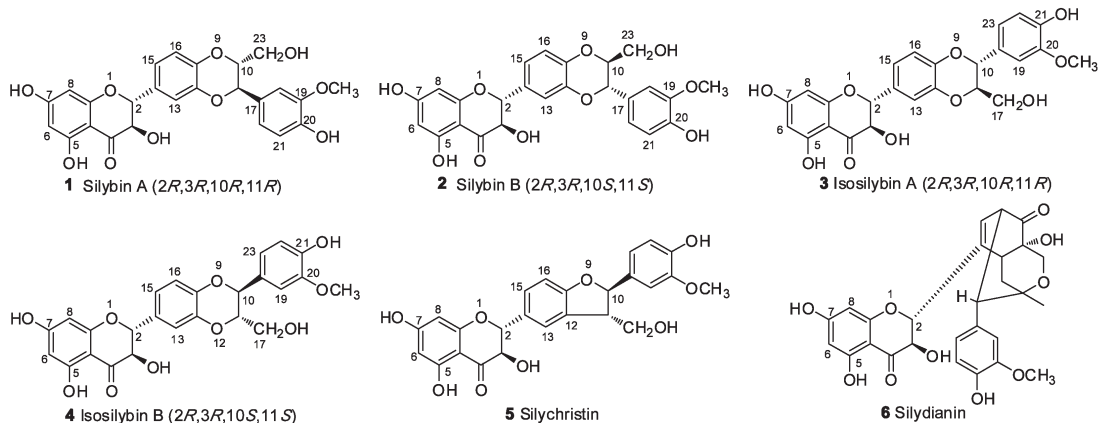
水飞蓟素(Silymarin)是指从菊科药用植物水飞蓟种子的种皮中提取得到的一种黄酮木脂素类化合物, 黄色粉末, 味苦。主要的活性成分有水飞蓟宾(Silybin)、异水飞蓟宾(Isosilybin)、水飞蓟亭(Silychristin)和水飞蓟宁(Silydianin)等四种同分异构体<sup>[1,2]</sup>, 其中水飞蓟宾含量为 50% ~ 70%<sup>[3]</sup>, 结构式最终由 Lee 等<sup>[4]</sup>确定(如图 1)。水飞蓟用来治疗肝胆疾病已有 2000 多年的历史<sup>[6]</sup>, 水飞蓟素作为其主要的活性成分可以防止化学毒素、食物毒素和药物等对肝脏造成的损伤, 促进肝细胞的再生和修复, 被称为“天然的保肝药”<sup>[7-9]</sup>; 作为强抗氧化剂, 能够清除体内的自由基, 延缓衰老<sup>[10]</sup>。近年来药理学研

究表明, 水飞蓟宾具有较强的抗癌和抗炎活性<sup>[11-13]</sup>, 它被广泛应用于医药、保健品、食品和化妆品等产品中。

然而, 水飞蓟宾难溶于水(430 mg/L), 吸收率在 20% ~ 50% 之间, 生物利用度低等特点<sup>[14]</sup>, 极大地限制了其临床应用。鉴于水飞蓟宾的各种生物学功能与其结构的密切关系, 国内外学者通过化学修饰的方法制备各种水飞蓟宾衍生物<sup>[15]</sup>及类似物, 或采用结合载体<sup>[16,17]</sup>、包膜<sup>[18,19]</sup>以及固体分散体<sup>[20,21]</sup>等修饰方法, 改善其溶解性, 增强其疗效。本文拟从结构修饰和化学合成等方面, 概述水飞蓟宾及其类似物的化学修饰和生物活性的研究进展。

## 1 水飞蓟宾及其衍生物

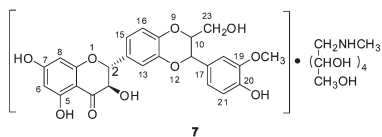
为增加难溶性药物的溶解性, 通过修饰成盐、成酯或在主药分子结构上引入亲水基团形成亲水性大

图1 水飞蓟素主要活性成分的化学结构式<sup>[4,5]</sup>Fig. 1 Chemical structures of the main active constituents in Silmyarin<sup>[4,5]</sup>

分子是常用的化学修饰方法。

### 1.1 水飞蓟宾葡甲胺盐

将水飞蓟宾和有机胺反应制成有机胺盐,可将水飞蓟宾转变为水溶性制剂,是研究最早的水飞蓟素复盐之一。林建广等<sup>[22]</sup>采用差示扫描量热法分析化合物水飞蓟宾葡甲胺(7)的结构(如图2),并测定了其在25℃水中的溶解度。结果表明,化合物7以盐的形式存在,有别于水飞蓟宾与葡甲胺的简单混合,其溶解度为7182.50 mg/L,明显改善了水飞蓟宾在水中的溶解性能。有文献报道该药能够预防和治疗半乳糖胺所导致的肝损伤。该复合物还可制成冻干注射制剂、片剂、包合物等,用途较为广泛。临床试验表明该药具有作用快、疗效强等特点。

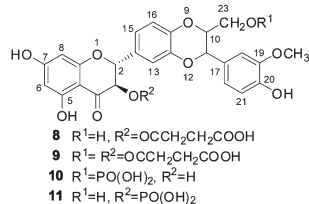
图2 水飞蓟宾葡甲胺结构式<sup>[22]</sup>Fig. 2 Chemical structures of silybin meglumine<sup>[22]</sup>

### 1.2 水飞蓟宾的酯化修饰

#### 1.2.1 水飞蓟宾-二偏琥珀酸酯及其钠盐

水飞蓟宾-二偏琥珀酸酯钠盐也是研究比较早的水溶性水飞蓟素复盐,具有强的抗肝损伤作用。Braatz等在上世纪80年代制得化合物9(如图3),其水溶性得到显著的改善,之后被用作治疗急性肝中毒的静脉注射剂而得以推广。该复盐能迅速地与羟基自由基起反应,具有清除活性氧的作用,对羟基自由基的清除作用强于叔丁氧基自由基的清除作用<sup>[23]</sup>。朱琳等<sup>[24]</sup>将水飞蓟宾与丁二酸酐在碱性条

件下反应,可以选择性地对水飞蓟宾分子中的醇羟基进行酯化,制得水溶性好的衍生物8和9。对产物进行抗急性肝损伤的研究表明,产物均可降低血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性,对CCl<sub>4</sub>致小鼠急性肝损伤具有保护作用。

图3 水飞蓟宾酯化物结构式<sup>[24,25]</sup>Fig. 3 Chemical structures of esterification silybin<sup>[24,25]</sup>

#### 1.2.2 水飞蓟宾磷酸酯

Raffaello等<sup>[25]</sup>通过在分子中引入亚磷酸根等亲水性基团(如图3),制得化合物10和11,pH为4时即显示良好水溶性,而水飞蓟宾琥珀酸酯钠盐在更高的pH值时才开始溶解;相比之前有机酯类具有更好的化学稳定性。康怀萍等<sup>[26]</sup>在之后的试验中得到了相似的结论。

#### 1.2.3 水飞蓟宾酰基化衍生物

Varga等<sup>[27]</sup>分析了水飞蓟宾及其衍生物对多形核白细胞(PMNLs)中过氧化氢生成和超氧阴离子释放的抑制作用,结果发现5,7,20-三甲基水飞蓟宾(13,如图4)抑制超氧阴离子的活性与维生素E相近,均大于水飞蓟宾及水飞蓟宾酰基化衍生物,活性顺序为:13 ≈ VE > 利肝隆 > 12 > 水飞蓟宾 > 14;作者发现水飞蓟宾及其衍生物的抗氧化活与分子的立体结构与浓度等有密切关系;分子的亲油

性增加,其抑制超氧阴离子释放作用也随之增强。朱琳等<sup>[28]</sup>将水飞蓟宾和冰醋酸在加热条件下,选择性地对水飞蓟宾分子中的醇羟基进行乙酰化,合成了23-*O*-乙酰水飞蓟宾和3,23-二-*O*-乙酰水飞蓟宾,产物脂溶性较好,以期增加其口服生物利用度。

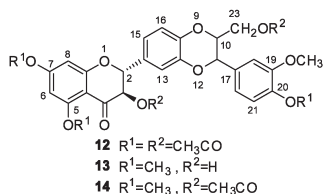


图4 飞蓟宾酰基化结构式<sup>[27]</sup>

Fig. 4 Chemical structures of acetylation silybin<sup>[27]</sup>

### 1.3 水飞蓟宾糖苷化修饰

糖苷化是对黄酮类化合物进行化学修饰的有效途径之一,它可改善黄酮类化合物的水溶性、稳定性、选择性,提高黄酮类化合物的药效<sup>[29]</sup>。捷克学者 Kren 等对水飞蓟宾糖苷化作了系统的研究,早期文献<sup>[30]</sup>报道了在水飞蓟宾的 C-23-OH 上引入不同的糖基(如图5)以增加其水溶性。结果显示,化合物16、18、21、23的水溶性分别为13.0、1.7、3.8、5.6 g/L,与水飞蓟宾(0.43 g/L)相比较,水飞蓟宾糖苷化衍生物的水溶性增加4~30倍;水飞蓟宾对乳酸脱氢酶的抑制作用为10%,引入糖基后化合物16的抑制作用为20%,化合物18为23%。随后,Kren所在课题组采用植物细胞培养法将水飞蓟素的C-7-OH进行糖苷化修饰,产物显示出较好的水溶性<sup>[31]</sup>;Kubisch等<sup>[32]</sup>采用环糊精葡聚糖转移酶催化合成了水飞蓟宾的C-23位低聚糖苷,复合物显示出较好的抗氧化活性;Kosnia等<sup>[33]</sup>对化合物16、18、21、23清除自由基和抗脂质过氧化活性进行了系统分析,结果显示,在防治小鼠肝线粒体膜中由叔丁基过氧化氢引起的脂质过氧化实验中,糖苷化衍生物比水飞蓟宾具有更好的效果,而且对于叔丁基过氧化氢引

起的肝细胞和血红细胞的损伤,糖苷化衍生物比水飞蓟宾具有更好的保护作用。

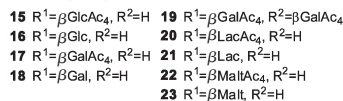
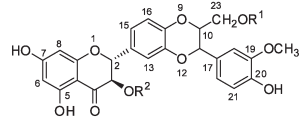


图5 水飞蓟宾的 $\beta$ -糖苷结构<sup>[30,32]</sup>

Fig. 5  $\beta$ -Glycoside structure of Silybin<sup>[30,32]</sup>

## 2 2,3-脱氢水飞蓟宾及其衍生物

2,3-脱氢水飞蓟宾(24,如图6)是水飞蓟素中的活性成分之一,含量甚微,不易分离得到。Gazka等<sup>[34]</sup>认为2,3-脱氢水飞蓟宾是水飞蓟宾的一种氧化产物,其对毒鹅膏毒素的抵抗力虽低于水飞蓟宾,但其抗氧化活性强于水飞蓟宾。Kurkin等<sup>[35]</sup>从水飞蓟中分离得到水飞蓟宾和2,3-脱氢水飞蓟宾,研究了它们对小鼠肝脏匀浆中由硫酸亚铁引起的脂质过氧化物的抑制作用,实验证明2,3-脱氢水飞蓟宾的抗氧化活性比水飞蓟宾高。这提示C环上2,3位双键与化合物的抗氧化活性有密切的关系。

### 2.1 2,3-脱氢水飞蓟宾烷基化衍生物

Maitrejean等<sup>[36]</sup>将水飞蓟宾的2和3位脱氢后在6或8位引入异戊烯基和香叶基(如图6),考察其对P-糖蛋白的核苷酸结合区(NBD2)的亲合能力。结果表明水飞蓟宾对NBD2的结合能力 $K_d = 6.8\mu\text{M}$ ,氧化成脱氢水飞蓟宾以后结合能力增加( $K_d = 2.2\mu\text{M}$ ),化合物27和28的亲合能力分别提高6倍和9倍,香叶基化后化合物25和26的亲合能力更进一步提高。实验结果预示脱氢水飞蓟宾的烷基化产物具有很强的NBD2亲合能力,有望开发为新的肿瘤多药耐药抑制剂。

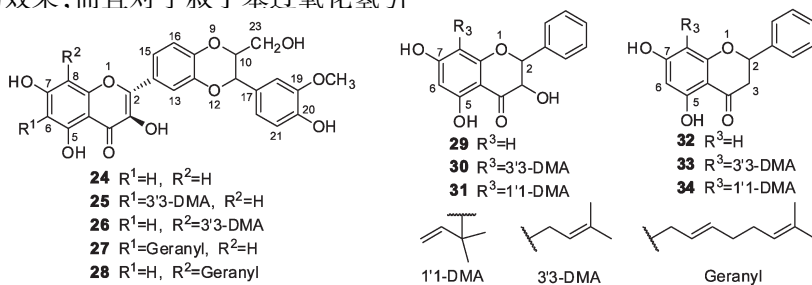


图6 2,3-脱氢水飞蓟宾烷基化衍生物<sup>[36,37]</sup>

Fig. 6 Chemical structures of alkylation derivatives of 2,3-dehydrosilybin<sup>[36,37]</sup>

Perez-Victoria 等<sup>[37]</sup>在 Maitrejean 之后也研究了水飞蓟宾类似物对 P-糖蛋白的 NBD2 的亲合能力,得到了相似的结论;同时还合成化合物 **30**、**31**、**33**、**34**,并将各化合物的 NBD2 亲合能力做了比较,结果如表 1。

表 1 不同化合物的 NBD2 亲合能力<sup>[37]</sup>

Table 1 Binding affinities of different compounds<sup>[37]</sup>

| 化合物<br>Compound    | 结合常数<br>$K_d$ ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) | 最大猝灭值<br>% Maximal<br>quenching $\pm$ SD |
|--------------------|---|--|
| 25                 | 0.27 $\pm$ 0.05                               | 76.1 $\pm$ 2.4                           |
| 26                 | 0.11 $\pm$ 0.02                               | 76.1 $\pm$ 1.7                           |
| 27                 | 0.67 $\pm$ 0.06                               | 56.7 $\pm$ 1.4                           |
| 28                 | 0.31 $\pm$ 0.05                               | 72.0 $\pm$ 2.2                           |
| 29 <sup>[38]</sup> | 9.2 $\pm$ 1.0                                 | 75.9 $\pm$ 3.9                           |
| 30                 | 0.62 $\pm$ 0.24                               | 80.0 $\pm$ 6.4                           |
| 31                 | 0.34 $\pm$ 0.09                               | 85.0 $\pm$ 4.0                           |
| 32 <sup>[38]</sup> | 17.6 $\pm$ 5.9                                | 81.3 $\pm$ 8.6                           |
| 33                 | 2.9 $\pm$ 0.3                                 | 84.3 $\pm$ 2.0                           |
| 34                 | 1.4 $\pm$ 0.2                                 | 75.4 $\pm$ 2.7                           |

## 2.2 含羧基或酯基取代水飞蓟宾类似物

Gazka 等<sup>[34]</sup>选择性地水飞蓟宾的 23 位羟基氧化,得到水飞蓟酸,依据同样的方法将脱氢水飞蓟宾转化为脱氢水飞蓟酸,并检测了它们的抗氧化性,结果表明 2,3-脱氢水飞蓟宾的清除超氧自由基活性是水飞蓟宾的 25 倍,清除脂质过氧化物活性是水飞蓟宾的 10 倍,但亲水性是水飞蓟宾的 0.01 倍。与脱氢水飞蓟宾相比,脱氢水飞蓟酸亲水性是前者的 100 倍,但抗氧化能力只有前者的十分之一。水飞蓟宾转化成水飞蓟酸以后水溶性提高 10 倍,但抗氧化活性降低一半。通过该研究初步探明了水飞蓟宾衍生物的抗氧化特性。

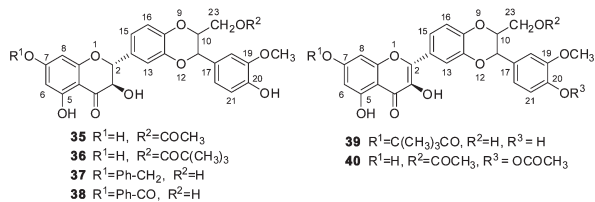


图 7 含酯基取代水飞蓟宾类似物<sup>[39]</sup>

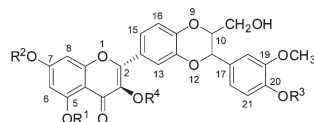
Fig. 7 Silybin analogues containing ester groups<sup>[39]</sup>

Plíšková 等<sup>[39]</sup>通过体外基因分析研究了飞蓟宾类似物(如图 7)的雌激素受体和芳香烃受体的介导

活性。结果发现,这些化合物在大鼠肝癌细胞中对芳香烃受体的介导活性没有影响,除化合物 **36** 外,其余的水飞蓟宾衍生物没有调节雌激素受体介导的活性。有趣的是化合物 **37** 本身不具有雌激素样活性,当与 17- $\beta$ -糖二醇(E2)一起使用时却能加强 E2 调节雌激素受体介导的活性。作者总结出了水飞蓟宾及其类似物的结构活性关系,在 23 位引入羧基或者乙酰基团的脱氢水飞蓟宾没有雌激素活性,当用特戊酰代替 23 位的乙酰基团时,所得化合物表现出显著地雌激素活性。提示没有雌激素活性的水飞蓟宾衍生物有望成功用做化学预防药物。

## 2.3 2,3-脱氢水飞蓟宾甲氧基化衍生物

Dzubak 等<sup>[40]</sup>合成了一系列的 *O*-烷基-2,3-脱氢水飞蓟宾衍生物(如图 8),发现化合物 **44**、**46**~**48** 在较低剂量时就表现出 P-糖蛋白所介导药物外排的抑制活性;化合物 **24**、**41**、**42**、**45** 也能有效地抑制 P-糖蛋白所介导药物外排,但同时对所测细胞系具有内在的细胞毒性;化合物 **43** 和 **49** 的抑制活性要弱于其母体。研究发现将 2,3-脱氢水飞蓟宾的 3, 20 位羟基甲基化或在 C-7-OH 上引入空间位阻大的苄基,所得衍生物对 P-糖蛋白所介导药物外排的抑制活性得到明显的改善。2,3-脱氢水飞蓟宾的 C-20-OH 甲基化降低了细胞毒性,而在 5 或 7 位碳的羟基甲基或苄基化会导致细胞毒性高于母体 2,3-脱氢水飞蓟宾。



**41**  $\text{R}^1=\text{R}^3=\text{R}^4=\text{H}$ ,  $\text{R}^2=\text{Bn}$   
**42**  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{H}$ ,  $\text{R}^4=\text{CH}_3$   
**43**  $\text{R}^1=\text{R}^3=\text{R}^4=\text{H}$ ,  $\text{R}^2=\text{CH}_3$   
**44**  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^4=\text{H}$ ,  $\text{R}^3=\text{CH}_3$   
**45**  $\text{R}^1=\text{R}^3=\text{H}$ ,  $\text{R}^2=\text{R}^4=\text{CH}_3$   
**46**  $\text{R}^1=\text{R}^4=\text{H}$ ,  $\text{R}^2=\text{R}^3=\text{CH}_3$   
**47**  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$ ,  $\text{R}^3=\text{R}^4=\text{CH}_3$   
**48**  $\text{R}^1=\text{H}$ ,  $\text{R}^2=\text{R}^3=\text{R}^4=\text{CH}_3$   
**49**  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{CH}_3$ ,  $\text{R}^4=\text{H}$

图 8 2,3-脱氢水飞蓟宾甲氧基化衍生物结构<sup>[40]</sup>

Fig. 8 Chemical structures of *O*-alkyl derivatives of 2,3-dehydro-silybin<sup>[40]</sup>

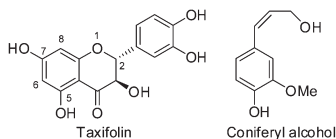
## 3 水飞蓟宾及其类似物的全合成制备

鉴于水飞蓟宾及其类似物具有很好的药理活性,为探明水飞蓟宾类化合物的活性构效关系,国内外一些学者对水飞蓟宾及其类似物进行了全合成研究。

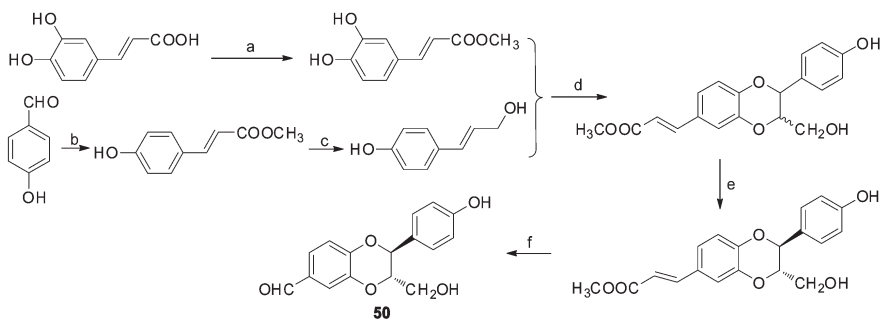
### 3.1 水飞蓟宾的全合成

Merlini 等首先报道了以分离得到的黄杉素

(Taxifolin) 和松柏醇 (Coniferyl alcohol) 为原料, 在无苯和无水丙酮中, 用氧化银为催化剂, 经氧化耦合合成了水飞蓟宾。反应产物中有将近一半是异水飞蓟宾。



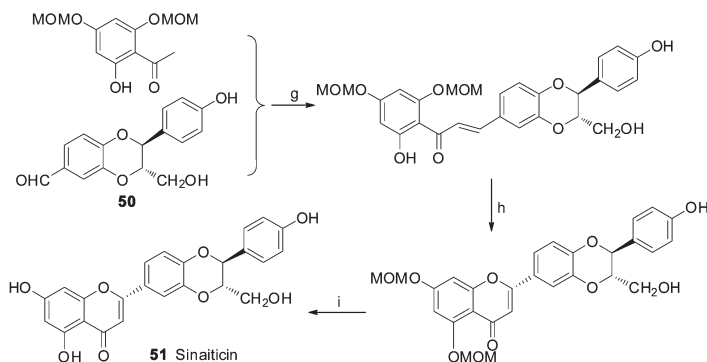
李绍顺等<sup>[41]</sup>以查尔酮为原料, 经不对称环氧化、手性 HPLC 柱分离、立体选择性环合得光学纯的 2R 3R (+) 黄杉素, 然后在无水苯和无水丙酮中用碳酸银作催化剂, 将所合成的黄杉素与松柏醇耦合得到水飞蓟宾和异水飞蓟宾的混合物。因松柏醇具有特殊的分子立体结构, 在水飞蓟宾的合成中多采用其为原料, 但经合成得到单一构型水飞蓟宾的反应少有报道。



a: Py, Hexahydropyridine, reflux, (95%); b:  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{AlCl}_3$ , (90%); c:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , reflux, (95%); d:  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{NaOAc}$ ; e:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, then HCl (d, e overall yield 32%); f:  $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ , (67%)

图9 关键中间体的合成路线<sup>[42]</sup>

Fig. 1 The Synthesis route of key intermediate<sup>[42]</sup>



g:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{-H}_2\text{O}$ , KOH, rt, h: DDQ, dioxane reflux, i: 3 N HCl, reflux

图10 Sinaiticin 的合成路线<sup>[42]</sup>

Fig. 10 The synthesis route of Sinaiticin<sup>[42]</sup>

### 3.2 Sinaiticin 的全合成

Sinaiticin(51) 是一种黄酮木脂素, 活性实验表明它对动物体内淋巴白血球 P-388 细胞有强抑制作用。兰州大学潘鑫复教授所在课题组对水飞蓟宾类似物 Sinaiticin 的合成进行了大量的研究。She 等<sup>[42]</sup>在之前工作的基础上, 以对羟基苯甲醛, 咖啡酸为起始原料, 先构筑二氧六环, 再建造黄酮环化合物 50, 最终得到了 Sinaiticin(51)。作者发现该合成路线(图9、10)具有操作简单、条件温和等优点, 适用于各种苯并二氧六环新木脂素及黄酮木脂素的合成。

此外, 该课题组以阿魏酸和 3-羟基-4-苄氧基为起始原料, 通过不对称双羟基化反应, 分子内环环及 Mistunbou 反应, 脱保护环合的方法制得单一绝对构型的产物。Gu 等<sup>[43]</sup>认为通过这种方法有望合成单一构型的水飞蓟宾。



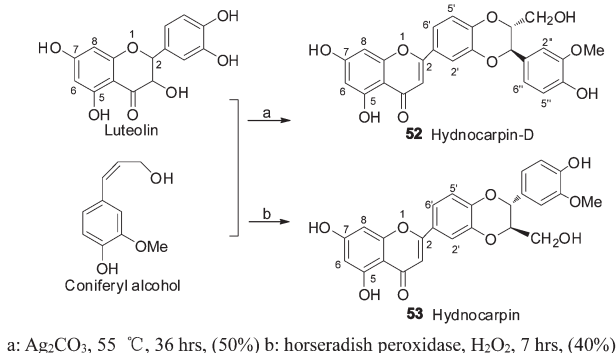


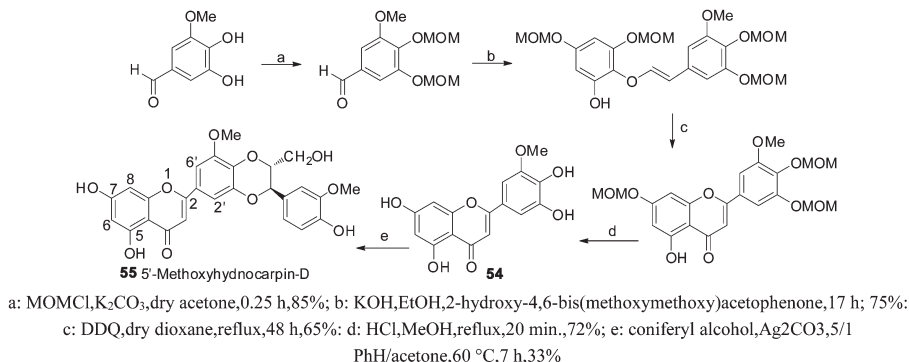
图 11 Hydnocarpin-D 和 Hydnocarpin 的合成

Fig. 11 Syntheses of Hydnocarpin-D and Hydnocarpin

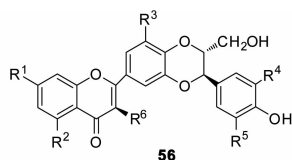
### 3.3 Hydnocarpin 类化合物的全合成

5'-Methoxyhydnocarpin (5'-MHC) 是大风子油的微量组分,在麻疯病的传统治疗中起重要的作用。Stermitz 等<sup>[44-46]</sup>研究发现 5'-MHC 本身不具有抗菌活性,当与小檗碱一起使用时,明显加强了小檗碱对金黄色葡萄球菌生长的抑制活性。Guz 等<sup>[47]</sup>以木

犀草素(Luteolin)和松柏醇为原料在不同的条件下分别合成了化合物 52 (Hydnocarpin-D)和 53 (Hydnocarpin),经检测两者为同分异构体(如图 11)。为获得单一的 5'-MHC-D(55),Guz 等反复试验,最终通过有效地方法制得了中间体 54,然后用氧化银为催化剂,与松柏醇氧化偶合合成了产物 55(如图 12)。

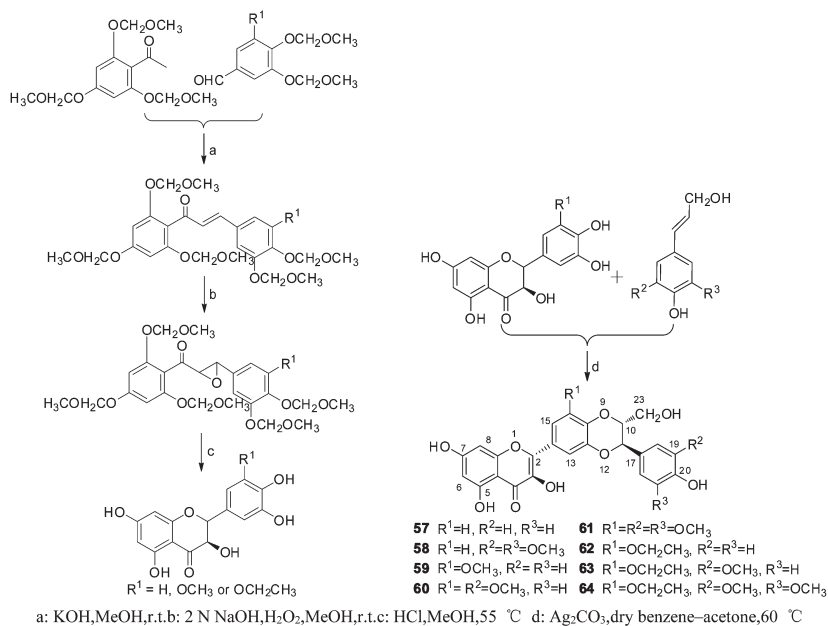
图 12 5'-Methoxyhydnocarpin-D 的合成<sup>[42]</sup>Fig. 12 Synthesis of 5-Methoxyhydnocarpin-D<sup>[42]</sup>

随后 Guz 等<sup>[48]</sup>又合成了一系列的水飞蓟宾类似物,并探索了在小檗碱存在下合成产物对金色葡萄球菌抑制作用的构效关系。研究结果显示合成产物的活性与天然产物木犀草素的活性相当或更强,当母体结构 56 的  $\text{R}^1, \text{R}^2$  为乙酰基或者氢时,化合物的抑菌活性较高。 $\text{R}^3$  为甲氧基时活性降低, $\text{R}^6$  为羟基时,活性也降低。 $\text{R}^4, \text{R}^5$  的结构对于活性的影响起到很大的作用,当它们同时为甲氧基也使活性降低,同时为氢时则所得产物将失去活性。



### 3.4 新型水飞蓟宾类似物的合成

浙江大学赵昱教授课题组<sup>[49,50]</sup>对水飞蓟宾的 B 环或 E 环结构改造进行了大量研究,设计合成了 8 种不同的水飞蓟宾类似物(图 13),并通过 NBT 还原比色法考察了它们的抗氧化活性。由表 2 可以看出化合物 60 具有很好的清除超氧自由基能力,其半抑菌浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 26.5  $\mu\text{M}$ ,而槲皮素  $\text{IC}_{50} = 38.1 \mu\text{M}$ ;化合物 58、61、64 对两种自由基均显示出一定的清除作用。研究表明,在 B 环和 E 环上引入甲氧基将会提升水飞蓟宾类似物的清除超氧自由基能力,而只在 E 环引入甲氧基所得化合物的清除 DP-PH 自由基能力将有所改善。

图 13 8 种新型水飞蓟宾类似物的合成<sup>[49]</sup>Fig. 13 Synthesis of eight novel silybin analogues<sup>[49]</sup>表 2 57~64 在 40 μg/mL 浓度下对超氧自由基和 DPPH 自由基的清除率 (%)<sup>[49]</sup>Table 2 The clearance rate of 57-64 on superoxide anion and DPPH radicals at the concentration of 40 μg/mL (%)<sup>[49]</sup>

| 化合物<br>Compound | 超氧自由基<br>Superoxide<br>anion radical | DPPH 自由基<br>DPPH radical |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 57              | 15.5                                 | 11.3                     |
| 58              | 31.9                                 | 45.0                     |
| 59              | 25.1                                 | 14.5                     |
| 60              | 69.7a                                | 13.9                     |
| 61              | 44.4                                 | 37.5                     |
| 62              | 27.6                                 | 17.8                     |
| 63              | 28.8                                 | 18.7                     |
| 64              | 44.3                                 | 41.2                     |
| Quercetin       | 64.4b                                | 99.5c                    |

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> = 2.65 × 10<sup>-5</sup> M. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> = 3.81 × 10<sup>-5</sup> M. <sup>c</sup>IC<sub>50</sub> = 3.20 × 10<sup>-6</sup> M.

## 4 结束语

水飞蓟素或水飞蓟宾的部分生物活性在国际上仍有争议<sup>[51,52]</sup>,但大量的研究表明,水飞蓟宾具有广泛的药理活性<sup>[53]</sup>,其中多种活性已经显示出很好的开发潜力,这也预示了水飞蓟宾是一种具有极高研究价值的药用先导化合物。为改善其溶解性和药

代动力学性质,对水飞蓟宾 3 位或 23 位羟基进行酯化或糖苷化等修饰,可明显改善水飞蓟宾的溶解性,但修饰后产物的生物活性较母体有所减弱;对母体各环结构修饰后的部分化合物表现出比水飞蓟宾更好的生物活性,尤其是 2,3-脱氢水飞蓟宾衍生物显示出很好的清除自由基和抗脂质过氧化活性。因此,通过化学修饰筛选出高效低毒的水飞蓟宾衍生物及类似物,研究其在生物体内的作用机理及毒性和生物活性之间的关系,仍然是一项十分有价值 and 意义的研究工作。

## 参考文献

- 1 Kvasnicka F, *et al.* Analysis of the active components of silymarin. *J Chromatogr A*, 2003, 990: 239-245.
- 2 Kim NC, *et al.* Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org Biomol Chem*, 2003, 1: 1684-1689.
- 3 Dhiman RK, Chawla YK. Herbal medicines for liver diseases. *Digest Dis Sci*, 2005, 50: 1870-1812.
- 4 Lee JI, *et al.* Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006, 1116: 57-68.
- 5 Křen V, *et al.* Chemoenzymatic preparative separation of silybins A and B. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, 61: 247-251.
- 6 Mayer KE, *et al.* Silymarin treatment of viral hepatitis: a sys-

- tematic review. *J Viral Hepatitis*, 2005, 12: 559-567.
- 7 Frascini F, *et al.* Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest*, 2002, 22: 51-65.
  - 8 Saller R, *et al.* The use of silymarin in the treatment of liver. *Diseases Drugs*, 2001, 61: 2035-2063.
  - 9 Ball KR, Kowdley KV. A review of *Silybum marianum* (milk thistle) as a treatment for alcoholic liver disease. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39: 520-528.
  - 10 Zhao J, *et al.* Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 811-816.
  - 11 Singh RP, Agarwal R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid Redox Sign*, 2002, 4: 655-663.
  - 12 Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer prevention by silibinin. *Curr Cancer Drug Tar*, 2004, 4: 1-11.
  - 13 Gerhauser C, *et al.* Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res*, 2003, 523-524: 163-172.
  - 14 Křen V, Walterová D. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed Papers*, 2005, 149: 29-41.
  - 15 Yang J (杨晋), *et al.* Advances in the pharmaceutical research on the silymarin. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 185-187.
  - 16 Maheshwari H, *et al.* Preparation and pharmacological evaluation of silibinin liposomes. *Arzneimittelforschung*, 2003, 53: 420-427.
  - 17 El-Samalgly MS, *et al.* Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and *in vivo* performance. *Int J Pharm*, 2006, 319: 121-129.
  - 18 Kidd P, Head K. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos<sup>®</sup>). *Altern Med Rev*, 2005, 10: 193-203.
  - 19 Xiao YY, *et al.* The preparation of silybin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats. *Int J Pharm*, 2006, 307: 77-82.
  - 20 He J (何军), *et al.* Bioavailability of silymarin-loaded solid lipid nanoparticles. *Chin Tradit Pat Med*, 2005, 27: 19-21.
  - 21 Sun NY, *et al.* Enhanced dissolution of silymarin/polyvinylpyrrolidone solid dispersion pellets prepared by a one-step fluid-bed coating technique. *Powder Technol*, 2008, 182: 72-80.
  - 22 Lin JG(林建广), *et al.* Structure and solubility of silybin-N-meglumine. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 214-216.
  - 23 Mira L, *et al.* Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48: 753-759.
  - 24 Zhu L(朱琳), *et al.* Preparation and hepatoprotective effects inspection of silybin mono succinate. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2009, 5: 46-48.
  - 25 Giorgi R, *et al.* US Patent 4 886 791, 1989-12-12.
  - 26 Kang HP(康怀萍), *et al.* Preparation and quality inspection of sodium 11-phosphate derivative of silymarin. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2004, 35: 71-72.
  - 27 Varga Z, *et al.* Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytother Res*, 2001, 15: 608-612.
  - 28 Zhu L(朱琳), *et al.* Selective synthesis of acylate Silybin. *Syn Chem* (合成化学), 2009, 17: 262-264.
  - 29 Hu X(胡昕), *et al.* Advances in glycosidation modification of flavonoids. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2007, 19: 465-473.
  - 30 Kren V, *et al.* Glycosylation of silybin. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1, 1997, 17: 2467-2474.
  - 31 Kren V, *et al.* Glucosylation of silybin by plant cell cultures of *Papaver somniferum* var. *setigerum*. *Phytochemistry*, 1998, 47: 217-220.
  - 32 Kubisch J, *et al.* Chemoenzymatic preparation of oligoglycosides of silybin, the flavonolignan from *Silybum*. *Heterocycles*, 2001, 54: 901-915.
  - 33 Kosina P, *et al.* Antioxidant properties of silybin glycosides. *Phytother Res*, 2002, 16: S33-S39.
  - 34 Gažák R, *et al.* Oxidised derivatives of silybin and their anti-radical and antioxidant activity. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12: 5677-5687.
  - 35 Kurkin VA, *et al.* Antioxidant properties of flavolignans from *Silybum marianum* fruits. *Rastitel'nye Resursy*, 2003, 39: 89-94.
  - 36 Maitrejean M, *et al.* The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of p-glycoprotein. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 157-160.
  - 37 Perez-Victoria JM, *et al.* High-affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a leishmania tropica KP-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin. *Antimicrob Agents Chem*, 2001, 45: 439-446.
  - 38 Perez-Victoria JM, *et al.* Correlation between the affinity of flavonoids binding to cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry*, 1999, 38: 1736-1743.
  - 39 Plíšková M, *et al.* Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicology*, 2005, 215: 80-89.

## 大蒜辣素(二烯丙基硫代亚磺酸酯)性质及相关研究进展

李新霞<sup>1,2\*</sup>, 林守峰<sup>1</sup>, 陈 坚<sup>1,2</sup><sup>1</sup>新疆医科大学药学院药化 有机教研室, 乌鲁木齐 830054; <sup>2</sup>新疆埃乐欣药业有限公司, 乌鲁木齐, 830011

**摘要:** 大蒜辣素作为大蒜的主要生物活性物质因其不稳定性使用受到很大限制, 本文综述了大蒜辣素的理化性质及稳定性和大蒜辣素制备及分析方法等研究的相关进展。

**关键词:** 大蒜辣素; 理化性质; 稳定性

中图分类号: R284. 1; R284. 2; R284. 3

文献标识码: A

## Research Advances on Properties of Allicin (Diallyl-thiosulfinate) and Its Relevant Study

LI Xin-xia<sup>1,2\*</sup>, LIN Shou-feng<sup>1</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicinal and Organic Chemistry, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China; <sup>2</sup>Xinjiang Ailexin Pharmaceutical Co., Ltd, Urumqi 830011, Xinjiang, China

**Abstract:** Allicin is the main bioactive substance of garlic. This paper reviewed the research advances of the physicochemical property and the stability of allicin and preparative and analytical method.

**Key words:** allicin; physicochemical property; stability

大蒜是多年生百合科葱属植物蒜(*Allium sativum* L.)的地下鳞茎, 是历史悠久的药食两用植物。大蒜中公认的标志性成分是蒜氨酸(alliin)和大蒜辣素(allicin)<sup>[1]</sup>, 大蒜辣素作为大蒜的主要生物活性物质, 由 Cavallito 和 Bailey 在 1944 年首先从碾碎的大蒜中分离得到, 并由 Cavallito 第一个阐明碾碎大蒜有气味成分的物理性质和化学结构, 并命名为“allicin”, 化学结构为  $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{S}-\text{CH}_2-$

$\text{CH} = \text{CH}_2$ <sup>[2,3]</sup>。大蒜辣素是大蒜被粉碎后生成的一个含氧硫化物, 它的前体化合物蒜氨酸是稳定的, 与蒜酶(蒜氨酸裂解酶, Alliinase)分处大蒜细胞的不同部位, 大蒜经粉碎后, 蒜氨酸与蒜酶相遇, 快速反应产生大蒜辣素(图 1)。因此完整、新鲜的大蒜中并没有大蒜辣素, 大蒜辣素不稳定, 可进一步分解为一系列含硫的化合物。

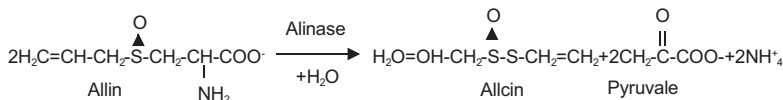


图 1 蒜酶催化裂解蒜氨酸生成大蒜辣素、丙酮酸和氨

Fig. 1 Alliinase catalytic enzymolysis alliin to generated allicin, pyruvate and ammonia

国外大量文献报道大蒜辣素的药理作用, 但因其不稳定性, 对进一步深入进行大蒜辣素的药学研究等带来一定困难。

## 1 大蒜辣素的理化性质

大蒜辣素(allicin, Diallyl thiosulfinate), 化学名为二烯丙基硫代亚磺酸酯(2-propene-1-sulfinothioic acid, S-2-propenyl ester), 分子式  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$ , 分子量 162.23, 纯大蒜辣素为无色油状液体, 比重 1.112 (20 °C,  $d^{20}$ ), 折射率( $n^{20}_D$ )1.561, 无旋光性, 10 °C 时在水中的溶解度约为 2.5%, 溶于乙醇、苯、乙醚等有机溶剂<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2010-01-06 接受日期: 2010-06-04

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BA130B02-4); 科技部国家中小企业创新基金(07C26216502091); 自治区科技支撑计划(200891124)

\* 通讯作者 Tel: 86-991-4365034; E-mail: lxx6668@163.com

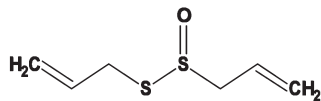


图2 大蒜辣素(Allicin)的化学结构

Fig. 2 The chemical structure of allicin

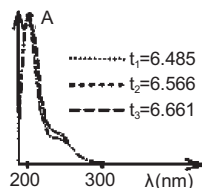


图3 不同保留时间下大蒜辣素峰的光谱图

Fig. 3 The spectrum of allicin in different retention time

纯大蒜辣素对皮肤有刺激性,与其他烯丙基硫化物相比更具有蒜香味<sup>[5]</sup>。大蒜辣素水溶液的pH值约为6.5,静止可见油状沉淀,随着少量二氧化硫的形成,酸性略有增加,加入碱后烯丙基二硫化物沉淀立即失活,并形成碱性亚硫酸盐<sup>[2]</sup>。对热和碱不稳定,对酸较稳定<sup>[6]</sup>。

德国 Herwig Jansen<sup>[7]</sup>等1987年报道大蒜辣素纯品为淡黄色油状液体,采用高效液相的二极管阵列检测器检测大蒜辣素的UV光谱,最大吸收波长为202 nm,特征肩峰接近240 nm,与大蒜辣素水溶液的光谱数据一致(图3)。将大蒜辣素于铝镜表面成膜,采用反射技术测定了大蒜辣素的红外光谱(图4)。

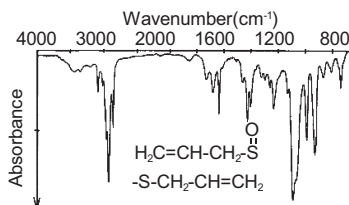


图4 大蒜辣素的红外吸收光谱图

Fig. 4 The infrared absorption spectrum of allicin

## 2 大蒜辣素的稳定性研究

大蒜辣素化学性质不稳定,遇光、热或有机溶剂

降解成各种含硫有机化合物(图5)。Brodnitz发现大蒜辣素在20℃经20小时后几乎完全分解为二烯丙基二硫化物(diallyl disulfide, 66%)、二烯丙基三硫化物(diallyl trisulfide, 9%)、二烯丙基硫化物(diallyl sulfide, 14%)、二氧化硫(sulfur dioxide)及微量的大蒜辣素脱水产物(4和5)<sup>[8]</sup>。

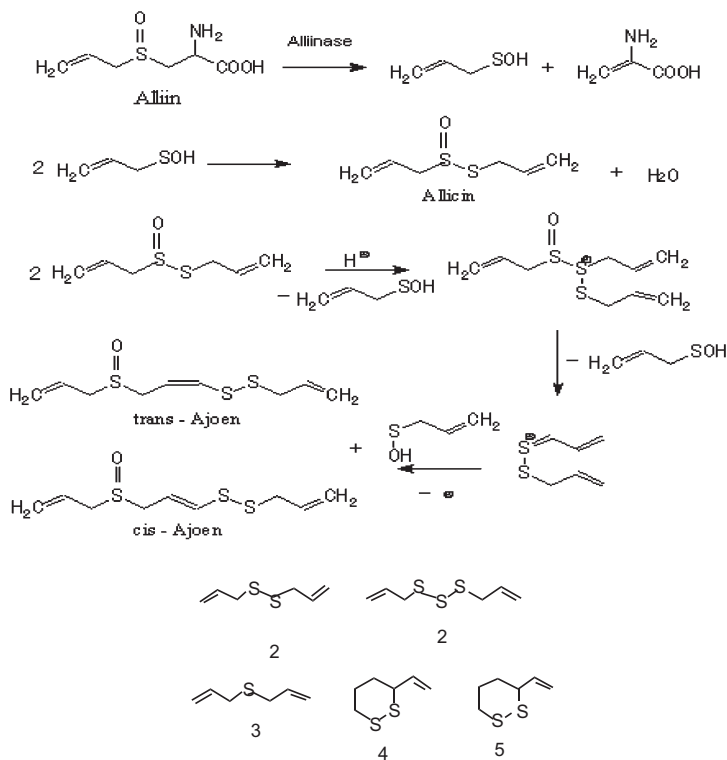


图5 蒜酶催化裂解蒜氨酸生成大蒜辣素及大蒜辣素进一步分解过程及产物

Fig. 5 Alliinase catalytic enzymolysis alliin to generate allicin and the further decomposed product of allicin

Lawson<sup>[9]</sup>课题组将大蒜粉碎后提取大蒜辣素, 研究显示 23 °C 时 16 h 后被分解, 半衰期为 30 ~ 40 d, 但大蒜辣素稀的水溶液更稳定一些。该课题组后期又报道, 室温下纯大蒜辣素半衰期是 2 ~ 16 h; 在大蒜汁或破碎大蒜中其半衰期是 2.4 d; 1:1 大蒜汁和水的稀释液中半衰期是 22 d。冷冻干燥可以使大蒜辣素的寿命延长 20 d<sup>[10]</sup>。

日本研究人员 Hiroyuki<sup>[11]</sup> 等以美国 LKT 实验室 (LKT Laboratories, MN, USA) 提供的含量为 99.39% 的大蒜辣素对照品 (需在 -70 °C 保存, 用时开启), 研究大蒜水提取物中的大蒜辣素的稳定性, 实验时间 30 d, 在一定温度, 大蒜辣素的减少与时间的关系符合一级动力学:  $N_t = N_0 e^{-kt}$ 。  $N_t$  与  $N_0$  分别为第  $t$  天与第一天大蒜辣素的量, 并根据获得的稳定性曲线获得  $k$  值后计算半衰期, 半衰期  $t_{1/2} = \ln 2 / k = -0.693 / -k$ 。实验结果, 4 °C 时大蒜辣素的半衰期约为 1 年 (浓度从 1.8 mg/mL 降至 0.9 mg/mL), 15 °C 时的半衰期为 32 d, 37 °C 时的半衰期仅为 1 d (浓度从 2.0 mg/mL 降至 1.0 mg/mL)。23 °C 时的半衰期为 9.4 d, 此数据结果与 Lawson 课题组研究结果不一致, Hiroyuki 认为稳定性与大蒜辣素溶液的浓度有关, 差异是浓度不相同所致。

### 3 大蒜辣素的制备方法

文献报道大蒜辣素的制备方法主要有生物合成法<sup>[12]</sup>和化学合成法<sup>[13]</sup>。

Herwig Jansen<sup>[7]</sup> 等以二烯丙基二硫化物、间氯过氧苯甲酸为原料化学合成大蒜辣素, 用氯仿、水、乙醚多步提取后减压除去溶剂, 得到大蒜辣素的粗品。以 Sephadex LH-20 (26 × 580 mm) 进行柱分离, 粗品中加入 150 °C 干燥的硅胶, 于室温干燥的空气流除去乙醚。硅胶-大蒜辣素吸附物于干燥器中以 98% 硫酸干燥, 置于 -24 °C 贮存, 三个月大蒜辣素对照品的含量和纯度没有明显减少。硅胶吸附前与吸附干燥后之差为大蒜辣素的量, 使用时以流动相提取吸附的大蒜辣素, 可作为大蒜辣素对照品, 以 HPLC 测定纯度大于 99%, IR、MS 对结构进行了确认。

美国专利<sup>[14]</sup> 报道生物合成法制备大蒜辣素, 专利中特别指明蒜酶为天然来源, 蒜氨酸采用天然来源或人工合成, 制成一定浓度水溶液后与蒜酶反应转变为大蒜辣素。以低沸点非极性溶剂提取大蒜辣素。可得到的大蒜辣素纯品, 但必须保存在 -70 °C,

以防止大蒜辣素分解。

Gregorio<sup>[13]</sup> 采用另一种化学合成法: 称取 1 g 二烯丙基二硫化物, 50 mL 二氯甲烷溶解; 称取 1.69 g 单过氧邻苯二甲酸镁 (3.42 mmol) (MMPO) 和 232 mg (0.68 mmol) 的  $(\text{Bu})_4\text{NHSO}_4$ , 用 50 mL 水溶解后, 用 0.1 M NaOH 中和, 用冰醋酸调节 pH 至 4.6, 将两溶液加入 500 mL 的烧瓶中, 在室温下, 搅拌反应 1 h, 移走水相, 有机相再加 50 mL pH 6.6 的 0.1 mol/L 的碳酸铵进行清洗, 放入 -20 °C 冰箱 1 h, 迅速真空抽滤, 滤液放在 -80 °C 保存。取 12 mL 滤液, 用  $\text{N}_2$  气流吹去溶剂使成 4 mL, 用制备型 TLC 进行分离 (条件: 硅胶 G, 正己烷-异丙醇 (92:8) 为展开剂), 刮下  $R_f = 0.3$  处的硅胶, 用二氯甲烷提取, 提取液用旋转蒸发器浓缩后, 得油状残渣, 用 50 mL 水溶解后, 用  $\text{C}_{18}$  小柱进行固相萃取, 得纯度相对较高的大蒜辣素。

Rabinkov<sup>[15]</sup> 课题组使用  $N, N'$ -二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (DSC) 或者对硝基苯基氯甲酸酯活化载体生成稳定的固定化蒜酶, 固定化的蒜酶在室温下被装入柱中, 蒜氨酸溶液以 7 mL/h 流速注入柱中, 连续产生大蒜辣素, 大蒜辣素生产的效率与固定化酶的比活力有直接的比例。以合成或天然提取的高含量蒜氨酸为原料, 蒜酶催化蒜氨酸反应可生成纯度较高的大蒜辣素, 一般以有机溶剂提取时可能会使蒜酶失活, 美国专利<sup>[14]</sup> 报道正戊烷、乙醚和氯仿不会使蒜酶失活, 但甲醇水溶液中甲醇含量大于 80% 时, 会抑制蒜酶活力。

### 4 大蒜辣素的分析方法

Fujiwara<sup>[16]</sup> 等 1955 年报道了大蒜辣素纸层析色谱鉴别大蒜辣素的方法, 详细描述了展开系统、显色剂及  $R_f$  值。

第一个定量测定大蒜辣素的方法是根据丙酮酸的专属性反应, 即丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼的反应<sup>[17]</sup>, 之后还有采用丙酮酸与亚硝基铁氰化钠和叠氮碘、 $N$ -乙基顺丁烯二酰亚胺及氢氧化钾的 2-丙醇溶液<sup>[18-20]</sup>。这些测定方法均为比色法, 最大的缺陷是产生的物质不稳定, 此外由于蒜酶裂解大蒜中所有的烷基半胱氨酸亚砷均能生成丙酮酸, 所以测定值比实际值偏高。

由于大蒜辣素对热不稳定, 有研究采用 GC 或 GC-MS 研究了大蒜辣素分解产物, 如二硫化物和三硫化物<sup>[21,22]</sup> 来确定大蒜辣素的量。

HPLC 法是直接定性和定量测定大蒜辣素及大蒜中的其他成分的方法,由于大蒜辣素对照品来源有限,大多采用内标法定量测定大蒜辣素含量<sup>[23,24]</sup>。

Marta de Diego<sup>[25]</sup>等采用 RP- $C_{18}$  ( $4 \times 125$  mm) 色谱柱,流动相:甲醇-水 (50/50, v/v), 检测波长 220 nm。羟苯乙酯作为内标物,用来检测大蒜粉和 大蒜片剂中潜在大蒜辣素的含量。

目前欧洲药典 6.0<sup>[26]</sup> 记载的“garlic powder”中大蒜辣素的含量测定也是以羟苯丁酯为内标物,采用  $C_{18}$  柱 ( $4 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ), 甲醇-1% 甲酸 (60:40) 为流动相,检测波长 254 nm。测定大蒜辣素峰面积,按 1 mg 羟苯丁酯相当于 8.65 mg 的大蒜辣素计算含量。

袁耀佐<sup>[27]</sup>对欧洲药典中测定大蒜辣素的方法进行了改进。采用羟苯乙酯作为内标物,检测波长改为 242 nm,确定 1 mg 羟苯乙酯相当于 4.71 mg 的大蒜辣素。

Herwig Jansen<sup>[7]</sup>等化学合成了大蒜辣素对照品,直接用外标法 HPLC 反相色谱,流动相为甲醇:0.1% 甲酸水 = 60:40,大蒜辣素得到很好分离,以二极管阵列检测器,测定多个波长处的峰高比例,得到对照品的纯度,并测定了地中海区域鲜蒜中的大蒜辣素潜在含量。

Rabinkov<sup>[28]</sup>研究小组采用高效液相色谱法 RP- $C_{18}$  柱,甲醇:0.1% 甲酸 = 60:40 同时测定蒜氨酸和 大蒜辣素,并建立一种衍生化光谱法测定大蒜辣素的含量。

## 5 展望

大蒜辣素是大蒜发挥药效的主要活性成分之一,将其开发为治疗药物是国内外研究的热点,并且愈来愈受到关注。早在 1944 年 Cavallito<sup>[1]</sup> 就报道了小鼠毒性试验表明,大蒜辣素水溶液的静脉给药  $LD_{50}$  为 60 mg/kg、皮下给药  $LD_{50}$  为 120 mg/kg。Rabinkov<sup>[29]</sup> 课题小组进行大蒜辣素药物研究在 2004 年进入研发二期 (Phase II), 应用类别为抗菌,抗真菌,抗感染治疗,抗血小板治疗,凝血功能障碍治疗,血液学药物,脂蛋白质紊乱治疗,代谢药物。由于大蒜辣素不稳定,动物试验所用的大蒜辣素为临用前由蒜氨酸与蒜酶反应制备,但蒜氨酸为合成品。

国内外学者已经对大蒜辣素形成的两个关键因

素蒜酶和蒜氨酸作了大量深入的研究,同时也对大蒜辣素的药用活性和检测方法进行了大量研究,但由于大蒜辣素极不稳定,为从分子水平研究大蒜辣素作用机制带来一定困难。对大蒜辣素理化性质的充分认识,有利于进一步分离、提取、纯化、分析检测和保存大蒜辣素,使大蒜中的这一有效成分的开发和利用取得突破性进展。

## 参考文献

- 1 Iberl B, *et al.* Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med*, 1990, 56: 320-326.
- 2 Cavallito CJ, Bailey JH. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I: isolation, physical properties and antibacterial action. *J Am Chem Soc*, 1944, 66: 1950-1951.
- 3 Cavallito CJ, *et al.* Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II: determination of the chemical structure. *J Am Chem Soc*, 1944, 66: 1952-1954.
- 4 Merck. Merck Index, 13th Edition. New York: Chapman and Hall, 2001. 49.
- 5 Eric B, *et al.* Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 7045-1055.
- 6 Block E. The chemistry of garlic and onion. *Sci Am*, 1985, 252: 94-98.
- 7 Jansen H, *et al.* Allicin characterization and its determination by HPLC. *Planta Med*, 1987, 53: 559-562.
- 8 Brodnitz MH, *et al.* Flavor components of garlic extract. *J Agric Food Chem*, 1971, 19: 273-275.
- 9 Hahn G, *et al.* Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. 1-24.
- 10 Lawson LD. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. in: *phytochemicals of Europe: chemistry and biological activity*, ACS symposium series #691. Lawson LD, Bauer R. Eds. Washington DC: American Chemical Society, 1998. 176-209.
- 11 Hiroyuki F, *et al.* Thermostability of allicin determined by chemical and biological assay. *J Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 2877-2883.
- 12 Jansen H, *et al.* Alliinase from garlic, *Allium sativum*, investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and on a new coenzyme. *Planta Med*, 1989, 55: 440-445.
- 13 Gregorio CV. Synthesis of allicin and purification by solid-phase extraction. *J Anal Biochem*, 2001, 290: 376-378.
- 14 Williams DM, Pant CM. Process for the production of allicin. Pat. US2004247711, 2004. (下转第 61 页)

# 竹笋深加工及其功能活性研究进展

林倩,王强\*,刘红芝

中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193

**摘要:**竹笋是一种高蛋白、低脂肪、富纤维的食品。本文综述了竹笋膳食纤维、活性多糖、含氮化合物等深加工产品的制备方法,比较了不同方法对竹笋深加工产品纯度、得率、功能活性等方面的影响;对竹笋改善肠功能、抗氧化、调节血脂血糖、消炎抗肿等方面的功能活性进行了论述;分析了目前竹笋深加工过程中存在的问题,对今后研究的方向、重点和趋势进行了展望。

**关键词:**竹笋;膳食纤维;活性多糖;抗氧化;调节血脂

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

## Research Progress on Deep-processing and Functional Activities of Bamboo Shoot

LIN Qian, WANG Qiang\*, LIU Hong-zhi

*Institute of Agro - food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*

**Abstract:** Bamboo shoot is one kind of nutritive food with high protein, low fat and rich dietary fiber. The preparation methods of functional deep processed products from bamboo shoots, such as dietary fiber, polysaccharides, nitrogen compounds were summarized in this article. The effects on product purity, yield and functional activities caused by different methods were compared. And the beneficial effects on bowel function, oxidation resistance, antilipemic function, hypoglycemic activity, and anti-inflammatory were expounded. Besides, the existing problems of bamboo shoot deep-processing were analyzed, and the research direction and priority were prospected.

**Key words:** bamboo shoot; review; dietary fiber; polysaccharides; oxidation resistance; antilipemic function

竹笋是竹子膨大的芽和幼嫩的茎,也是传统的森林蔬菜之一。我国食用竹笋历史悠久,中医认为竹笋味甘性寒,可滋阴益气、清热祛痰、消食去烦。“十五”以来,我国竹产业发展迅速,竹笋产量逐年递增,40%的竹笋用于鲜销,60%需要靠竹笋罐藏、腌渍、干制、冻干等加工手段来转化<sup>[1]</sup>,预计2010年笋制品产量将达到80万吨。但是,初加工竹笋产品存在产值较低,浪费严重等问题,要将竹笋资源优势转化为经济优势,就必须加大科研投入,重视产品创新。开发具有功能活性的竹笋深加工产品,综合利用竹笋资源,提高竹笋产业经济效益,创造社会效益及增加环境效益具有重要意义。本文就国内外对竹笋深加工及其功能活性研究进行综述。

### 1 竹笋文献的统计分析

通过对国内1999~2008年的竹笋相关文献统

计分析(见表1,文献均检索自CNKI数据库),可以看出,对竹笋保鲜、加工等利用研究的文献数量占34.22%,而对竹笋营养、采后生理等基础研究的文献仅占13.25%,表明我国对基础研究相对不足;通过对竹笋利用研究的文献统计分析(见表2)可知,对竹笋初加工研究占46.48%,是深加工文献数量的2.54倍,说明国内对竹笋深加工利用的研究有待加强。从历年的趋势来看,深加工文献数量在2001~2007年都只有1~2篇,但2008年增至8篇,可见国内竹笋研究侧重点开始由初加工转向深加工。通过Science Direct检索英文文献,从1966~2009年共检索到23篇竹笋相关研究文献,关于竹笋功能性质深加工的文献都集中在2009年,这表明对竹笋功能性质及深加工的研究也开始引起国际学者的重视。在此基础上,本文对竹笋深加工及其功能活性研究进展进行了综述,以为竹笋深度研发提供参考。



表 1 1999~2008 年竹笋相关文献统计分析

Table 1 Statistical analysis of the literature for bamboo shoots in 10 years from 1999 to 2008

| 年份<br>Year | 栽培育种<br>Cultivation<br>and breeding | 利用研究<br>Utilization<br>research | 基础研究<br>Basic<br>research | 经济政策<br>Economic<br>policy | 饮食文化<br>Cooking<br>culture | 合计<br>Total | 平均<br>Average |
|------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|---------------|
| 1999       | 8                                   | 16                              | 1                         | 2                          | 3                          | 30          | 7.23%         |
| 2000       | 9                                   | 15                              | 1                         | 4                          | 6                          | 35          | 8.43%         |
| 2001       | 13                                  | 6                               | 5                         | 3                          | 0                          | 27          | 6.51%         |
| 2002       | 20                                  | 22                              | 5                         | 10                         | 9                          | 66          | 15.90%        |
| 2003       | 11                                  | 17                              | 4                         | 3                          | 5                          | 40          | 9.64%         |
| 2004       | 21                                  | 18                              | 6                         | 7                          | 6                          | 58          | 13.98%        |
| 2005       | 13                                  | 12                              | 9                         | 4                          | 4                          | 42          | 10.12%        |
| 2006       | 16                                  | 8                               | 8                         | 5                          | 4                          | 41          | 9.88%         |
| 2007       | 6                                   | 9                               | 4                         | 2                          | 9                          | 30          | 7.23%         |
| 2008       | 7                                   | 19                              | 12                        | 6                          | 2                          | 46          | 11.08%        |
| 合计 Total   | 124                                 | 142                             | 55                        | 46                         | 48                         | 415         |               |
| 平均 Average | 29.88%                              | 34.22%                          | 13.25%                    | 11.08%                     | 11.57%                     |             |               |

表 2 1999~2008 年竹笋利用研究文献统计分析

Table 2 Statistical analysis of the literature for the research on the utilization of bamboo shoots

| 年份 Year    | 保鲜 Preservation | 初加工 pretreating | 深加工 Deepprocessing | 总计 Total | 平均 Average |
|------------|-----------------|-----------------|--------------------|----------|------------|
| 1999       | 7               | 5               | 4                  | 16       | 11.27%     |
| 2000       | 4               | 8               | 3                  | 15       | 10.56%     |
| 2001       | 2               | 3               | 2                  | 6        | 4.23%      |
| 2002       | 9               | 11              | 2                  | 22       | 15.49%     |
| 2003       | 6               | 10              | 1                  | 17       | 11.97%     |
| 2004       | 4               | 12              | 2                  | 18       | 12.68%     |
| 2005       | 4               | 7               | 1                  | 12       | 8.45%      |
| 2006       | 3               | 4               | 1                  | 8        | 5.63%      |
| 2007       | 6               | 1               | 2                  | 9        | 6.34%      |
| 2008       | 6               | 5               | 8                  | 19       | 13.38%     |
| 合计 Total   | 51              | 66              | 26                 | 142      |            |
| 平均 Average | 35.92%          | 46.48%          | 18.31%             |          |            |

## 2 竹笋深加工研究现状

目前,研究人员对竹笋深加工的研究主要集中在从竹笋中提取膳食纤维、活性多糖、低聚糖、含氮化合物等功效成分方面;另外,利用竹笋生产生物乙醇也成为新的研究趋势。

### 2.1 竹笋膳食纤维

竹笋及笋渣含有丰富的膳食纤维成分,目前提取竹笋膳食纤维的方法主要有化学法、发酵法和酶法三种。

化学法制取竹笋膳食纤维是将笋原粉浸泡漂洗后,经碱处理(10% NaOH, 60 °C, 2 h),酸浸泡(30% 乙酸, 60 °C, 2 h),再经漂洗、过滤、脱色等处理得到成品,最终产品的总膳食纤维含量为 52.7%<sup>[2]</sup>。

发酵法是目前常用的方法,以麻竹笋为原料,接种 18% 的绿色木霉发酵母液, pH 7.3, 温度 36 °C, 发酵时间 56 h, 得到产品的总膳食纤维含量为 68.52%<sup>[3]</sup>。

邓安彬<sup>[3]</sup>用混合酶法提取麻竹笋膳食纤维的

工艺为:0.2%混合酶(淀粉酶和纤维素酶,比例1:1),温度60℃,pH 6.0,水解1 h后再添加0.1%的中性蛋白酶,在50℃、pH 6.0条件下酶解2.5 h,产品的总膳食纤维含量可达70.0%。

综上,酶法提取的竹笋膳食纤维纯度更高,而且酶法生产周期短,对生产环境要求低,操作简便,是一种较易于实际生产的方法。由于酶法成本较高,今后研究中可以考虑采用物理、化学和生物的综合方法。

## 2.2 竹笋活性多糖

提取竹笋活性多糖的方法主要有化学浸提法、柱层析法和生物酶法。

李义<sup>[4]</sup>以毛竹笋为原料提取水溶性多糖,水料比10:1(mL:g),提取时间4 h,温度100℃,95%乙醇醇析,产品得率为0.3%,其中,乙醇体积分数是影响竹笋水溶性多糖得率的主要因素。Katoy<sup>[5]</sup>等用草酸胺-草酸连续提取分离毛竹笋细胞壁多糖,由4%和24%的氢氧化钾分别获得 $\beta$ -D-葡聚糖和木葡聚糖,通过甲基化作用和酶法分析了两种多糖的结构和组成。

Kweon M<sup>[6]</sup>等采用热水浸提、DEAE-Toyopearl 1650 M柱层析、淀粉酶消化、伴刀豆蛋白A吸附和Sephacryl S-100 HR柱层析,从竹笋中分离和纯化得3种水溶性的 $\beta$ -葡聚糖(BS-BGA、BS-BGB和BS-BGC),经甲基化分析和NMR光谱测定3种多糖的相对分子质量范围为14,500~85,300。

Tadashi I<sup>[7-13]</sup>等通过酶解法从毛竹竹笋细胞壁中得到7种糖类化合物,分别是:二阿魏酰阿拉伯木聚己糖、阿魏酸阿拉伯木聚糖、阿魏酸木葡聚糖、对香豆酰阿拉伯木聚糖、鼠李半乳糖醛酸聚糖硼(II)复合物和半纤维素多糖,通过核磁共振、甲基化分析及质谱分析方法研究了木葡聚糖和阿拉伯木聚糖的结构及连接方式,以及阿魏酸阿拉伯木聚糖中阿拉伯呋喃糖的乙酰化作用。

活性多糖是目前研究热点之一,尤其是多糖的修饰改性工艺,通过改性,多糖的物化性质和生物活性得到有效改善,其应用范围也能得到进一步拓宽。

## 2.3 竹笋含氮化合物

竹笋含氮化合物主要包括竹笋蛋白质、过氧化物酶及氨基酸肽类。

提取蛋白质一般用酸沉法,原料经捣碎后加水抽提,再经酸沉(pH 5.0~5.5)、离心(5000 r/min)

得到竹笋蛋白,500 g鲜笋脚料可获得1.4 mg蛋白<sup>[14]</sup>。Wang HX等<sup>[15]</sup>以新鲜麻竹笋为原料,通过均质、离心(15,000 g,30 min),再经过DEAE-纤维素色谱柱(5×20 cm)层析,Tris-HCl缓冲液洗脱,羧甲基纤维素-琼脂糖凝胶亲和色谱柱(1.5×10 cm)透析,再经中性醋酸铵缓冲液洗脱得到抗真菌蛋白。

过氧化物酶的制备是回收竹笋蛋白后,对剩余液结合硫酸铵盐析、丙酮分级,采用快速阳离子纤维素层析纯化,磷酸缓冲液进行梯度洗脱后,分光光度法检测酶活,合并酶活较高管的酶液并浓缩,得到Rz值为3.1的纯酶,回收率为28%<sup>[14]</sup>。

Masatoshi F<sup>[16]</sup>利用亲和色谱从毛竹中分离出2种抗菌肽Pp-AMP<sub>1</sub>和Pp-AMP<sub>2</sub>,并测定了其氨基酸序列,发现与槲寄生毒素有高度同源性。张英等<sup>[17]</sup>利用超滤和反渗透技术从竹笋加工废液中制备出竹笋氨基酸肽类提取物,氨基酸总量(以干基计)10%~50%,游离氨基酸含量占5%~40%,超滤膜系统条件为40~50℃,0.2~1 MPa,反渗透膜系统压力在1~2.5 MPa。张金萍等<sup>[18]</sup>从毛竹春笋(或笋加工废液)中分离、精制酪氨酸,具体工艺流程为竹笋破碎抽提上清液,等电点沉淀,乙醇胺溶解后沉淀,复溶再沉淀,干燥得到纯品,制取得率为3.8%~4.2%,精制纯度大于98.5%。

化学法提取竹笋含氮化合物易造成环境污染,可考虑用酶法制备竹笋肽产品;今后研究重点还应集中在对竹笋含氮化合物的分级精制方面。

## 2.4 竹笋醇类及苷类

提取竹笋醇类和苷类的方法以有机溶剂萃取法和超临界萃取法为主。

陈竞<sup>[19]</sup>以苦竹笋根为原料,采用75%乙醇浸提,有机溶剂(氯仿、正丁醇)萃取,氯仿层浸膏过硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯)洗脱,正丁醇浸膏过硅胶柱(氯仿-甲醇)梯度洗脱,分离确定了6个化合物,分别为:对甲氨基苯乙醇酸 $\beta$ -D-葡萄糖苷、腺苷、对羟基苯乙醇、对羟基苯甲醇和 $\beta$ -谷甾醇、胡萝卜苷,化合物总量的得率为0.4%。

竹笋次生代谢产物中甾醇含量最高(251.4~279.5 mg/100 g),陆柏益<sup>[20]</sup>以水煮笋加工废弃物为原料,用超临界萃取、短程分子蒸馏制得竹笋甾醇,超临界萃取最佳工艺为压力26.2 MPa、温度43.4℃、CO<sub>2</sub>流量25.4 L/h和萃取时间2.5 h,甾醇萃取率为93.4±4.5%;蒸馏精制最佳工艺为整流温度180℃、真空度1.3 Pa、刮膜转速220 r/min、进料

速率 5 mL/min、冷凝温度 15 °C,重组分得率为 38.2 ± 2.4%,总甾醇含量为 46.8 ± 3.4%。

超临界流体萃取法与有机溶剂萃取法相比,具有得率高、无溶剂残留等优点,但超临界流体萃取的实际应用还很有限,需要加强对此方法的基础研究,建立分析模型应用于实际生产。

## 2.5 竹笋黄酮类化合物

目前,文献报道的提取竹笋黄酮的主要方法有乙醇索氏提取法和超声波提取法。

许丽旋等<sup>[21]</sup>以毛竹笋壳粉为原料,用乙醇在 80 ~ 90 °C 水浴下索氏提取 2 ~ 4 h 后抽滤,将滤液通过聚酰胺砂芯层析柱,用乙醇进行洗脱,收集洗脱液得到黄酮。

江丽<sup>[22]</sup>采用超声波从竹笋中提取黄酮类化合物,在功率 240 W、65 °C 下萃取 40 min,黄酮含量可达到 0.72 mg/g,其中萃取温度对总黄酮得率的影响最大。

对竹笋黄酮的提取可以借鉴竹叶黄酮的提取方法,考虑用微波法或大孔树脂吸附法,以期实现产业化生产。

## 2.6 竹笋生物乙醇

Tomoko S<sup>[23]</sup>等以斑竹笋和毛竹笋为原料用同步糖化发酵法生产燃料乙醇,酿酒酵母(NBRC 2347)在 YM 肉汤培养基中预先培养 24 h,温度 30 °C,摇床转速 200 r/min;在发酵摇瓶中加入 5% 磨碎处理的样品,在柠檬酸钠盐缓冲液中蒸煮 20 min,加入酶制剂(2 ~ 12 FPU/g)和酵母颗粒,恒温 30 °C 搅拌,最终产量为 139 ~ 169 g/kg,糖化产量为 69%。

# 3 竹笋的功能活性

## 3.1 排毒、减肥、改善肠功能

竹笋中富含膳食纤维,研究人员分别用体外实验、动物实验及人群试验对竹笋膳食纤维的功能性质进行了评价。

竹笋膳食纤维对重金属具有束缚作用,曹小敏<sup>[2]</sup>发酵法制备的竹笋膳食纤维对 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 的最大束缚量分别为 38.8、37.4、35.3 mol/g。

竹笋膳食纤维具有良好的持水性、持油性、溶胀性及结合水力,能够吸附胆固醇和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>;对大白鼠在蛋白质和脂肪的消化率方面也有显著影响,2.5% 以上的剂量能使脂肪的消化率显著降低,在 5% 剂量下蛋白质的消化率显著降低<sup>[3]</sup>。溶胀性及不易被消化的性质可延缓胃排空时间,减少食物和能量摄

入;吸附胆固醇,降低脂肪消化率,可减少脂肪在体内积累,促进体内脂肪代谢。

李安平等<sup>[24]</sup>动物试验表明,连续给予 5.0 g/d/kg · BW 的发酵竹笋膳食纤维 1 周后,肠道菌群失调小鼠的胃肠道内双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌数量得到恢复;在给予中、高剂量后,便秘小鼠的首便时间、小肠推进率等均有显著性变化。Eun JP 等<sup>[25]</sup>通过对健康状态的 21 ~ 23 岁的女性进行人群实验研究评价了以竹笋为膳食纤维来源对便秘症状的短期效应,对粪便排泄评价调查表的数据分析结果表明,食用竹笋组粪便体积和肠蠕动频率有所增加。

## 3.2 抗氧化和延缓衰老功能

竹笋富含黄酮类、酚类等抗氧化活性因子,研究人员体外和体内实验评价了竹笋的抗氧化和延缓衰老的功能。

江丽<sup>[22]</sup>采用碘-硫代硫酸钠滴定法对不同剂量的黄酮(0.01% 和 0.05%)进行研究,同时以 0.01% 的芦丁为对照,测定相同保存天数时植物油的过氧化值,表明竹笋黄酮对食用菜子油有明显的抗氧化作用,抗氧化能力大于芦丁,且抗氧化性与剂量成正比关系。

陈竞<sup>[19]</sup>通过跟踪监测自由基清除及酪氨酸酶抑制活性,证明竹笋中对甲氨基苯乙醇酸 β-O-葡萄糖苷 2 mg/mL 的浓度可使自由基清除率与酪氨酸酶抑制率达到 80% 以上,随浓度的增加,抑制作用增强;由 f MLP 诱导的过氧化反应中,腺苷浓度为 30 μmol/L 时,几乎能完全抑制;由 AA 诱导的过氧化反应中,对羟基苯甲醇抑制作用最强。

用 DPPH 法和 ABTS 法测定竹笋提取物的抗氧化活性,用分光光度法测定各竹笋的总多酚含量,结果表明竹笋总多酚含量与 DPPH 法和 ABTS 法测定的抗氧化活性存在显著相关性,相关系数 R 分别为 0.974 和 0.976<sup>[26]</sup>。

梅同荷等<sup>[27]</sup>用雷竹笋汁对衰老大鼠灌胃 4 周,测定鼠血浆中的丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及急性缺氧和游泳的存活时间,表明雷竹笋汁能显著延长衰老模型小鼠缺氧和游泳的存活时间,升高 SOD 活性和降低 MDA 含量。

## 3.3 调节血脂、血糖及护肝作用

竹笋甾醇能显著降低高脂血症大鼠血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇浓度和动脉粥样硬化指数,具有降脂和调脂功能;同时,能有效降低大鼠肝脏、浓度,减轻脂肪肝和肝指数的作用,对肝

脏的色泽、质地、体积有显著改善<sup>[20]</sup>。国外研究也表明竹笋提取物能够降低血清胆固醇,预防是指由于肝细胞内脂肪堆积过多而引发的脂肪肝<sup>[28]</sup>。

Shu SJ等<sup>[29]</sup>分别用不同剂量的雷竹笋汁 205.7 mg/kg(雷竹笋 I 组)和 436.4 mg/kg(雷竹笋 II 组)对糖尿病大鼠灌胃 28 d,并以健康大鼠作正常对照,测定各组大鼠肝糖原含量和血浆多种因子水平,结果表明雷竹笋汁能明显降低糖尿病大鼠血浆葡萄糖、三酰甘油、NEFA、LDL-c 和 MDA 及升高 HDL-c、SOD 和肝糖原等因子水平。

舒思洁等<sup>[30]</sup>向实验性肝损伤模型大鼠灌胃雷竹笋汁,检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、超氧化物歧化酶的活性和葡萄糖、血清甘油三酯、丙二醛含量,计算白蛋白/球蛋白比值,表明雷竹笋汁对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤大鼠肝功能和肝纤维化有明显的改善作用。

### 3.4 抑菌、消肿、抗炎作用

Lu BY<sup>[31]</sup>利用巴豆油致小鼠耳廓肿胀模型试验,表明  $\beta$ -谷甾醇(2.5 g/kg)肿胀抑制率可达到 68.0%;醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性模型研究表明竹笋甾醇能显著对抗小鼠腹腔毛细血管通透性的亢进,使腹腔洗出液的伊文思蓝浓度显著下降,肿胀抑制率 > 42.0%。

对竹笋抗炎作用机理的研究表明:PBS 25 具有良好的清除 DPPH 的作用,有良好的抗氧化活性;另外, $\beta$ -谷甾醇和 PBS 25 对热诱导的红细胞溶血均有一定的抑制效果,并呈现剂量依赖关系;竹笋甾醇可降低模型大鼠血清细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ )的含量,调节细胞因子及受体的分泌;炎症细胞因子与受体基因芯片研究分析发现竹笋甾醇可提高下调基因的水平,抑制上调基因水平,从而起到抗炎作用。

从竹笋壳提取黄酮并对其抑菌效果进行了初步研究结果证明竹笋壳黄酮提取液对金黄色葡萄球菌和藤黄八叠球菌有强烈的抑制作用,抑菌作用与黄酮提取液浓度正相关<sup>[21]</sup>。Wang HX 等<sup>[14]</sup>提取了一种竹笋抗真菌蛋白,与一般类甜蛋白相比,其分子量较小,仅为分子量 20 kDa, N-末端序列与类甜蛋白差异较大,且该蛋白不能使红血球凝聚,也没有核糖核酸酶活性。

### 3.5 免疫激活作用

竹笋多糖可经过经典或旁路途径激活补体系统,是有效的免疫激活剂<sup>[6]</sup>。研究表明竹黄酮可促进小鼠体内抗体的产生,提高体液免疫和细胞免疫

功能,增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能。

## 4 问题与展望

### 4.1 问题

竹笋功效成分提取和制备研究不足,对其功能活性的研究不明确,竹笋功能食品种类较少;竹笋生产季节性较强,产笋期集中,采后容易发生木质化和褐变,而且竹笋大多产于偏远地区,从采摘到销售的时间跨度长,竹笋保鲜问题亟待解决;初加工竹笋产品存在产值较低,浪费严重等问题,随着化肥和农药的大量施用,竹笋污染问题也开始出现。

### 4.2 展望

4.2.1 今后要注重对竹笋活性成分量效、构效关系、作用机制及稳定性的研究,从而为生产竹笋功能食品提供依据;应充分利用竹笋营养丰富、功能因子齐全的优点,结合先进的加工成型技术研制更多的功能食品,如开发减肥产品,抗衰老产品,降血脂、血糖产品等;对实验方法进行工艺放大,将深加工技术系统化、集成化,使竹笋及竹笋加工剩余物得到综合利用,也是今后研究的主要方向。

4.2.2 目前,竹笋保鲜方法主要有低温法、气调法、减压法、臭氧法、微波法及涂抹保鲜剂的方法,今后应注重成本低廉、操作方便的保鲜方法以及鲜笋活体保鲜的技术研究。不同种类、不同季节竹笋之间的采后生理变化及加工特性有很大差异,各种竹笋的最佳保鲜方法和加工方式还有待细化研究。

4.2.3 消费者对竹笋品质、口味及安全性要求越来越高,为满足市场需求,必须改善传统加工方法,研发竹笋加工新产品,同时要建立现代食品安全的理念,统一无公害竹笋标准及产品认证标准,将 HAC-CP、GMP 等应用到竹笋生产中,实现对竹笋培育、加工、贮藏、销售各个环节全程质量控制。

### 参考文献

- Huang WS(黄伟素), Lu BY(陆柏益). Advances in deep-processing technology of bamboo shoots. *Sci Silvae Sin*(林业科学), 2008, 44: 118-123.
- Cao XM(曹小敏). Studies on Preparation and Properties of Dietary Fiber of Bamboo (*phyllostachys praecoxx-preveynalis*) Shoot. Yaan: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), MSC, 2005.
- Deng AB(邓安彬). Extraction and Characters of Dietary Fiber from Bamboo Shoots and Their Dregs. Yaan: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), MSC. 2008.

- 4 Li Y(李义). Study on extraction technology of water-soluble polysaccharides from bamboo (*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie) shoots. *Chem Ind Forest Prod*(林产化学与工业), 2008, 28:99-102.
- 5 Kato Y, et al. Structural investigation of a  $\beta$ -D-glucan and axylglucan from bamboo-shoot cell-walls. *Carbohydr Res*, 1982, 109:233-248.
- 6 Kweon M, et al. Isolation and characterization of anticomplementary  $\beta$ -glucans from the shoots of bamboo. *Planta Med*, 2003, 69:56-62.
- 7 Tadashi I, Hiroi T. Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydr Res*, 1990, 206:297-310.
- 8 Tadashi I, Tadakazu H. Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr Res*, 1990, 196:175-183.
- 9 Tadashi I, et al. Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 1990, 29:1999-2003.
- 10 Tadashi I. Acetylation at O-2 of arabinofuranose residues in feruloylated arabinoxylan from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 1991, 30:2317-2320.
- 11 Tadashi I. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr Res*, 1991, (219):15-22.
- 12 Edashige Y, Tadashi I. Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 1998, 49:1675-1682.
- 13 Satoshi K, et al. A boron-rhamnogalacturonan- II complex from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry*, 1997, 44:243-248.
- 14 Jing L(江丽). Studies on Extraction Conditions of Bamboo Shell Flavonols and Peroxidase. Hefei: Anhui Agricultural University(安徽农业大学), MSc. 2008.
- 15 Wang HX, Ng TB. Dendrocin. A distinctive antifungal protein from bamboo shoots. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307:750-755.
- 16 Masatoshi F, et al. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP1 and Pp-AMP2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69:642-645.
- 17 Zhang Y(张英), et al. A preparation method and application of bamboo shoot Amino acid and peptide(竹笋氨基酸肽类提取物及其制备方法和用途). CN1854121A, 2006-11-1.
- 18 Zhang JP(张金萍), et al. The preparation and application of bamboo shoot tyrosine. Collections of the second forestry Sci-tech week among forestry industry, ZheJiang Province(浙江省第二届林业科技周科技与林业产业论文集), 2005, 224-226.
- 19 Chen J(陈竞). Study on Bamboo (*Pleioblastus amarus* (keng) keng f.) active constituents. Shanghai: Fudan University(复旦大学), MSc. 2004.
- 20 Lu BY(陆柏益). Studies on Phytosterols in Bamboo Shoot. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), MSc. 2007.
- 21 Xu LX(许丽旋), Cai JX(蔡建秀). Preliminary study on bacteriostasis of flavone extractive from shells of bamboo shoot. *World Bamboo Rattan*(世界竹藤通讯), 2006, 4(4):29-31.
- 22 Jiang L(江丽), et al. Ultrasonic extraction conditions of Bamboo Shell Flavones and its antioxidative activity on oil. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2009, 21:146-151.
- 23 Tomoko S, et al. Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production. *Bioresour Technol*, 2009, 100:6651-6654.
- 24 Li AP(李安平), Xie BX(谢碧霞). Study on bamboo shoots dietary fiber for improving the gastrointestinal functions in BALB/C mice. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2005, 26:171-173.
- 25 Eun JP, Deok YJ. Effects of bamboo shoot consumption on lipid profiles and bowel function in healthy young women. *Nutrition*, 2009, 25:723-728.
- 26 Li AP(李安平), et al. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from bamboo shoots. *Acta Nutr Sin*(营养学报), 2008, 30:321-322.
- 27 Mei TH(梅同荷), et al. Effects of Leizhusun juice on MDA, SOD and the tolerances of acute hypoxia and swimming in decrepit mice. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2007, 27:760-762.
- 28 Story JA. Bamboo shoots lower serum cholesterol in rats. *Fed Am Soc Exp Biol*, 1992, 6(5):A1653.
- 29 Shu SJ, et al. Juice of leizhusun for many plasma factors and hepatic glycogen in rats with diabetes. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9:232-233.
- 30 Shu SJ(舒思洁), et al. Effects of Leizhusun juice on liver injury and hepatic fibrosis in rats. *Shandong J Med*(山东医药), 2005, 45(7):23-25.
- 31 Lu BY, et al. Effects of genetic variability, parts and seasons on the sterol content and composition in bamboo shoots. *Food Chem*, 2009, 112:1016-1021.

# 多孔板-MTT 比色法评价植物和微生物代谢产物的抗真菌活性

钟灵允<sup>1</sup>, 王 兰<sup>2</sup>, 单体江<sup>1</sup>, 刘 浩<sup>1</sup>, 赵江林<sup>1</sup>, 徐 梁<sup>1</sup>, 周立刚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193;

<sup>2</sup> 塔里木大学塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 阿拉尔 843300

**摘要:** 多孔板-MTT 比色法测定植物和微生物代谢产物对真菌抑制活性的步骤为: 在多孔板的每孔中依次加入浓度为  $10^5$  孢子/mL 的供试真菌孢子悬液 90  $\mu$ L, 不同浓度的药液 10  $\mu$ L。25  $^{\circ}$ C 暗培养 48 h, 然后每孔中加入 8 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu$ L, 继续培养 10 h 后, 离心去上清, 加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 30 min, 离心后上清液在 510 nm 测定吸光值。采用上述条件测定了白屈菜红碱对稻瘟病菌和西瓜枯萎病菌的 MIC 值分别为 80 和 1.5  $\mu$ g/mL, IC<sub>50</sub> 值分别为 21.99 和 0.78  $\mu$ g/mL; Diepoxin  $\zeta$  对稻瘟病菌的 MIC 和 IC<sub>50</sub> 值分别为 200 和 96.21  $\mu$ g/mL。多孔板-MTT 比色法为快速有效地筛选和评价植物和微生物抗真菌活性成分创造了条件。

**关键词:** 多孔板-MTT 比色法; 植物代谢产物; 微生物代谢产物; 抗真菌活性

中图分类号: Q946.887; Q939.92; S482.2 文献标识码: A

## Evaluation of Antifungal Activity of Plant and Microbial Metabolites by Microplate-MTT Colorimetric Assay

ZHONG Ling-yun<sup>1</sup>, WANG Lan<sup>2</sup>, SHAN Ti-jiang<sup>1</sup>, LIU Hao<sup>1</sup>, ZHAO Jiang-lin<sup>1</sup>, XU Liang<sup>1</sup>, ZHOU Li-gang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resource in Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group of China, Tarim University, Alar 843300, China

**Abstract:** An optimal experimental procedure with the microplate-MTT colorimetric assay was developed, that was as follows: 90  $\mu$ L of fungal spore suspension at concentration of  $10^5$  spores/mL was added in each well of the 96-well microplate first; 10  $\mu$ L of the sample solution with its different concentration was then added, and cultivated for 48 h at 25  $^{\circ}$ C in darkness; 10  $\mu$ L of MTT solution at 8 mg/mL was added into each well, and incubated for another 10 h at 25  $^{\circ}$ C and centrifuged; The supernatant was removed, and 150  $\mu$ L of DMSO was added; After shaking for another 30 min at 15 rpm, light absorption values at 510 nm were obtained for the supernatant transferred in a new plate with a microplate spectrophotometer. With the optimal MTT assay mentioned above, the minimum inhibitory concentration (MIC) values of chelerythrine from *Macleaya cordata* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Magnaporthe oryzae* were 80 and 1.5  $\mu$ g/mL respectively, and the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were 21.99 and 0.78  $\mu$ g/mL, correspondingly. The MIC and IC<sub>50</sub> values of diepoxin  $\zeta$  from the endophytic fungus Dzf12 on *Magnaporthe oryzae* were 200 and 96.21  $\mu$ g/mL. It indicated that the antifungal metabolites from plants and microbes could be evaluated fast and micro-quantitatively by using microplate-MTT colorimetric assay that is favorable for screening antifungal components with a high throughput.

**Key words:** microplate-MTT colorimetric assay; plant metabolites; microbial metabolites; antifungal activity

为了快速、高效地从植物和微生物中筛选抗真菌活性成分, 目前常用的方法有带毒平板法、药剂扩散法、孢子萌发法等, 这些方法均有一定的不足之

处<sup>[1]</sup>。1983 年 Mosmann 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法来间接反映细胞的增殖和活力水平, 其原理是通过活细胞中的琥珀酸脱氢酶 (真核生物位于线粒体中, 原核生物位于细胞膜上) 将淡黄色的 MTT 还原成蓝紫色的甲臞 (Formazane)<sup>[2]</sup>。MTT 在水中具有较好的溶解性, 而甲臞不溶于水, 易溶于乙醇、异丙醇、二甲基亚砷 (DMSO) 等有机溶剂, 通过多孔板分光光度计 (酶标仪) 依颜色深浅可测定出吸光度值。

收稿日期: 2011-06-24 接受日期: 2011-09-19

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20060019048); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放基金 (BRZD1102); 国家自然科学基金 (31071710)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-62731199; E-mail: lgzhou@cau.edu.cn

由于生成甲臜的量与反应的活细胞数量成正比,因此吸光度值的大小可以反映活细胞的数量和活性程度,从而间接反映药物对细胞活力的抑制作用<sup>[3,4]</sup>。目前,MTT 方法已得到愈来愈多的应用,逐步用于检测细胞对化学药物的敏感性、免疫细胞对刺激剂的反应、免疫细胞毒活性和细胞因子活性等领域<sup>[5-8]</sup>。而将此法用来定量评价植物和微生物代谢产物对丝状真菌的抑制活性,鲜见报道。本文优化了真菌接种量,加药时间及 MTT 的浓度等各项可能会影响测定结果的实验条件,并用多孔板-MTT 比色法测定了两种分别来自于植物和内生真菌的抗菌化合物白屈菜红碱(Chelerythrine)和 Diepoxins  $\xi$  对真菌的抑制作用,为将来快速有效地筛选和评价植物和微生物抗菌活性成分创造条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 购自美国 Amresco 公司,用 pH 7.2、0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS)配成 2~12 mg/mL 不同浓度的溶液,过滤除菌,于 4℃ 避光保存;多菌灵(Aldrich 公司);两性霉素 B(Amresco 公司);乙醇等溶剂(分析纯,北京化学试剂公司)。

多孔板分光光度计(PowerWave HT, BioTek Instruments, USA);GFL-1083 摇床(日本);多孔培养板(北京);LS-B55L 蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备厂);HZQ-Q 振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);TS-8 转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),HPG-280B 光照培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);FLC-3 超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);AL104 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);TG16W 型多孔板离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

### 1.2 待测样品及药液的配制

白屈菜红碱(Chelerythrine)系本课题组分离自博落回(*Macleaya cordata*),为异喹啉类生物碱<sup>[9]</sup>;Diepoxin  $\zeta$  分离自盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)内生真菌 Dzf12,为螺二萜类化合物<sup>[10]</sup>。初步的活性测定表明,白屈菜红碱和 Diepoxin  $\zeta$  均具有明显的抗细菌和抗真菌活性。取 1 mg 白屈菜红碱(或 Diepoxin  $\zeta$ )溶于 0.5 mL 有机溶剂(Diepoxin  $\zeta$  用 20% 乙醇溶解,白屈菜红碱用 10% DMSO 溶解)中,

配成 2000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用相应的有机溶剂依次稀释成 5.0~1000  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。

对照药剂为两性霉素 B 和多菌灵。取两性霉素 B 1 mg 溶于 1.0 mL 10% DMSO 中,配成 1000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用 10% DMSO 依次稀释成 15.6~500  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。取多菌灵 1 mg 溶于 1.0 mL 20% 乙醇中,配成 1000  $\mu\text{g/mL}$  的母液,然后用 20% 乙醇依次稀释成 5.0~800  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度。

### 1.3 供试真菌培养及孢子悬液的配制

稻瘟病菌 P131 (*Magnaporthe oryzae* P131) 和西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 由中国农业大学植物病理学系提供。稻瘟病菌孢子悬液的制备参照本小组前期的方法<sup>[11]</sup>。西瓜枯萎病菌孢子悬液的制备步骤如下:首先用灭菌的牙签从保存菌种的小管中挑取少量菌丝,接种到 PDA 培养基平板上,用封口膜封好,25℃ 下黑暗培养 5~7 d,待菌丝长满平板后,转接到新鲜 PDA 培养基中継代培养 2~3 次。然后,挑取少量菌丝接种到 PD 培养基中,25℃,150 rpm 摇培 4~5 d,诱导产孢。用一层纱布过滤收集孢子滤液,弃上清,再往其中加入无菌水,离心 3 次(10000 rpm,每次离心 15 min),利用血球计数板测定孢子浓度。

### 1.4 真菌菌丝在培养基中的生长曲线测定

以稻瘟病菌 P131 和西瓜枯萎病菌为代表性供试真菌,通过测定  $OD_{530\text{nm}}$  吸光值,明确真菌在多孔板中的菌丝生长情况,确定培养时间。操作如下:分别取上述两种孢子悬液 90  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中(孢子悬液用 PD 培养基稀释至  $10^5$  孢子/mL),分别在 4、6、8、10、24、30、48、60 及 72 h 暗培养后测定  $OD_{530\text{nm}}$  值,每个处理重复 3 次。结果(图 1)表明,西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌的菌丝生长曲线较为相似,在 48 h

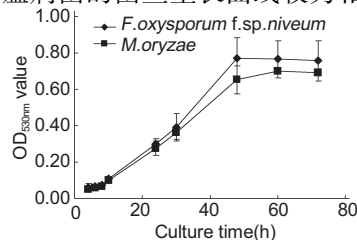


图 1 西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌菌丝在 PD 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Mycelia growth curves of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *M. oryzae* in PD medium

后达到稳定期,因此以下试验采用 48 h 作为药剂与供试真菌共培养时间。

### 1.5 采用多孔板-MTT 比色法测定样品对真菌的抑制活性

最低抑制浓度(MIC)的测定:取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液( $10^5$  孢子/mL),加入到 96 孔板中,然后加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的待测样品,以无菌水为空白对照,阴性对照为相应的溶剂,两性霉素 B 和多菌灵为阳性对照,每处理三个重复。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  8 mg/mL 的 MTT,以肉眼观察判定 MIC 值,即加入 MTT 后不变蓝的孔所对应的最小浓度。

抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ )的测定:取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液,加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的待测样品,以无菌水为空白对照,阴性对照为相应溶剂,两性霉素 B 和多菌灵为阳性对照,每处理三个重复。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  8 mg/mL 的 MTT,继续培养 10 h,2500 rpm 离心,弃上清,加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 终止反应。30 min 后再次离心,将上清转移到新 96 孔板中测定其吸光值( $OD_{510\text{nm}}$ ),按下式计算供试样品的抑制率(%):

抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照孔(溶剂对照)} OD_{510\text{nm}} - \text{药液孔 } OD_{510\text{nm}}}{\text{对照孔(溶剂对照)} OD_{510\text{nm}}} \times 100$$

在 Microsoft excel 中,将求得的抑制率转换成抑制率机率值( $Y$ ),将药液浓度( $\mu\text{g/mL}$ )换算成浓度对数( $X$ ),即可求出线性方程  $Y = aX + b$ ,根据线性方程可求出抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 多孔板-MTT 比色法条件的确立和优化

采用两性霉素 B 作为抗真菌物质,西瓜枯萎病菌作为供试真菌,确立并优化多孔板-MTT 比色法的测定条件。

#### 2.1.1 MTT 反应产物甲臞的吸收波长

通过分光光度计测定西瓜枯萎病菌还原的甲臞在 DMSO 溶液中可见光区的最大吸收波长为 510 nm,因此采用 510 nm 作为测定波长。

#### 2.1.2 接种量对 MTT 测定结果的影响

为了探讨孢子悬液的接种量与 MTT 形成甲臞量的关系,用 PD 培养基将孢子悬液依次稀释成  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  孢子/mL,每孔加入孢子悬液 90  $\mu\text{L}$ (3 个重复),培养 48 h 后,加入 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的 MTT(初步确定),继续培养 10 h,2500 rpm 离

心,弃上清,加入 DMSO 终止反应。30 min 后再次离心,将上清转移到新 96 孔板中测定其吸光值。结果(图 2)表明,随着孢子接种量的增加, $OD_{510\text{nm}}$  值(即甲臞量)随之增加,在一定范围内( $10^4 \sim 10^6$  孢子/mL)接种量对数值与  $OD_{510\text{nm}}$  值表现出较好的线性关系,故将此浓度范围定为 MTT 分光光度法测定的线性范围。本试验后续试验采用的孢子悬液的浓度为  $10^5$  孢子/mL。

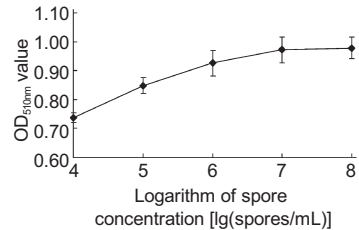


图 2 孢子接种量对数值与吸光值  $OD_{510\text{nm}}$  关系

Fig. 2 Relations between spore concentration logarithm and  $OD_{510\text{nm}}$  values

#### 2.1.3 加入 MTT 后的反应时间

取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液( $10^5$  孢子/mL),加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  无菌水(3 个重复)。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的 MTT,分别在加入 MTT 后的 2、4、8、10、16 h 和 32 h 时测量生成甲臞量的吸光值。结果(图 3)显示,随着反应时间增加,甲臞量呈现增加趋势,在加入 MTT 后反应 10 h 甲臞量达到最大,因此本试验确定加入 MTT 后反应 10 h。

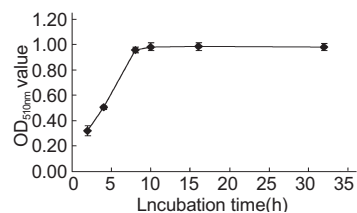


图 3 加入 MTT 后培养时间对 Formazane 生成的影响

Fig. 3 Effects of incubation time on the quantity of formazane after MTT addition

#### 2.1.4 不同 MTT 浓度对甲臞生成量的影响

将 MTT 配成 2、4、6、8 和 10 mg/mL 不同的浓度,测定其浓度与  $OD_{510\text{nm}}$  值的关系。取 90  $\mu\text{L}$  孢子悬液,加入到 96 孔板中,加入 10  $\mu\text{L}$  无菌水(3 个重复)。培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  系列浓度的 MTT,继续培养 10 h 后测定其吸光值。结果(图 4)表明 MTT 浓度在 6 ~ 10 mg/mL 范围内,吸光值基本保持不变,因此以下试验 MTT 浓度设为 8 mg/mL。



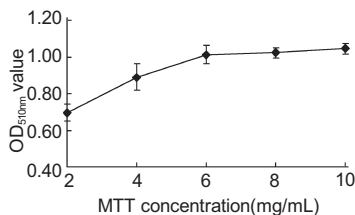


图4 MTT 浓度与 Formazane 生成量的关系

Fig. 4 Relations between MTT concentration and formazane quantity

### 2.1.5 加药时间对菌丝生长抑制率的影响

在 96 孔板中加入一定浓度 ( $10^5$  孢子/mL) 孢子悬液 90  $\mu$ L 后,分别在 0 h、8 h 和 16 h 时加入不同浓度 (1.56、3.13、6.25、12.5、25  $\mu$ g/mL) 的两性霉素 B 10  $\mu$ L,共培养 48 h。加入 10  $\mu$ L 8 mg/mL 的 MTT,继续培养 10 h,测定各孔的  $OD_{510nm}$  值,并计算抑制率。从图 5 中可以看出,加药越早,抑制率越高。本试验选择 0 h 加药(即加入孢子悬液后立即加入药剂)。

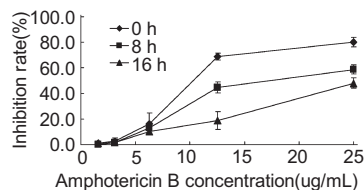


图5 加药时间对菌丝生长抑制率的影响

Fig. 5 Effects of drug addition time on inhibitory rate of mycelia growth

## 2.2 采用多孔板-MTT 比色法测定样品对真菌的抑制活性

采用优化后的试验方案,测定样品对西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌的抑制活性,结果见表 1,白屈菜红碱对西瓜枯萎病菌和稻瘟病菌都具有较强的抑制作用,最低抑制浓度 (MIC) 分别为 80  $\mu$ g/mL 和 1.5  $\mu$ g/mL,抑制中浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 21.99  $\mu$ g/mL 和 0.78  $\mu$ g/mL。Diepoxin  $\zeta$  的抑制活性相对较弱,对稻瘟病菌的 MIC 和  $IC_{50}$  值分别为 200  $\mu$ g/mL 和 96.21  $\mu$ g/mL;对西瓜枯萎病菌的 MIC 大于 200  $\mu$ g/mL,未进一步检测  $IC_{50}$ 。

表1 样品对真菌的抑制活性

Table 1 Antifungal activity of the samples

| 样品<br>Sample           | 待测真菌<br>Test fungus | 抑制活性回归方程<br>Regress equation and correlation coefficient | 抑制中浓度<br>$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL) | 最低抑制浓度<br>MIC ( $\mu$ g/mL) |
|------------------------|---------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|
| 白屈菜红碱<br>Chelerythrine | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 0.8130 X + 3.9087 (R = 0.9777)$                     | 21.99                            | 80                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 4.5843 X + 5.4943 (R = 0.9895)$                     | 0.78                             | 1.5                         |
| Diepoxin $\zeta$       | <i>F. o. niveum</i> | -  | -                                | >200                        |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 2.0826 X + 0.8697 (R = 0.9777)$                     | 96.21                            | 200                         |
| 多菌灵 Carbendazim        | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 2.4551 X + 2.5161 (R = 0.9789)$                     | 10.35                            | 20                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 2.2887 X + 1.5068 (R = 0.9799)$                     | 33.60                            | 60                          |
| 两性霉素 B Amphotericin B  | <i>F. o. niveum</i> | $Y = 2.9647 X + 1.8428 (R = 0.9799)$                     | 11.61                            | 25                          |
|                        | <i>M. oryzae</i>    | $Y = 1.2979 X + 2.6744 (R = 0.9767)$                     | 61.92                            | 100                         |

注:  $Y = aX + b$ ,  $Y$  为抑制率机率值,  $X$  为浓度对数; - 表示为样品在浓度为 200  $\mu$ g/mL 时未检测出; *F. o. niveum* 表示为西瓜枯萎病菌; *M. oryzae* 表示为稻瘟病菌; 多菌灵和两性霉素 B 为阳性对照。

Note:  $Y = aX + b$ ,  $Y$  is the inhibitory probit value and  $X$  is concentration logarithm of the component; -, undetected below concentration of 200  $\mu$ g/mL; *F. o. niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; *M. oryzae*, *Magnaporthe oryzae*; Both carbendazim and amphotericin B were used as the positive controls.

## 3 讨论

我们研究小组曾采用称量法直接测定样品在液体培养基中对真菌菌丝生长的影响<sup>[12]</sup>,该方法虽然比较准确,但培养体积相对较大,需要较多的样品量,且每次测定的样品数有限,也很难反映活菌丝的活力状态。丝状真菌是多细胞真核生物,代谢生成的甲臌量与活细胞数量之间存在一定的比例关系,因此通过测定吸光值可以反映供试样品对真菌细胞生长的影响。

本研究采用多孔板-MTT 比色法测定样品抗真菌活性的优化条件是:每孔加入浓度为  $10^5$  孢子/mL 的供试真菌孢子悬液 90  $\mu$ L,不同浓度的药液 10  $\mu$ L,25  $^{\circ}$ C 暗培养 48 h,然后每孔中依次加入 8 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu$ L,继续培养 10 h 后,离心去上清,加入 DMSO 150  $\mu$ L,振荡 30 min,离心后上清液在 510 nm 测定吸光值。采用上述条件测定了白屈菜红碱对稻瘟病菌和西瓜枯萎病菌的  $IC_{50}$  值分别为 21.99  $\mu$ g/mL 和 0.78  $\mu$ g/mL,Diepoxin  $\zeta$  对稻瘟病菌  $IC_{50}$  值为 96.21  $\mu$ g/mL。

多孔板-MTT 比色法适合于以细菌、酵母菌及产

孢丝状真菌为靶标的抗菌活性测定,该方法通过测定氧化还原产生的甲臞溶液的吸光值来评价抗菌活性的强弱,该方法能对多个样品的抗真菌活性进行快速测定,且样品用量少,符合高通量筛选的要求。本活性测定方法是在多孔板的小孔中接种一定量的孢子悬液(或已萌发的孢子悬液),以保证各处理之间接种生物量的一致,对于不产孢的靶标真菌,可以将菌丝打断,制成均匀的菌丝悬液。本研究所检测的是样品对丝状真菌的抑制活性,若要进一步确定样品的杀真菌浓度,还需要将供试真菌涂布在培养基平板上,通过后续的培养观察是否长出菌落来确定。为了消除样品颜色对 MTT 比色法吸光值的影响,可以将每个样品浓度设对照。如果样品溶液在 510 nm 处有强的光吸收,应考虑采用别的活性测定方法。一些供试真菌在培养过程中能产生有色化合物,会干扰比色测定的结果。

#### 参考文献

- Zhou LG (周立刚). Antimicrobial Compounds from Plants (植物抗菌化合物). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2005.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
- Zhao JL (赵江林), Xu LJ (徐利剑), Huang YF (黄永富), et al. Detection of antimicrobial components from extracts of the endophytic fungi associated with *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using TLC-bioautography-MTT assay. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 28-32.
- Tang J (唐静), Tan ML (谈满良), Zhao JL (赵江林), et al. Detection of plant antibacterial components by using microplate-MTT colorimetric assay. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 949-952.
- Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Brit J Cancer*, 1989, 60: 206-210.
- Jahn B, Martin E, Stueben A, et al. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 661-667.
- Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, et al. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3727-3729.
- Meletiadiis J, Meis JFGM, Mouton JW, et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 2949-2954.
- Liu H, Wang J, Zhao J, et al. Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Nat Prod Commun*, 2009, 4: 1557-1560.
- Cai X, Shan T, et al. Spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus Dzf12 of *Dioscorea zingiberensis* and their antimicrobial activities. *Nat Prod Commun*, 2009, 4: 1469-1472.
- Wang J, Zhao J, Liu H, et al. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*, 2010, 15: 6411-6422.
- Liu H (刘浩), Zhang N (张娜), Yin CH (阴春晖), et al. Comparison between radial growth assay and liquid suspension culture assay for screening of antifungal natural compounds. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 577-580.
- Yao LY (姚莉韵), Lu Y (陆阳), Chen ZL (陈泽乃). Studies on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 201-203.
- Tan CY (谭成玉), Hu JE (胡建恩), Wang HD (王焕弟), et al. Study on chemical constitues of *Smalanthus sonchifolius*. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40: 1861-1863.
- Sun WJ (孙文基). Extraction and Preparation of Natural Medicinal Compounds (天然药物成分提取分离与制备). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1999. 385.
- Chen Y (陈玉), Yang GZ (杨光忠), Li YC (李援朝). Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 301-303.
- Zhao AH (赵爱华), Zhao QS (赵勤实), Li RT (李蓉涛), et al. Chemical constituents from *Clerodendranthus spicatus*. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2004, 26: 563-568.
- Yang T, Wang CH, Liu HJ, et al. A new antioxidant compound from *Capparis spinosa*. *Pharm Biol*, 2010, 48: 589-594.

(上接第 54 页)