

覆盆子抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分研究

刘希达, 韩 娜, 刘志惠, 翟建秀, 李嗣凯, 殷 军*

沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: 目的 研究华东覆盆子 *Rubus chingii* 干燥果实中抗氧化与抑制 α -葡萄糖苷酶的活性成分。方法 采用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、凝胶柱色谱等多种色谱技术进行系统分离和纯化, 利用 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 波谱数据鉴定化合物的结构。采用 DPPH 自由基清除和 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价方法, 评估化合物的抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结果 从覆盆子 70% 乙醇提取物的 30% 乙醇洗脱部位中分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为 1,2,3,4,6-五没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖(1)、1,2,6-三没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖(2)、1-没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖(3)、原花青素 B₃(4)、银槲苷(5)、hovetrichoside C(6)、山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(7)、阿夫儿茶素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(8)、槲皮素(9)、methyl flavogallate(10)、鞣花酸(11)、短叶苏木酚酸甲酯(12)、2,4,6-三羟基苯乙酮-6-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(13)、没食子酸甲酯(14)、阿魏酸(15)、3,4'-二羟基苯乙酮(16)。结论 化合物 10 和 13 为首次从悬钩子属植物中分离得到。化合物 1~4、9~12、14 具有较好的抗氧化活性, 化合物 1、2、4、11 具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 化合物 1 的抗氧化活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强。

关键词: 覆盆子; 抗氧化活性; α -葡萄糖苷酶抑制活性; 1,2,3,4,6-五没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖; methyl flavogallate; 2,4,6-三羟基苯乙酮-6-O- β -D-吡喃葡萄糖苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)17-5226-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.014

Active components of antioxidation and α -glucosidase inhibitory from *Rubi Fructus*

LIU Xi-da, HAN Na, LIU Zhi-hui, ZHAI Jian-xiu, LI Si-kai, YIN Jun

School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To investigate the active components which have antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of dry fruits from *Rubus chingii*. **Methods** The fraction was separated and purified by silica gel column chromatography, ODS column chromatography, gel column chromatography. The structures of compounds were identified by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data. DPPH radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activity evaluation methods were used to assess the antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of compounds. **Results** Sixteen compounds were isolated from 30% ethanol elution site of the ethanolic extract from *R. chingii*. The structures of these compounds were identified by spectroscopic analysis as 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucoside (1), 1,2,6-penta-O-galloyl- β -D-glucoside (2), 1-O-galloyl- β -D-glucoside (3), procyanidin B₃ (4), tiliroside (5), hovetrichoside C (6), kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (7), 7-O- β -D-glucopyranosyl(-)-afzelechin (8), quercetin (9), methyl flavogallate (10), ellagic acid (11), methyl brevilolin-carboxylate (12), 2,4,6-trihydroxy-acetophenone-6-O- β -D-glucopyranoside (13), methyl gallate (14), ferulic acid (15), and 3,4'-dihydroxypropiofenone (16). **Conclusion** Compounds 10 and 13 are firstly isolated from the genus *Rubus*. Compounds 1—4, 9—12, and 14 have good antioxidant effects, compounds 1, 2, 4, and 11 have good inhibitory activity of α -glucosidase. Compound 1 has the best antioxidant activity and inhibitory activity of α -glucosidase.

Key words: *Rubus chingii* Hu; antioxidant activity; α -glucosidase inhibitory activity; 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucoside; methyl flavogallate; 2,4,6-trihydroxy-acetophenone-6-O- β -D-glucopyranoside

收稿日期: 2021-06-27

作者简介: 刘希达(1996—), 男, 硕士。E-mail: 441590920@qq.com

*通信作者: 殷 军(1965—), 女, 沈阳药科大学 51 期中药、1992 级硕士生药学专业及 1999 级博士天然药物化学专业校友, 双博士、教授、博士生导师, 辽宁省特聘教授, 辽宁省百千万人才“百人”层次, 中国药典委员会委员, 辽宁省药学会中药与天然药物专业委员会主任委员, 曾获全国优秀药师、国家中医药管理局中医药科技进步奖等多项奖励。

Tel: (024)43520717 E-mail: yinjun826@sina.com

覆盆子为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥成熟果实, 主要分布于我国江西、安徽、江苏、浙江和福建, 具有益肾固精缩尿、养肝明目等功效。覆盆子的主要成分包括萜类、黄酮类、有机酸类和多糖等^[1]。现代药理学研究表明, 覆盆子的抗氧化以及降糖活性显著^[2-3], 且与其酚类化合物有关。为了进一步阐明覆盆子抗氧化和降糖的物质基础, 本课题组前期对覆盆子 70%乙醇提取物大孔树脂洗脱物进行了初步筛选, 发现其 30%乙醇洗脱部位具有良好活性, 本研究对该部位的化学成分及生物活性进行探究, 从中分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为 1,2,3,4,6-五没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖 (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucoside, **1**)、1,2,6-三没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖 (1,2,6-penta-O-galloyl- β -D-glucoside, **2**)、1-没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖 (1-O-galloyl- β -D-glucoside, **3**)、原花青素 B₃ (procyanidin B₃, **4**)、银槲苷 (tiliroside, **5**)、hovetrichoside C (**6**)、山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside, **7**)、阿夫儿茶素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 [7-O- β -D-glucopyranosyl-(α)-afzelechin, **8**]、槲皮素 (quercetin, **9**)、methyl flavogallate (**10**)、鞣花酸 (ellagic acid, **11**)、短叶苏木酚酸甲酯 (methyl brevilolin-carboxylate, **12**)、2,4,6-三羟基苯乙酮-6-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (2,4,6-trihydroxy-acetophenone-6-O- β -D-glucopyranoside, **13**)、没食子酸甲酯 (methyl gallate, **14**)、阿魏酸 (ferulic acid, **15**)、3,4'-二羟基苯乙酮 (3,4'-dihydroxypropiophenone, **16**)。体外活性结果显示化合物 **1**~**4**、**9**~**12**、**14** 具有较好的抗氧化活性, 化合物 **1**、**2**、**4**、**11** 具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 化合物 **1** 的抗氧化活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强, 为其进一步开发和利用提供依据。

1 仪器与材料

Bruker Avance-600 型核磁共振波谱仪、Bruker Avance-400 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker Biospin 公司); LC-10A 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); Sephadex LH-20 凝胶柱 (美国 Pharmacia 公司); 柱色谱用硅胶 G、GF₂₅₄ (100~200 目, 青岛海洋化工厂); 色谱级甲醇 (天津康科德科技有限公司); 其他试剂均为分析纯 (沈阳莱博试剂公司); ODS-A 液相色谱柱 (50 μ m, 日本 YMC 公司); α -葡萄糖苷酶、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷

(PNPG, 上海麦克林生化科技有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, 美国 Sigma 公司); 阿卡波糖 (批号 H19990205, 北京拜耳医药保健有限公司); 维生素 C 片 (批号 H21020713, 东北制药集团沈阳第一制药有限公司)。

覆盆子购买自安国市义通中药材有限公司, 经沈阳药科大学中药学院生药学教研室殷军教授鉴定为华东覆盆子 *R. chingii* Hu 的干燥成熟果实。

2 提取与分离

取华东覆盆子干燥成熟果实 6 kg, 粉碎后用 50 L 70%乙醇回流提取 3 次, 2 h/次, 合并提取液, 减压浓缩得 7.7 L 覆盆子提取物; 上样于 D101 型大孔吸附树脂柱, 分别用水及 30%、60%、90%乙醇进行梯度洗脱, 得 30%乙醇洗脱部位 (115.0 g)、60%乙醇洗脱部位 (330.0 g) 和 90%乙醇洗脱部位 (45.1 g)。

30%乙醇洗脱部位经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (20:1 $\rightarrow$ 0:100) 梯度洗脱得到 5 个流分 (Fr. 1~5)。Fr. 1 (0.4 g) 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (50:1 $\rightarrow$ 1:1) 梯度洗脱得到 5 个流分 (Fr. 1-1~1-5), 其中亚流分 Fr. 1-1 经制备液相分离, 以甲醇-水 (60:40) 为流动相得到化合物 **9** (3.3 mg)。Fr. 2 (0.9 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇等度洗脱得到 2 个流分 (Fr. 2-1~2-2), Fr. 2-1 经过反复甲醇重结晶得到化合物 **10** (56.0 mg), Fr. 2-2 经制备薄层色谱, 醋酸乙酯-甲醇-水 (5:1:0.9) 为流动相得到化合物 **15** (10.0 mg)。Fr. 3 (6.7 g) 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇-水 (30:1:0.1 $\rightarrow$ 3:1:0.1) 梯度洗脱后得到 2 个流分 (Fr. 3-1~3-2), Fr. 3-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇等度洗脱得到化合物 **4** (6.3 mg), Fr. 3-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇等度洗脱得到 2 个亚流分 (Fr. 3-2-1~3-2-2), Fr. 3-2-1 经过反复甲醇重结晶得到化合物 **5** (16.5 mg), Fr. 3-2-2 经薄层色谱制备 [醋酸乙酯-甲醇-水 (5:1:0.9)] 得到化合物 **6** (3.1 mg) 和 **14** (2.2 mg)。Fr. 4 (20 g) 经 ODS 柱色谱, 甲醇-水 (20:80 $\rightarrow$ 40:60) 梯度洗脱, 得到 2 个流分 (Fr. 4-1~4-2), Fr. 4-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇等度洗脱得到 2 个流分 (Fr. 4-1-1~4-1-2), Fr. 4-1-1 经制备液相分离纯化 [甲醇-水 (20:80)] 得到化合物 **11** (2.2 mg, t_R =35.6 min)、**13** (3.0 mg, t_R =42.3 min) 和 **16** (11.5 mg, t_R =52.2 min), Fr. 4-1-2 经制备液相分离纯化 [甲醇-水 (20:80)] 得到化合

物 **1** (3.6 mg, t_R = 62.5 min)、**2** (2.1 mg, t_R = 46.7 min) 和 **3** (1.9 mg, t_R = 55.9 min), Fr. 4-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 甲醇等度洗脱得到化合物 **12** (1.4 mg)。Fr. 5 (15 g) 经 ODS 色谱柱分离, 甲醇-水 (10:90→30:70) 梯度洗脱得到 5 个流分 (Fr. 5-1~5-5), Fr. 5-1 经 ODS 色谱柱分离, 甲醇-水 (0:100→30:70) 梯度洗脱得到化合物 **7** (1.6 mg) 和 **8** (2.6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 棕色粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl_3 乙醇溶液显蓝黑色。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.12 (2H, s, 1-galloyl-H-2, 6), 7.06 (2H, s, 2-galloyl-H-2', 6'), 6.99 (2H, s, 3-galloyl-H-2', 6'), 6.96 (2H, s, 4-galloyl-H-2', 6'), 6.91 (2H, s, 6-galloyl-H-2', 6'), 6.24 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-1), 5.91 (1H, t, J = 9.7 Hz, H-3), 5.62 (2H, m, H-4), 4.51 (1H, dd, J = 12.2, 1.9 Hz, H-5), 4.40 (2H, m, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.9 (1-galloyl-C-7'), 167.2 (2-galloyl-C-7'), 166.9 (3-galloyl-C-7'), 166.9 (4-galloyl-C-7'), 166.2 (5-galloyl-C-7'), 146.5 (1-galloyl-C-4'), 146.4 (2-galloyl-C-4'), 146.4 (3-galloyl-C-4'), 146.3 (4-galloyl-C-4'), 146.2 (5-galloyl-C-4'), 140.7 (1-galloyl-C-3', 5'), 140.3 (2-galloyl-C-3', 5'), 140.2 (3-galloyl-C-3', 5'), 140.0 (4-galloyl-C-3', 5'), 139.9 (5-galloyl-C-3', 5'), 121.0 (1-galloyl-C-1'), 120.3 (2-galloyl-C-1'), 120.2 (3-galloyl-C-1'), 120.2 (4-galloyl-C-1'), 119.7 (5-galloyl-C-1'), 110.6 (1-galloyl-C-2', 6'), 110.4 (2-galloyl-C-2', 6'), 110.4 (3-galloyl-C-2', 6'), 110.3 (4-galloyl-C-2', 6'), 110.3 (5-galloyl-C-2', 6'), 93.8 (Glc-C-1), 74.3 (Glc-C-5), 74.0 (Glc-C-3), 72.1 (Glc-C-2), 69.8 (Glc-C-4), 63.1 (Glc-C-6)。根据以上数据并结合文献报道^[4], 推断化合物 **1** 为 1,2,3,4,6-五没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖。

化合物 **2**: 棕色粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl_3 乙醇溶液显蓝黑色。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.96 (2H, s, 1-galloyl-H-2, 6), 6.91 (2H, s, 2-galloyl-H-2, 6), 6.87 (2H, s, 6-galloyl-H-2, 6), 5.89 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 5.03 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-3), 4.43 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-4), 4.31 (1H, dd, J = 12.2, 4.9 Hz, H-2), 4.22 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-5), 3.81 (2H, m, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.7 (1-galloyl-

C-7'), 164.9 (2-galloyl-C-7'), 164.1 (6-galloyl-C-7'), 145.6 (1-galloyl-C-4'), 145.5 (2-galloyl-C-4'), 145.4 (6-galloyl-C-4'), 138.6 (1-galloyl-C-3', 5'), 138.6 (2-galloyl-C-3', 5'), 138.5 (6-galloyl-C-3', 5'), 119.3 (1-galloyl-C-1'), 119.1 (2-galloyl-C-1'), 118.9 (6-galloyl-C-1'), 108.9 (1-galloyl-C-2', 6'), 108.7 (2-galloyl-C-2', 6'), 108.6 (6-galloyl-C-2', 6'), 92.1 (Glc-C-1), 74.7 (Glc-C-5), 73.6 (Glc-C-3), 72.6 (Glc-C-2), 69.5 (Glc-C-4), 65.0 (Glc-C-6)。根据以上数据并结合文献报道^[5], 推断化合物 **2** 为 1,2,6-三没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖。

化合物 **3**: 白色粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl_3 乙醇溶液显蓝黑色。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 7.18 (2H, s, H-2, 6), 5.71 (1H, d, J = 7.2 Hz, Glc-H-1), 3.89 (1H, dd, J = 12.4, 1.5 Hz, Glc-H-3), 3.73 (1H, dd, J = 12.5, 5.4 Hz, Glc-H-4), 3.61 (3H, t, J = 7.1 Hz, Glc-H-6, 2), 3.48 (1H, t, J = 9.0 Hz, Glc-H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ : 169.4 (C-7), 147.4 (C-3, 5), 142.1 (C-4), 121.9 (C-1), 113.2 (C-2, 6), 97.2 (Glc-C-1), 79.7 (Glc-C-3), 78.3 (Glc-C-5), 74.9 (Glc-C-2), 72.0 (Glc-C-4), 63.2 (Glc C-6)。根据以上数据并结合文献报道^[6], 推断化合物 **3** 为 1-没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖。

化合物 **4**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 10% 硫酸乙醇溶液显黄色。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.84 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.77 (1H, dd, J = 8.3, 2.1 Hz, H-6'), 6.69 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.60 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'''), 6.59 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6'''), 6.57 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'''), 5.85 (1H, s, H-6''), 5.74 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6), 5.67 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 4.38 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 4.26 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2''), 4.22 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-4), 2.78 (1H, dd, J = 16.2, 8.4 Hz, H-4'a), 2.33 (1H, dd, J = 16.2, 8.4 Hz, H-4'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.5 (C-9), 157.3 (C-7), 154.6 (C-5), 154.2 (C-7'), 153.5 (C-9'), 153.4 (C-5'), 144.8 (C-3'), 144.6 (C-3'''), 144.2 (C-4'''), 144.0 (C-4'), 129.1 (C-1'''), 128.9 (C-1'), 118.8 (C-6'), 117.6 (C-6'''), 115.3 (C-5'''), 114.9 (C-2'), 114.6 (C-5'), 114.3 (C-2'''), 108.4 (C-8'), 106.2 (C-10), 105.8 (C-10'), 98.9 (C-6) 98.5 (C-6''), 95.5 (C-8), 82.3 (C-2), 81.4 (C-2'), 71.7 (C-3), 67.0 (C-3'), 37.2 (C-4), 29.0

(C-4''). 根据以上数据并结合文献报道^[7], 推断化合物 **4** 为原花青素 B₃。

化合物 **5**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 10% 硫酸乙醇溶液显黄色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.99 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.37 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2'', 6''), 7.34 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7''), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.79 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3'', 5''), 6.39 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.15 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.11 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8''), 5.45 (1H, d, J = 6.1 Hz, Glc-H-1), 5.24 (1H, d, J = 5.7 Hz, Glc-H-3), 5.18 (1H, d, J = 4.9 Hz, Glc-H-4), 4.27 (1H, dd, J = 11.9, 2.1 Hz, Glc-H-2), 4.03 (1H, dd, J = 11.8, 6.3 Hz, Glc-H-5), 3.20 (2H, m, Glc-H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.4 (C-4), 166.1 (C-9''), 164.2 (C-7), 161.1 (C-5), 160.0 (C-4'), 159.8 (C-4''), 156.4 (C-2), 156.3 (C-9), 144.6 (C-7''), 133.0 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 130.1 (C-2'', 6''), 124.9 (C-1''), 120.7 (C-1'), 115.7 (C-3', 5'), 115.0 (C-3'', 5''), 113.6 (C-8''), 103.8 (C-10), 100.9 (Glc-C-1), 98.7 (C-6), 93.6 (C-8), 76.2 (Glc-C-2), 74.2 (Glc-C-5), 74.1 (Glc-C-3), 69.9 (Glc-C-4), 62.9 (Glc-C-6)。根据以上数据并结合文献报道^[8], 推断化合物 **5** 为银锻苷。

化合物 **6**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.93 (2H, t, J = 7.3 Hz, H-2', 6'), 6.55 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-3', 5'), 6.01 (1H, s, H-5), 5.91 (1H, s, H-7), 4.93 (1H, d, J = 6.7 Hz, Glc-H-1), 3.65 (1H, m, Glc-H-3), 3.47 (1H, m, Glc-H-4), 3.25 (4H, m, Glc-H-2, 5, 6), 2.92 (2H, m, H-b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 192.6 (C-3), 171.9 (C-7a), 168.8 (C-6), 156.8 (C-4), 156.7 (C-4'), 131.3 (C-2', 6'), 124.2 (C-1'), 114.7 (C-3', 5'), 105.5 (C-2), 101.8 (C-3a), 99.4 (Glc C-1), 96.0 (C-5), 91.8 (C-7), 77.2 (Glc-C-5), 76.8 (Glc-C-3), 72.9 (Glc-C-2), 69.3 (Glc-C-4), 60.4 (Glc-C-6), 40.4 (C-b)。根据以上数据并结合文献报道^[9], 推断化合物 **6** 为 hoveirichoside C。

化合物 **7**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 10% 硫酸乙醇溶液显黄色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.07 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.86 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6),

5.40 (1H, d, J = 7.6 Hz, Glc-H-1), 5.19 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-2), 4.86 (1H, d, J = 5.7 Hz, Glc-H-3), 4.50 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-3), 4.50 (1H, d, J = 5.83 Hz, Glc-H-4), 3.66 (1H, d, J = 3.5 Hz, Glc-H-2), 3.54 (1H, ddd, J = 9.2, 7.5, 3.8 Hz, Glc-H-5), 3.47~3.44 (1H, m, Glc-H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.9 (C-4), 165.0 (C-7), 161.6 (C-5), 160.4 (C-4'), 156.8 (C-9), 156.7 (C-2), 133.6 (C-3), 131.4 (C-2', 6'), 121.3 (C-1'), 115.5 (C-3', 5'), 104.2 (C-10), 102.1 (Glc, C-1), 99.2 (C-6), 94.1 (C-8), 76.2 (Glc-C-5), 73.5 (Glc-C-3), 71.6 (Glc-C-2), 68.3 (Glc-C-4), 60.6 (Glc-C-6)。根据以上数据并结合文献报道^[10], 推断化合物 **7** 为山柰酚-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **8**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 10% 硫酸乙醇溶液显黄色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.16 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.75 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.13 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 5.89 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 4.72 (1H, d, J = 7.6 Hz, Glc-H-1), 4.55 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-2), 3.84 (1H, td, J = 8.3, 5.5 Hz, H-3), 3.70~3.67 (1H, m, Glc-H-6a), 3.50 (1H, m, Glc-H-6b), 3.21 (4H, dd, J = 15.8, 8.3 Hz, Glc-H-2~5), 2.93 (1H, dd, J = 16.3, 5.5 Hz, H-4), 2.40 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 156.9 (C-7), 156.6 (C-5), 156.3 (C-9), 155.0 (C-4'), 129.8 (C-1'), 128.6 (C-2', 6'), 114.8 (C-3', 5'), 101.4 (C-10), 100.6 (Glc-C-1), 96.1 (C-8), 95.0 (C-6), 81.1 (C-2), 76.9 (Glc-C-4), 76.5 (Glc-C-5), 73.2 (Glc-C-3), 69.5 (Glc-C-2), 66.1 (C-3), 60.5 (Glc-C-6), 28.0 (C-4)。根据以上数据并结合文献报道^[11], 推断化合物 **8** 为阿夫儿茶素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **9**: 黄色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 365 nm 下有蓝色荧光, 硅胶板薄层喷 10% 硫酸乙醇溶液显黄色。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 10.76 (1H, s, 3-OH), 9.57 (1H, s, 7-OH), 9.34 (1H, s, 4'-OH), 9.28 (1H, s, 5'-OH), 7.67 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, J = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.18 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 175.8 (C-4), 163.8 (C-7), 160.7 (C-5), 156.1 (C-9), 147.6 (C-4'), 146.7 (C-3'), 145.0 (C-2), 135.7 (C-3), 121.9 (C-1'), 119.9 (C-6'), 115.5 (C-5'), 115.0 (C-2'),

103.0 (C-10), 98.1 (C-6), 93.3 (C-8)。根据以上数据并结合文献报道^[12], 推断化合物 **9** 为槲皮素。

化合物 **10**: 淡黄色无定形粉末, 易溶于甲醇, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.48 (1H, s, H-5'), 7.09 (1H, s, H-6''), 3.44 (3H, s, 7''-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.5 (C-7''), 159.6 (C-7'), 157.8 (C-7), 148.2 (C-4'), 146.5 (C-4), 144.4 (C-5''), 144.0 (C-3''), 139.6 (C-3'), 138.6 (C-3), 137.8 (C-2'), 136.8 (C-2), 135.9 (C-4''), 125.8 (C-1''), 119.2 (C-6), 118.6 (C-2''), 113.1 (C-1'), 112.0 (C-1), 110.4 (C-6), 109.6 (C-5), 107.9 (C-5'), 107.8 (C-6''), 51.4 (-OCH₃)。根据以上数据并结合文献报道^[13], 推断化合物 **10** 为 methyl flavogallate。

化合物 **11**: 白色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.29 (1H, s, H-3, 3'); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 160.6 (C-7, 7'), 149.4 (C-6, 6'), 139.5 (C-4, 4'), 136.4 (C-5, 5'), 113.8 (C-1, 1'), 111.0 (C-2, 2'), 108.4 (C-3, 3')。根据以上数据并结合文献报道^[14], 推断化合物 **11** 为鞣花酸。

化合物 **12**: 淡黄色针状晶体, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.30 (1H, s, H-7), 4.42 (1H, dd, *J* = 7.8, 2.1 Hz, H-9), 3.63 (3H, s, 9b-OCH₃), 2.98 (1H, dd, *J* = 18.7, 7.8 Hz, H-10b), 2.47 (1H, dd, *J* = 18.8, 2.1 Hz, H-10a); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 193.5 (C-11), 173.0 (C=O), 160.6 (C-8), 150.1 (C-6), 146.2 (C-2), 144.1 (C-4), 141.0 (C-5), 138.9 (C-3), 115.4 (C-7a), 113.3 (C-3a), 108.5 (C-7), 52.5 (-OCH₃), 41.0 (C-9), 37.4 (C-10)。根据以上数据并结合文献报道^[15], 推断化合物 **12** 为短叶苏木酚酸甲酯。

化合物 **13**: 淡黄色针状晶体, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.01 (1H, s, H-3), 5.79 (1H, s, H-5), 4.88 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, Glc-H-1), 3.69 (1H, Glc-H-3), 3.50 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, Glc-H-4), 3.30 (2H, Glc-H-2, 5), 3.21 (2H, m, Glc-H-6), 2.59 (3H, s, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 201.7 (C=O), 167.6 (C-4), 166.0 (C-2), 161.1 (C-6), 103.7 (C-1), 100.6 (Glc-C-1), 97.1 (C-3),

95.1 (C-5), 77.1 (Glc-C-5), 76.7 (Glc-C-3), 73.1 (Glc-C-2), 69.4 (Glc-C-4), 60.4 (Glc-C-6), 32.6 (-CH₃)。根据以上数据并结合文献报道^[16], 推断化合物 **13** 为 2,4,6-三羟基苯乙酮-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **14**: 白色粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.94 (2H, s, H-2, 6), 3.74 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.3 (C-7), 145.6 (C-3, 5), 138.4 (C-4), 119.3 (C-1), 108.5 (C-2, 6), 51.5 (-OCH₃)。根据以上数据并结合文献报道^[17], 推断化合物 **14** 为没食子酸甲酯。

化合物 **15**: 无色针状结晶, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.48 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 7.27 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 7.07 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.36 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 3.81 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.5 (C-9), 149.5 (C-3), 148.3 (C-4), 144.9 (C-7), 126.2 (C-1), 123.2 (C-6), 116.1 (C-8), 115.9 (C-5), 111.5 (C-2), 56.1 (-OCH₃)。根据以上数据并结合文献报道^[18], 推断化合物 **15** 为阿魏酸。

化合物 **16**: 白色无定形粉末, 紫外灯 254 nm 下有暗斑, 硅胶板薄层喷 2% FeCl₃ 乙醇溶液显蓝黑色。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, 5), 3.74 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-8), 3.02 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-9); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 197.5 (C-7), 163.0 (C-4), 131.0 (C-2, 6), 128.7 (C-1), 115.7 (C-3, 5), 57.6 (C-8), 41.3 (C-9)。根据以上数据并结合文献报道^[19], 推断化合物 **16** 为 3,4'-二羟基苯乙酮。

4 活性测试

4.1 化合物体外抗氧化活性的测定

覆盆子提取物及各洗脱部位用于测定的质量浓度为 15.625~500.000 μ g/mL, 各单体化合物用于测定的浓度为 15.625~500.000 μ mol/L。参照文献方法^[20]并进行适当改进, 在 96 孔板中加入 100 μ L 不同浓度的样品, 再加入 100 μ L 含 0.2 mmol/L DPPH 的甲醇溶液; 空白组加入 100 μ L 甲醇和 100 μ L DPPH 自由基溶液; 背景组加入 100 μ L 样品和 100 μ L 甲醇。避光放置 20 min, 测定 517 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 按照公式计算清除率。以维生素 C 为阳

性对照药物, 每个样品平行测试 3 次。覆盆子提取物和各洗脱部位的抗氧化活性见表 1, 16 个单体化合物的抗氧化活性见表 2。

$$\text{清除率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}) / A_{\text{空白}}$$

表 1 覆盆子提取物和各洗脱部位的抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Antioxidant activity of extract and different elution site from *Rubus chingii* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
维生素 C	25.02 ± 0.38
覆盆子提取物	28.87 ± 1.67
30%乙醇洗脱部位	2.61 ± 0.87**
60%乙醇洗脱部位	26.02 ± 0.62
90%乙醇洗脱部位	55.48 ± 0.95**

与维生素 C 组比较: ** $P < 0.01$, 表 2 同

** $P < 0.01$ vs vitamin C group, same as table 2

表 2 16 个单体化合物的抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Anti-oxidant activity of 16 compounds ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
维生素 C	101.07 ± 1.37	9	12.88 ± 1.01**
1	2.36 ± 1.08**	10	3.55 ± 0.15**
2	31.00 ± 1.75**	11	53.55 ± 2.25**
3	72.64 ± 1.99**	12	52.41 ± 2.23**
4	36.15 ± 0.28**	13	> 500**
5	> 500**	14	30.86 ± 0.12**
6	> 500**	15	157.85 ± 2.24**
7	> 500**	16	> 500**
8	> 500**		

每个样品平行测试 3 次。覆盆子提取物和各洗脱部位的 α -葡萄糖苷酶抑制活性见表 3, 16 个单体化合物的

表 3 覆盆子提取物和各洗脱部位的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 α -Glucosidase inhibitory activity of extract and different elution site from *R. chingii* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
阿卡波糖	42.13 ± 1.84
覆盆子提取物	113.53 ± 6.95**
30%乙醇洗脱部位	47.68 ± 1.74
60%乙醇洗脱部位	53.30 ± 0.57
90%乙醇洗脱部位	393.76 ± 47.29**

与阿卡波糖组比较: ** $P < 0.01$, 表 4 同

** $P < 0.01$ vs acarbose group, same as Table 4

4.2 化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

覆盆子提取物及各洗脱部位用于测定的质量浓度为 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$, 各单体化合物用于测定的浓度为 15.625~500.000 $\mu\text{mol/L}$ 。参照文献方法^[21]并进行适当改进, 在 96 孔板中加入 20 μL 不同浓度的样品、20 μL PBS 溶液 (0.1 mol/L) 和 20 μL α -葡萄糖苷酶 (1.3 U/mL); 样品背景组加入 20 μL 样品和 40 μL PBS 溶液; 空白组加入 20 μL 2% DMSO、20 μL PBS 溶液和 20 μL α -葡萄糖苷酶; 空白背景组加入 20 μL 2% DMSO 和 40 μL PBS 溶液; 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化 5 min, 加入 20 μL PNPG (2.5 mmol/L) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 再加入 80 μL Na_2CO_3 (0.2 mol/L) 终止反应, 测定 405 nm 处的 A 值, 按照公式计算抑制率。以阿卡波糖为阳性对照药物,

物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性见表 4。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品背景}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白背景}})$$

5 讨论

本研究从覆盆子醇提物的 30%乙醇洗脱部位中分离并鉴定了 16 个单体化合物, 包括 3 个鞣质类化合物、6 个黄酮类化合物、3 个内酯类化合物和 4 个苯酚类化合物。其中化合物 10 和 13 为首次从悬钩子属中分离得到。由活性数据可知, 30%乙醇洗脱部位的抗氧化活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性均为最强, 表明经过不同比例的乙醇-水洗脱后, 覆盆子抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶的活性成分得到了有效富集。化合物 1 的清除 DPPH 自由基活性以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强, 其 IC₅₀ 分别为 (2.36 ± 1.08)、(2.41 ± 0.11) $\mu\text{mol/L}$ 。本研究结果进一步丰

表 4 16 个单体化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 α -Glucosidase inhibitory activity of 16 compounds ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
阿卡波糖	0.13 $\pm$ 0.02	9	> 500**
1	2.41 $\pm$ 0.11**	10	343.85 $\pm$ 21.38**
2	17.38 $\pm$ 2.07**	11	11.55 $\pm$ 2.60**
3	97.73 $\pm$ 5.05**	12	> 500**
4	17.79 $\pm$ 1.05**	13	> 500**
5	> 500**	14	> 500**
6	> 500**	15	> 500**
7	> 500**	16	> 500**
8	296.75 $\pm$ 6.32**		

富了覆盆子的化学物质组成和生物学活性信息, 为覆盆子的开发利用提供了研究基础和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang T T, Liu Y J, Yang L, et al. Extraction of antioxidant and antiproliferative ingredients from fruits of *Rubus chingii* Hu by active tracking guidance [J]. *Medchemcomm*, 2017, 8(8): 1673-1680.
- [2] Zhang T T, Jiang J G. Analyses on essential oil components from the unripe fruits of *Rubus chingii* Hu by different methods and their comparative cytotoxic and anti-complement activities [J]. *Food Anal Methods*, 2015, 8(4): 937-944.
- [3] 谢欣梅, 庞晓斌, 李晓婷. 覆盆子酮对糖尿病模型小鼠的降血糖作用及其机制研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(23): 1899-1904.
- [4] Santos R T D, Hiramoto L L, Lago J H G, et al. Anti-trypanosomal activity of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae) [J]. *Quím Nova*, 2012, 35(11): 2229-2332.
- [5] Yakubu O F, Adebayo A H, Dokunmu T M, et al. Cytotoxic effects of compounds isolated from *Ricinodendron heudelotii* [J]. *Molecules*, 2019, 24 (1): 145.
- [6] Zhang Y J, DeWitt D L, Murugesan S, et al. Novel lipid-peroxidation- and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrorhiza kurroa* seeds [J]. *Chem Biodivers*, 2004, 1(3): 426-441.
- [7] Yang S Y, Tian W J, Pan Z R, et al. Polyphenols from *Polygonum cuspidatum* reactivate latent HIV [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(2): 318-322.
- [8] Fernandes D A, Souza M S R, Teles Y C F, et al. New sulphated flavonoids and larvicidal activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2784.
- [9] Wu S B, Wen Y, Li X W, et al. Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris* and *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2009, 37(1): 1-5.
- [10] 王洪庆, 赵春阳, 陈若芸. 乌柏叶化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(12): 1179-1181.
- [11] Su J, Wu Z J, Shen Y H, et al. Flavonoids from *Daphne giraldii* Nitsche [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(15): 1355-1358.
- [12] 赵凡, 戴湾, 李翎熙, 等. 血三七正丁醇部位化学成分的研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2346-2350.
- [13] Fang X Y. Chemical constituents from the leaves of *Cistus parviflorus* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2018, 27(1): 40-50.
- [14] da Silva S L, Calgarotto A K, Chaar J S, et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity [J]. *Toxicon*, 2008, 52(6): 655-666.
- [15] 肖洪明, 祖灵博, 李石平, 等. 掌叶覆盆子化学成分的研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2011, 21(3): 220-226.
- [16] Sidana J, Neeradi D, Choudhary A, et al. Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculata* [J]. *J Chem Sci*, 2013, 125(4): 765-775.
- [17] 尚小雅, 李帅, 王映红, 等. 红绒毛羊蹄甲的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(23): 1953-1955.
- [18] 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 蝉翼藤茎中有机酸成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2001, 26(4): 258-260.
- [19] Lee M W, Tanaka T, Nonaka G I, et al. Phenolic compounds on the leaves of *Betula platyphylla* var. *latifolia* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 1992, 15(3): 211-214.
- [20] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [21] Matsui T, Ueda T, Oki T, et al. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(4): 1948-1951.

[责任编辑 李亚楠]