

紫苏愈伤组织迷迭香酸的纯化及抗菌活性研究*

李荣贵 滕大为 杜桂彩 王斌

(青岛大学天然产物研究所 青岛 266071)

摘要: 紫苏叶外植体在添加 NAA 和 2,4-D 的 MS 培养基上诱导分化愈伤组织,愈伤组织中迷迭香酸的含量为 0.85%,愈伤组织干燥后经乙醇提取,乙酸乙酯萃取后,经 Sephadex LH-20 柱层析,最后获得了纯度为 95% 的迷迭香酸。抑菌实验表明此法获得的迷迭香酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及立枯丝合菌的生长均有明显的抑制作用,其最低抑制浓度分别为 300、400、及 800 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 紫苏,愈伤组织,迷迭香酸,抗菌活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0324-04

ISOLATION OF ROSMARINIC ACID FROM CALLUS OF PERILLA FRUTESCENS AND STUDIES OF ITS INHIBITION ON THE GROWTHS OF BACTERIA AND FUNGAL

LI Rong-Gui TENG Da-Wei DU Gui-Cai WANG Bin

(Institute of natural products, Qingdao University, Qingdao 266071)

Abstract: *Perilla frutescens* callus were induced from leave explants on MS medium supplemented with NAA and 2,4-D. The Rosmarinic acid (RosA) content of dried callus was 0.85%. The RosA was extracted from the callus with 80% alcohol and purified through extraction with ethyl acetate and a Sephadex LH-20 column chromatography. The purity of the final product was 95% as analyzed by HPLC. RosA could inhibit the growths of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Rhizotonia* with MICs of 300, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Key words: *Perilla frutescens*, Callus, Rosmarinic acid, Antifungal and antibacterial activities

迷迭香酸(Rosmarinic acid,简称 RosA)是一种酚类化合物。最早由 Ellis 从迷迭香这种植物中发现的,故而得名,现已发现 RosA 存在于唇形科的多种植物中。RosA 是一多功能的天然活性物质,作为抗氧化剂,它具有极强的清除体内自由基的活性,其抗氧化活性强于咖啡酸、绿原酸、叶酸等^[1],由于其抗氧化活性, RosA 还能抑制内皮细胞调节的低密度脂蛋白的氧化^[2]。

RosA 还具有抗病毒活性,Arda 等^[3]发现变豆菜的醇水提取物具有抗 HIV(人类免疫缺陷病毒)的活性,其中发挥作用的主要物质是 RosA, Mazumder 等^[4]的研究进一步表明, RosA 能抑制 HIV-1(人类免疫缺陷病毒 1)整合酶的活性,其

* 山东省自然科学基金和青岛大学校内基金资助项目

收稿日期:1999-09-11,修回日期:1999-11-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

IC₅₀(半抑制浓度)值小于 10mmol/L。Hangay 等^[5]的研究发现 RosA 是控制疱疹病的一种有效成份。此外, RosA 还具有其它方面的功能, Kwak 等^[6]在专利申请说明中介绍, RosA 能抗急性慢性感染, 抑制血小板或全血的凝集, 抑制免疫细胞的非正常增殖, 降低感染引起的酶含量。

紫苏是一种常用中草药, 苏叶入药具有解毒散寒, 行气和胃的功效。苏叶水提物是一种广谱性的抗菌剂, 苏叶在试管内能抑制葡萄球菌的生长, 苏叶浸膏对某些真菌的生长具有抑制作用, 现在认为其中抗菌活性物质是紫苏醛, 但迄今为止对紫苏中抗菌活性的其他成份的研究不多。Fujita 等^[7]发现紫苏叶中的 β -葡萄糖苷具有抗菌活性, 并且纯化了紫苏苷 B-C。紫苏现已被大规模种植, 但由于季节性强, 受环境条件的影响, 不同产地与品种紫苏的 RosA 的含量差别很大, 本研究通过诱导紫苏愈伤组织的形成并从中分离 RosA, 为研究 RosA 抗菌性及其作用机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

紫苏种子购自日本暴井种苗株式会社, 西洋参立枯丝合菌 (*Rhizoctonia solani*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及大肠杆菌 JM109 (*Escherichia coli* JM109) 均为本室保存, RosA 标准品按已有方法^[8]制备, 其它试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 紫苏愈伤组织的诱导

紫苏种子经 1% 次氯酸钠消毒 10min, 75% 乙醇消毒 3min, 无菌水洗 5 次, 播种于 MS 基本培养基上, 光照培养箱中 28℃ 培养, 光暗间隔各为 12h, 当出现第五片真叶时, 取叶子作为外植体, 接种于添加 1mg/LNAA, 0.4mg/L 2, 4-D 的 MS 培养基上, 28℃ 暗处培养, 两周后, 外植体周围开始分化愈伤组织, 继续培养 2~3 周后, 继代培养。

1.3 愈伤组织中 RosA 的提取

准确称取愈伤组织干粉 1g, 用 15mL 80% 的酒精 50℃ 提取 3 次, 合并提取液, 定容至

50mL。

1.4 HPLC 检测提取物中 RosA

所用仪器为岛津高效液相色谱仪 (LC-10A), 色谱柱为 VP-ODS (150×4mm) SPD-10A 紫外可见检测器, 检测波长为 280nm, 流动相为水 (含 0.1% H₃PO₄): 乙腈 (60: 40), 流速为 0.5 mL/min。精确称取 RosA 标准品 5mg, 用无水乙醇溶解后定容至 50mL, 分别进样 2、4、6、8、10 μ L, 根据峰面积求得标准曲线, 然后根据标准曲线计算愈伤组织或产品中 RosA 的含量。

1.5 愈伤组织中 RosA 的分离纯化参照文献 [8] 略有改动

500g 紫苏愈伤组织干粉经 80% 乙醇 50℃ 提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至原体积的 1/5, 后用正己烷萃取, 水相用 1mol/L 的盐酸调 pH 至 2.0, 然后用乙酸乙酯萃取, 有机相减压蒸干, 浓缩物用少量无水乙醇溶解后, 上 Sephadex LH-20 柱 (1.8×110cm), 80% 乙醇洗脱, 分步收集, FeSO₄ 法检测各部分中的 RosA 含量^[9], 吸收光谱由岛津 UV-1601 测定。合并含 RosA 的溶液部分, 减压蒸去乙醇, 水溶液置于 4℃, 数天后析出 RosA 颗粒, 沉淀经冰水洗涤后, 重结晶一次, 提取物真空干燥。

1.6 RosA 对大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌及立枯丝合菌生长的抑制

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、立枯丝合菌分别接种于 1.5% 琼脂的 LB、牛肉膏、土豆培养基上, 细菌于 37℃ 培养 2h, 真菌 (立枯丝合菌) 28℃ 培养至菌落明显 (直径约 2cm), 再在平板上打取若干小孔 (直径约 6mm), 分别加入一定浓度的 RosA 水溶液, 以蒸馏水为对照, 继续培养至结果明显。

2 结果与讨论

外植体在 MS 培养基上培养 3d 后, 其花青素含量迅速增加, 两周后, 在外植体周围开始分化出愈伤组织, 初期愈伤组织的颜色为白色, 继续培养后颜色逐渐变深呈褐色, 可能是愈伤组织中的 RosA 与细胞内外的 Fe²⁺ 形成暗蓝色复合物的缘故^[9]。Tamura 等^[10]的实验表明, 细胞

分裂素、硝酸盐、磷酸盐等都能影响紫苏悬浮培养细胞中花青素及 RosA 的合成, 本研究也发现, 紫苏叶外植体在添加 NAA(1mg/L) 和 2, 4-D(0.4mg/L) 的 MS 培养基上分化的愈伤组织不含花青素, 更适于 RosA 的纯化, 而外植体在添加 NAA(1mg/L) 及 6-BA(0.4mg/L) 的 MS 培养基上, 外植体只增厚却不形成愈伤组织。

愈伤组织干粉经酒精提取后, 提取液经 HPLC 分析, 根据标准曲线计算得知愈伤组织干粉中的 RosA 含量为 0.85%。愈伤组织干粉经酒精抽提, 乙酸乙酯萃取后, 最后经 Sephadex LH-20 柱层析纯化, 获得了含 RosA 的组分, 该组分经 HPLC 检测, 主要为单一成份(如图 1), 其保留时间与 RosA 标准品的保留时

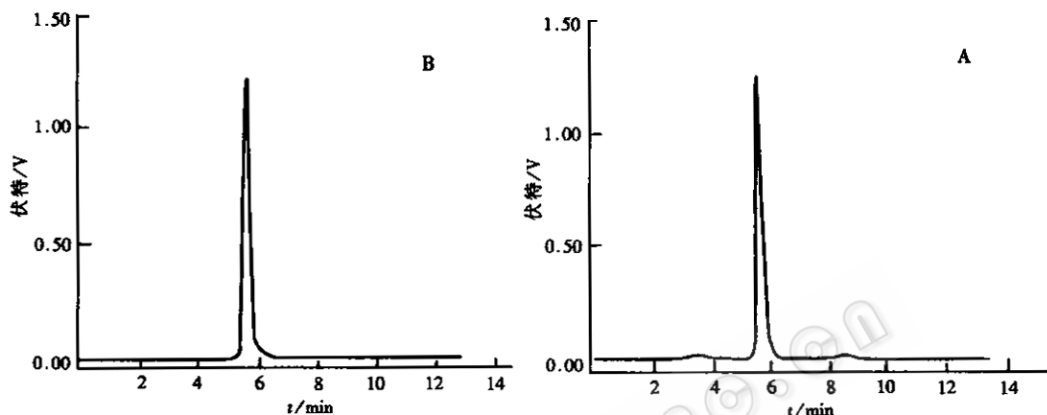


图1 RosA组分(A)及RosA标准品(B)的HPLC测试分析图

间一致, 均为 5.856min(图 1)。该组分与 FeSO_4 反应产生暗蓝色, 最大吸收峰位于 570nm 处, 与其他植物来源的 RosA- Fe^{2+} 复合物有相同的吸收曲线及最大吸收波长^[12], 因此推断所得组分为 RosA。根据标准曲线计算该组分中重结晶的 RosA 的含量为 95%。

用一系列不同浓度的 RosA 水溶液对供试菌

株的抑菌实验表明, 不同菌对 RosA 的敏感性不同, 大肠杆菌(JM109)对 RosA 最敏感, 其最低抑菌浓度为(MIC)300 $\mu\text{g/mL}$, 而真菌立枯丝合菌对 RosA 的敏感性最差, 其 MIC 为 800 $\mu\text{g/mL}$, 属于革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌介于二者之间, 其 MIC 为 400 $\mu\text{g/mL}$, 图 2 显示 RosA 对 3 种菌生长的抑制情况。

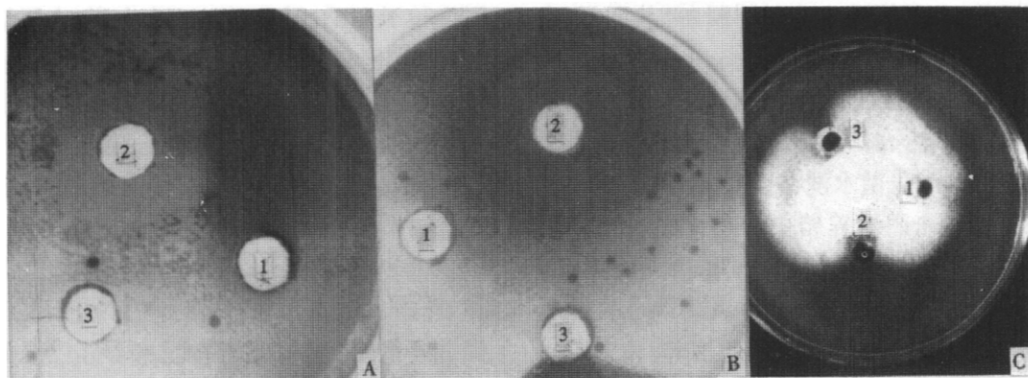


图2 RosA对大肠杆菌(A)、金黄色葡萄球菌(B)、立枯丝合菌(C)生长的抑制

1 对照, 2 3.0mg/mL RosA处理

由此可见 RosA 是一种广谱性抗菌物质, 由于苏叶中 RosA 的含量很高, 最高时可达苏叶干

重的 4%^[8], 因此, 紫苏提取物中除紫苏醛外, RosA 也是一种主要的抗菌活性成分。由于

RosA 在多种植物中都有存在, 因此, 推测 RosA 在这些植物的抗病作用中可能发挥了重要的作用, 本文还提供了紫苏愈伤组织诱导方法及 RosA 的纯化方法, 为进一步开发紫苏这种中草药的研究打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Chen J H, Ho Ch T. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(7):2374~2378.
- [2] Pearson D A, Frankel E N, Aeschbach R, *et al.* *J Agric Food Chem*, 1997, 45(3):578~582.
- [3] Arda N, Goeren, Kuru A *et al.* *J Med Chem*, 1997, 60(11):1170~1173.
- [4] Mazumder A, Neamati N, sunder S, *et al.* *J Med Chem*, 1997, 40(19):3057~3063.
- [5] Hangay Gy, Kelen A, Keseru P, *et al.* *Olaj Szappan Kozmet*, 1994, 30-2.
- [6] Kwak W J, Han C K, Kin H S, *et al.* *Eur Pat Appl EP832652*, 1998.
- [7] Fujita T, Nahayama M. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP04306889*, 1992.
- [8] 陈发奎主编. 常用中草药成分含量测定. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [9] Lopez-Arnoldos M, Lopez-Serrano A, Ros Barcelo A A *et al.* *Fresenius J Anal Chem*, 1995, 351:311~314.
- [10] Tamura H, Takahashi K. *Kagawa Daigaku Nogakubj Gakujutsu Hokoku*, 1994, 46(2):135~140.