

芦丁铬配合物的合成及组合物的抑菌作用研究

李艾华^{1*}, 郭艳华¹, 张玉敏¹, 许国权²

¹江汉大学化学与环境工程学院; ²江汉大学生命科学院, 武汉 430056

摘要: 本文合成了芦丁铬配合物, 通过 UV、IR 和 TG-DTA 等手段对合成产物进行了表征。主要对芦丁铬配合物及组合物(芦丁铬 + 鱼腥草提取物)的抑菌作用进行了研究。结果表明: 芦丁铬和鱼腥草提取物联合抑菌有增效作用, 其抑菌效果均优于芦丁、芦丁铬配合物、鱼腥草、芦丁和鱼腥草组合物; 同时抑菌作用随浓度增大而增强; 在 pH 为 6 时, 抑菌效果最好。

关键词: 芦丁; 芦丁铬配合物; 芦丁铬配合物及组合物; 抑菌作用

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.015

Synthesis of Rutin-Chromium(III) Complex and Investigation of its Antibacterial Properties

LI Ai-hua^{1*}, GUO Yan-hua¹, ZHANG Yu-min¹, XU Guo-quan²

¹School of Chemistry and Environmental Engineering; ²School of Life Sciences, Jiangnan University, Hubei Wuhan 430056, China

Abstract: In this study, the rutin-chromium(III) complex was synthesized and characterized by UV, IR and TG-DTA. The antibacterial properties of the rutin-Cr(III) complex and the compositions of rutin-Cr(III) and *Houttuynia cordata* thunb extract were studied. The results showed that the compositions of rutin-Cr(III) and *H. cordata* extract showed synergistic antibacterial effect. Its inhibitory effect was better than that of rutin, *H. cordata* extract, the compositions of rutin and *H. cordata* extract, rutin-Cr(III) complex. The antibacterial effect increased with the increase of concentration, and the highest antibacterial effect happened at pH 6.

Key words: rutin; rutin-Cr(III); chromium complex and composition; antibacterial effect

芦丁(Rutin)又名芸香苷,为一种药食植物中来源很广的黄酮类化合物,它具有抗炎、抗过敏、降血压、抗心律失常、抗血小板凝聚、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用,它类似一些黄酮类化合物,在食品行业和医药中有广泛的应用^[1-3]。Cr(III)是生命必需的微量元素之一,Cr(III)的作用主要是维持机体正常的糖代谢及脂类代谢,缺乏时会发生两种物质的代谢紊乱^[4]。人体对无机铬的吸收率低于 1%,有机铬吸收率较无机铬高 10% ~ 25%。Cr(III)具有空的价轨道,芦丁具有配位原子,在适当条件下两者可以生成配合物^[5]。目前,芦丁及芦丁配合物的抑菌作用少有报道,本课题组在近些年的研究工作中,对芦丁及芦丁配合物的抗氧化作用和抑菌作用作了一些研究^[6],也对天然植物鱼腥草中提取物的生物

活性进行了研究^[7,8],两者均有一定的抑菌作用。为了制备更强的抑菌剂,本课题组对鱼腥草中提取物和其它天然植物提取物科学配比,测定的抑菌作用有所增强。考虑到芦丁配合物是黄酮类化合物芦丁和金属配位的产物,鱼腥草中提取物的抑菌成分部分也为黄酮类化合物,于是将两者复合,测定其抑菌作用。本文在此思路的基础上研究了芦丁铬配合物的合成,比较了芦丁、芦丁铬配合物、鱼腥草以及芦丁铬配合物和鱼腥草提取物联合的抑菌效果,结果显示联合抑菌作用明显增强,这一结论对开拓芦丁铬配合物和中草药联合抑菌在食品和医药领域的应用具有实际意义。

1 材料与仪器

芦丁(BR)、六水氯化铬(AR)、无水乙醇(AR)、硝酸(GR)、高氯酸(GR),均购于国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯。鱼腥草提取物(提取方法按文献^[7]进行);牛肉膏,蛋白胨,琼脂

收稿日期: 2015-09-08 接受日期: 2016-02-23

基金项目: 湖北省教育厅科技项目(B2014073; B2014074); 湖北省教育厅科技项目(B20114504)

* 通讯作者 Tel: 86-018086638319; E-mail: 786135183@qq.com

均属生化试剂。供试菌种:大肠杆菌,金黄色葡萄球菌、啤酒酵母、枯草杆菌(由本校生科院实验室提供)。

UV-2550 紫外可见分光光度计,日本岛津; TENSOR27 型红外光谱仪, BRUKER 公司; M6 原子吸收分光光度计, 美国赛默飞世尔; CRY-2P 型差热分析仪, 北京光学仪器厂; JJ-1 型定时电动搅拌器, 江苏金坛中大仪器厂; JA2003N 型电子分析天平, 上海菁海仪器有限公司; 上海雷磁 PHS-25 PH 计, 上海精密科学仪器有限公司; 数显恒温水浴锅, HH-2 国华电器有限公司。

2 实验方法

2.1 芦丁铬配合物的合成

通过对芦丁铬配合物的合成条件进行探讨后, 按下列方法合成: 将 619.1 mg (约 1.0 mmol) 芦丁与 20 mL 无水乙醇投入三口烧瓶中, 微热使其溶解完全, 再加入 215.8 mg 无水碳酸钠 (约 2.0 mmol) 搅拌 1 h, 有黄色的物质生成, 然后将 273.6 mg (约 1.0 mmol) $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入三口烧瓶中, 在 50 °C 的恒温水浴锅中加热搅拌反应, 同时缓慢滴加 0.5 mol/L 的盐酸溶液至 pH 7.6, 溶液成为深棕色。继续回流搅拌 4 h, 观察到有大量棕黄色沉淀生成, 放置、冷却、抽滤, 沉淀反复用蒸馏水和无水乙醇洗涤, 抽干, 室温真空干燥, 最后得浅棕黄色粉末状产品, 备用。

2.2 芦丁铬配合物组成与结构的表征

配比测定用等摩尔连续变化法^[9], 测溶液在 424 nm 处的吸光度, 并对芦丁体积作图。

铬含量的测定用原子吸收分光光度法: 精确称取 0.5 g 左右样品置于 100 mL 小烧杯中, 在通风橱中滴加 3 mL 混酸 ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 4 : 1$), 于电热板上加热消解至近干, 用稀硝酸溶解残留物, 将溶液定量转移至 100 mL 容量瓶中用高纯水定容。用石墨炉原子吸收光谱仪在波长 357.9 nm, 狭缝宽度 1.0 nm, 灯电流 12 mA 条件下测铬标准液和样品溶液的吸光度, 根据工作曲线计算样品溶液中铬的浓度。

差热-热重分析测定: 取 4.6 mg 芦丁铬放入 CRY-2P 型差热分析仪中, 在 N_2 气氛中, 升温速度为 20 °C/min, 测定范围为 20 ~ 700 °C 条件下, 绘制其 TG-DTA-DTG 曲线图。

紫外吸收光谱测定: 用 95% 乙醇溶液作参比, 在 200 ~ 700 nm 范围扫描样品溶液的紫外可见吸收光谱图。扫描速度为 500 nm/min, 分辨率为 0.02 nm。

红外光谱测定: KBr 压片, 在 400 ~ 4000 cm^{-1} 区间范围内扫描其红外光谱, 结果见表 1。

2.3 芦丁铬配合物的抑菌作用研究

2.3.1 培养皿的制备

培养皿的制备方法和抑菌实验方法按文献^[10,11]进行实验。供试菌种有大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母、枯草杆菌, 测试样品浓度均为 10 mg/mL, 样品编号为: (1): Ru; (2): Ru-Cr; (3): Ru-Cr (1 mg/mL) + 鱼腥草提取物 (9 mg/mL); (4) Ru-Cr (3 mg/mL) + 鱼腥草提取物 (7 mg/mL); (5): Ru-Cr (5 mg/mL) + 鱼腥草提取物 (5 mg/mL); (6): Ru-Cr (7 mg/mL) + 鱼腥草提取物 (3 mg/mL); (7): 鱼腥草提取物; (8) Ru (5 mg/mL) + 鱼腥草提取物 (5 mg/mL), 圆滤纸片的直径为 5 mm, 在温度 37 °C 下经 24 h 培养后, 用游标卡尺测定其抑菌圈直径, 实验结果见表 2。

2.3.2 芦丁铬配合物抑菌活性的影响因素研究

① pH 的影响: 取浓度均为 10 mg/mL 的样品溶液, 将样品调制不同的 pH (2、4、6、8、10) 的溶液; ② 浓度的影响: 用无菌水为溶剂和 DMSO 配成总浓度为 0.5、1、10、30 mg/mL 样品溶液, 分别按 2.3.1 的方法测定 (1 ~ 8) 样液 (浓度变化时, 各样品按浓度大小同时增大或缩小, 比例不变) 的抑菌圈变化, 供试菌种选用样品溶液对其抑菌作用相对更强的金黄色葡萄球菌。

3 结果与分析

3.1 芦丁铬配合物组成的测定

图 1 即为用等摩尔连续变化法测配位比的曲线, 由图可见当 Ru 和 Cr (III) 体积比为约 1:1 时吸光度最大, 说明此时配位完全, 因此可以推测芦丁铬配合物的组成为 $\text{Ru} : \text{Cr} (\text{III}) = 1 : 1$ 。

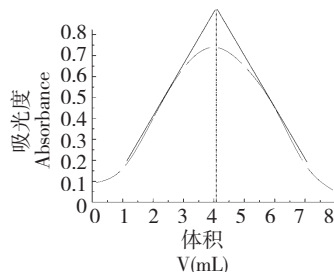


图 1 芦丁铬配合物配位比的测定

Fig. 1 The determination of proportion of rutin-Cr (III)

图 2 为芦丁铬配合物的 TG-DTA-DTG 曲线图,

由图可见,热重曲线在一开始也有由于气流不稳所致的鼓起部分,在 55 °C 左右有一吸热峰,是由于芦丁铬配合物失去结晶水所致,对应于热失重曲线,失重率为 7.39%,推测结晶水分子数为 3;在 282 °C 处有一吸热峰,为配合物的分子结构被破坏而引起分解所致,对应于热失重曲线,失重率为 53.91%;最后剩余 38.7% 为少量 C 和 Cr₂O₃ 的质量。

原子吸收分光光度法测铬的计算结果为 5.92%,Cr(C₂₇H₃₀O₁₆)Cl₃·3H₂O 中铬的理论含量为 6.32%。

结合以上配位比组成的测定,差热与热重分析的数据和铬含量的分析,可以推测出合成的芦丁铬配合物分子式为 Cr(C₂₇H₃₀O₁₆)Cl₃·3H₂O。

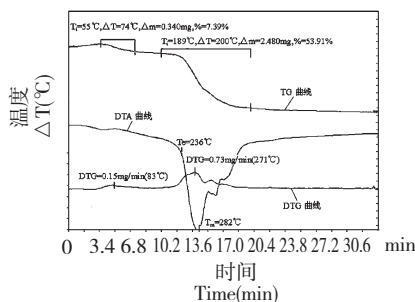


图 2 芦丁铬配合物的 TG-DTA-DTG 曲线

Fig. 2 The TG-DTA-DTG curves of rutin-Cr(III)

3.2 紫外-可见光谱分析

图 3 为芦丁铬配合物的紫外可见吸收光谱。芦丁在乙醇溶液中的最大吸收波长为 258 nm,360

nm,形成配合物后两个峰带均发生了红移,分别移动 5 nm 和 64 nm。谱带的移动一方面证明了羟基氧的孤对电子进入金属离子的 d 轨道形成了配合物,另一方面,在形成芦丁铬配合物后,整个分子中电子的离域程度增大,致使电子跃迁时需要的能量降低,吸收峰发生红移^[12]。

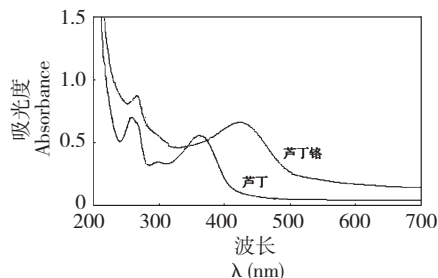


图 3 芦丁及其配合物在 95% 乙醇溶液中的紫外吸收光谱
Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of rutin and rutin-Cr

3.3 红外光谱分析

表 1 为芦丁及其配合物的红外光谱数据,配体芦丁在 1655 cm⁻¹处出现羰基伸缩振动吸收峰,芦丁铬中此峰的位置和配体相比没有发生明显的变化,这可能是 3-OH 被糖基屏蔽,致使其羰基不能参与配合^[13]。芦丁铬在 565.86 cm⁻¹处出现了 Cr-O 键的特征吸收峰,而该吸收峰在芦丁的红外波谱图中没有出现,可见金属离子与配体发生了络合。芦丁在 1504.76 cm⁻¹处出现的峰为苯环 π 键共轭体系的(C=C)键伸缩振动峰,在配合物中此峰向低波数移动了 20.46 cm⁻¹,这是配位反应对苯环共轭体系影响所致。

表 1 红外吸收光谱

Table 1 IR absorption spectrum

化合物 Compounds	C=O (cm ⁻¹)	C=C (cm ⁻¹)	C-O-C (cm ⁻¹)	O-H (cm ⁻¹)	M-O (cm ⁻¹)
芦丁 Rutin	1655.31	1504.76	1298.10	3419.00	-
芦丁铬 Rutin-Cr	1651.56	1484.30	1269.65	3428.26	565.86

3.4 芦丁铬配合物及组合物的抑菌作用

按 2.3.1 的实验方法测定,用游标卡尺测定其抑菌圈直径(mm),数据列于表 2。

确定物质抑菌能力大小可以比较抑菌圈大小,抑菌活性越高的抑菌圈直径就越大^[10]。由表 2 数据分析可知:(1~8)号样品对金黄色葡萄球菌的抑菌作用比大肠杆菌及枯草杆菌的抑菌作用都强,其间存在显著性差异(P<0.05),对啤酒酵母的抑菌作用相对较弱;(3~6)号样,即芦丁铬组合物的

抑菌作用均强于芦丁、芦丁铬、鱼腥草提取物,也强于芦丁+鱼腥草提取物,其中(4)Ru-Cr(3 mg/mL)+鱼腥草提取物(7 mg/mL)的抑菌效果最好,说明 Ru-Cr 和鱼腥草提取物组合有协同抑菌作用。Ru-Cr 和鱼腥草提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最佳,可能原因是这些物质与细胞磷脂和肽链上的羧基有较强协同亲和力,能稳定存在于细胞膜及溶酶体膜上,从而较强地抑制溶酶体释放炎症物质,一方面可以与菌的转移核糖核酸中的磷酸基键合,抑

表2 芦丁铬配合物及与组合物的抑菌效果

Table 2 The antibacterial properties of the rutin-Cr(Ⅲ) complex and the compositions of rutin-Cr(Ⅲ) and *H. cordata* extract

样品编号 No.	菌种 Strains			
	大肠杆菌 <i>Bacterium coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	啤酒酵母 <i>Beer yeast</i>	枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
(1)	7.6 ± 0.2b	8.8 ± 0.3a	6.3 ± 0.4c	6.5 ± 0.4bc
(2)	9.4 ± 0.3a	10.1 ± 0.2a	7.4 ± 0.4b	7.7 ± 0.5b
(3)	9.5 ± 0.3b	11.0 ± 0.2a	7.7 ± 0.4c	8.4 ± 0.4bc
(4)	10.1 ± 0.3b	13.2 ± 0.2a	8.5 ± 0.4c	9.0 ± 0.3bc
(5)	9.7 ± 0.4b	12.4 ± 0.2a	7.5 ± 0.5c	8.6 ± 0.3c
(6)	9.3 ± 0.3b	10.4 ± 0.2a	7.3 ± 0.5c	8.1 ± 0.4bc
(7)	7.9 ± 0.4b	9.2 ± 0.3a	6.6 ± 0.3c	6.8 ± 0.4bc
(8)	8.2 ± 0.4b	9.7 ± 0.3a	6.9 ± 0.4b	7.3 ± 0.3b

注:(1)表中同行数据后小写字母相同者表示在5%水平上差异不显著(DMRT);(2)表中数据为平均数 ± SD, n = 3。

Note:(1) The data within the same column followed by the same letter indicated no significant difference at P = 0.05 level, based on Duncan's multiple range test (DMRT); (2) The data were mean ± SD, n = 3.

制核酸酶的活性及功能,结果使细菌的生长受到抑制;另一方面,由于芦丁形成 Ru-Cr 配合物后,配合物的分子量和共轭效应都相应增强,脂溶性也增强,对细胞膜的穿透或破坏能力必然增强,使细菌生长和代谢需要的关键成分流失,导致细菌不能完成正常的生长^[14,15]。

3.5 芦丁铬配合物及组合物抑菌效果的影响因素

3.5.1 pH 对抑菌效果的影响

按 2.3.2 的试验方法得到的 pH 对抑菌效果影响的实验结果见表 3。由表 3 可知,在 pH 为 4 ~ 8 范围内,芦丁铬配合物及组合物抑制金黄色葡萄球

菌的抑菌活性表现为稳定性较好,在 pH 为 6 时对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,而在 pH 大于 8 以后,芦丁铬配合物及组合物抑菌作用逐渐下降,增至 pH 为 10 时,下降幅度增大。而芦丁在 pH 大于 6 以后对金黄色葡萄球菌的抑菌效果下降幅度比芦丁铬配合物及组合物更大。在不同 pH 值下,抑菌圈直径均大于 5 mm,说明均有较好的抑菌效果。综合来看,芦丁铬配合物及组合物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性均在酸性条件下更好,而芦丁在 pH 变化时的稳定性均弱于芦丁铬配合物及组合物。

表3 pH 值对芦丁铬配合物及组合物抑菌效果的影响

Table 3 The effect of pH on antibacterial properties of the rutin-Cr(Ⅲ) complex and the compositions of rutin-Cr(Ⅲ) and *H. cordata* extract

样品编号 No.	pH				
	2	4	6	8	10
(1)	8.7 ± 0.3	8.6 ± 0.2	8.9 ± 0.3	7.9 ± 0.4	6.3 ± 0.5
(2)	9.7 ± 0.3	9.7 ± 0.2	10.0 ± 0.3	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.3
(3)	9.8 ± 0.2	10.0 ± 0.3	10.6 ± 0.2	9.5 ± 0.2	8.4 ± 0.3
(4)	11.8 ± 0.2	11.9 ± 0.2	12.7 ± 0.1	11.3 ± 0.2	9.9 ± 0.3
(5)	11.1 ± 0.3	11.0 ± 0.2	11.8 ± 0.2	10.6 ± 0.3	8.9 ± 0.3
(6)	9.8 ± 0.3	10.1 ± 0.3	10.5 ± 0.2	9.7 ± 0.2	8.2 ± 0.4
(7)	8.3 ± 0.3	8.4 ± 0.3	9.0 ± 0.3	8.0 ± 0.3	6.5 ± 0.4
(8)	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.2	9.5 ± 0.2	8.6 ± 0.2	7.2 ± 0.4

注:表中数据为平均值 ± SD, n = 3。

Note: The data were mean ± SD, n = 3.

3.5.2 浓度对抑菌效果的影响

按 2.3.2 的试验方法实验,其结果见表 4。芦

丁铬配合物及组合物的抑菌作用在一定浓度范围内随浓度的增大而增强,呈剂量效应关系。在四种测

定的浓度下,芦丁铬配合物和鱼腥草组合物对金黄色葡萄球菌的抑菌作用始终强于芦丁、芦丁铬、鱼腥草提取物和芦丁+鱼腥草提取物。在相同浓度下,仍然是(4) Ru-Cr(3 mg/mL)+鱼腥草提取物(7 mg/mL)的抑菌作用最强;在浓度增加过程中,芦丁

铬、芦丁铬配合物和鱼腥草组合物抑菌作用增加的幅度始终大于芦丁。在浓度很低,为0.5 mg/mL时,芦丁铬配合物和鱼腥草组合物对金黄色葡萄球菌仍有较强的抑菌作用,而芦丁、鱼腥草单独存在时几乎没有抑菌作用。

表4 不同浓度芦丁铬配合物及组合物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果比较

Table 4 Comparison of the antibacterial effect of different concentrations of the rutin-Cr(Ⅲ) complex and the compositions on *Staphylococcus aureus*

样品编号 No.	浓度 Concentration (mg/mL)			
	30.00	10.00	1.00	0.50
(1)	11.2 ± 0.3	8.8 ± 0.4	7.3 ± 0.4	5.5 ± 0.7
(2)	13.0 ± 0.2	10.1 ± 0.4	8.8 ± 0.3	7.0 ± 0.2
(3)	13.8 ± 0.2	11.0 ± 0.2	9.6 ± 0.4	7.8 ± 0.4
(4)	16.1 ± 0.2	13.2 ± 0.3	11.9 ± 0.4	9.8 ± 0.2
(5)	15.0 ± 0.1	12.4 ± 0.2	10.9 ± 0.3	9.0 ± 0.3
(6)	13.2 ± 0.2	10.4 ± 0.4	9.2 ± 0.2	7.6 ± 0.3
(7)	11.9 ± 0.4	9.2 ± 0.3	7.6 ± 0.5	5.7 ± 0.6
(8)	12.7 ± 0.3	9.7 ± 0.2	8.4 ± 0.3	6.7 ± 0.5

注:表中数据为平均值 ± SD, n = 3。

Note: The data were mean ± SD, n = 3.

4 结论

本文合成了芦丁铬配合物,结合UV中的等摩尔连续变化法和TG-DTA等手段初步确定其分子式为 $\text{Cr}(\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16})\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,并对芦丁铬配合物的结构进行了表征。通过对芦丁铬配合物及组合物(芦丁铬+鱼腥草提取物)抑菌作用的研究,表明芦丁铬配合物及组合物(芦丁铬+鱼腥草提取物)具有广谱的抑菌作用,芦丁铬和鱼腥草提取物联合抑菌有增效作用,其抑菌效果均优于芦丁、鱼腥草、芦丁和鱼腥草组合物、芦丁铬配合物;芦丁铬和鱼腥草提取物联合抑菌的稳定性好,同时抑菌作用随浓度增大而增强。

参考文献

- 1 Samsonowicz M, Kamińska I, Kalinowska M, et al. Alkali metal salts of rutin-Synthesis, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV-VIS), antioxidant and antimicrobial studies. *Spec Acta A-Mol Biomol Spec*, 2015, 151: 926-938.
- 2 Kathrin M, Bettina B, Krystyna B, et al. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46(1-2): 79-85.
- 3 Djelili H, Arrar L, Naline E, et al. Relaxant effects of quercetin and rutin on human isolated bronchus. *Chin Med*, 2012, 3: 94-100.

- 4 Sun Z (孙忠), Wu YT (吴蕴棠). Study on regulation of chromium on GLUT4 expression of skeletal muscle in diabetic rats. *Acta Nutri Sin* (营养学报), 2005, 27: 196-199.
- 5 Huang JD (黄建东), Wang JZ (王建中). Synthesis of rutin and chrome and its auxiliary function of the blood sugar reduction. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 6: 376-380.
- 6 Guo YH (郭艳华), Xu GQ (许国权), Li AH (李艾华), et al. Chemical modification and bacteriostatic action of natural flavonoid rutin. *J Jiangnan Univ, Nat Sci* (江汉大学学报, 自科版), 2013, 2: 31-35.
- 7 Guo YH (郭艳华), Xu JY (许江扬). Extraction and purification of *Houttuynia cordata* flavonoids and identification of flavonoids type. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28: 287-291.
- 8 Guo YH (郭艳华), Qiu HX (邱红心), Zhang YF (张远方), et al. Effect of chemical components in *Houttuynia cordata* on the blocking of N-nitrosation reaction. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31(23): 72-75.
- 9 Li AH (李艾华), Guo YH (郭艳华), Zhang YM (张玉敏). Synthesis, characterization of rutin-Fe(Ⅲ) and its interaction with DNA. *J Jiangnan Univ, Nat Sci* (江汉大学学报, 自科版), 2013, 41(6): 33-36.
- 10 Guo YH (郭艳华), Ding XZ (丁小智), Dong YL (董映兰), et al. Preliminary study on antibacterial effect of ginger composite antioxidants of two components on *Escherichia coli*. *China Brew* (中国酿造), 2009, 5: 46-49.