

文章编号:1001-6880(2018)6-0964-04

山楂中一个具有抗菌活性的黄酮类新化合物

李晶¹,孔维松¹,刘欣¹,耿永勤¹,胡秋芬¹,李涛^{2*},杨叶昆^{1*}¹云南中烟工业有限责任公司技术中心,昆明 650106; ²曲靖市第一人民医院口腔医院,曲靖 655000

摘要:为研究蔷薇科山楂属植物山楂果实的化学成分,本研究采用色谱技术从山楂70%乙醇提取物中分离得到了1个新化合物,波谱学方法鉴定了该化合物结构,命名为:2'-羟基-7-(3-羟丙基)-6-甲氧基-黄酮。生物活性测试表明,该新化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株的MIC₉₀值为34.8 ± 3 μg/mL,具有一定的抗菌活性。

关键词:山楂;黄酮;抗菌活性

中图分类号:R284.2;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.008

A New Flavone from *Crataegus pinnatifida* and Its Antibacterial Activity

LI Jing¹, KONG Wei-song¹, LIU Xin¹, GENG Yong-qin¹, HU Qiu-fen¹, LI Tao^{2*}, YANG Ye-kun^{1*}¹China tobacco Yunnan industrial Co.,Ltd, Kunming, 650106, China;²Stomatological hospital of Qujing first people's hospital, Qujing 655000, China

Abstract: For the research of the chemical components of the fruit of *Crataegus pinnatifida*, a new compound has been isolated from the ethanol extracts (extracted by 75% ethanol) of this sample by using various chromatographic techniques. Its structure was identified by spectral methods, and was named as 2'-hydroxy-7-(3-hydroxypropyl)-6-methoxyflavone. The biological activity test showed that this compound exhibited certain antibacterial activity with MIC₉₀ value of 34.8 ± 3 μg/mL for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain.

Key words: *Crataegus pinnatifida*; flavone; antibacterial activity

山楂(*Crataegus pinnatifida*),又名山里果、山里红,为蔷薇科山楂属落叶小乔木,在我国南北各地均有分布,生于海拔100~1500 m的山坡林边或灌木丛中^[1]。山楂果实酸甜可口,含丰富的维生素、山楂酸、柠檬酸、黄酮类等,能生津止渴,亦可入药,是一种非常受人们喜爱的果实^[2]。经常吃山楂可以帮助减肥瘦身、强心降脂、降血压、生津开胃等功效^[3-4]。山楂干果还具有非常高的药用价值;民间中成药焦兰仙、保和丸、山楂丸等均以山楂为其主要成分。山楂入药归脾、胃、肝经,有消食化积、活血散瘀的功效^[5]。

国内外研究表明,山楂中的主要化学成分有:黄酮类、有机酸类、三萜类、原花青素等。黄酮类物质是山楂中的主要活性成分,目前,从山楂中分离得到100余种黄酮类化合物^[6]。山楂黄酮具有降血脂、抗动脉粥样硬化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等

多种较强的生理活性^[7,8]。为了从山楂中发现更多的活性化学成分,本实验对产自云南大理的山楂果实(拉丁名 *Crataegus pinnatifida* Bunge)的化学成分进行了研究,并从中分离到一个新的黄酮类化合物,结构见图1,该化合物具有一定的抗菌活性。

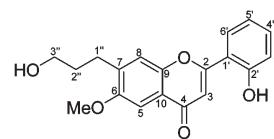


图1 化合物1的结构

Fig. 1 The chemical structure of compound 1

1 仪器与材料

UV-2401A 紫外光谱仪(日本岛津公司); Bio-Rad FTS-185 傅里叶变换红外光谱仪(美国伯乐BIO-RAD公司); DRX-500型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司); API QSTAR 飞行时间质谱(美国应用生物公司), VG Autospec-3000 高分辨质谱(英国质谱仪器公司), 半制备 HPLC 分析仪器为安捷伦1200型高效液相色谱仪, 色谱柱为安捷伦公司 Zor-

收稿日期:2017-09-08 接受日期:2018-04-04

基金项目:中国烟草总公司科技重点项目(110201502006); 云南中烟科技项目(2016JC03); 国家自然科学基金(21462051)

*通信作者 E-mail: huqifena @ aliyun. com

bax PrepHT GF (250 mm × 21.2 mm, 7 μm) 和安捷伦 Zorbax C₁₈ (250 mm × 9.4 mm, 5 μm)。柱色谱硅胶 (80 ~ 100、150 ~ 200 目)、GF₂₅₄ (100 × 100 mm) 硅胶板, 均为青岛海洋化工厂生产; MCI 填充材料为 MCI-gel CHP-20P (75 ~ 150 μm), 购于日本三棱公司; 凝胶为 Sephadex LH-20, 购于安玛西亚生物技术(上海)有限公司; 薄层色谱法显色, 显色剂为 5% H₂SO₄乙醇溶液, 喷洒后适当加热即可; 工业用二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯。

实验样品为蔷薇科山楂属植物山楂干燥的果实 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)。标本经云南民族大学民族医药学院杨青松教授鉴定, 标本(编号: 2016122)保存于云南民族大学民族药资源化学重点实验室标本馆。

2 实验方法

2.1 提取与分离

取干燥的山楂样品 3.8 kg 粉碎到 30 目, 然后用 70% 乙醇水溶液提取 4 次, 每次用量为 4.5 L, 室温浸泡、超声 4 次(每次 30 min), 过滤, 合并提取液, 提取物浓缩到小体积后用乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯萃取物蒸干, 用 95% 的甲醇溶解, 通过用 MCI 树脂脱色, 脱色后的溶液减压浓缩得浸膏 52.6 g。浸膏用 80 g 粗硅胶 (80 ~ 100 目) 拌样, 烘干; 然后用 500 g 硅胶 (150 ~ 200 目) 装柱层析, 二氯甲烷:丙酮 (20:1、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5) 梯度洗脱, 分成 6 个部分。将二氯甲烷-丙酮 7:3 洗脱部分用甲醇溶解, 采用 Agilent 公司的 Zorbax PrepHT GF (250 mm × 21.2 mm, 7 μm) 反相柱, 以 55% 的甲醇水溶液为流动相, 体积流量为 20 mL/min, 收集 25.4 min 的色谱峰, 得化合物粗品。粗品再以甲醇为流动相, 用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析净化可得化合物 1 的纯品 12.6 mg。

取干燥的山楂样品 3.8 kg 粉碎到 30 目, 然后用 70% 乙醇水溶液提取 4 次, 每次用量为 4.5 L, 室温浸泡、超声 4 次(每次 30 min), 过滤, 合并提取液, 提取物浓缩到小体积后用乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯萃取物蒸干, 用 95% 的甲醇溶解, 通过用 MCI 树脂脱色, 脱色后的溶液减压浓缩得浸膏 52.6 g。浸膏用 80 g 粗硅胶 (80 ~ 100 目) 拌样, 烘干; 然后用 500 g 硅胶 (150 ~ 200 目) 装柱层析, 二氯甲烷:丙酮 (20:1、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5) 梯度洗脱, 分成 6 个部分。将二氯甲烷-丙酮 7:3 洗脱部分用甲

醇溶解, 采用 Agilent 公司的 Zorbax PrepHT GF (250 mm × 21.2 mm, 7 μm) 反相柱, 以 55% 的甲醇水溶液为流动相, 体积流量为 20 mL/min, 收集 25.4 min 的色谱峰, 得化合物粗品。粗品再以甲醇为流动相, 用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析净化可得化合物 1 的纯品 12.6 mg。

2.2 体外抗菌活性

受试菌株为云南省第一人民医院分离于临床标本的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株。苯唑西林耐药表型阳性(≥ 4 mg/L), 且 mecA 基因检测阳性。采用美国临床与实验室标准协会(CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) 推荐的微量肉汤稀释法进行药敏试验^[10], 方法如下:

2.2.1 抗菌药物贮存液制备: 制备抗菌药物贮备液的浓度为 2560 μg/mL, 配制好的抗菌药物贮存液应贮存于-20 ℃以下环境, 保存期不超过 6 个月。

2.2.2 待测菌的制备: 用接种环挑取过夜培养的 MH(A)培养皿上的单菌落于 MH(B)培养基中, 校准为 0.5 麦氏比浊标准, 约含菌数 1×10^8 CFU/mL, 然后稀释 100 倍, 即得到约含菌数 1×10^6 CFU/mL 的菌液, 备用。

2.2.3 分别将抗菌药物贮备液母液(2560 μg/mL)稀释 10 倍, 得到浓度为 256 μg/mL 的抗菌药物溶液。取无菌 96 孔板, 1 ~ 10 孔中各孔药物浓度依次为: 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL, 第 11 孔加入 200 μL 菌液(阳性对照), 第 12 孔加入 200 μL MH(B)培养基(阴性对照)。

2.2.4 在 1 至 10 孔各加入 50 μL 之前备好的菌液, 使每管最终菌液浓度约为 5×10^5 CFU/mL, 第 1 孔至第 11 孔药物浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL。将接种好的 96 孔板放置 37 ℃培养箱进行培养, 24 h 观察菌液生长情况。同时用标准株做质控。

2.2.5 结果判断与解释: 在读取和报告所测试菌株的 MIC 前, 应检查生长对照管的细菌生长情况是否良好, 同时还应检查接种物的传代培养情况以确定其是否污染, 质控菌株的 MIC 值是否处于质控范围。以肉眼观察, 药物最低浓度管无细菌生长者, 即为受试菌的 MIC。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 1 黄色胶状物(CDCl₃); mp. 238 ℃;

$[\alpha]_D^{25} = -110$ (c 0.4, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \varepsilon$) 210, 256, 358 nm; IR (KBr) ν_{max} 3418, 1664, 1610, 1551, 1441 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ_{H} ppm: 6.64 (1H, s, H-3), 7.16 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, s, H-8), 6.90 (1H, d, J = 7.6, H-3'), 7.31 (1H, t, J = 7.6, H-4'), 6.85 (1H, t, J = 7.6, H-5'), 7.71 (1H, d, J = 7.6, H-6'), 2.79 (2H, t, J = 7.8, H-1''), 1.90 (2H, m, H-2''), 3.56 (2H, t, J = 6.6, H-3''), 3.84 (3H, s, -OMe-8), 10.90 (1H, s, Ar-OH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} ppm: 162.9 (s, C-2), 106.5 (d, C-3), 177.2 (s, C-4), 113.9 (d, C-5), 153.0 (s, C-6), 130.5 (s, C-7), 116.3 (d, C-8), 149.3 (s, C-9), 122.9 (s, C-10), 119.4 (s, C-1'), 158.4 (s, C-2'), 116.3 (d, C-3'), 131.5 (d, C-4'), 121.6 (d, C-5'), 128.7 (d, C-6'), 28.8 (t, C-1''), 37.6 (t, C-2''), 63.6 (t, C-3''), 56.3 (q, -OMe-8); HR-ESI-MS m/z : 349.1059 [$\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$, 349.1052)。

化合物 **1** 黄色胶状物, HRESI-MS 显示其准分子离子峰为 349.1059 [$\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值 349.1052), 结合 ^1H NMR 和 DEPT 谱确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$, 不饱和度为 11。红外光谱中显示了羟基 (3418)、羰基 (1664) 和芳环 (1610、1551 和 1441 cm^{-1}) 的共振吸收峰。而紫外光谱在 210、256、358 nm 有最大吸收也说明了化合物中可能存在芳环结构。

化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱数据 (如表 1) 显示其含有 19 个碳和 18 个氢, 包括 1 个 1,2,4,5-四取代的苯环 (C-5 ~ C-10, H-5, H-8), 1 个 1,2-二取代的苯环 (C-1' ~ C-6', H-3' ~ H-6'), 1 个 α,β -不饱和羰基 (C-2, C-3, C-4, H-3), 1 个羟丙基 (C-1'' ~ C-3'', H2-1'' ~ H2-3'')^[6], 1 个甲氧基 (C 56.3 q, H 3.84

s), 以及 1 个酚羟基 (H 10.90 s)。根据典型的 2 个苯环、 α,β -不饱和羰基和双键信号, 可推测该化合物为黄酮类化合物^[7]。根据 H-3 和 C-2、C-4、C-10、C-1', H-5 和 C-4、C-9、C-10, H-8 和 C-6、C-7、C-9、C-10, 以及 H-6' 和 C-2 的 HMBC 相关 (如图 2) 可进一步确认化合物为黄酮类结构。化合物的母体确定后, 其余的取代基, 羟丙基、甲氧基和酚羟基可视为黄酮上的取代基。化合物的 HMBC 谱中 (如图 2) 可观察到甲氧基氢 (H 3.84) 与 C-6 (C 153.0) 的 HMBC 相关, 可推测该甲氧基分别取代在 C-6 位; 根据 H2-1'' (H 2.79) 与 C-6 (C 153.0)、C-7 (C 130.5)、C-8 (C 116.3), H2-2'' (H 1.90) 与 C-7 (C 130.5), 以及 H-8 (H 6.79) 和 C-1'' (C 28.8) 的 HMBC 相关, 可证实羟丙基取代在 C-7 位。酚羟基取代在 C-2' 可通过酚羟基氢 (H 10.90) 和 C-1' (C 119.4)、C-2' (C 158.4) 和 C-3' (C 116.3) 的 HMBC 相关得到确认。另外典型的苯环上质子信号 [H-5, H 7.16 s; H-8, H 6.79 s, H-3', H 6.90 (d) 7.6; H-4', H 7.31 (t) 7.6; H-5', H 6.85 (t) 7.6; H-6', H 7.71 (d) 7.6] 也可证实化合物 **1** 的 A 环为 6,7-位二取代, B 环为 2'-位单取代。

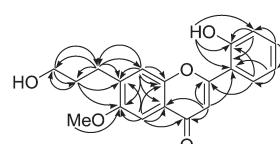


图 2 化合物 **1** 的主要 HMBC 相关

Fig. 2 Key HMBC correlations of compound **1**

综上所述, 化合物 **1** 的结构如图 2 所示, 经美国化学文摘 (CA) 数据库检索, 确定为新化合物, 命名为: 2'-羟基-7-(3-羟丙基)-6-甲氧基-黄酮。

表 1 化合物 **1** 的核磁共振数据 (500/125 MHz, 溶剂为 CDCl_3)

Table 1 ^1H and ^{13}C -NMR spectral data of compound **1** (500/125 MHz, CDCl_3)

No.	δ_{C}	δ_{H} (m, J, Hz)	No.	δ_{C}	δ_{H} (m, J, Hz)
2	162.9		2'	158.4	
3	106.5	6.64 s	3'	116.3	6.90 (d) 7.6
4	177.2		4'	131.5	7.31 (t) 7.6
5	113.9	7.16 s	5'	121.6	6.85 (t) 7.6
6	153.0		6'	128.7	7.71 (d) 7.6
7	130.5		1''	28.8	2.79 (t) 7.8
8	116.3	6.79 s	2''	37.6	1.90 m
9	149.3		3''	63.6	3.56 (t) 6.6
10	122.9		-OMe-8	56.3	3.84 s
1'	119.4		Ar-OH		10.90 s

3.2 体外抗菌活性

化合物**1**对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的MIC₉₀为34.8±3 μg/mL,对照药物左氧氟沙星的MIC₉₀为56±6 μg/mL,表明化合物**1**对受试菌株具有一定的抑制活性。化合物**1**和对照药物的抑菌效果见图3。



图3 化合物**1**的(SY-34)和对照左氧氟沙星(SY-33)的抑菌效果图

Fig. 3 The inhibitory effect of compound **1** (SY-34) and positive control levofloxacin (SY-33)

4 结论

本论文对蔷薇科山楂属植物山楂果实的化学成分进行研究。运用硅胶、凝胶、MCI-gel 树脂及 RP-HPLC 等多种色谱技术从山楂 70% 乙醇提取物中分离鉴定了一个羟丙基取代的黄酮类化合物,该结构类型的羟丙基取代黄酮类化合物为山楂属植物中首次发现。抗菌活性结果显示,化合物**1**对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用,可作为一种潜在的抗菌药物,值得进一步研究。

参考文献

- Wu ZY (吴征镒). *Flora reipublicae popularis sinicae*(中国植物志)[M]. Beijing:Science Press,1974:189.
 - He G(何钢),Wu RY(吴若炎),Zhao SD(赵思东),et al. Analysis and comparison of fruit quality of main varieties of Hawthorn[J]. *Non For Res*(经济林研究),1996,(4):36-37.
 - Qi CC(戚晨晨),Wang WX(王向未). Application and development status of hawthorn and hawthorn products in food industry[J]. *Ligh Industr Sci Tech*(轻工科技),2013,29(5):9-11.
 - Zhang RQ (张瑞巧),Liu SL (刘石磊),Sun ZD (孙智达),et al. Antioxidant activity and DNA damage preventing effect of procyanidin of hawthorn sarcocarp [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2008,20:131-133.
 - Zhang ZS (张泽生),Zhao CY (赵春艳),Xu Y (徐英),et al. Study on extraction procedure of proanthocyanidins from hawthorn fruit[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2007,19:127-130.
 - Lou LJ(楼陆军),Luo JX(罗洁霞),Gao Y(高云). Overview of chemical compositions and pharmacological action of grataegus pinnatifida bunge[J]. *Chin Pharma*(中国药业),2014,23(3):92-94.
 - Zhou M,Zhou K,He P,et al. Antiviral and cytotoxic isocoumarin derivatives from an endophytic fungus Aspergillus oryzae[J]. *Planta Med*,2016,82:414-417.
 - Tripoli E,Guardia M,Giammanco S,et al. Citrusflavonoids: Molecular structure, Biological activity and nutritional properties[J]. *Food Chem*,2007,104:466-479.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)[M]. Pennsylvania:Wayne,2008.
- nents in Tangshen Qingdu Granular by HPLC-DAD method [J]. *China Pharm* (中国药房),2017,28:816-820.
- Liu LL(刘利利),Liu YX(刘颖新),Mao QF(毛群芳),et al. Simultaneous determination of four effective components in herbal pair rhizome of Atractylodes lancea-Radix Scrophulariae by HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*,2016,36:81-85.
 - Jia CY(贾成友),Zhang CH(张传辉),Zhao FP(赵凤平),et al. Study on quality control method of *Radix scrophulariae* Pieces[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:1385-1390.

(上接第 943 页)

- Li ZD(李祚丹). Study on purification of iridoids from figwort[D]. Chongqing: Chongqing University (重庆大学), 2014.
- Liu WJ(刘文君),Meng ZQ(孟兆青),Sun L(孙林),et al. Stability of harpagoside in gastrointestinal contents of rats and analysis of its constituents absorbed in rat serum after oral administration[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志),2017,23(4):108-111.
- Shi ZR(石征蓉),Yang XQ(杨秀青),Gu JH(谷江华),et al. Simultaneous determination of the seven active compo-