

云南香料烟中 1 个新黄酮及其抗菌活性

吴玉萍^{1,2}, 李雪梅², 孔维松², 耿永勤², 刘欣², 杜刚³, 杨海英³, 李晶^{2*}, 胡秋芬^{1,3*}

1. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100

2. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650106

3. 云南民族大学民族药资源化学国家民委教育部重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 对云南香料烟的化学成分进行研究, 试图从中发现新活性化合物。方法 运用硅胶、凝胶及 RP-HPLC 等多种色谱技术进行分离纯化, 并根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构。结果 从云南香料烟中分离得到 2 个烷基取代的黄酮类化合物, 分别鉴定为 2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮 (1) 和烟草黄酮 A (2)。对化合物 1 和 2 进行了抗菌活性筛选, 其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 菌株的 MIC₉₀ 值分别为 (38±4) 和 (33±3) μg/mL。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为香料烟黄酮 A。化合物 2 首次从香料烟中分离到, 化合物 1 和 2 均具有显著的抗菌活性。

关键词: 香料烟; 黄酮; 香料烟黄酮 A; 烟草黄酮 A; 抗菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5238-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.003

A new flavone from leaves of *Nicotiana tabacum* and its antibacterial activity

WU Yu-ping^{1,2}, LI Xue-mei², KONG Wei-song², GENG Yong-qin², LIU Xin², DU Gang³, YANG Hai-ying³, LI Jing², HU Qiu-fen^{1,3}

1. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi 653100, China

2. Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650106, China

3. Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To find the new biological compounds, the research of the chemical constituents in the leaves of *Nicotiana tabacum* had been carried out. **Methods** The chemical constituents in the leaves of *N. tabacum* were isolated by silica gel, Sephadex LH-20 column chromatographies, and RP-HPLC methods. The structures of isolations were detected by using various spectroscopic techniques, including extensive 1D and 2D NMR techniques. **Results** Two C-alkylated flavones were isolated from 95% ethanol extract of plant, which identified as 2'-hydroxy-7-(3-hydroxypropyl)-8-methoxy-flavone (1) and tabaflavone A (2). Compounds 1 and 2 were evaluated for their anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) activity. **Conclusion** Compound 2 is isolated from the leaves of *N. tabacum* for the first time. Compound 1 is a new compound named orientalflavone A. Compounds 1 and 2 also show good anti-MRSA activity with MIC₉₀ value of (38±4) and (33±3) μg/mL, respectively.

Key words: *Nicotiana tabacum* L.; flavones; orientalflavone A; tabaflavone A; antimicrobial activity

烟草是世界上化学成分最为复杂的植物, 次生代谢产物非常丰富, 据 Rodgman 等^[1]的报道, 烟草、烟草代用品以及卷烟烟气中发现的化合物总数大约为 8 700 种。目前, 人们从烟草中鉴定出来的单体化学物质就超过 3 000 多种, 而且还有许多成分尚未鉴定出来。烟草除主要用于卷烟抽吸用途外, 也

是一种云南民间常用的药用植物, 具有消肿、解毒、抗菌、杀虫等功效, 主要用于疔疮肿毒、头癣、白癣、秃疮、毒蛇咬伤等症^[2]。从烟草中分离鉴定新的化学成分, 并从中发现有开发利用价值的先导性化合物也是近几年来植物活性研究热点。近期文献报道从烟草中发现的活性化合物有鞣质、苯丙素、萜类、

收稿日期: 2018-04-21

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

作者简介: 吴玉萍 (1997—), 女, 副研究员, 主要从事烟草化学研究工作。

*通信作者 胡秋芬, 女, 教授, 博士生导师。Tel: (086)68329045 E-mail: huqiufena@aliyun.com

色酮、黄酮等类型^[3-8]。

香料烟 *Nicotiana tabacum* L. 又称土耳其烟 (Turkish tobacco)、东方型烟 (oriental tobacco), 原产于地中海沿岸国家, 是红花烟草的一种特殊类型。由于香料烟具有浓郁芳香和纯净吃味的品质特点, 在烟草制品中有着特殊的应用价值^[9]。为了从烟草属植物中发现更多的活性化学成分, 开发烟草的非吸烟用途, 本实验对云南香料烟的化学成分进行了研究, 从中发现了 2 个烷基取代的黄酮类化合物, 分别鉴定为 2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮 [2'-hydroxy-7-(3-hydroxypropyl)-8-methoxy-flavone, **1**] 和烟草黄酮 A (tabaflavone A, **2**), 结构见图 1, 其中化合物 **1** 为新化合物, 命名为香料烟黄酮 A。化合物 **2** 为首次从香料烟中分离到。对化合物 **1** 和 **2** 进行了抗菌活性筛选, 其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 菌株的抑制 90% 细菌生长的最低药物浓度 (MIC₉₀) 分别为 (38±4) 和 (33±3) μg/mL。

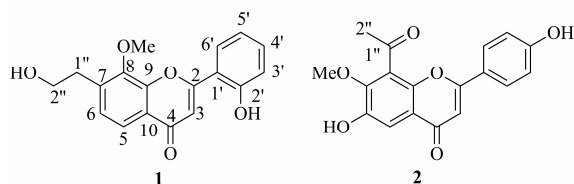


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的结构

Fig. 1 Structures of compounds **1** and **2**

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 核磁共振仪 (瑞士布鲁克公司); 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 Zorbax PrepHT GF (250 mm×21.2 mm, 7 μm)。

拌样硅胶 80~100 目, 柱色谱硅胶 200~300 目, GF₂₅₄ (100 mm×100 mm) 硅胶板, 均为青岛海洋化工厂生产; 反相填充材料 Rp₁₈ (40~63 μm), Merck 公司生产; MCI 填充材料为 MCI-gel CHP-20P (75~150 μm), 日本三菱公司生产; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶, 购于美国 GE 公司; 薄层色谱显色剂为 5% H₂SO₄-乙醇溶液; 三氯甲烷、甲醇、醋酸乙酯、石油醚为工业纯; 色谱纯乙腈为天津市瑞金特化学品有限公司生产; 超纯水为娃哈哈饮用纯净水。

香料烟样品 2016 年 9 月采集于云南保山, 品种为“云香巴斯玛 1 号”, 取成熟的香料烟全株晒干

供随后的提取和分离用。标本经云南民族大学民族医药学院杨青松教授鉴定为香料烟 *Nicotiana tabacum* L. 全株, 标本 (编号 2016124) 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 提取与分离

取干燥的香料烟样品 3.5 kg 粉碎到 30 目, 然后用 95% 乙醇水溶液提取 4 次, 每次溶剂用量为 4.5 L, 室温浸泡、超声 4 次 (每次 30 min), 滤过, 合并提取液, 提取物浓缩到小体积后用醋酸乙酯萃取, 将醋酸乙酯萃取部分用 MCI 脱色, 减压浓缩得浸膏 68.9 g。浸膏用 80 g 粗硅胶 (80~100 目) 拌样, 烘干, 用 500 g 硅胶 (200~300 目) 柱色谱, 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 (8:2) 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) 反相柱分离 (以 55% 的甲醇水溶液为流动相, 体积流量为 20 mL/min) 可得化合物粗品。粗品再以甲醇为流动相, 用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱净化得到纯品化合物 **1** (12.3 mg) 和 **2** (18.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色胶状物, HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 335.088 8 [M+Na]⁺ (计算值 C₁₈H₁₆NaO₅, 335.089 5), 结合 ¹H-NMR 和 DEPT 谱确定其分子式为 C₁₈H₁₆O₅, 不饱和度为 11。红外光谱中显示了羟基 (3 440 cm⁻¹)、羰基 (1 665 cm⁻¹) 和芳环 (1 612、1 553 和 1 420 cm⁻¹) 的共振吸收峰。而紫外光谱在 210、255、360 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 ¹³C-NMR 数据 (表 1) 显示其含有 18 个碳和 16 个氢, 包括 1 个 1,2,3,4-四取代的苯环 (C-5~C-10, H-5、H-6), 1 个 1,2-二取代的苯环 (C-1'~C-6', H-3'~6'), 1 个 α,β-不饱和羰基 (C-2、C-3、C-4, H-3), 1 个羟乙基 [δ_C 32.8 t, 63.2 t; δ_H 2.64 (t, J=7.2 Hz), 3.60 (t, J=7.2 Hz)], 1 个甲氧基 (δ_C 61.2 q, δ_H 3.83 s), 以及 1 个酚羟基 (δ_H 10.82)。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 **1** 为黄酮类化合物。根据 H-3 和 C-2、C-4、C-10、C-1', H-5 和 C-4、C-9、C-10, 以及 H-2', 6' 和 C-2 的 HMBC 相关 (图 2) 可进一步确认化合物 **1** 为黄酮类结构^[10]。化合物的母体确定后, 其余的取代基, 羟乙基、甲氧基和酚羟基可视为黄酮上的取代基。化合物的 HMBC 谱中可观察到甲氧基氢 (δ_H 3.83) 与 C-8 (δ_C

表 1 化合物 1 的核磁共振数据 (500/125 MHz, CDCl₃)Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of compound 1 (500/125 MHz, CDCl₃)

碳位	δ_C	δ_H	碳位	δ_C	δ_H
2	163.3 (s)		2'	158.5 (s)	
3	106.7 (d)	6.63 (s)	3'	116.1 (d)	6.92 (d, $J = 7.6$ Hz)
4	177.1 (s)		4'	131.3 (d)	7.31 (t, $J = 7.6$ Hz)
5	124.7 (d)	7.54 (d, $J = 8.2$ Hz)	5'	121.8 (d)	6.86 (t, $J = 7.6$ Hz)
6	126.4 (d)	6.76 (d, $J = 8.2$ Hz)	6'	128.5 (d)	7.72 (d, $J = 7.6$ Hz)
7	132.4 (s)		1''	32.8 (t)	2.64 (t, $J = 7.2$ Hz)
8	153.7 (s)		2''	63.2 (t)	3.60 (t, $J = 7.2$ Hz)
9	150.9 (s)		8-OMe	61.2 (q)	3.83 (s)
10	122.2 (s)		Ar-OH		10.82 (s)
1'	119.2 (s)				

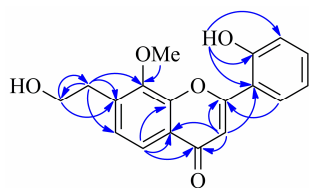


图 2 化合物 1 的主要 HMBC 相关 (↷)

Fig. 2 Key HMBC correlations (↷) of compound 1

153.7) 的 HMBC 相关, 可推测该甲氧基分别取代在 C-8 位; 根据 H-1'' (δ_H 2.64) 和 C-6 (δ_C 126.4)、C-7 (δ_C 132.4)、C-8 (δ_C 153.7), H-2'' (δ_H 3.60) 和 C-7 (δ_C 132.4), 以及 H-6 (δ_H 6.76) 和 C-1'' (δ_C 32.8) 的 HMBC 相关, 可证实羟乙基取代在 C-7 位; 酚羟基取代在 C-2' 可通过酚羟基氢 (δ_H 10.82) 和 C-1' (δ_C 119.2)、C-2' (δ_C 158.5) 和 C-3' (δ_C 116.1) 的 HMBC 相关得到确认。另外典型的苯环上质子信号 [H-5, δ_H 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz); H-6, δ_H 6.76 (d, $J = 8.2$ Hz); H-3', δ_H 6.92 (d, $J = 7.6$ Hz); H-4', δ_H 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz); H-5', δ_H 6.86 (t, $J = 7.6$ Hz); H-6', δ_H 7.72 (d, $J = 7.6$ Hz)] 也可证实该黄酮化合物的 A 环为 7,8 位二取代, B 环为 2' 位单取代。至此, 化合物的结构确定为 2'-羟基-7-(2-羟乙基)-8-甲氧基-黄酮, 命名为香料烟黄酮 A。

化合物 2: 黄色胶状物; 分子式 C₁₄H₁₀O₅; ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ : 6.54 (1H, s, H-3), 7.42 (1H, s, H-5), 7.74 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.65 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 2.50 (3H, s, H-2''), 3.85 (3H, s, 7-OMe), 11.18 (1H, s, Ar-6-OH), 10.58 (1H, s, Ar-4'-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ : 163.2 (s, C-2), 106.3 (d, C-3), 178.8 (s, C-4), 121.2 (d, C-5),

142.7 (s, C-6), 158.5 (s, C-7), 114.6 (s, C-8), 148.2 (s, C-9), 120.3 (s, C-10), 122.7 (s, C-1'), 130.8 (d, C-2', 6'), 116.6 (d, C-3', 5'), 157.6 (s, C-4'), 198.4 (s, C-1''), 29.3 (q, C-2''), 61.2 (q, 5-OMe)。通过其核磁共振数据和文献报道^[11]对比确定化合物 2 为烟草黄酮 A。

4 体外抗菌活性检测

受试菌株为云南省第一人民医院分离于临床标本的 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 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的微量肉汤稀释法进行药敏实验, 操作规范参照 CLSIM07-A9 标准, 判定标准参照 CLSIM100-S24 标准。

4.1 方法

4.1.1 抗菌药物贮备液制备 制备抗菌药物贮备液的质量浓度为 2.56 mg/mL, 溶解度低的抗菌药物可稍低于上述质量浓度。所需抗菌药物溶液量或粉剂量可根据公式进行计算。配制好的抗菌药物贮备液应贮存于 -20 °C 以下环境, 保存期不超过 6 个月。

4.1.2 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 MRSA 1×10^8 CFU/mL, 然后稀释 100 倍, 即得约含 1×10^6 CFU/mL 的菌液, 备用。

4.1.3 分组及测定 分别将抗菌药物贮备液母液 (2.56 mg/mL) 稀释 10 倍, 得到质量浓度为 256 μ g/mL 的抗菌药物溶液。取无菌的 96 孔板, 第 1 孔加入 200 μ L 的抗菌药物, 第 2~10 孔分别加入 100 μ L 的 MH 肉汤培养基, 从第 1 孔吸取 100 μ L

加入第 2 孔,混匀,再吸取 100 μL 至第 3 孔,依次类推,第 10 孔吸取 100 μL 弃去。此时各孔药物质量浓度依次为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$,第 11 孔加入 200 μL 抗菌药物溶液(阳性对照),第 12 孔加入 200 μL MH (B) 培养基(阴性对照)。

在 1~10 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 1~11 孔药物质量浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。将接种好的 96 孔板放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

在读取和报告所测试菌株的最小抑菌浓度(MIC)前,检查生长对照管的细菌生长情况是否良好,同时还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。

4.2 结果

测试结果表明,对化合物 1 和 2 对 MRSA 菌株的 MIC₉₀ 值分别为 (38 $\pm$ 4) 和 (33 $\pm$ 3) $\mu\text{g/mL}$,均具有显著的抗菌活性。其 MIC₉₀ 值小于阳性对照左氧氟沙星的 MIC₉₀ 值 [$\geq$ (56 $\pm$ 6) $\mu\text{g/mL}$]。

参考文献

- [1] Rodgman A, Perfetti T A. *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2012.
- [2] 田友清,丁平,张云庆.烟草药用研究概述 [J].中

国药业, 2015, 24(9): 126-128.

- [3] Shang S Z, Zhao W, Tang J G, *et al.* Antiviral sesquiterpenes from leaves of *Nicotiana tabacum* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 108(1): 1-4.
- [4] Shen Q P, Li L, Xu X M, *et al.* Phenylpropanoids from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. *Heterocycles*, 2015, 91(9): 1775-1780.
- [5] Shen Q, Xu X, Zhang F, *et al.* Two new benzolactones from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(13): 1464-1469.
- [6] Miao M M, Li L, Shen Q P, *et al.* Anti-TMV activity flavones from the leaves of Yunnan local air cured tobacco [J]. *Fitoterapia*, 2015, 103: 260-264.
- [7] Shang S Z, Duan Y X, Zhang X, *et al.* Phenolic amides from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 9(1): 148-187.
- [8] Yang G Y, Zhao W, Zhang T, *et al.* Chromone derivatives from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities [J]. *Heterocycles*, 2014, 89(1): 183-188.
- [9] 屈生彬,兰应海,李廷睦,等.保山香料烟可持续发展对策研究 [J].中国烟草科学, 2014, 35(5): 103-108.
- [10] Tripoli E, Guardia M, Giammanco S, *et al.* Citrusflavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties [J]. *Food Chem*, 2007, 104(2): 466-479.
- [11] Yuan L, Huang W Z, Zhang C M, *et al.* Antiviral flavones from the leaves of *Nicotiana tabacum* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 12(1): 75-78.