

迷迭香叶中三萜酸类成分及其抑菌活性分析

李茵芳, 王一旻, 袁干军^①, 李国华, 许雪杰, 宋晓媛

(江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

Analyses on triterpene acids components in leaves of *Rosmarinus officinalis* and their inhibitory activities LI Junfang, WANG Yimin, YUAN Ganjun^①, LI Guohua, XU Xuejie, SONG Xiaoyuan (College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(1): 115-117

Abstract: Triterpene acids components in leaves of *Rosmarinus officinalis* Linn. were separated and identified by HPLC, silica gel column chromatography and reversed-phase C₁₈ semi-preparative liquid chromatography method. And taking the minimum inhibitory concentration (MIC) as the index, the inhibitory activity of each compound was determined. The results show that 4 triterpene acids compounds are isolated from ethanol extracts of leaves of *R. officinalis*; according to the peak characteristics of reference substances, compound 2, 3 and 4 are identified as betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid, respectively; based on physicochemical constants and spectral data, compound 1 is identified as $\Delta^{20(30)}$ -ene-ursolic acid. Ursolic acid, $\Delta^{20(30)}$ -ene-ursolic acid and oleanolic acid have a certain inhibitory activity to Gram-positive strains (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), in which, the MIC value of ursolic acid to MRSA is 8.000-128.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and its inhibitory activity is the strongest; however, none of 4 compounds shows inhibitory activity to Gram-negative strain (*Escherichia coli* S002).

关键词: 迷迭香叶; 三萜酸类; $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸; 熊果酸; 最低抑菌浓度

Key words: leaves of *Rosmarinus officinalis* Linn.; triterpene acids; $\Delta^{20(30)}$ -ene-ursolic acid; ursolic acid; the minimum inhibitory concentration

中图分类号: Q946; R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)01-0115-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.01.14

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* Linn.) 隶属于唇形科 (Lamiaceae) 迷迭香属 (*Rosmarinus* Linn.), 为常绿灌木, 原产于沿地中海国家, 现广泛种植于世界各地。该植物主要含有萜酚类、酚酸类、黄酮类和三萜酸类成分^[1-2], 其中, 迷迭香叶中含有的熊果酸等三萜酸类成分具有显著的抗炎、抗菌和抗肿瘤等活性^[1,3-5], 但目前不同研究者从迷迭香叶中分离的三萜酸类成分存在差异, 如: Altinier 等^[2] 确定迷迭香叶中具有抗炎活性的三萜酸类成分为熊果酸、齐墩果酸、 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸和 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸甲酯; Martínez 等^[5] 确定迷迭香叶中具有镇痛活性的三萜酸类成分为熊果酸、齐墩果酸和 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸; 还有研究者^[3,6] 报道迷迭香叶含有熊果酸、齐墩果酸和白桦脂酸。

作者所在课题组发现迷迭香叶中鼠尾草酸具有显著的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 活性^[7], 鉴于新型抗多重耐药菌 (MDROs) 药物研发的迫切性, 为进一步明确迷迭香叶中三萜酸类成分及其抑菌活性, 作者对迷迭香叶乙醇提取

物中的三萜酸类成分进行了分离和鉴定, 并以 MRSA 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为指示菌, 对各成分的抑菌活性进行分析, 以期对迷迭香叶的药效研究和产业化开发等提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试迷迭香鲜叶采自江西农业大学迷迭香种植基地, 60 °C 鼓风干燥后粉碎成粗粉 2.7 kg, 备用。

主要仪器: Waters 2695 高效液相色谱仪和 Waters 1525EF 半制备液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AB Sciex TripleTOF™ 5600 高分辨率质谱仪 (美国 AB Sciex 公司)。

主要试剂: 熊果酸、齐墩果酸和白桦脂酸对照品购自海南舒普生物科技有限公司; 万古霉素 (纯度大于 98%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 左氧氟沙星 (纯度 97%) 购自

收稿日期: 2018-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260476; 81460529); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610410023)

作者简介: 李茵芳 (1995—), 女, 浙江丽水人, 硕士研究生, 主要从事中药及天然药物研发方面的研究。

^①通信作者 E-mail: sqlygj@126.com

美国 Ark Pharm 公司;MHA 固体培养基和 MHB 液体培养基购自青岛海博生物技术有限公司;甲醇和乙腈为色谱纯,水为去离子水,其余试剂均为分析纯;MRSA ATCC33592 菌株由美国典型培养物保藏中心提供,MRSA HK01、MRSA HK02、MRSA HK03 和 *E. coli* S002 菌株由海南省人民医院提供,其中,MRSA 为革兰氏阳性菌株,*E. coli* S002 为革兰氏阴性菌株。

1.2 方法

1.2.1 供试溶液制备和 HPLC 分析

1.2.1.1 样品溶液制备 称取样品粉末 1.0 g,分别用 30 和 20 mL 无水乙醇超声提取 2 次,每次 15 min,过滤,合并滤液,45 °C 减压浓缩;残渣用 1 000 μ L 甲醇超声溶解,0.45 μ m 有机相滤头压滤,滤液为样品溶液。

1.2.1.2 对照品溶液制备 精密称量熊果酸、齐墩果酸和白桦脂酸对照品 3.6、1.8 和 3.6 mg,分别用甲醇溶解并定容至 100 mL,再取 1.0 mL 用甲醇定容至 100 mL,得到熊果酸、齐墩果酸和白桦脂酸的对照品溶液,浓度分别为 0.36、0.18 和 0.36 μ g \cdot mL⁻¹。

1.2.1.3 HPLC 分析 分别将上述样品溶液和对照品溶液组合成以下供试溶液:a) V(熊果酸):V(齐墩果酸)=1:1 混合液;b) 白桦脂酸溶液;c) V(样品):V(熊果酸):V(齐墩果酸)=1:1:1 混合液;d) V(样品):V(白桦脂酸)=1:1 混合液;e) 样品溶液。对各供试溶液进行 HPLC 分析。

色谱条件:SinoChrom ODS-BP 反相色谱柱(4.5 mm \times 25 mm, 5 μ m),检测波长 210 nm;流动相为 V(乙腈):V(甲醇):V(质量体积分数 0.5% 乙酸铵水溶液)=67:12:21 的混合液,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;检测温度 25 °C,进样量 10 μ L。

1.2.2 单体制备及鉴定 称取样品粉末 1 000 g,分别用 8 000 和 6 400 mL 体积分数 95% 乙醇回流提取 2.0 和 1.5 h,过滤,合并滤液,45 °C 减压浓缩,干燥;然后依次用 1 500 和 1 200 mL 三氯甲烷回流提取 2 次,抽滤,合并滤液,40 °C 减压浓缩至约 100 mL。浓缩液用硅胶柱层析进行分离,先用 3 倍柱体积的三氯甲烷洗脱,然后用 V(三氯甲烷):V(乙酸乙酯)=1:1 混合溶剂洗脱,分段收集洗脱液;洗脱液重复硅胶柱层析,并结合反相 C₁₈ 半制备液相色谱,对各色谱峰对应的化合物进行单体制备,获得化合物 1、2、3 和 4,质量分别为 203、121、75 和 328 mg。测定化合物 1 的 NMR、HR-ESIMS(阴离子模式)和 UV 谱等,测定旋光度等理化常数,并参考文献[2,8]的波谱数据对化合物 1 进行鉴定;根据各化合物的 HPLC 色谱峰保留时间、对称性和峰高,并参考文献[4,6]对化合物 2、3 和 4 进行鉴定。

1.2.3 抑菌活性测定 用 MHA 固体培养基分别对 MRSA 和 *E. coli* S002 菌株进行活化,然后接种于 20 mL MHB 液体培养基中,并于 37 °C 条件下 160 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 24 h,稀释成 1 \times 10⁶ CFU \cdot mL⁻¹ 菌悬液,供试。

参照 CLIS 2012 标准,采用微量肉汤稀释法^[9],以万古霉素为阳性对照,在 96 孔细菌培养板上测定 4 个化合物对

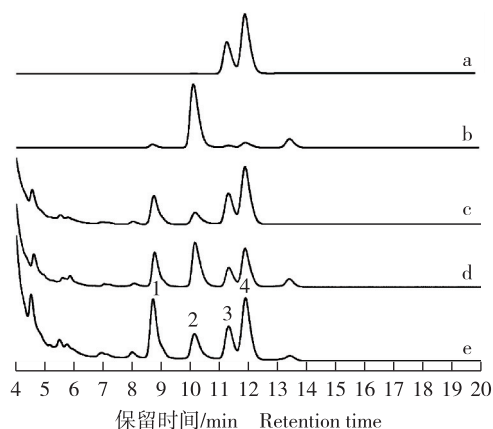
MRSA ATCC33592、MRSA HK01、MRSA HK02 和 MRSA HK03 菌株的最低抑菌浓度(MIC);以左氧氟沙星为阳性对照,同法测定 4 个化合物对 *E. coli* S002 菌株的 MIC 值。实验均设 3 次重复。

2 结果和分析

2.1 化合物鉴定结果

化合物 1:白色无定形粉末,易溶于甲醇和三氯甲烷;薄层析体积分数 10% 硫酸-乙醇溶液显红色。 $[\alpha]_D^{25} + 17.8^\circ$ ($c = 0.11$, CHCl₃); UV $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ nm(log ϵ): 205 nm; HR-ESIMS(m/z): 453.3374[M-H]⁻,结合¹³C-NMR 和¹H-NMR,确定其分子式为 C₃₀H₄₅O₃,相对分子质量 453。¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 79.0(C-3), 23.3(C-11), 126.3(C-12), 137.6(C-13), 48.0(C-17), 54.7(C-18), 37.3(C-19), 152.6(C-20), 179.4(C-28), 16.1(C-29), 105.3(C-30)。¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 3.22(1H, dd, H-3), 1.90/1.94(1H, dd, H-11), 5.30(1H, t, H-12), 2.29(1H, d, H-18), 2.35(1H, m, H-19), 2.22/2.27(2H, m, H-21), 4.64(1H, br. s, H-30), 4.70(1H, br. s, H-30)。参考文献[2,8]中 NMR 数据,鉴定化合物 1 为 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸。

化合物 2、3 和 4:化合物 2、3 和 4 对应的 HPLC 色谱峰保留时间分别为 10.12、11.30 和 11.88 min,根据对照品的色谱峰的保留时间、对称性和峰高(图 1),并结合文献[4,6],鉴定化合物 2、3 和 4 分别为白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸。



a: 熊果酸和齐墩果酸对照品 Reference substances of ursolic and oleanolic acids; b: 白桦脂酸对照品 Reference substance of betulinic acid; c: 样品及熊果酸和齐墩果酸对照品 Sample and reference substances of ursolic and oleanolic acids; d: 样品和白桦脂酸对照品 Sample and reference substance of betulinic acid; e: 样品 Sample. 1: $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸 $\Delta^{20(30)}$ -ene-ursolic acid; 2: 白桦脂酸 Betulinic acid; 3: 齐墩果酸 Oleanolic acid; 4: 熊果酸 Ursolic acid.

图 1 迷迭香叶中三萜酸类成分的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of triterpene acids components in leaves of *Rosmarinus officinalis* Linn.

2.2 抑菌活性测定结果

以 MRSA ATCC33592、MRSA HK01、MRSA HK02、MRSA HK03 和 *E. coli* S002 为指示菌株,以万古霉素和左氧氟沙星为阳性对照药,测定 4 个化合物的最低抑菌浓度(MIC)。结果(表 1)表明:熊果酸对 MRSA 菌株的抑菌活性最强,MIC 值为 8.000~128.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸和齐墩果酸

对 MRSA 菌株的抑菌活性依次减弱;白桦脂酸未显示出对 MRSA 的抑菌活性。此外,4 个化合物对不同 MRSA 菌株的 MIC 值存在差异,对 MRSA HK02 菌株的 MIC 值最小。4 个化合物均未显示出对 *E. coli* S002 菌株的抑菌活性。说明熊果酸、 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸和齐墩果酸是迷迭香叶中抑制 MRSA 的主要三萜酸类成分。

表 1 迷迭香叶中 4 个三萜酸类化合物的最低抑菌浓度

Table 1 The minimum inhibitory concentrations of four triterpene acids compounds in leaves of *Rosmarinus officinalis* Linn.

化合物 ¹⁾ Compound ¹⁾	对不同菌株的最低抑菌浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ ²⁾ Minimum inhibitory concentration to different strains ²⁾				
	MRSA ATCC33592	MRSA HK01	MRSA HK02	MRSA HK03	<i>E. coli</i> S002
1	512.000	128.000	32.000	>512.000	>512.000
2	>512.000	>512.000	>512.000	>512.000	>512.000
3	>512.000	512.000	64.000	>512.000	>512.000
4	128.000	64.000	8.000	128.000	>512.000
CK1	1.000	1.000	1.000	0.500	ND
CK2	ND	ND	ND	ND	0.016

¹⁾ 1: $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸 $\Delta^{20(30)}$ -ene-ursolic acid; 2: 白桦脂酸 Betulinic acid; 3: 齐墩果酸 Oleanolic acid; 4: 熊果酸 Ursolic acid; CK1: 万古霉素 Vancomycin; CK2: 左氧氟沙星 Levofloxacin.

²⁾ MRSA: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ND: 未测定 Not determined.

3 讨论和结论

近年来,对迷迭香叶成分的药理作用研究扩展至抗氧化、抗阿尔茨海默病和抗肿瘤等方面,其药用价值更加明确,但不同研究者获得的迷迭香叶三萜酸类成分却存在差异^[3,5-6],可能与研究方法及供试材料的产地、品种和生长状况的差异有关。作者参照前人研究结果,依据 HPLC 色谱峰定位、理化性质和详细的波谱数据等,从迷迭香叶乙醇提取物中分离鉴定出 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸、白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸。

迷迭香叶中上述 4 个三萜酸类化合物对革兰氏阴性菌(*E. coli* S002 菌株)均未显示出抑菌活性;熊果酸、 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸和齐墩果酸对革兰氏阳性菌(MRSA 菌株)均具有一定的抑菌活性,其中熊果酸的抑菌活性最强,这与 Fontanay 等^[4]的研究结果类似,仅对不同菌株的 MIC 值有一定差异,原因是后者使用的金黄色葡萄球菌大多为敏感菌株,而本研究使用的是耐药菌株。由于 4 个化合物的化学结构相似,尤其是 $\Delta^{20(30)}$ -烯-熊果酸、齐墩果酸和熊果酸的结构极为相似,而其抑菌活性却存在较大差异,因此,有关迷迭香叶抗 MRSA 的作用机制和三萜酸类成分的构效关系有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] BORRÁS-LINARES I, STOJANOVIĆ Z, QUIRANTES-PINÉ R, et al. *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014,

- 15: 20585-20606.
- [2] ALTINIER G, SOSA S, AQUINO R P, et al. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 1718-1723.
- [3] ABE F, YAMAUCHI T, NAGAO T, et al. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25: 1485-1487.
- [4] FONTANAY S, GRARE M, MAYER J, et al. Ursolic, oleanolic and betulinic acids; antibacterial spectra and selectivity indexes[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 120: 272-276.
- [5] MARTÍNEZ A L, GONZÁLEZ-TRUJANO M E, CHÁVEZ M, et al. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 142: 28-34.
- [6] MOLDOVEANU S C, SCOTT W A. Analysis of four pentacyclic triterpenoid acids in several bioactive botanicals with gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39: 324-332.
- [7] 袁干军, 李沛波, 杨 慧. 迷迭香中鼠尾草酸的抗 MRSA 活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(7): 571-574.
- [8] MIYAICHI Y, ISHII K, KUNO T, et al. Studies on the constituents of *Scutellaria* species XX constituents of roots of *Scutellaria strigillosa* Hemsl. [J]. Natural Medicines, 1999, 53: 237-241.
- [9] 吴雪娇, 徐 莉, 李沛波, 等. 阿扎霉素 F 衍生物及联合维生素 K₃ 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(8): 584-589.

(责任编辑: 郭严冬)