

文章编号: 0490-6756(2006)04-0913-05

东紫苏根中抑菌活性成分的研究

胡浩斌^{1,*}, 王鑫², 刘建新², 曹宏³, 简毓峰³

(1. 陇东学院化学系, 甘肃庆阳 745000; 2. 陇东学院生命科学系, 甘肃庆阳 745000;

3. 陇东学院农学系, 甘肃庆阳 745000)

摘要: 采用生物活性跟踪法从东紫苏根中分离出 3 个具有广谱抑菌活性的物质, 通过波谱分析与文献值比较, 分别鉴定为卢氏冬凌草素 5 (I)、槲皮素 (II) 和木犀草素 (III), 其中化合物 I 为首次从该属植物中分离得到。抑菌试验表明: 3 个化合物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等有不同程度的抑菌和杀菌作用。

关键词: 东紫苏; 抑菌活性; 槲皮素; 木犀草素; 卢氏冬凌草素 5

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

东紫苏 (*Elsholtzia bodinieri* Vaniot), 为唇形科多年生草本植物, 又名“凤尾茶”。主要分布于甘、黔、蜀和滇等西部地区的山坡、路旁草丛中或灌木林下^[1]。全草可入药, 具有发散解表, 理气和胃之功效, 主要用来治外感风寒、头身痛、咽喉痛、消化不良和肝炎等症^[2]。国内对东紫苏的研究主要集中在挥发油的化学成分、药材性状及理化性质等方面^[3-6], 而对其植化成分的研究较少。目前, 药物化学工作者将筛选活性好的天然化合物作为先导化合物或模板, 通过分子结构修饰或改造, 并进行构效关系研究, 最终合成安全、有效的一类高活性药物, 已成为开发新药的有效途径之一。笔者研究发现东紫苏根的粗提物对多种病原菌具有良好的抑制作用, 并首次采用活性跟踪法分离和各种波谱数据鉴定了其中的 3 个抑菌活性成分 CFA₃₂、EFA₄₂和 EFA₄₃。本文报道对这 3 个化合物的分离、结构鉴定及抑菌作用的研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

8100 型显微熔点测定仪 (北京科仪电光仪器厂, 温度未校正), AVATAR-360FT 红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司, KBr 压片法), HP5989A 质谱仪 (美国惠普公司), VARIAN INOVA-400 型核磁共振仪 (美国 Varian 公司, TMS 为内标), 721 分光光度计 (上海第三分析仪器厂), R-201 型旋转蒸发仪 (上海申胜生物技术有限公司), Sephadex LH-20 (瑞士 Pharmacia 公司), 柱层析、薄层色谱用硅胶 G 和 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂)。所用试剂均为分析纯。

东紫苏全草于 04 年 7 月采自甘肃子午岭, 经西北师范大学生命科学学院廉永善教授鉴定。样品阴干, 取其根部粉碎过 40 目筛备用。

供试菌种: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 白色念珠菌 (*Candida albicans*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 均由本院生命科学系微生物实验室提供。

培养基: 细菌培养基 (牛肉膏蛋白胨培养基), 霉菌培养基 (马铃薯葡萄糖培养基)。

收稿日期: 2005-11-22

基金项目: 陇东学院科研资助项目 (XYZK0503); 甘肃省十五科技攻关项目 (ZGS035-A43-070)

(C) 2006 China Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 方法

1.2.1 提取和分离 采用圆形滤纸片($\Phi=6\text{mm}$)跟踪法测试分离过程中不同分离段提取物的抑菌活性,每次均选取活性相对较高组分进行下一步分离工作.对各种提取物抑菌活性的分析是以相对应的溶剂为对照,用抑菌圈直径的大小来表示(测量值-对照值).

分离过程如下:称取东紫苏根粉(5kg),用95%乙醇渗漏提取,减压蒸馏浓缩得乙醇浸膏(EE, 265g).加水悬浮后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别浓缩得4部分萃取浸膏.取对大肠杆菌抑制活性较高的氯仿浸膏(CF, 64g)进行硅胶柱层析,用石油醚-氯仿(5:3~1:5, v/v, 下同)、氯仿-丙酮(9:1~1:1)梯度洗脱,经TLC检测合并,分别得到CFA₁、CFA₂、CFA₃和CFA₄组分.取活性较高的CFA₃经二次硅胶柱层析,以氯仿-丙酮(5:1~2:1)梯度洗脱、纯化结晶得到无色片状晶体CFA₃₂(I, 9 mg).将对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较强抑菌活性的乙酸乙酯浸膏(EF, 75g)进行硅胶柱层析,依次用氯仿、氯仿-丙酮(7:3~1:5)、氯仿-甲醇(9:1~1:10)和甲醇洗脱,经TLC检测合并,得到EFA₁、EFA₂、EFA₃、EFA₄和EFA₅组分.取活性较高的EFA₄上Sephadex LH-20凝胶柱,用氯仿-丙酮(4:1~1:4)和氯仿-甲醇(10:1~1:10)梯度洗脱,用TLC检测、合并相同组分,并减压蒸除溶剂,分别得到EFA₄₁、EFA₄₂、EFA₄₃和EFA₄₄组分,对EFA₄₂再经制备薄层(苯-乙酸乙酯-甲酸=50:40:8)纯化、重结晶得黄色晶体EFA₄₂(III, 18 mg).另一活性较高的EFA₄₃,以甲醇为洗脱剂,用Sephadex LH-20凝胶柱纯化,得到黄色晶体EFA₄₃(II, 11 mg).

1.2.2 供试菌株的制备 a) 在无菌室中将供试菌种接入相应的试管斜面培养基上,每种接多支重复,置恒温培养箱内培养(细菌37℃, 24h;霉菌28℃, 48h), 0~4℃冷藏备用; b) 分别用接种环挑取少许菌体于装有9mL 无菌水的试管内,振荡均匀,制成菌悬浮液.霉菌用血球计数板计数,细菌用比浊法计数.调整菌悬浮液的浓度,使其含菌体为 $10^6\sim10^7$ 个/mL,即得供试菌株悬浮液.

1.2.3 最低抑菌浓度 MIC 的测定 采用2倍稀释法^[7],将提取物配制成不同浓度的系列溶液.以一系列无菌液作空白对照,进行比色测定,二者OD值相同即培养基中没有细菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度(MIC).

1.2.4 最低杀菌浓度 MBC 的测定 将上述MIC各菌药混合液继续培养24h,观察生长情况.将接种系列和空白系列进行比色测定,二者OD值相同即培养基中没有细菌生长的最低浓度为最低杀菌浓度(MBC)^[7].

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物I 无色片状晶体(丙酮), mp. 264~266℃, 易溶于乙酸乙酯、丙酮中;由HREI-MS m/z : 360.1564 (calc. 360.1573) 确定分子式为C₂₀H₂₄O₆, 不饱和度为9;其¹³C-NMR及DEPT谱显示有20个碳信号,其中有1个甲基,8个亚甲基(包括一个烯碳),5个次甲基(包括2个连氧的叔碳),6个季碳(包括2个羰基碳和一个烯碳);IR $\nu_{\max}$ (KBr): 3498(羟基), 1764, 1741(酯基), 1694, 1642(共轭羰基) cm⁻¹; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH): 233nm. 综合以上信息并结合¹H-NMR数据,可推断此化合物具有螺断贝壳杉烯型二萜类的结构^[8]. EI-MS m/z : 360 [M]⁺, 342 [M-H₂O]⁺, 332 [M-CO]⁺, 314 [M-H₂O-CO]⁺, 299 [M-H₂O-CO-CH₃]⁺, 289 [M-H₂O-2CO]⁺, 270 [M-H₂O-3CO-H]⁺, 256, 233, 222, 211, 201, 105; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ _H: 7.08 (1H, *d*, *J*=2.8 Hz, HO-11, D₂O 交换后消失), 5.58 (1H, *s*, H-17a), 6.18 (1H, *s*, H-17b), 1.05 (3H, *s*, H-18), 3.59 (1H, *d*, *J*=10.0 Hz, H-19a), 3.75 (1H, *d*, *J*=10.0 Hz, H-19b), 5.18 (1H, *d*, *J*=14.0 Hz, H-20a), 5.25 (1H, *d*, *J*=14.0 Hz, H-20b), 3.19 (1H, *d*, *J*=12.0 Hz, H-14a), 2.18 (1H, *dd*, *J*=12.0, 4.0 Hz, H-14b), 3.17 (1H, *dd*, *J*=8.0, 4.0 Hz, H-13), 2.26 (1H, *dd*, *J*=14.0, 9.0 Hz, H-12a), 1.69 (1H, *d*, *J*=14.0, 4.0 Hz, H-12b), 4.22 (1H,

(AlCl₃/HCl): 265sh, 276, 295sh, 356, 385nm; λ_{max}(NaOAc): 268, 325, 383nm; λ_{max}(NaOAc/H₃BO₃): 260, 302sh, 371, 430 nm], 推测有典型的黄酮结构; EI-MS *m/z*: 286 [M]⁺(45), 285 (100); 结合 MS. H 及 ¹³C-NMR(DEPT) 数据推知分子式为 C₁₅H₁₀O₆, 不饱和度为 11. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ_H: 13.0 (1H, *s*, HO-5), 10.8 (1H, *s*, HO-7), 9.90 (1H, *s*, HO-4'), 9.38 (1H, *s*, HO-3'), 7.40 (1H, *dd*, *J*=8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.38 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.88 (1H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.59 (1H, *s*, H-3), 6.43 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ_C: 164.5 (C-2), 103.9 (C-3), 182.1(C-4), 162.0 (C-5), 99.1 (C-6), 164.8 (C-7), 94.3(C-8), 159.6 (C-9), 103.9 (C-10), 121.8 (C-1'), 114.5 (C-2'), 146.6 (C-3'), 150.7 (C-4'), 116.5 (C-5'), 119.8 (C-6'). 其¹H 和 ¹³C-NMR 数据与木犀草素^[11]一致.

2.2 抑菌活性

东紫苏根各提取物的体外抑菌试验结果见表 1.

表 1 各提取物的抑菌活性*								
Tab.1 Antimicrobial activity of the extract of <i>E. bodinieri</i> V.								
供试菌	EE	CF	CFA ₃	CFA ₃₂	EF	EFA ₄	EFA ₄₂	EFA ₄₃
大肠杆菌	0.81±0.01	2.86±0.02	3.59±0.05	4.57±0.03	—	—	—	—
金黄色葡萄球菌	1.83±0.02	0.90±0.02	0.96±0.03	3.95±0.03	2.38±0.02	2.96±0.03	3.59±0.03	1.94±0.04
枯草芽孢杆菌	0.76±0.03	0.67±0.03	0.81±0.02	0.96±0.02	2.14±0.03	2.37±0.03	2.79±0.02	0.92±0.04
白色念珠菌	0.51±0.02	—	—	—	0.61±0.04	0.72±0.04	0.74±0.03	0.85±0.03
黑曲霉	0.65±0.04	0.79±0.03	0.86±0.03	0.89±0.03	—	—	—	—

*"—"表示无明显抑菌环,判定为无抑菌作用;标注数据的是抑菌环直径(mm)

从东紫苏根中分离得到的活性成分对供试菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)测定结果见表 2.

表 2 化合物的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)						
Tab.2 The values of minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) of the pure isolated compounds from <i>E. bodinieri</i> V.(μg·mL ⁻¹)						
供试菌	CFA ₃₂		EFA ₄₂		EFA ₄₃	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	5	10	NE	NE	NE	NE
金黄色葡萄球菌(<i>S. aureus</i>)	30	50	40	50	60	80
枯草芽孢杆菌(<i>B. subtilis</i>)	80	100	70	80	90	> 100
白色念珠菌(<i>C. albicans</i>)	NE	NE	100	> 100	100	> 100
黑曲霉(<i>A. niger</i>)	100	> 100	NE	NE	NE	NE

由表 1 和 2 可知,东紫苏根的乙醇提取物无论是对供试菌中的革兰氏阳性菌,还是革兰氏阴性菌,无论是球菌,还是杆菌均表现出良好的抑菌活性,说明它的抗菌谱较宽.而乙醇提取物用氯仿和乙酸乙酯分别提取后,不溶解部分均无活性;而氯仿溶解部分对大肠杆菌有较好的抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的抑菌效果次之,而对白色念珠菌无活性;乙酸乙酯溶解部分则对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较好的抑菌活性,对白色念珠菌的抑菌效果次之,对大肠杆菌和黑曲霉均无活性.但从氯仿和乙酸乙酯的提取物中分离得到的卢氏冬凌草素 5、木犀草素及槲皮素 3 种成分,在中性至碱性条件下(pH 5.0~8.5),对细菌有不同的抑制活性,如卢氏冬凌草素 5 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有较好的抑制和杀菌作用,MIC 和 MBC 分别为 5, 30 和 10, 50×10⁻⁶g·mL⁻¹,对枯草芽孢杆菌和黑曲霉的效果次之,MIC 和 MBC 分别为 80, 100 和 100, 大于 100×10⁻⁶g·mL⁻¹,而对白色念珠菌无活性;木犀草素对金

黄色葡萄球菌、枯草杆菌有较好的抑制和杀菌效果, MIC 和 MBC 分别为 40, 70 和 50, $80 \times 10^{-6} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对白色念珠菌的效果次之. MIC 和 MBC 分别为 100 和大于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对大肠杆菌和黑曲霉均无活性; 槲皮素对供试细菌的抑制和杀菌活性与木犀草素相似, 但均比木犀草素弱一些, 如对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 60 和 $80 \times 10^{-6} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的 MIC 分别为 90, $100 \times 10^{-6} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, MBC 均大于 $100 \times 10^{-6} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而对大肠杆菌和黑曲霉均无活性.

3 讨论

生物体内常常存在具有相同或相似生物活性的分子群, 各活性分子的结构之间也常存在相似之处, 它们可单独或协同表现出某一生物活性, 但不同活性成分的含量常常差异较大, 人们一般最先发现的常常是那些具有绝对含量优势或活性优势的活性成分. 根据本研究结果, 我们可以推测东紫苏的氯仿和乙酸乙酯粗提物主要以黄酮类和萜类化合物为主, 这和邹海舰等^[3]的初试结果是一样的, 而且槲皮素、木犀草素和卢氏冬凌草素 5 等成分可能就是东紫苏的主要抑菌活性成分, 这些活性物质可能与该植物的抗菌、消炎等药效有着直接的关系. 据文献报道^[3-6], 东紫苏全草不但含有大量的挥发油, 而且其根部含丰富的萜类物质, 种子又具有丰富的营养成分, 因而在食品、医药等领域具有很大的开发潜力, 值得进一步研究.

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [3] 邹海舰, 唐自明, 韦群辉, 等. 凤尾茶的生药研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1999, 41(6): 359.
- [4] 程伟贤, 古昆, 李聪, 等. 云南凤尾茶精油成分分析[J]. 云南民族大学学报, 2004, 13(2): 86.
- [5] 胡浩斌, 简毓峰. 子午岭东紫苏种子的化学成分[J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2004, 3(4): 35.
- [6] 胡浩斌, 简毓峰, 刘建新, 等. 东紫苏根中萜类化合物的分析[J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2005, 4(2): 74.
- [7] 马慕英. 大蒜抗真菌作用研究[J]. 食品科学, 1993, 14(1): 7.
- [8] 郑新荣, 高增义, 孙汉董, 等. 卢氏冬凌草素的结构[J]. 云南植物研究, 1984, 8(3): 316.
- [9] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册(第七分册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [10] Zong Y Y, Che C T. Guucosides from *Lagotis breviflora* [J]. Planta Med, 1995, 61(6): 585.
- [11] Markham K R, Ternai B, Stanley R, et al. Carbon 13 NMR studies of flavonoids- III, naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives[J]. Tetrahedron, 1978, 34(8): 1389.

Study on the Antifungal Components in the Root of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot

HU Hao-bin¹, WANG Xin², LIU Jian-xin², CAO Hong³, JIAN Yu-feng³

(1. Department of Chemistry, Longdong University, Gansu Qingyang 745000, China;

2. Department of Life science, Longdong University, Gansu Qingyang 745000, China;

3. Department of Agronomy, Longdong University, Gansu Qingyang 745000, China)

Abstract: Three antimicrobial active components were isolated from the root of *Elsholtzia bodinieri* V. by bioactivity guided method. On the basis of spectral analysis and comparison with literature, their structures were identified as ludongnin 5 (I), quercetin (II) and luteolin (III), respectively. Among them, compound I was obtained from *Elsholtzia* genus for the first time. The antimicrobial experiments indicated that compounds I ~ III showed the inhibitory and bactericidal activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in varying degrees. The scientific foundations were provided more further to exploit and utilize this plant by the studying.

Key words: *Elsholtzia bodinieri* V.; antimicrobial activity; quercetin; luteolin; ludongnins