

枫杨的抗菌活性成分

潘为高, 李汉浠, 罗彭*, 李兵, 卢汝梅, 盘涌
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 从枫杨树皮中寻找抗菌活性成分, 揭示其抗菌作用的物质基础及发现新抗菌素。方法: 生物活性跟踪法; 体外抗菌为检测指标; 萃取、沉淀、硅胶吸附柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱的为分离手段; EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 DEPT 为结构鉴定手段。结果: 筛选到一个对卡拉双球菌、白色念球菌、小麦赤霉、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、棉花球菌、放线菌等有显著拮抗作用的单体, 结构鉴定为 5-羟基-2-乙氧基-1, 4-萘醌。结论: 该活性单体与已知抗菌物质胡桃醌仅有一个 2-乙氧基的区别, 揭示此类结构母核具有抗菌开发价值。本研究明确了枫杨抗菌作用的物质基础, 也为枫杨药材质量控制和研发枫杨活性部位抗菌外用药奠定了基础。

[关键词] 枫杨; 抗菌活性; 生物活性跟踪法; 分离纯化; NMR; EI-MS; 萘醌

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0082-03

Study on Antibacterial Activity Constituent from *Pterocarya stenoptera*

PAN Wei-gao, LI Han-xi, LUO Peng*, LI Bing, LU Ru-mei, PAN Yong
(Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China)

[Abstract] The purpose was to screen antibacterial constituent from the barks of *Pterocarya stenoptera*, which was a Chinese traditional drug often used to treat bacterial and fungous skin diseases for hundreds of years. Through extraction, precipitation, silica gel column adsorption chromatography, Sephadex LH-20 gel chromatography using a bioassay-guided fractionation technique (An antibacterial experiment in vitro was used as the screening technique), a red needlelike liposoluble compound with excellent antibacterial activity to *Diplococcus cata*, *Streptococcus albus*, *Gibberella saubinetii*, *Salmonella sp.*, *Bacillus subtilis*, and so on, was isolated from the barks of *P. stenoptera*. The compound was identified as 2-ethoxy-5-hydroxynaphthalene-1, 4-dione (C₁₂H₁₀O₄, M=218) by EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and DEPT. The structure of another antibacterial compound, juglone (Azadbakht M, 2005), is very similar to 2-ethoxy-5-hydroxynaphthalene-1, 4-dione except for a 2-ethoxy, which suggest that this kind of chemical structure may has potential value for development and application of new antibacterial compound. The results in this paper had not only revealed the antibacterial activity substance of of *P. stenoptera*, but also laid the foundation for the study of quality standard of *P. stenoptera* and antibacterial active section for externally used.

[Key words] *Pterocarya stenoptera*; antibacterial activity; bioassay-guided fractionation technique; isolation and purification; NMR; EI-MS; naphthoquinone

枫杨 *Pterocarya stenoptera* C. DC. 为胡桃科

(Juglandaceae) 枫杨属 *Pterocarya* 植物^[1], 原产于我国, 生长繁殖迅速, 资源分布广泛。枫杨在抗肿瘤^[2-3]、抗病毒^[4]、杀灭钉螺^[5-6]等方面具有一定的药用价值; 但其更为重要的价值, 是在民间传统上用于治疗各类真菌性皮肤病和细菌性脓、疮, 此用药习惯在古籍、古方及当代中药书籍中均有大量记载, 用法是将树皮、树叶捣碎用于治疗疥癣^[1, 7]、脚癣^[8]、头

[收稿日期] 20100907(004)

[基金项目] 广西壮族自治区教育厅面上项目(200810MS039)

[第一作者] 潘为高, 博士, 副教授, 从事天然活性成分研究,
E-mail: 81706672@qq.com

[通讯作者] * 罗彭, 硕士, 讲师, 从事民族药研究, Tel: 0771-3134025, E-mail: agao81706672@163.com

癣和其他病菌性疾病^[9-10]。张兴悦等^[11]证实枫杨乙醇或丙酮提取液有抑菌作用,但并未对其中的抗菌活性成分进行研究;目前国内外尚无枫杨抗菌药理及抗菌活性成分的报道。本研究拟通过生物活性跟踪法,探明枫杨抗菌作用的物质基础,寻找新的抗菌素,同时为研制抗菌活性部位药及控制药材质量奠定基础。

1 材料

1.1 药材 枫杨树皮采集于广西桂林兴安县五里峡坝区,在阴凉处自然风干。

1.2 药品及菌种 30~60 沸程石油醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、丙酮均由上海有机化工试剂研究所生产;薄层硅胶 H(60 型)购于青岛海洋化工集团公司;10 cm × 20 cm 硅胶 G 板为武安市诚朋科技开发有限公司产品;Sephadex LH-20 葡聚糖为瑞士安玛西亚产品。

卡拉双球菌 *Diplococcus cata*、白色念球菌 *Streptococcus albus*、小麦赤霉 *Gibberella saubinetii*、沙门氏菌 *Salmonella sp.*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 等菌种由四川大学生命科学学院微生物研究室提供。

1.3 仪器 DZF-2001 真空干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂);RE-3000B 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);100~1 000 μL 量程及 10~100 μL 量程移液枪(eppendorf);HD-650 超净台(吴江市伟峰净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 抗菌活性的测定方法

2.1.1 肉汤琼脂培养基的配制 蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,牛肉浸膏 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,加热融化后滤过,调 pH 7.4~7.6,0.15 MPa 灭菌 20 min,待用(实验中,细菌、真菌在此培养基上均能很好生长)。

2.1.2 药物配制 药品用灭菌注射用水配制,用少量灭菌吐温-20 助溶,所有药物均配成统一浓度 10 g·L⁻¹(1.0%)。

2.2.3 琼脂平板打孔法测定抗菌活性(一菌多药,定性测定) 在无菌平皿内加入熔化的肉汤琼脂培养基,使其厚度约为 0.5 cm,待其冷却凝固后作为底层;再取熔化的肉汤琼脂培养基,冷至 50 左右,铺在底层之上,使其厚度约为 0.5 cm,冷却凝固后作为上层。用推平板接种法,将供试验菌液均匀地涂布于琼脂平板的表面。用灭菌不锈钢打孔器在已涂布

菌液的琼脂平板上打孔,孔的直径为 0.5 cm,只打穿上层琼脂,不损伤底层琼脂,各孔均匀分布,间距约为 2 cm。用移液器分别吸取各药液约 90 μL 加于各琼脂孔内(枪头灭菌,一药一枪头)。于 37 培养 18~24 h,观察孔周围有无抑菌圈,通过抑菌圈的大小比较各药物的抗菌效力。

2.2 抗菌活性成分的分离纯化 干燥粉碎的枫杨树皮粉 1 017.0 g 用 10 倍量的 90% 乙醇于 60 水浴下进行温浸搅拌提取,连续提取 3 次,合并滤液,旋蒸浓缩(60)得无醇味的含水母液(经折算,其中干膏为 159.6 g,得率为 15.7%)。取部分含水母液浓缩得干膏 23.4 g;其余含水母液(折算含干膏 136.2 g)待用。90% 乙醇提取后的药材残渣,用 10 倍量水于 60 水浴下进行温浸搅拌提取,连续提取 3 次,合并滤液,旋蒸浓缩,得干膏 102.8 g,得率 10.1%。

将 90% 乙醇提取物()、水提取物() 分别进行抗菌实验。结果发现水提取物() 对各菌无明显抑制作用;而 90% 乙醇提取物() 对卡拉双球菌、白色念球菌、小麦赤霉、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、棉花球菌、放线菌、鞭毛菌、苏云杆菌、姜瘟菌、玉米弯孢菌、玉米大斑菌、墨入菌均具有不同程度的抑制作用,其中对卡拉双球菌、小麦赤霉的抑制作用最为强烈。故而后续抗菌活性成分的分离纯化起始部位采用 90% 乙醇提取物(),选用抗菌效果最为显著的卡拉双球菌(细菌)、小麦赤霉(真菌)作为筛选活性成分的实验用菌。

往待用含水母液(,折算含干膏 136.2 g) 中加入少量水,用氯仿萃取,分别将上下层浓缩成干膏,水层的物质() 占大量(未定量),氯仿层萃取物() 的占少量。抗菌实验发现,水层物质() 无抗菌活性,氯仿层物质() 有明显抗菌活性。

部位 用热无水乙醇配制成溶液,加入 10 倍量 30~60 沸程的石油醚,离心,分为上下层。上层物质浓缩成膏状(,占少量)后,经测试,具有显著的抗菌活性;下层为大量黑色黏性物质(),无抗菌活性。

部位 用丙酮溶解,离心。离心后的溶液浓缩成膏状物(),经测试,具有显著抗菌活性;析出的晶状物() 无抗菌活性。

部位 用丙酮溶解,加入 10 倍量 30~60 沸程的石油醚,分为上下层。上层物质() 浓缩成膏

状, 经测试具有显著的抗菌活性。

部位 量已较少, 直接上硅胶小柱, 填充料为薄层硅胶 H, 柱内径 2 cm, 高 30 cm, N₂ 加压, 用 30 ~ 60 沸程石油醚-乙酸乙酯体系梯度洗脱, 得到几个混合段和几个晶体。分别进行活性测定, 其中一个红色针状晶体具有显著的抗菌活性, 而其他物质均无抗菌活性。对红色针状晶体进行硅胶 TLC 检测, 发现有杂斑。用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶色谱柱对红色针状晶体进行除杂, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到高纯度的红色针状晶体 A。

2.3 抗菌活性物质的结构鉴定 化合物 A 易溶于乙酸乙酯、丙酮、氯仿、甲醇, 不溶于水。EI-MS 在 Finnigan Trace DSQ 四级杆质谱仪上进行, 电离方式 EI⁺, 电子能量 70 eV, 扫描范围 m/z 50 ~ 1 000。¹H-NMR、¹³C-NMR 和 DEPT 谱在瑞士 Bruker Drx-500 MHz 核磁仪上行。¹H-NMR 测试频率为 500 MHz, ¹³C-NMR 和 DEPT 测试频率为 125.74 MHz, 测定溶剂均为 CDCl₃, 测试温度均为常温 20 。

3 结果与讨论

EI-MS (m/z) 218 (M⁺), 203 [M-CH₃]⁺, 199 [M-CH₂CH₃]⁺, 190, 173, 162, 134, 121, 120, 105, 93, 77, 69, 63, 53, 51。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 与 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 数据见表 1。

表 1 化合物 A 的 ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 数据 (500 MHz, CDCl₃)

Position	¹³ C-NMR c	DEPT	¹ H-NMR	
			H	J/Hz
1	179.4	C		
2	160.4	C		
3	109.7	CH	6.07	s
4	190.9	C		
5	161.0	C		
6	125.0	CH	7.26	8.70, d
7	135.4	CH	7.56	8.15, 7.70, t
8	119.5	CH	7.65	7.50, d
9	131.1	C		
10	114.1	C		
11	65.6	CH ₂	4.12	7.02, q
12	13.8	CH ₃	1.53	7.03, t

解析鉴定化合物 A 为 5-羟基-2-乙氧基-1,4-萘醌 (2-ethoxy-5-hydroxynaphthalene-1,4-dione, C₁₂H₁₀O₄, M=218), 结构式见图 1。参照文献 [2, 12], 可知化合物 A 为已知化合物, 但其抗菌活性为首次报道。该活性单体与文献 [13] 报道的抗菌物质胡桃

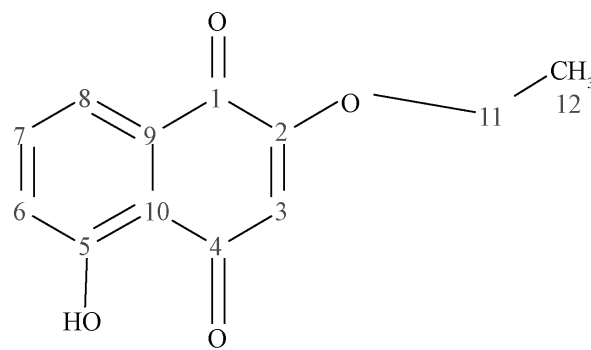


图 1 化合物 A 的结构式

醌结构非常相似, 二者仅有一个 2-乙氧基的结构区别, 印证了这类骨架结构的化合物确实具有抗菌开发价值, 为后续人工合成此类抗菌母核的研究提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1821.
- [2] 刘红兵. 中草药东京枫杨 *Pterocarya Tonkinesis* (Franch.) Dode 抗肿瘤活性成分研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [3] 刘红兵, 崔承彬, 蔡兵, 等. 东京枫杨中三萜类化合物的分离鉴定与抗肿瘤活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(3): 165, 175.
- [4] Cheng H Y, Lin T C, Yang C M, et al. Mechanism of action of the suppression of herpes simplex virus type 2 replication by pterocamin A [J]. *Microbes and infection*, 2004, 6(8): 738.
- [5] 王宏, 温和秀, 王万贤, 等. 夹竹桃、枫杨、羊蹄灭螺活性成分的初步分离 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2006, 23(2): 182.
- [6] 陈珊珊, 曹剑虹. 浅析枫杨在解毒、杀菌及灭钉螺等方面的应用 [J]. 药物与临床, 1999, 21(6): 85.
- [7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 2 册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 384.
- [8] 贾俊荣, 田秋爱. 柳叶治疗脚癣 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2004, 14(2): 85.
- [9] 都长庚. 用枫杨、苦楝、深扉蒿浸泡液防治元胡霜霉病 [J]. 中药材, 1987, 10(2): 5.
- [10] 徐志荣, 张斌, 王秋发, 等. 枫杨洗剂治疗旋耳疮 [J]. 新中医, 2007, 39(7): 105.
- [11] 张兴悦. 抑菌植物筛选与枫杨杀菌活性研究 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2007.
- [12] 李大馨, 崔承彬, 蔡兵, 等. 枫杨属植物研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2007, 23(5): 365.
- [13] Azadbakht M, Marston A, Hostettmann K, et al. Isolation of two naphthalene derivatives from *Pterocarya fraxinifolia* leaf and evaluation of their biological activities [J]. *Chemistry (Rajkot, india)*, 2005, 1(12): 780.

[责任编辑 邹晓翠]