

乌柏根皮乙酸乙酯部位抑菌活性研究

彭元丽¹, 邹坤^{1*}, 陈国华¹, 何晓雯², 周媛¹ (1. 三峡大学化学与生命科学学院, 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443002; 2. 湖北省宜昌市中心医院检验科, 湖北宜昌 443003)

摘要 [目的] 研究乌柏根皮乙酸乙酯部位的抑菌活性。[方法] 采用纸片扩散法, 以病原菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和绿脓杆菌(*Bacillus aeruginosus*)以及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为受试菌, 测定乌柏根皮乙酸乙酯部位过正相硅胶柱后各流分的抑菌活性。[结果] 乌柏根抑菌活性物质主要存在极性较大的部分, 但极性很大的甲醇洗脱部分也没有抑菌活性; 乙酸乙酯可溶部抑菌成分较复杂, 不同部分对不同细菌的抑制作用不同, 总体来说对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有一定的抑制作用。[结论] 乙酸乙酯部位经正相硅胶柱层析分离所得不同流分对各细菌的抑菌活性有很大区别。

关键词 乌柏根皮; 醇提取物; 乙酸乙酯部位; 抗菌活性

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15231-02

Research on the Antibacterial Activity of Ethyl Acetate in the Root Bark of Chinese Sapium

PENG Yuan-li et al (College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization of Hubei Province, Yichang, Hubei 443002)

Abstract [Objective] The antibacterial activity of acetate ethyl in the root bark of Chinese sapium was investigated. [Method] The antibacterial activity of the different flowing products of ethyl acetate after over normal phase silica gel column to pathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus aeruginosus* and *Bacillus subtilis* was determined with the disk diffusion method. [Results] The results showed that the material with the antibacterial activity in sapium root bark primarily was in the part of large polarity, but there was antibacterial activity in the material of the methanol elution with larger polarity; and the inhibitory components of the soluble material of ethyl acetate was complex and the different parts had the variable inhibition to different bacteria and in general these materials had a certain inhibition to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. [Conclusion] There was a quite difference in the antibacterial activity of different flowing products of ethyl acetate isolated by normal phase silica gel column chromatography.

Key words Chinese sapium root bark; Methanol extract; Ethyl acetate extract; Antibacterial activity

乌柏[*Sapium sebiferum* (L.) Roxb.]为大戟科乌柏属植物^[1], 落叶乔木。生于山坡、村边、路旁, 产于华东、中南、西南及甘肃。其根皮、茎皮、种子及叶均可入药。乌柏性微温、味苦、有毒, 具有利水、消积、杀虫、解毒、通便等功效。现代药理试验表明, 乌柏具有体外抑菌、抗炎、降压、降胆固醇作用^[2]。乌柏是我国的特有植物, 在古代农书《齐民要术》和《农政全书》中均有乌柏栽培和利用的记载^[3]。陈玉等曾报道乌柏中主要化学成分为黄酮、香豆素、二萜、三萜及其他酚酸类成分^[4], 霍光华等以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为受试菌, 依次测定不同种质乌柏叶水、70%乙醇和乙酸乙酯3种溶剂提取物的抑菌活性, 结果表明乙酸乙酯部位活性最强, 其中, 酸类物质和黄酮类物质是乌柏叶抑菌活性的功能成分^[5]。柳润辉等从乌柏叶乙醇提取液乙酸乙酯可溶部中, 通过硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇系统梯度洗脱得到槲皮素(queretin)、山柰酚(kaempferol)、没食子酸乙酯(ethyl gallate)、鞣花酸(ellagic acid)、没食子酸(gallic acid)、异槲皮苷(isoquercetrin)等化合物^[6]。叶舟对乌柏叶乙醇提取物部分进行分离、活性跟踪试验, 结果表明乌柏叶抑制金黄色葡萄球菌的活性成分, 主要存在于95%乙醇提取液的乙酸乙酯可溶部中, 为黄酮类酚性成分^[7]。虽然对乌柏叶的抗菌活性已有报道, 但仅初步涉及乌柏叶粗提物的抗菌效果, 对乌柏根未见详细报道。因此, 笔者对乌柏根皮乙酸乙酯部位进行了较为深入的研究。

基金项目 湖北省教育厅科学研究计划项目(Q200713002); 三峡大学科研启动基金项目(0620060113)。

作者简介 彭元丽(1985-), 女, 湖北荆门人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: kzou@ctgu.edu.cn。

收稿日期 2009-07-06

1 材料与方法

1.1 药材 自采药材, 2006年9月采于湖北宜昌猗亭区, 经三峡大学生物技术中心王玉兵老师鉴定为大戟科乌柏属植物乌柏[*Sapium sebiferum* (L.) Roxb.], 标本存放于三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室。

1.2 测试菌种 测试菌种包括由湖北省宜昌市中心医院检验科提供的病原菌株: 大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和绿脓杆菌(*B. aeruginosus*)以及由三峡大学化学与生命科学学院微生物室提供的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

1.3 方法

1.3.1 活性物质提取与分部 取干燥乌柏根皮1.5 kg, 用浓度为95%乙醇80℃加热回流提取3次, 每次1 h, 合并提取液。提取液真空浓缩至原来体积的1/3后, 依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取, 收集乙酸乙酯部分, 干燥, 用乙酸乙酯溶解后用正相硅胶(200~300目)拌样, 干法上样。上10 cm × 57 cm普通硅胶柱, 石油醚:乙酸乙酯 = 10:1~0:1, 乙酸乙酯:甲醇 = 100:1~0:1, 不同配比洗脱剂的体积皆为1个柱体积, 500 ml为1个流分, 共收集119个流分, TLC检测, 合并组成相近流分, 得不同柱层析分离部后, 将各分离部分别浓缩, 挥干溶剂。受试样品制备流程图见图1。



图1 乙酸乙酯部分柱层析分离

Fig. 1 The ethyl acetate fraction separated by silica gel column chromatography

1.3.2 菌种活化培养。试验菌株经传代活化培养后,取一接种环菌种接种于普通肉汤培养基中,37℃恒温箱培养12 h,使受试菌处在对数生长期即对药物最敏感期。

1.3.3 抑菌试验。采用纸片扩散法^[8],在超净工作台上将灭菌后的肉汤琼脂培养基,倒入培养皿($D=9\text{ cm}$)中,每皿15 ml,放置冷却。

用灭菌镊子将圆滤纸片($D=6\text{ mm}$)浸入已配制好的各供试液溶液中(5 mg/ml),取出自然风干,用浸泡灭菌后的干滤纸片作对照。用无菌棉签浸润测试菌悬液,涂在营养琼脂平皿上。待琼脂吸收菌液约3~10 min后,将吸附测试样品的滤纸片贴于涂有细菌的平皿培养基上。各供试液3个重复。

1.4 数据处理 采用Spss 13.0软件对多次抗菌测试结果进行均值分析,试验数据以 $\bar{x}\pm S$ 表示。

2 结果与分析

将培养皿置于37℃条件下培养16~18 h,观察抑菌效果,结果见表1。

表1 不同流分对不同细菌的抑菌圈直径

Table 1 The inhibitory zone diameter of different components against tested bacteria mm

样品 Samples	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	绿脓杆菌 <i>B. aeruginosus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
5号	0	0	0	0
6号	3.11±0.93	0	0	0
7号	2.44±0.53	0	0	0
9号	0	3.22±0.97	0	0
10号	0	3.89±0.78	0	0
11号	3.11±0.60	0	0	0
12号	3.11±0.26	0	0	0
13号	2.89±0.20	0	0	0

注:对照组和其他几个样品没有抑菌活性。

Note: The control group and several samples had no antibacterial activity.

2.1 不同极性段的抑菌活性 由表1可知,乌柏根皮乙酸乙酯部位抑菌活性成分主要集中在所得流分的前和后一段,最前有一小段(1~5号)无抑菌活性,而前面段刚好从乙酸乙酯开始;其中,6、7、11、12、13号对金黄色葡萄球菌都有抑制作用,而且抑菌圈直径相差不大,10号(乙酸乙酯:甲醇=100:1~50:1)对大肠杆菌的抑菌圈直径为(3.89±0.78) mm,

强于其他部分,表明乌柏根抑菌活性物质主要存在极性较大的部分,但极性很大的甲醇洗脱部分也没有抑菌活性,如14和15号。

2.2 各流分对不同细菌的抑菌活性 乌柏根皮95%乙醇提取物的乙酸乙酯部位大多对金黄色葡萄球菌有抑制作用,但对其他菌抑制作用较差,尤其是对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌没有抑制活性。分析结果表明,乙酸乙酯可溶部抑菌成分较复杂,不同部分对不同细菌的抑制作用不同,总体来说对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有一定的抑制作用。

3 结论与讨论

乌柏根皮95%乙醇提取物乙酸乙酯部位各流分对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于对大肠杆菌的抑制作用,这与乌柏叶片部分研究试验^[5]结论类似。随着耐药菌株的不断增多,寻找新型的抗菌药很有必要。乌柏根皮作为民间治疗大肠杆菌感染具有一定的疗效,研究发现其醇提取物对金黄色葡萄球菌也有一定的抑制作用,从而为更广泛地利用乌柏资源提供一条新途径。乌柏根皮醇提取物与水提取物在抗菌活性方面具有一定的差异,再次说明提取方法对活性成分的影响^[9-10]。下一步的研究须加强对抗菌活性较强部分细分纯化,以得到单体化合物,从而研究它的构效关系,并对它进行结构改造而提高抗菌活性。

参考文献

- [1] 国家医药管理局中华本草编委会. 中华本草:第4卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:854.
- [2] 郭晓庄. 有毒中药大辞典[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1991:113.
- [3] 陈才水,高荫榆,熊华,等. 开发乌柏脂利用的新途径[J]. 食品科学,1985(12):33.
- [4] 陈玉,杨光忠,张世璠,等. 乌柏化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发,1999,11(5):114.
- [5] 霍光华,高荫榆,陈明辉. 乌柏叶抑菌活性功能成分的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(3):52-55.
- [6] 柳润辉,孔令义. 乌柏叶酸性成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(15):1213-1215.
- [7] 叶舟. 乌柏叶提取物抑菌活性研究[J]. 福建林学院学报,2007,27(3):231-235.
- [8] RUKACHAISIRIKUL T, INNOK P, AROONRERK N, et al. Antibacterial Pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 110:171-175.
- [9] 陈国华,邵伟,何晓雯,等. 乌柏根皮水提取物抗菌活性的初步研究[J]. 时珍国医国药,2007,20(9):2139-2140.
- [10] 邢国秀,李楠,崔丽均,等. 苦杏仁苷提取工艺优化[J]. 中国医药工业杂志,2004,35(1):20-21.
- [11] 杨丽敏. 寒地水稻低直链淀粉材料的筛选及影响因素的研究[J]. 黑龙江农业科学,1999(1):11-13.
- [12] 俞桂林. 香味的遗传特点及营养品质[J]. 浙江农业科学,1987(3):113-115.
- [13] 董彦君. 日本新性状稻米品质研究进展[J]. 中国稻米,1998(1):36-38.
- [14] 郑有川. 稻米的营养价值与中医食疗作用[J]. 中国稻米,2000(1):38.
- [15] 梁乃亭,林应春,魏玉波. 优质水稻品种等级与评价方法[J]. 新疆农业科学,1995(4):151-155.
- [16] 周少川,李宏,王家生,等. 华南籼稻晚造稻米蒸煮、外观和碾米品质与食味品质的相关研究[J]. 杂交水稻,2002,17(2):53-55.
- [17] 胡如英,郑建华,杨聚宝. 国际水稻引种的遗传与利用评价[J]. 遗传育种,2001,19(3):23,28.

(上接第15185页)

- [8] 陈叔平. 作物种质资源国内外研究现状与展望[J]. 农牧情报研究,1992(6):25-30.
- [9] 冯银喜. 国外水稻资源在湖南水稻育种中的利用研究[J]. 湖南农业科学,1994(6):16-17.
- [10] 路剑武,吐尔逊·艾则孜. 温泉县水稻引种试验初报[J]. 新疆农业科学,1997(2):64-65.
- [11] 罗玉坤,杨金华. 中国优特稻种资源评价[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [12] 冯中华,张振海. 水稻品种资源研究初报[J]. 宁夏农林科技,1990(4):5-7.
- [13] 刘吉新,赵国珍. 低直链淀粉 du 基因在水稻品质育种中的利用[J]. 云南农业科技,2001(1):127-128.