

迎春花叶抑菌活性物研究

卢成瑛, 杨伟波, 黄早成, 钟 维

(吉首大学 湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000)

摘 要: 采用硅胶柱层析(CC)、薄层层析(TLC)和重结晶等技术, 从迎春花叶乙酸乙酯萃取物中分离到一强抑菌活性单体。理化检测和波谱分析数据鉴定属裂环烯醚萜葡萄糖苷类(secoiridoid glucosides)的迎春花素(jasminin)。该单体在强酸性环境中不稳定, 高温、紫外光处理后抑菌活性稳定, 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)为均为1mg/ml, 对痢疾杆菌、大肠杆菌的最小抑菌浓度为0.5mg/ml, 对三个受试菌的最小杀菌浓度(MBC)为2mg/ml。
关键词: 迎春花叶; 分离; 裂环烯醚萜葡萄糖苷; 抑菌活性; 单体

Study on Antibacterial Composition from Leaves of *Jasminum nudiflorum* Lindl.

LU Cheng-ying, YANG Wei-bo, HUANG Zao-cheng, ZHONG Wei

(Key Laboratory for Forest Products and Chemical Industry Engineering of Hunan,
Jishou University, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract: A antibiotic monomer was isolated from the leaves of *Jasminum nudiflorum* Lindl. by column chromatography(CC), thin layer chromatography(TLC) and recrystallization. The structure of this substance was identified as secoiridoid glucosides (jasminin) based on the chemical and spectroscopic evidence. Its antibiotic activity was unstable in strong acidic solution, but was stable after being treated by high temperature and ultraviolet. The minimal inhibition concentration (MIC) of this monomer against *Staphylococcus aureus* was 1 mg/ml, while against *Shigella dysenteriae* and *Escheichia coli* 0.5 mg/ml, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was 2 mg/ml against these three bacteria.

Key words *Jasminum nudiflorum* Lindl.; isolation; secoiridoid glucosides; bacteriostatic activity; monomer

中图分类号: R284.2 Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0043-04

迎春花(*Jasminum nudiflorum* Lindl.)系木犀科茉莉花属植物, 其生命力极强, 早春春寒料峭之时即绽放出串串金黄色花朵, 是名副其实的报春之花, 为我国优秀的园林绿化美化品种之一, 长江流域各地域广有栽培。《本草纲目》中述其治肿毒恶疮^[1], 迎春花为湘西民间常用草药, 其叶苦、涩、平、无毒, 可解毒清热、止血、止痛, 用于治疗跌打损伤、外伤出血、口腔炎、妇科炎症、痈疽肿毒和外阴搔痒等症。花常作茶饮, 其味甘、涩、平, 清热利尿、解毒, 可治疗头痛发热、泌尿系统感染和下肢溃疡。文献记载迎春花的枝、叶含丁香甙(syringin)、迎春花苷(jasminflorin)和迎春花苦味质(jasmpierin)有清热解暑之功效^[2-3]。国外已有迎春花叶多个化学组分的报道^[4-6], 但是对迎春花抑菌活性物的研究尚未见报道, 为此我们对迎春花叶抑菌活性物进行提取分离和理化检测, 以期更有效地开发利用迎春花这一丰富的资源植物。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 植物材料

迎春花叶于2006年8月采自吉首大学张家界校区校园内, 45℃烘干, 粉碎。

1.1.2 供试菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escheichia coli*)和痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*) 湖南省疾病预防控制中心。

1.1.3 试剂

95%乙醇、石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、浓盐酸、硼酸、氨水、NaOH、NaCl(AR); 琼脂、牛肉膏、蛋白胨(BR); 薄层硅胶H、柱层析硅胶 青岛海洋化工厂。

收稿日期: 2007-02-19

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(03JJY6016)

作者简介: 卢成瑛(1952-), 女, 教授, 研究方向为应用微生物学。

培养基 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.1.4 仪器

旋转蒸发仪(RE540 yamato); pH酸度计(HM-205 TOA); 培养箱(PW/10-002) 重庆实验设备厂; 超净工作台(CCV-1311); 高压蒸汽灭菌器(SM-52); 1/万天平(AEG-220); 红外光谱仪(RF-5000 SHIMADZU); 超导核磁共振谱仪(Unity Varian-Inova 600); ZabSpec高分辨质谱仪 英国Micromas公司; WRS-1数字熔点仪 上海物理光学仪器厂。

迎春花叶, 45℃烘干, 粉碎, 90%乙醇浸提, 抽滤, 取滤液, 减压浓缩, 浓缩液依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。取抑菌活性最好的乙酸乙酯萃取物进行硅胶柱层析, 氯仿-甲醇进行梯度洗脱, 选择抑菌活性最好的流份合并, 硅胶薄层层析, 切取各层析段分离物进行抑菌实验, 收集强抑菌活性部位, 乙醇重结晶得到化合物1, 脱水干燥, 用于抑菌活性检测、理化检测和IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、EI-MS、DEPT等波谱数据分析^[7-8]。

1.2 最小抑菌浓度(MIC)测定^[9]

采用试管二倍稀释法测定最小抑菌浓度。称取样品, 8mg置于小试管中, 加入无菌肉汤培养基1.0ml, 然后取出0.5ml放入第2管中, 加入培养基0.5ml, 依次类推, 稀释成不同浓度, 再用刻度滴管加入浓度为 5×10^6 CFU/ml(麦氏比浊)的各种菌液0.05ml, 充分摇匀, 使各试管的菌液浓度为 5×10^5 CFU/ml, 含药量分别为8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625mg/ml, 置37℃摇床(200r/min)中培养16~24h观察结果, 观察试管澄清度, 若液体培养基混浊, 表示细菌生长, 若液体培养基完全清亮, 表示无细菌生长。无细菌生长的最小浓度为最小抑菌浓度。设未加菌液为空白对照, 四环素为阳性对照。

1.3 最小杀菌浓度(MBC)测定^[9]

最小抑菌浓度(MIC)测定实验中, 将无细菌生长的液体培养基中取出0.1ml涂布平板, 置37℃温箱中培养16~24h观察有无细菌生长。无细菌生长的最小浓度为最小杀菌浓度。

1.4 稳定性实验^[10]

1.4.1 酸碱稳定性实验

用稀盐酸和稀氨水溶液将化合物水溶液的pH值分别调至2、4、5、6、7、8、9、10、12, 后置于容量瓶中定容至2mg/ml, K-B纸片法测定抑菌活性。

1.4.2 热稳定性实验

试管分装适量化合物水溶液, 置不同温度70、85、100、121℃处理分别于8、7、4、2、1h后取出放冷至室温, 后置于容量瓶中定容至2mg/ml, K-B纸片法

测定抑菌活性。

1.4.3 光处理实验

将5ml迎春花素液分装于10cm培养皿中, 置紫外灯(256nm, 6W, 样距5cm)下照射不同时间, 置室光下放置1、2、3、6d, 后置于容量瓶中定容至2mg/ml, K-B纸片法测定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 提取分离与理化检测、波谱分析结果

迎春花叶的乙酸乙酯萃取物抑菌活性最好, 取其进行硅胶柱层析、硅胶薄层层析、重结晶、干燥得到的化合物1为白色结晶性粉末, 具较强的抑菌活性, 其难溶于氯仿, 易溶于甲醇、乙醇; mp 151.8~154℃(温度计未校正), $UV_{\max}^{MeOH}$: 238nm。分子式为 $C_{26}H_{38}O_{12}$, 分子量542; 在氯仿、甲醇比例为7:3展开剂中展开后斑点圆整, R_f 约0.45, 10%硫酸喷后加热显色, 呈紫红色IR(KBr压片法, cm^{-1}): 3350, 2990, 2900, 2869, 1730, 1690, 1610。¹H-NMR(DMSO, $\times 10^{-6}$) 7.414(s峰, 1.77H); 5.912, 5.889(4.23H); 5.150, 5.141(d峰, 1.99H); 5.016, 5.007(d峰, 2H); 4.951, 4.942(d峰, 1.97H); 4.877, 4.859(d峰, 2.04H); 4.757, 4.751(d峰, 2.00H); 4.637, 4.624(d峰, 2.17H); 4.513, 4.505, 4.501, 4.943(dd峰, 2.02H); 4.411, 4.403, 4.394(t峰, 1.91H); 4.332, 4.324, 4.315(t峰, 1.80H); 3.964, 3.944(dd峰, 2.15H); 3.679, 3.665, 3.645(m峰, 4.29H); 3.440, 3.420, 3.394(m峰, 7.27H); 3.305(s峰, H_2O); 3.249, 3.223, 3.209, 3.186, 3.171, 3.155(m峰, 6.20H); 3.081, 3.058, 3.042, 3.026, 3.011(m峰, 4.16H); 2.511, 2.508, 2.505, 2.493, 2.490, 2.489(DMSO); 2.459, 2.452, 2.438, 2.432, 2.403, 2.391, 2.378, 2.371, 2.359, 2.346, 2.323, 2.303, 2.282(m峰, 6.24H); 2.128, 2.116, 2.104, 2.092(m峰, 1.97H); 1.835, 1.823, 1.812, 1.800(m峰, 2.41H); 1.748, 1.734(d峰, 6.29H); 1.702, 1.689, 1.665, 1.646, 1.640(m峰, 3.93H); 1.547, 1.536, 1.527, 1.516, 1.505(m峰, 1.95H); 1.057, 1.045, 1.033(t峰, 5.00H); 0.952, 0.941(d峰, 6.01H); 0.914, 0.901(d峰, 5.54H)。¹³C-NMR(DMSO, $\times 10^{-6}$): 170.897, 164.842, 152.840, 129.739, 121.769, 108.051, 99.039, 92.832, 80.336, 77.399, 76.562, 73.232, 69.974, 65.869, 64.924, 61.079, 55.985, 50.022, 42.957, 42.352, 40.554, 40.243, 34.503, 29.947, 20.083, 18.516, 15.406, 12.748。DEPT($\times 10^{-6}$)CH₃: 20.083, 18.516, 15.406, 12.748。CH₂: 65.869, 64.924, 61.079, 55.985,

42.352, 34.503. CH: 152.840, 121.769, 99.039, 92.832, 80.336, 77.399, 76.562, 73.232, 69.974, 50.022, 42.957, 40.554, 40.243, 29.947. EI-MS: m/z : 380.2; 362.2; 344.2; 211.1; 193.1; 153.1; 135.1; 121.1; 107.1; 95.1(基峰, 100%)以上数据与文献[7-11]报道裂环烯醚萜甙(secoiridoids glucosides)类的迎春花素(jasminin)一致。其结构如下:

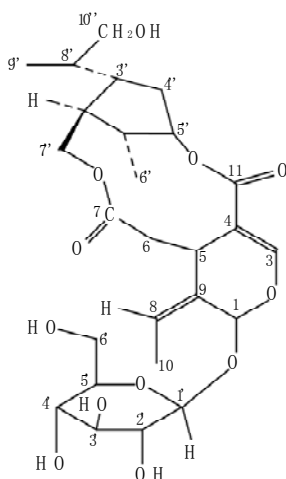


表1 最小抑菌浓度(MIC)测定
Table 1 MIC test of ethanol extract

受试菌	浓度(mg/ml)						
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
金黄色葡萄球菌	-	-	-	+	++	++	++
痢疾杆菌	-	-	-	-	+	++	++
大肠杆菌	-	-	-	-	+	++	++

注:“-”表示没有长菌;“+”表示长菌。

2.2 MIC、MBC 的测定

结果表明,迎春花素对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为为1mg/ml,对痢疾杆菌、大肠杆菌的最小抑菌

表2 最小杀菌浓度(MBC)测定
Table 2 MBC test of ethanol extract

受试菌	浓度(mg/ml)						
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
金黄色葡萄球菌	-	-	++	++	++	++	++
痢疾杆菌	-	-	++	++	++	++	++
大肠杆菌	-	-	++	++	++	++	++

注:“-”表示没有长菌;“+”表示长菌。

浓度为均为0.5mg/ml,对三个受试菌的最小杀菌浓度为均为2mg/ml。

2.3 抑菌活性稳定性实验

2.3.1 酸碱稳定性实验

实验表明碱处理对迎春花素抑菌活性影响较小,酸对其活性影响较大。pH 值 ≤ 2 时,受试菌没有出现明显的生长抑制(表3)。

2.3.2 热稳定性实验

迎春花素高温处理后进行抑菌活性测定,结果表明热处理对其抑菌活性没有明显影响(表4)。

2.3.3 紫外光处理实验

紫外光处理后迎春花素仍具强抑菌活性,表明紫外光处理对其抑菌活性无显著影响(表5)。

表5 365nm 紫外光处理后提取物的抑菌圈直径(mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)
Table 5 Diameter of the inhibition zone of extract by treated at 365 nm ultraviolet light (mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)

受试菌	365nm紫外光处理			
	未处理	5min	15min	30min
金黄色葡萄球菌	17.5 $\pm$ 0.41	18.2 $\pm$ 0.85	17.8 $\pm$ 1.03	17.2 $\pm$ 0.62
痢疾杆菌	17.3 $\pm$ 0.47	17.7 $\pm$ 0.94	16.5 $\pm$ 0.41	18.3 $\pm$ 0.94
大肠杆菌	17 $\pm$ 0.24	18 $\pm$ 0	17.5 $\pm$ 0.41	18.5 $\pm$ 0.41

3 结 论

本研究对迎春花叶抑菌活性物进行分离、检测,

表3 酸碱处理后提取物的抑菌圈直径(mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)
Table 3 Diameter of inhibition zone of extract at different pH values (mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)

受试菌	pH值							
	未处理	2	4	6	7	8	10	12
金黄色葡萄球菌	17.5 $\pm$ 0.41	-**	16 $\pm$ 0.71	18 $\pm$ 0.71	18.3 $\pm$ 0.47	15.3 $\pm$ 0.47	16.2 $\pm$ 0.85	16.7 $\pm$ 0.94
痢疾杆菌	17.3 $\pm$ 0.47	-**	18 $\pm$ 0	17 $\pm$ 0.71	17.8 $\pm$ 0.24	17.5 $\pm$ 1.47	16.7 $\pm$ 0.47	15.7 $\pm$ 0.47
大肠杆菌	17 $\pm$ 0.24	-**	17.2 $\pm$ 0.47	17.7 $\pm$ 1.25	18.7 $\pm$ 0.47	16.2 $\pm$ 1.31	16.2 $\pm$ 0.62	15.7 $\pm$ 0.94

注:“-”明显抑菌圈(后同), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

表4 热处理后提取物的抑菌圈直径 (mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)
Table 4 Diameter of inhibition zone of extract by treated at different temperatures (mm, $\bar{x} \pm s$, n=3)

受试菌	热处理温度与时间							
	未处理	70℃, 30min	70℃, 1h	85℃, 30min	85℃, 1h	100℃, 30min	100℃, 1h	121℃, 20min
金黄色葡萄球菌	17.5 $\pm$ 0.41	16.8 $\pm$ 0.24	17 $\pm$ 0.82	16.8 $\pm$ 0.24	16 $\pm$ 0.82	16.2 $\pm$ 0.62	18.7 $\pm$ 0.47	18.7 $\pm$ 0.47
痢疾杆菌	17.3 $\pm$ 0.47	17 $\pm$ 0	17.7 $\pm$ 0.24	16.3 $\pm$ 0.47	16.3 $\pm$ 0.25	16.7 $\pm$ 0.24	17.2 $\pm$ 0.85	17 $\pm$ 0
大肠杆菌	17 $\pm$ 0.24	16.7 $\pm$ 0.47	17.3 $\pm$ 0.94	15.5 $\pm$ 0.41	17.7 $\pm$ 0.47	15.7 $\pm$ 0.24	18 $\pm$ 0.82	17 $\pm$ 0.82

采用硅胶柱层析(CC)、薄层层析(TLC)和重结晶等技术,从迎春花叶乙酸乙酯萃取物中分离到一强抑菌活性单体。经理化检测和IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、EI-MS、DEPT波谱数据分析鉴定为裂环烯醚萜甙类的迎春花素。裂环烯醚萜苷类成分在迎春花中分布较多,是该植物化学成分研究热点,目前已发现约20种。该类化合物在马钱科、龙胆科、忍冬科、木犀科、茜草科等植物中广有分布,尤其在龙胆科和忍冬科中结构类型多样、数量众多,在生物合成中常常是吲哚生物碱的前体。已有药理实验研究表明一些裂环烯醚萜甙及环烯醚萜甙类化合物对心血管、消化系统、中枢神经系统都显示出一定的生物活性,具有降压、抗肝毒、解痉、抗炎等药理作用。目前有关迎春花裂环烯醚萜苷药理活性研究尚未见报道,生物活性作用物质基础不明确,导致该植物应用受限。本研究表明迎春花裂环烯醚萜苷单体具有很高的抑菌活性,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)为均为1mg/ml,对痢疾杆菌、大肠杆菌的最小抑菌浓度为0.5mg/ml,对三个受试菌的最小杀菌浓度(MBC)为2mg/ml。其具亲水性,在强酸性环境中不稳定,高温、紫外光、氧化还原剂处理对其抑菌活性没有明显影响。深入探索迎春花叶裂环烯醚萜苷的其他生物学活性和毒性,将促进迎春花这一丰富的资源植物尽早用于医药和食品防腐领域,更好地进行产业化

综合开发。

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目:校点本[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982: 1053.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社, 1978: 915.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977: 1156-1157.
- [4] TANAHASHI T, TAKENAKA Y, NAGAKURU N, et al. Three secoiridoid glucosides from *Jasminum nudiflorum*[J]. J Nat Prou, 1999, 62(9): 1311-1315.
- [5] TANAHASHI T, TAKENAKA Y, NAGAKURU N, et al. Five secoiridoid glucosides esterified with a cyclopentanoid monoterpene unit from *Jasminum nudiflorum*[J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(8): 1200-1204.
- [6] TAKENAKA Y, TANAHASHI T, TAGUCHI H, et al. Nine new secoiridoid glucnsides from *Jasminum nudiflorum*[J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(3): 384-389.
- [7] 龚运淮, 丁立生. 天然产物核磁共振 $^{13}\text{C-NMR}$ 碳谱分析[M]. 昆明:云南科技出版社, 2006.
- [8] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科技出版社, 1996: 441-442.
- [9] 卢成英, 徐东翔, 杜勇, 等. 檵木叶抑菌活性成分提取分离与检测[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 40-42.
- [10] 卢成英, 唐克华, 黄早成, 等. 红檵木花红色素提取物抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 107-110.
- [11] 贺震旦, 杨崇仁. 野迎春叶的单萜裂环烯醚萜甙研究[J]. 云南植物研究, 1989, 11(1): 55-59.



研究发现: 长期吃甜食损害容颜 皱纹变多

《英国皮肤病学杂志》刊文指出:长期吃甜食易长皱纹面对甜食,很多女孩都是爱恨有加,左右为难。吃会发胖,不吃又经不起这张馋嘴的折腾。近日《英国皮肤病学杂志》上发表的一项研究为拒绝甜食又添新筹码,长期吃甜食将使你的皮肤黯淡无光,皱纹变多。

这是因为吃完甜食后会在人体产生糖化,他们会随血液流动,伺机寻找并粘住某种蛋白,最容易受到攻击的蛋白就是胶原和保持弹性的蛋白,最后形成一种新的被糖化的分子“蛋白质高度糖化终产物(AGE)”。

吃的糖越多,那么产生的蛋白质高度糖化终产物就越多,从而会攻击越来越多的蛋白。最终结果就是让我们的皮肤松垂,皱纹变多。

在2007年6月份,拥有20多年经验的美国权威皮肤科医生布兰特出版了新书《10分钟/10年:追求美丽年轻外表的可靠指南》。他同样指出,只要减少吸收糖分,就能轻易令肌肤返老还童10年,改善肤色、质感及光泽。

美国营养学家、美国饮食协会发言人Kerry Neville在美国有线电视新闻网(CNN)上指出,预防皮肤老化就必须限制饮食中糖的摄入。其中关键的是揪出食物中的糖,许多食品中看似不含糖,实际上会以其他名称出现,比如食品成分中的大麦芽、玉米浆、右旋糖、浓缩果汁、麦芽糖、蜂蜜、糖蜜等等。