

# 蝙蝠葛茎叶抗菌活性成分的研究\*

孔阳<sup>a</sup>, 马养民<sup>b</sup>, 余博<sup>a</sup>, 史清华<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a 生命科学学院; b 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 将蝙蝠葛(*Menispermum dahuricum* DC.)茎叶的乙醇粗提物分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。其萃取物抗菌活性试验结果表明,石油醚萃取物对青霉菌(*Penicillium* sp.)有强抑制作用;乙酸乙酯萃取物对假丝酵母菌(*Candida* sp.)有强抑制作用,对金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)有较强抑制作用,对辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)有抑制作用;正丁醇萃取物无明显抗菌活性。经对乙酸乙酯萃取物分离纯化得到2个化合物I和II,抗菌试验结果表明,化合物I具有抑制金色葡萄球菌和辣椒疫霉菌的活性,化合物II具有抑制假丝酵母菌和辣椒疫霉菌的活性;经光谱和化学分析鉴定化合物I为异槲皮素甙,该化合物为首次从蝙蝠葛植物中得到。

**[关键词]** 蝙蝠葛; 抗菌活性; 黄酮; 异槲皮素甙

**[中图分类号]** Q 946.8; S482.2<sup>+</sup> 92

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)04-0151-03

蝙蝠葛(*M. dahuricum* DC.)为防己科蝙蝠葛属植物,又名蝙蝠藤、山豆秧、黄条香、野豆根等,为多年生草本攀缘植物。在我国主要分布于东北、华北、华中、华东等地,陕西省北部及秦岭北坡也有分布,多生于海拔1500 m以下的田边或石砾滩地<sup>[1-4]</sup>。其干燥根茎可作药用,称“北豆根”,具有抗心律失常、降压、解痉和抗癌等作用<sup>[5-7]</sup>,其制剂已被广泛应用于临床治疗癌症、咽喉肿痛、风湿痹痛、心脑血管疾病、慢性支气管炎等病症。以往人们只采其根部作药用而废弃了其地上部分,对蝙蝠葛资源造成了极大的破坏和浪费。为了扩大药源,特开展了蝙蝠葛茎叶的开发利用研究,现将蝙蝠葛茎叶抗菌活性成分的研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 蝙蝠葛茎叶于2003-08采自西安市翠华山,由西北农林科技大学林学院韩恩贤副研究员鉴定。柱层析用硅胶由青岛海洋化工厂生产(粒度0.05~0.074 mm),薄层层析用硅胶G和GF<sub>254</sub>均由青岛海洋化工厂生产,Sephadex LH20由上海维编科贸有限公司生产,其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 NOVA400型超导核磁共振仪,PE-Spectrum One FT-IR型红外光谱仪,X-6精密

显微微量熔点测定仪(温度计未校正),高压灭菌锅LB-502,电热恒温培养箱(上海国光医化仪器厂),超净工作台(天长市光华仪器设备有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 粗提物的制备 取阴干粉碎的蝙蝠葛茎叶5 kg,用工业乙醇常温浸泡,乙醇用量每次20 L,共浸泡5次,合并提取液,回收乙醇得浸膏170 g。将浸膏悬浮于2.5 L蒸馏水中,然后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得石油醚萃取物74 g,乙酸乙酯萃取物41 g,正丁醇萃取物55 g。

1.2.2 粗提物抗菌活性测定 (1)测试样品。石油醚萃取物,乙酸乙酯萃取物,正丁醇萃取物。(2)测试菌株。细菌用金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*);真菌用假丝酵母菌(*Candida* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *Vasinfestum*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* Sch1 f. sp. *Niveum*)和棉花枯萎病菌(*Botrytis cinerea* Pers.)。粗提物对大肠杆菌和金色葡萄球菌的抗菌活性在牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏3.5 g,蛋白胨10 g,琼脂20 g,水1000 mL, pH 7.0~7.2)上测定,对其余菌的抗菌活性在PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1000 mL, pH 7.0~7.2)上测定。(3)测试方法。

\* [收稿日期] 2004-11-26

[作者简介] 孔阳(1980-),女,山东曲阜人,在读硕士,主要从事植物化学研究。

[通讯作者] 马养民(1963-),男,陕西乾县人,副教授,博士,主要从事植物化学和有机合成研究。

采用纸片扩散法:将萃取物测试样品分别配成 0.05 mg/L 丙酮溶液,然后分别吸取 20  $\mu$ L 各测试样品的丙酮溶液至滤纸片( $\Phi=0.6$  cm)上,使其充分吸收,待纸片上溶剂挥发后备用。将经高温灭菌的培养基标号,分别涂上各测试菌溶液,注意要充分涂匀,然后将沾有样品的圆形滤纸片小心平放到培养皿中,每个样品对每种测试菌做 3 个重复,为增加随机性和减少工作量,可于一种测试菌的培养基中放 3 个样品,用纯丙酮作空白对照。将制好的培养基放入 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 2~4 d 后观察结果,测定抑菌圈大小<sup>[8]</sup>。

1.2.3 活性成分的分离纯化 将乙酸乙酯萃取物(41 g)用硅胶拌样,经硅胶柱层析,以氯仿-甲醇系统梯度洗脱(体积比分别为 1:0; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1; 1:1; 0:1),得到 7 个组分(F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7),活性试验发现 F4 具有抗菌活性。在活性跟踪下,经对 F4 进行多次硅胶柱层析和 Sephadex LH20 柱层析,分离得到淡黄色片状结晶 I 和橘红色针状结晶 II。2 个化合物分别经薄层层析检查,用不同展开系统展开后在紫外光下观察为单一斑点,用浓硫酸显色剂及在碘缸中显色均呈单一斑点,初步证明化合物 I, II 为纯化合物。

1.2.4 化合物 I 的结构鉴定 (1) 化学分析。取化合物 I 5 mg 溶解于 5 mL 乙醇中制得供试溶液。盐酸-镁粉试验:吸取 1 mL 供试液于试管中,加入 2 滴浓盐酸,再加入少许镁粉,观察颜色变化。三氯化铝反应:取 1 mL 供试液于试管中,加入几滴 10 g/L

三氯化铝溶液,在日光和紫外光下观察颜色。另将样品溶液点于滤纸上,然后喷 10 g/L 三氯化铝溶液,在紫外光下观察颜色变化。(2) 波谱分析。取化合物 I 进行红外光谱和  $^1\text{H NMR}$  分析,光谱数据如下: IR ( $\nu, \text{cm}^{-1}$ ) 3 272, 1 655, 1 594, 1 561, 1 493, 1 465, 1 295, 1 204, 1 133, 1 108, 1 016, 1 001, 944, 879, 813;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DM SO-d}_6$ )  $\delta$  3.00~3.60 (6H, m, G-2, 3, 4, 5, 6ab-H), 5.47 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, G-1-H), 6.210 (1H, s, 6-H), 6.415 (1H, s, 8-H), 6.850 (1H, d,  $J=9.2$  Hz, 5-H), 7.580 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 6-H), 7.590 (1H, s, 2-H), 9.270 (1H, s, 3-OH), 9.770 (1H, s, 4-OH), 10.89 (1H, s, 7-OH), 12.65 (1H, s, 5-OH)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗提物抗菌活性测试结果

由表 1 可以看出,石油醚萃取物对青霉菌(*Penicillium* sp.)有强抑制作用;乙酸乙酯萃取物对假丝酵母菌(*Candidasp*)有强抑制作用,对金色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)有较强抑制作用,对辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)有抑制作用;正丁醇萃取物对所有测试菌无明显抗菌活性。

### 2.2 化合物 I 和 II 的抗菌测试结果

从表 1 可以看出,化合物 I 具有较强抑制金色葡萄球菌和辣椒疫霉菌的活性;化合物 II 具有强抑制假丝酵母菌的活性,对辣椒疫霉菌也有抑制作用。

表 1 粗提物、化合物 I 和 II 的抗菌测试结果  
Table 1 Screening results of strains of component

测试菌株 Tested bacteria	石油醚萃取物 Components from petroleum ether	乙酸乙酯萃取物 Components from ethylacetate	正丁醇萃取物 Components from <i>n</i> -butanol	化合物 I Compound I	化合物 II Compound II
金色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	++	-	++	-
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	++	-	-	-
辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>	-	+	-	+	+
青霉菌 <i>Penicillium</i> sp.	+++	-	-	-	-
假丝酵母菌 <i>Candidasp</i>	-	+++	-	-	+++
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i>	-	-	-	-	-
棉花枯萎病菌 <i>Botrytis cinerea</i> Pers	-	-	-	-	-
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> Schl f. sp. <i>Niveum</i>	-	-	-	-	-

注: - . 0 <  $\Phi$  (平均抑菌圈直径) < 6 mm; + . 6 mm <  $\Phi$  < 10 mm; ++ . 10 mm <  $\Phi$  < 16 mm; +++ .  $\Phi$  > 16 mm。

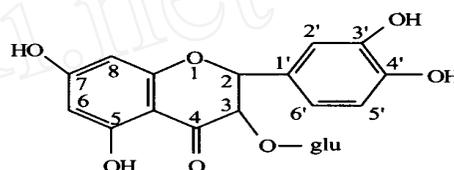
Notes: - . 0 <  $\Phi$  (average diameter of antibiotic circle) < 6 mm; + . 6 mm <  $\Phi$  < 10 mm; ++ . 10 mm <  $\Phi$  < 16 mm; +++ .  $\Phi$  > 16 mm.

### 2.3 化合物 I 的结构分析

2.3.1 化学分析 化合物 I 为淡黄色片状结晶(氯仿-甲醇), 经测定熔点为 233~ 235 ; 盐酸-镁粉试验, 溶液显红色, 反应呈阳性; 三氯化铝试验, 溶液显鲜黄色, 紫外光下显黄绿色荧光, 因此推测其为黄酮类化合物。

2.3.2 波谱分析 IR 谱图在  $3272\text{ cm}^{-1}$  处峰表明有羟基(OH)存在;  $1655\text{ cm}^{-1}$  处峰表明有羰基(C=O);  $1594, 1561, 1493, 1465\text{ cm}^{-1}$  处峰表明有苯环。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DM SO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.65 (1H, s), 10.89 (1H, s), 9.770 (1H, s), 9.270 (1H, s) 处的 4 个峰分别为 5-OH, 7-OH, 4-OH 和 3-OH 的信号; 7.580 (1H, d,  $J = 7.2\text{ Hz}$ ) 和 7.590 (1H, s) 处的峰分别为 6-H 和 2-H 的信号; 6.415 (1H, s)

和 6.210 (1H, s) 处峰分别为 8-H 和 6-H 的信号; 5.47 (1H, d,  $J = 7.2\text{ Hz}$ ) 处 1 个峰为葡萄糖 1 位碳上的质子信号, 其  $J$  为 7.2 表明是  $\beta$ D 葡萄糖; 3.00~ 3.60 (6H, m) 处多重峰为葡萄糖上其余 6 个质子(G-2, 3, 4, 5, 6ab-H)的质子信号; 3 位无羟基表明葡萄糖基是接在甙元异槲皮素的 3 位。光谱数据和熔点数据与文献值<sup>[9-14]</sup>完全一致, 确定该化合物为异槲皮素甙(结构如下)。



致谢: 本研究在陕西省经济植物资源开发利用重点实验室完成, 在此表示诚挚的感谢。

### [参考文献]

- [1] 龚 宁, 马养民, 付建熙. 蝙蝠葛茎叶化学成分的研究[J]. 陕西林业科技, 2001, (1): 8- 11.
- [2] 肖培根, 连文琰. 中药植物原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [3] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- [4] 国家医药管理局中药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [5] 冯克燕. 蝙蝠葛碱治疗心率失常的临床研究[J]. 中华心血管病杂志, 1984, (12): 264.
- [6] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997.
- [7] Kupenban S M, L iepa A J, Baxter R L, et al New alkaloids and related artifacts from *Cyclea peltata*[J]. Jorg Chem, 1973, 38: 1846.
- [8] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [9] 杨秀伟, 蒋玉梅, 李君山, 等. 骆驼刺中一个新的黄酮醇葡萄糖甙化合物[J]. 中草药, 1996, 27(12): 707- 711.
- [10] 邹耀洪. 国产甘薯叶黄酮类成分研究[J]. 分析测试学报, 1996, 15(1): 71- 74.
- [11] 易 醒, 石建功, 周光雄, 等. 青钱柳化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 43- 45.
- [12] Harborne J B, Mabry T J. The Flavonoids Advance in Research[M]. London and New York: Chapman and Hall Ltd, 1982. 52.
- [13] 殷志琦, 叶文才, 赵守训. 国产贯叶连翘化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 277- 279.
- [14] Markham K R, Ternar B, Stanley R, et al Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III[J]. Tetrahedron, 1978, 34: 1389.

## Studies on the antimicrobial active constituents of stem and leaves from *Menispermum dahuricum* DC.

KONG Yang<sup>a</sup>, MA Yang-min<sup>b</sup>, YU Bo<sup>a</sup>, SHI Qing-hua<sup>b</sup>

(a College of Life Sciences, b College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The stem and leaves of *M. dahuricum* DC. were exhaustively extracted with ethanol. The extraction was done with petroleum ether, ethylacetate and *n*-butanol in turn. The antimicrobial components from various extracts were investigated and found that the components from petroleum ether had high antimicrobial activity on the *Penicillium* sp. The components from ethylacetate could restrain the *Staphylococcus aureus* seriously, and have high antimicrobial activity against *Candidasp*, *E. coli* and *Phytophthora capsic*. The components from *n*-butanol had no antimicrobial activity. We derived compound I and compound II from ethylacetate extract. Compound I could restrain the *Staphylococcus aureus* and *Phytophthora capsic*. Compound II had antimicrobial activity on *Candidasp* and *Phytophthora capsic*. On the basis of spectral data and chemical reaction, Compound I was elucidated to be isoquercitrin, which was isolated from the stem and leaves of *M. dahuricum* DC. for the first time.

**Key words:** *Menispermum dahuricum* DC.; antimicrobial activity; flavone; isoquercitrin