

九头狮子草抗菌有效组分分析

Antibacterial effective component analysis of *Peristrophe japonica*

张丽娟¹ 王 正² 廖尚高³

ZHANG Li-juan¹ WANG Zheng² LIAO Shang-gao³

(1. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000;

3. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

(1. School of Food and Drug Manufacturing Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. School of Pharmacy, Hubei University of Medicine School of Pharmacy, Shiyan, Hubei 442000, China;

3. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550004, China)

摘要:为明确九头狮子草的抗菌有效组分及其化学成分,采用大孔树脂柱层析将药材的乙醇提取物进行分段,依次用水、80%乙醇、丙酮溶液洗脱,获得 3 个不同极性的组分 A、B、C;采用纸片扩散法对各个组分进行抗菌活性评价,筛选出九头狮子草的抗菌有效组分,并用试管稀释法测定有效组分的最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC);应用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对筛选出的有效组分中的成分进行定性、定量分析。结果表明:九头狮子草各组分均有不同程度的抗菌作用,其中大孔树脂柱层析丙酮洗脱部位(即组分 C)抗菌活性最强,从该有效组分中鉴定出 26 种成分,均为脂肪酸及其衍生物。因此脂肪酸及其衍生物是九头狮子草中的主要抗菌有效成分。

关键词:九头狮子草;抗菌活性;有效组分分析;GC-MS

Abstract: To determine the antibacterially effective fraction from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem. and to clarify its chemical components. The ethanol extract of *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem. was separated by macroporous resin column chromatography eluted with water, 80% ethanol and acetone, respectively, to give the fractions A-C. The *in vitro* antibacterial effects of the fractions were determined by the disc diffusion test. The anti-bacterial potencies of the active fraction was then assessed *in vitro* by determining the MICs and MBCs. The chemical structures and relative contents of the components present in the antibacterially effective fraction were determined by gas chromatography-mass spectrometry

基金项目:贵州省大学生创业基金(编号:T2010-22);贵州省科技厅贵州省优秀青年科技人才项目(编号:[2015]32号);贵州省科学技术基金(编号:黔科合基础[2017]1075)

作者简介:张丽娟,女,贵州理工学院讲师,硕士。

通信作者:廖尚高(1972—),男,贵州医科大学教授,博士。E-mail: lshangg@163.com

收稿日期:2017-09-20

(GC-MS). Each fraction from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem showed different levels of antibacterial activity with fraction C (the acetone fraction) being the most active fraction. Twenty-six compounds were identified by GC-MS in the effective fraction, these compounds are fatty acid and its derivatives. The fatty acid and its derivatives is the main antibacterially active ingredients in *Peristrophe japonica*.

Keywords: *Peristrophe japonica*; antibacterial activity; effective component analysis; GC-MS

九头狮子草[*Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem.]为爵床科(Acanthaceae)九头狮子草属(*Peristrophe* Nees)植物,别名辣叶青药、尖经药、咳风尖、晕病药等,其性味辛、凉,具有清肺泻火、消肿解毒的功能,在贵州省布依族民间广泛应用于小儿高热、小儿惊风等病症的治疗^[1]。以咽喉清喉片(贵州奥特药业)和甘果含片(浙江永宁制药厂)等为代表的具有抗菌、抗病毒、解热、抗炎作用的中药制剂,已在市场上获得了广泛认可。现代研究发现,九头狮子草以烷烃和甾醇类化合物为其主要成分,也含少量黄酮、木脂素类等化合物^[2-4],具有很好的解热镇痛^[5-6]、镇咳祛痰、杀菌止痒、抗炎、保肝、抗肝炎病毒^[7]等作用。罗忠圣^[8]、覃容贵等^[9-10]证实,九头狮子草的各种粗提物对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌均有较强的抑制作用。但迄今为止,九头狮子草抗菌活性的有效部位及其相关物质基础未见报道。本研究拟采用大孔树脂柱层析将九头狮子草 95%乙醇提取物分成了化学组成不同、极性差异较大的 3 个部位,分别对各部位进行抗菌活性评价,从中筛选出抗菌活性组分,再应用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术对该活性组分进行化学分析,以期为九头狮子草的抗菌药效物质基础研究及深度开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

九头狮子草:由贵阳医学院药用植物学及生药学教研室鉴龙庆德副教授鉴定,为 *Peristrophe japonica* (Thunb) Brem 的干燥全草;

标准菌株:大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、奇异变形杆菌(ATCC 35659);美国模式培养物集存库(ATCC);

MH 琼脂培养基、MH 肉汤培养基:杭州微生物试剂有限公司;

D101 大孔树脂:天津浩聚树脂科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

桌上式洁净工作台:HJ-VD-650 型,上海苏净实业有限公司;

电热恒温培养箱:HPX-9052MBE 型,上海博迅实业有限公司;

手提式压力蒸汽灭菌器:YXQ-SG46-280S 型,上海博迅实业有限公司;

GC-MS 联用仪:Agilent Technologies 7890A 型,美国安捷伦科技公司。

1.2 方法

1.2.1 组分制备 称取干燥九头狮子草全草 250 g,用 10 倍质量的 95%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h。合并滤液后浓缩得浸膏 18.0 g,D101 大孔树脂湿法上样,依次用水、80%乙醇、丙酮溶液洗脱,洗脱液分别浓缩至浸膏,得到大极性的组分 A、中极性的组分 B 以及小极性的组分 C。临用前取各组分低温冷冻干燥成粉末,再用二甲基亚砒配制成所需浓度。

1.2.2 有效组分筛选

(1) 菌悬液的制备:将供试菌株分别接种于 MH 琼脂平板,37 ℃培养 24 h 后,挑取平板上形态相同的菌落,用灭菌生理盐水校正菌液浓度至 2.40×10^{-5} mol/L。校正后的菌液均在 15 min 内接种^[11-12]。

(2) 纸片扩散法抑菌试验:用无菌棉签蘸取菌悬液,在琼脂表面均匀涂布。平板室温干燥 3~5 min 后,用无菌镊子将直径 6 mm 的无菌干燥滤纸片贴在已接种测试菌的琼脂表面,每块平板贴 4 片,并用移液枪吸取各组分溶液 1 μL,均匀添加在纸片上,每组分每供试菌平行重复 3 次试验。将平板置 37 ℃孵育 18~20 h 后观察结果,测定抑菌圈直径大小。用二甲基亚砒做阴性对照,庆大霉素(1 280 μg/mL)做阳性对照^[11-12]。

(3) MIC 及 MBC 的测定:采用试管 2 倍稀释法测定 MIC。取 15 支灭菌试管为一组。其中每组第 13、14、15 管分别标上肉汤对照、检测菌对照、溶剂对照。每支试管分别加入 MH 肉汤 2 mL。取抗菌活性最好的组分用 MH 肉汤稀释成 60 mg/mL 的药液。吸取 2 mL 60 mg/mL 的药液加入到第 1 管,混匀后吸取 2 mL 加入到第 2 管,以此类推,直至第 12 管。第 1~12 管的药物浓度分别为 60.00,30.00,15.00,7.50,3.75,1.88,0.94,0.47,0.24,0.12,0.06,0.03 mg/mL。

除肉汤对照管外,其余各管均加入菌液 0.1 mL,37 ℃培养 24 h 后,观察生长情况。在对照管符合要求的情况下,以无菌生长的最低稀释度为 MIC。在 MIC 测定的基础上,将未见细菌生长的各管培养物涡旋混匀后,分别吸取 0.1 mL 接种于 2 块 MH 固体培养基上,37 ℃培养 18 h。用活菌计数法测定平板上的菌落,平均数小于 5 个的最小稀释度的药物浓度即为 MBC。该试验重复 3 次,并以 1 280 μg/mL 为初始浓度的庆大霉素做阳性对照^[11-12]。

(4) 有效组分中化学成分的 GC-MS 分析:将样品用色谱甲醇溶解配制成 1 mg/mL 的待检品。色谱条件:色谱柱为 DB-17(30 m×250 μm×0.25 μm)弹性石英毛细管柱;进样口温度 230 ℃;程序升温:起始温度 70 ℃,以 20 ℃/min 速率升温至 230 ℃;分流比 1:1;进样量 1 μL;载气流量 2 mL/min;溶剂延迟 3.50 min。离子源:电子轰击源;以氦气为载气;离子源温度 230 ℃;四级杆温度 150 ℃;电子轰击能量 70 eV;电子倍增器电压 1 435 V;接口温度 230 ℃;扫描质量范围 m/z 30~800。运用 Agilent GC-MS 化学工作站对所获得数据进行数据处理,通过标准质谱库检索鉴定成分,按面积归一化法进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 九头狮子草各组分的抑菌活性

九头狮子草的各组分药液(60 mg/mL)对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及奇异变形杆菌均有不同程度的抑菌作用(见表 1),其中组分 C 对 4 种菌株抑制较为明显,为九头狮子草的主要抗菌有效组分。

表 1 九头狮子草各组分(60 mg/mL)的抑菌圈直径[†]
Table 1 Inhibition zone diameter of the fractions from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem (60 mg/mL) mm

组别	大肠埃希氏菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	奇异变形杆菌
A	8	8	7	8
B	7	8	8	7
C	23	26	20	24
庆大霉素	17	17	17	17
二甲基亚砒	—	—	—	—

† “—”表示溶剂空白无抑菌圈。

2.2 有效组分的 MIC 及 MBC 测定

九头狮子草组分 C 对各试验菌株的 MIC 及 MBC 测定结果见表 2。结果表明,组分 C 对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌抑菌作用较强,对铜绿假单胞菌抑菌活性稍弱。并且组分 C 的 MIC 均小于 MBC。

2.3 GC-MS 分析

通过优化条件,有效组分的主要色谱峰得到了较好的分离(见图 1)。定性、定量分析结果(见表 3)表明,有效组分 C 中主要含有十八烷酸等 26 种化合物,这 26 种化合物的含量占有效组分可测成分含量的 80.95%。其中棕榈酸含量最高(26.14%),其次是亚油酸(12.08%)、硬脂酸(8.84%)和油酸(6.48%)等。

表 2 九头狮子草组分 C 对各试验菌株的 MIC 及 MBC 测定结果

Table 2 MICs and MBCs of the fraction C from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem

组别	大肠埃希氏菌		金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		奇异变形杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
组分 C/(mg · mL ⁻¹)	15	30	15	30	30	60	15	30
庆大霉素/(μg · mL ⁻¹)	10	20	10	20	10	20	10	20

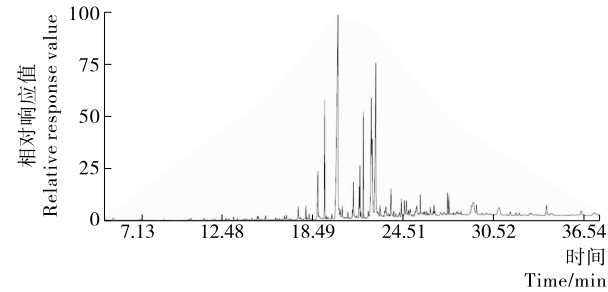


图 1 九头狮子草有效组分总离子流图

Figure 1 Total ion current chromatogram of the effective fractions from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem by GC-MS

表 3 九头狮子草有效组分中挥发性成分分析[†]

Table 3 Analysis result of volatile components in the effective fractions from *Peristrophe japonica* (Thunb.) Brem

t _R /min	化合物	相似度/%	相对含量/%
13.20	3-苯丙酸	99	0.17
14.84	2, 6-二叔丁基对甲酚	99	0.19
15.33	环癸酮	98	0.19
16.72	十四酸甲酯	97	0.25
17.50	十四烷酸	99	0.67
18.01	十五酸甲酯	99	0.57
18.80	十五烷酸	99	3.10
19.25	十六酸甲酯	99	4.49
20.13	棕榈酸	87	26.14
20.42	14-甲基十六烷酸甲酯	99	0.65
21.16	十七烷酸	95	1.82
21.55	十八碳酸甲酯	99	1.27
21.60	油酸甲酯	99	2.08
21.82	亚油酸甲酯	99	3.96
22.35	硬脂酸	99	8.84
22.41	油酸	98	6.48
22.65	亚油酸	98	12.08
22.92	α-亚麻酸	99	0.68
23.65	二十烷酸甲酯	98	1.63
24.35	花生酸	99	0.81
24.68	桐油酸	97	1.23
25.60	二十二酸甲酯	99	0.89
26.52	二十三酸甲酯	99	0.47
27.41	二十四酸甲酯	98	0.89
27.50	邻苯二甲酸二异辛酯	89	0.79
29.34	二十六酸甲酯	96	0.71

[†] 含量低于 0.15% 的成分未在表中列出。

3 结论

九头狮子草各组分均有不同程度的抗菌作用,其中大孔树脂柱层析丙酮洗脱部位抗菌活性最强(组分 C),对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及奇异变形杆菌均有一定的抗菌作用。GC-MS 分析表明,组分 C 中主要含有脂肪酸及其衍生物,与文献[13]报道的此类化合物具有较好的抗菌活性相一致。张希等[14]研究发现棕榈油酸、油酸、亚油酸等能有效抑制致病性大肠埃希氏菌 O157:H7 以及白色念珠菌的生长繁殖;Sun 等[15]通过比较脂肪酸及其单脂肪酸甘油酯对幽门螺旋杆菌的抑菌效果也发现,油酸和亚麻酸是抗菌作用最为有效的不饱和脂肪酸;Walters 等[16]发现亚油酸能有效抑制终极腐霉菌、立枯丝核菌、燕麦叶炫菌、可可丛枝病菌(植物病害菌)的生长;叶湘漓等[17]研究发现桉柑籽的主要成分为油酸、亚油酸、棕榈酸等,桉柑籽油具有调节动物血脂的作用。这些脂肪酸及其衍生物主要是作用于微生物细胞膜,引起电子传递链中断、氧化磷酸化解偶联、细胞内容物溶出,同时抑制胞内酶活性,减弱细胞对营养物质的吸收利用,并通过自身过氧化、自动氧化反应产生的 H₂O₂ 以及活性氧杀死细菌[18]。以上研究说明,以棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸等为主要成分的脂肪酸类化合物可能是组分 C 的主要抗菌药效物质,也可能是九头狮子草的主要抗菌活性成分。由于 GC-MS 仅能对组分中可挥发的成分进行分析,组分 C 的其它成分是否也与其抗菌作用相关,尚需进行进一步的研究。在后期研究中,可以将九头狮子草挥发性成分提取纯化后开发成新型食品防腐剂[19]。

参考文献

[1] 《中华本草》编委会. 中华本草: 第七卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 467.

[2] 皮慧芳, 杨希雄, 阮汉利, 等. 九头狮子草化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 1 011-1 013.

[3] 蒋小华, 谢运昌, 宾祝芳. GC-MS 分析九头狮子草挥发油的化学成分[J]. 广西植物, 2014, 34(2): 170-173.

[4] 何平, 陈琳, 赵超, 等. 九头狮子草研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 34(1): 239-241.

[5] 覃容贵, 范菊娣, 龙庆德, 等. 民族药九头狮子草解热有效部位的筛选[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(22): 1 797-1 800.

[6] 覃容贵, 范菊娣, 龙庆德, 等. 九头狮子草有效部位解热作用及其作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 211-214.

[7] 杨成雄, 潘朝旺, 王洪林. 九头狮子草水浸膏对 2.2.15 细胞中对 HBsAg、HBeAg 的分泌和 HBV DNA 复制的抑制作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(5): 294-296.

(下转第 46 页)

[5] ZHANG Yi, ZENG Hong-liang, WANG Ying, et al. Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects[J]. Food Chemistry, 2014, 155: 311-318.

[6] JIMINEZ J A, UWIERA T C, ABBOTT D W, et al. Impacts of resistant starch and wheat bran consumption on enteric inflammation in relation to colonic bacterial community structures and short-chain fatty acid concentrations in mice[J]. Gut Pathogens, 2016, 8(1): 67.

[7] 王蕾蕾, 何芳, 樊慧茹, 等. 高抗性淀粉大米血糖生成指数测定及对糖尿病患者血糖调控的干预研究[J]. 营养学报, 2017, 39(2): 197-199.

[8] KLOSTERBUER A S, THOMAS W, SLAVIN J L. Resistant starch and pullulan reduce postprandial glucose, insulin, and GLP-1, but have no effect on satiety in healthy humans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(48): 11 928-11 934.

[9] NICHENAMETLA S N, WEIDAUER L A, WEY H E, et al. Resistant starch type 4-enriched diet lowered blood cholesterols and improved body composition in a double blind controlled cross-over intervention[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(6): 1 365-1 369.

[10] 黄志强, 唐健, 白永亮, 等. 抗性淀粉及其防治肥胖症的研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 250-253.

[11] FUENTES-ZARAGOZA E, RIQUELME-NAVARRETE M J, SANCHEZ-ZAPATA E, et al. Resistant starch as functional ingredient: A review[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 931-942.

[12] SCHOLZ-AHRENS K E, ADE P, MARTEN B, et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure[J]. Journal of Nutrition, 2007, 137(3): 838-846.

[13] 朱平, 孔祥礼, 包劲松. 抗性淀粉在食品中的应用及功效研究进展[J]. 核农学报, 2015, 29(2): 327-336.

[14] 李昌文, 刘延奇, 李延涛. 怀山药淀粉性质研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(8): 23-26.

[15] 王丽霞, 王敬臻, 张金玲, 等. 长山山药淀粉的制备及性能[J]. 食品科学, 2017(9): 156-161.

[16] 宋洪波, 张丽芳, 安凤平, 等. 压热法制备淮山药抗性淀粉及其消化性[J]. 中国食品学报, 2014, 14(7): 59-65.

[17] 任广跃, 刘亚男, 乔小全, 等. 基于变异系数权重法对怀山药干燥全粉品质的评价[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 53-59.

[18] 张社利, 许文静, 张会菊, 等. 高效液相色谱法测定怀山药中的薯蓣皂苷元[J]. 理化检验: 化学分册, 2013, 49(1): 33-34, 38.

[19] ZHANG Li-jing, WANG Mao-shan. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 675-681.

[20] 赵喜亭, 宋志辉, 赵月丽, 等. 怀山药种栽质量分级标准研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2017, 45(3): 118-124.

[21] 李海兵, 周娜, 赵姣, 等. 怀山药种质资源的包埋玻璃化超低温保存与植株再生[J]. 植物学报, 2010, 45(3): 379-383.

[22] 刘树兴, 杨麒, 赵广蒙. 直链淀粉含量对小麦 RS3 型抗性淀粉得率的影响[J]. 食品科技, 2016(12): 226-231.

[23] 史苗苗, 高群玉. 抗性淀粉直链淀粉含量测定及消化性研究[J]. 食品工业科技, 2011(5): 105-107, 112.

[24] 曾红华. 抗性淀粉的理化性质及其益生效应[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2013; 20.

[25] 李光磊, 李新华. 抗性淀粉应用特性研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(6): 78-81.

[26] COOKE D, GIDLEY M J. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of the enthalpic transition[J]. Carbohydrate Research, 1992, 227: 103-112.

[27] 赵力超, 于荣, 刘欣, 等. 大米抗性淀粉制备工艺优化及特性分析[J]. 农业工程学报, 2013, 29(12): 277-285.

[28] KWEON M R, SHIN M S. Comparison of enzyme resistant starches forming during heat-moisture treatment and retrogradation of high amylose corn starches [J]. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 1997, 40(6): 508-513.

[29] 张丽芳, 宋洪波, 安凤平, 等. 淮山药淀粉及其抗性淀粉理化性质的比较[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 24-29.

[30] 杜双奎, 王华, 聂丽洁. 芸豆淀粉理化特性研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(8): 31-35.

(上接第 40 页)

[8] 罗忠圣, 周镁, 黄秀平, 等. 九头狮子草对小鼠的抑菌、止痒、抗炎作用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 555-557.

[9] 覃容贵, 李淑芳. 九头狮子草的抗菌作用研究[J]. 贵阳医学院院报, 2006, 25(2): 130-131.

[10] 覃容贵, 罗忠圣. 九头狮子草醇提物药效学的实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(9): 961-963.

[11] 陈奇, 卞如濂, 陈修. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 274.

[12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1 651.

[13] 张璐. 脂肪酸及其衍生物抑菌活性定量构效关系研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 53.

[14] 张希, 杨明, 宋飞. 脂肪酸及其衍生物的抑菌活性[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(2): 155-160.

[15] SUN C Q, OCONNOR C J, ROBERTON A M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against helicobacter pylori[J]. Fems Immunology & Medical Microbiology, 2003, 36(1/2): 9-17.

[16] WALTERS D, RAYNOR L, MITCHELL A, et al. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi[J]. Mycopathologia, 2004, 157(1): 87-90.

[17] 叶湘涓, 熊兴耀, 涂洪强, 等. 桉柑籽油的化学成分分析及其对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 62-64.

[18] DESBOIS A P, SMITH V J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 85(6): 1 629-1 642.

[19] 李燕, 戴佳锟, 马赛箭, 等. 天然食品防腐剂及其在鲜切果蔬中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 230-233.