

白及萃取物的抑菌活性及其二氯甲烷 萃取物化学成分分析

Antibacterial activity of fractions and chemical constituents analysis
of dichloromethane fraction from *Bletilla striata*

吴永祥¹ 程满怀² 江海涛¹ 侯书增¹ 万志兵¹

WU Yong-xiang¹ CHENG Man-huai² JIANG Hai-tao¹ HOU Shu-zeng¹ WAN Zhi-bing¹

(1. 黄山学院生命与环境科学学院, 安徽 黄山 245041; 2. 黄山学院分析测试中心, 安徽 黄山 245041)

(1. College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041, China;

2. Analysis and Test Center, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041, China)

摘要:采用甲醇回流提取、分级萃取获得正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物;以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌为受试菌,采用滤纸片扩散法与最小抑菌浓度(MIC)法,考察白及其各萃取物对4种受试菌的抑菌效果;采用气相色谱—质谱联用(GC-MS)法对抑菌活性最显著的萃取物进行化学成分分析。结果表明:白及的甲醇提取物、正己烷和二氯甲烷萃取物对4种受试菌均具有较好的抑菌效果,以二氯甲烷萃取物的抑菌活性最显著($P < 0.05$);二氯甲烷萃取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的抑菌圈直径与浓度呈正相关,其对4种受试菌的最小抑菌浓度均为2 mg/mL;通过GC-MS分析二氯甲烷萃取物的化学成分,共鉴定出11种化合物,占总峰面积量的94.16%,主要成分有2-甲基-3,4-苯并菲(39.97%)、高香兰酸乙酯(25.25%)、反式-4'-氟-4-甲硫基查耳酮(9.44%)、癸二酸二异辛酯(7.34%)和亚油酸(3.86%)等。故白及萃取物具有较好的抑菌活性,其中二氯甲烷萃取物的抑菌活性最显著,而高含量的芳香族、酯、有机酸类化合物可能是其抑菌活性的物质基础。

关键词:白及;二氯甲烷萃取物;抑菌;GC-MS

Abstract: *Bletilla striata* extracts were prepared by methanol circumfluence extraction. Five different polarity fractions were obtained by extraction in turn with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate,

n-butanol and water. The inhibiting effects on *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginos* were measured by using filter paper disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) method. The chemical constituents of the active fraction were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the methanol extract, n-hexane and dichloromethane fractions exhibited significant inhibition against four common bacterial strains. Dichloromethane fraction presented the best antibacterial effect than other fractions ($P < 0.05$). Dichloromethane fraction exerted potent inhibitory effects on *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginos* in a dose-dependent manner. Its MIC against four common bacterial strains was 2 mg/mL. Eleven compounds representing 94.16% of the total constituents were identified by GC-MS analysis. The main constituents of dichloromethane fraction were 2-methyl-3,4-benzophenanthrene (39.97%), ethyl homovanillate (25.25%), trans-4'-fluoro-4-(methylthio) chalcone (9.44%), dioctyl sebacate (7.34%), and linoleic acid (3.86%). In conclusion, *B. striata* fractions exerted potent antibacterial activity. Dichloromethane fraction was found to be the most active, and aromatic series, esters, organic acids might be potential bioactive components.

Keywords: *Bletilla striata*; dichloromethane fraction; antibacterial; GC-MS

基金项目:安徽省留学回国人员创新项目择优资助计划重点项目(编号:2017srst1);校企合作项目(编号:hxkt20170015, hxkt20170016);安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2017A398)

作者简介:吴永祥,男,黄山学院讲师,博士。

通信作者:万志兵(1980—),男,黄山学院教授,博士。

E-mail: wanzb626@hsu.edu.cn

收稿日期:2017-08-07

白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 又名白根、紫兰、地螺丝等,为兰科植物白及的干燥块茎。白及广泛分布于中国长江流域,主产于安徽、浙江、江苏、云南、四川等地,有很高的药用价值,具有补肺、收敛止血、消肿、生肌等功效,可用于治疗肺伤咳血、疮疡肿毒、外科创伤、胃及消化道溃疡疼痛等症状^[1-2]。现代药理研究表明:白及的主要化学成分是联苄类^[3]、菲类及其衍生物^[3]、多酚类^[4]、黄酮类^[5]、

多糖^[6]等,具有抗肿瘤^[7]、抗病毒^[8]、抗氧化^[9]、抗炎^[5]、抑制酪氨酸酶^[10]及促进创伤愈合^[11]等作用。国内外学者对白及的研究主要集中在多糖及其抗氧化方面^[6-7,9],对白及不同极性萃取物抑菌活性的研究仍然缺乏,关于白及活性成分分离与化学成分分析的研究尚未见报道。

随着对羟基苯甲酸丙酯(Propylparaben, PP)、苯甲酸、苯甲酸钠盐等食品防腐剂在食品工业的广泛应用,虽然在抑制微生物生长,防止食品品质劣变等方面有显著效果,但是这些人工合成的防腐剂对人体存在着潜在的危害,甚至引发癌症^[12-13]。研究开发安全、高效、天然抑菌剂的形势日趋紧迫。本研究以白及为原料,采用甲醇回流提取,并依次用正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水对其进行萃取,得到5种不同极性萃取物,探讨各萃取物的抑菌效果,采用GC-MS研究抑菌活性最显著萃取物的化学成分,挖掘白及作为新的抗菌药物的开发潜力,旨在为其在食品和药品方面的研究与应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

白及:2016年10月于安徽省黄山市祁门县采集;

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*):武汉大学微生物保藏中心;

蛋白胨、牛肉膏、琼脂等生物试剂:北京陆桥技术有限责任公司;

二甲基亚砜、甲醇、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等:分析纯,南京化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

气相色谱—质谱联用仪:Agilent HP7890-5975C型,美国Agilent公司;

全波长酶标仪:SpectraMax-190型,美国Molecular Devices公司;

旋转蒸发仪:EV341型,北京莱伯泰科仪器有限公司;

超纯水仪:Sartorius arium comfort II型,德国赛多利斯集团;

超净工作台:DL-CJ-1N型,北京东联哈尔仪器制造有限公司;

不锈钢立式电热蒸汽消毒器:YM50Z型,上海三申医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 白及各萃取物的制备 将新鲜白及洗净晾干,于60℃烘干至恒重,粉碎过80目筛,得白及粉末。称取白及粉末,按照料液比1:10(g/mL)加入甲醇,60℃恒温回流提取3h,重复3次,抽滤后经旋转蒸发浓缩,得到白及甲醇提取物。将甲醇提取物以1:10(g/mL)混悬于蒸馏水中,依次用等体积正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取3次,经旋转蒸发浓缩,真空冷冻干燥得到正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水层剩余物。

准确称取上述样品,用二甲基亚砜溶解,4℃保存备用。

1.2.2 菌种活化与菌悬液制备 将受试菌接种到新鲜斜面培养基上进行活化,37℃恒温培养24h。取活化好的菌种用生理盐水配置成浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL的菌悬液^[14-15],振荡摇匀,4℃保存待用。

1.2.3 滤纸片法测定各萃取物的抑菌作用 在超净工作台中,将灭菌好的培养基倒入培养皿,冷却凝固后,吸取制备好的菌悬液100μL于培养皿上,均匀涂布。用移液枪于无菌直径6mm的滤纸片中央加入10μL浓度为10mg/mL的白及各萃取物,以二甲基亚砜为空白对照组(control),以对羟基苯甲酸丙酯为阳性对照组(positive control, PP)。将处理好的培养皿倒置于37℃恒温培养箱中培养24h,培养后用游标卡尺采用十字交叉法测定抑菌圈直径(mm),结果重复3次,取平均值。

1.2.4 最小抑菌浓度测定 将白及的甲醇提取物、正己烷和二氯甲烷萃取物分别配制成2,5,10,15,20mg/mL不同浓度的样品溶液,然后参照文献^[16~17]的方法,观察各平板抑菌圈的有无,首次出现抑菌圈所对应的二氯甲烷萃取物的浓度即为MIC。

1.2.5 GC-MS化学成分分析 色谱条件:色谱柱为HP-5 MS(30m×0.25mm×0.25μm)的弹性石英毛细管柱;色谱柱初始温度60℃,保持3min,以5℃/min升至280℃,保持10min;载气为高纯氮气(99.999%),载气流速1.0mL/min;无分流进样,进样量0.5μL。质谱条件:离子源为EI,离子源温度230℃;四级杆温度150℃;电子能量70eV;质量扫描范围35~450amu;采用NIST08标准谱库进行检索。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计分析软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),利用Duncan's多重比较法分析样本间的差异显著性, $P<0.05$ 认为样本间具有显著性差异。所有试验重复3次,结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 白及不同极性萃取物的抑菌效果

由表1可知,除乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物无明显抑制作用外,白及的甲醇提取物、正己烷和二氯甲烷萃取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均有较强的抑制作用,以二氯甲烷萃取物的抑菌活性最显著($P<0.05$)。当二氯甲烷萃取物浓度为10mg/mL时,对受试菌的抑菌圈直径分别为大肠杆菌(13.00 ± 0.71)mm,金黄色葡萄球菌(10.13 ± 0.48)mm,枯草芽孢杆菌(12.75 ± 0.50)mm,绿脓杆菌(12.88 ± 0.25)mm。阳性对照组PP在浓度为1mg/mL条件下,对受试菌的抑菌圈直径分别为大肠杆菌(11.50 ± 0.82)mm,金黄色葡萄球菌(11.13 ± 0.48)mm,枯草芽孢杆菌(12.38 ± 0.25)mm,绿脓杆菌(12.00 ± 0.71)mm。由此可知,二氯甲烷萃取物和阳性对照PP对4种受试菌均具有显著的抑制作用,其中白及二氯甲烷萃取物对革兰氏阴性细菌的抑制效果优于革兰氏阳性细菌。

表 1 白及不同极性萃取物对 4 种菌的抑菌圈直径[†]

Table 1 Diameter of inhibitory zone of different polarity fractions of *B.striata* against four common bacterial strains mm

萃取物	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	绿脓杆菌
空白对照组	—	—	—	—
甲醇	9.88±1.03 ^c	8.75±0.50 ^c	9.50±0.41 ^b	10.88±0.63 ^c
正己烷	10.63±0.75 ^{bc}	9.25±0.50 ^c	9.75±0.96 ^b	11.75±0.29 ^b
二氯甲烷	13.00±0.71 ^a	10.13±0.48 ^b	12.75±0.50 ^a	12.88±0.25 ^a
乙酸乙酯	—	—	—	9.75±0.29 ^d
正丁醇	—	—	—	—
水	—	—	—	—
PP	11.50±0.82 ^b	11.13±0.48 ^a	12.38±0.25 ^a	12.00±0.71 ^b

[†] 萃取物浓度为 10 mg/mL;同列不同上标字母表示在统计学上具有显著差异(P<0.05)。

2.2 白及活性萃取物的最小抑菌浓度

为了定量研究白及活性萃取物对食品中常用菌的抑制效果,本试验进一步测定了其最小抑菌浓度(MIC),其中不同浓度的甲醇提取物、正己烷和二氯甲烷萃取物对 4 种受试菌的抑制效果见图 1。由图 1 可知,白及活性萃取物对 4 种受试菌的抑菌圈直径与浓度呈显著正相关,在 2~20 mg/mL 时,二氯甲烷萃取物对绿脓杆菌的抑菌圈直径分别为 (10.88±0.48), (12.13±1.31), (12.88±0.25), (13.75±0.65), (14.00±0.41) mm。白及甲醇提取物对大肠杆菌、绿脓杆菌的 MIC 为 2 mg/mL,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 为 5 mg/mL;正己烷萃取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的 MIC 为 2 mg/mL,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 5 mg/mL;二氯甲烷萃取物对 4 种受试菌的 MIC 均为 2 mg/mL。表明白及活性萃取物抑菌作用排序为二氯甲烷萃取物>正己烷萃取物>甲醇提取物。

2.3 白及二氯甲烷萃取物化学成分的 GC-MS 分析

采用 GC-MS 对白及不同极性萃取物中抑菌作用最显著的二氯甲烷萃取物进行化学成分分析,得到二氯甲烷萃取物化学成分的总离子流图,结果见图 2。各组分峰用 NIST08 质谱库进行检索,从二氯甲烷萃取物中共鉴定出 11 种化合物,占总峰面积量的 94.16%。鉴定匹配度高于 80%的化学成分,按峰面积归一化法计算出各化学成分的相对含量,结果见表 2。二氯甲烷萃取物含有芳香族、酯、酮、有机酸、醇类等多种成分,以芳香族、酯、酮、有机酸类为主,其中含有 4 种芳香族化合物(42.85%)、3 种酯类化合物(35.11%)、2 种酮类化合物(11.70%)、1 种有机酸(3.86%)。二氯甲烷萃取物中含量较高成分有 2-甲基-3,4-苯并菲(39.97%)、高香兰酸乙酯(25.25%)、反式-4'-氟-4-甲硫基查耳酮(9.44%)、癸二酸二异辛酯(7.34%)和亚油酸(3.86%)等。

3 结论

经过以上试验可知,除乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物无明显抑制作用外,白及的甲醇提取物、正己烷和二氯甲烷萃取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均具有较强的抑制作用,且随着萃取物浓度的增加,其抑菌作用不断增强。二氯甲烷萃取物的抑菌活性最显著,其对

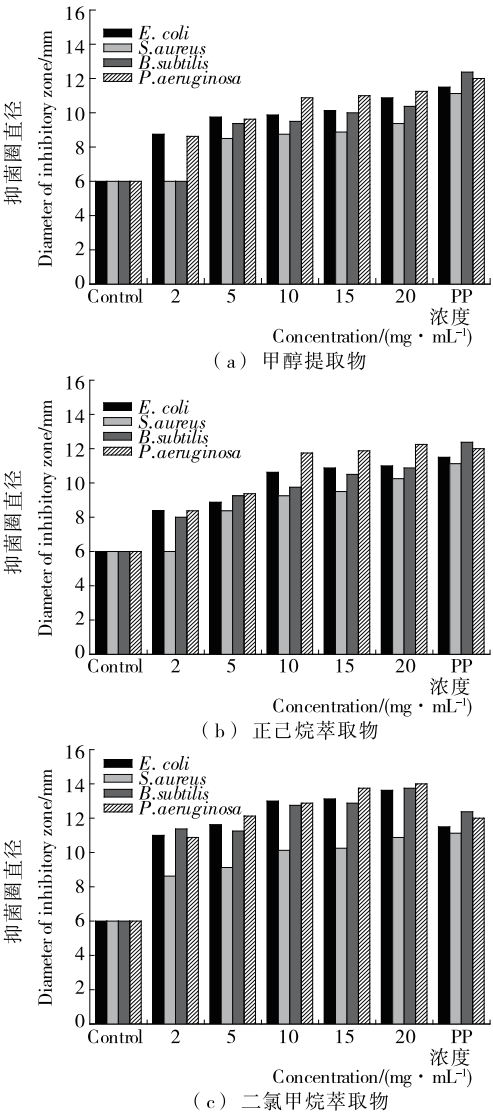


图 1 白及活性萃取物对 4 种菌的抑菌圈直径
Figure 1 Diameter of inhibitory zone of active fractions of *B.striata* against four common bacterial strains

4 种受试菌的最小抑制浓度均为 2 mg/mL。GC-MS 分析结果显示,二氯甲烷萃取物的主要化学成分以芳香族、酯、酮、有机酸类化合物为主,其中含量较高成分有 2-甲基-3,4-苯并

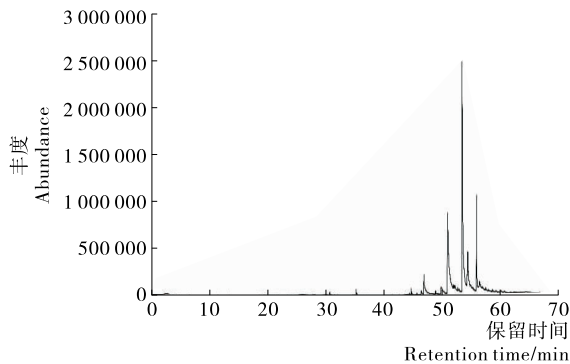


图 2 白及二氯甲烷萃取物的 GC-MS 总离子流图

Figure 2 Total ion chromatogram of dichloromethane fraction of *B.striata*

表 2 白及二氯甲烷萃取物的化学成分及其相对含量

Table 2 Chemical constituents and relative contents of dichloromethane fraction of *B.striata*

序号	保留时间/min	化合物	相对含量/%
1	30.628 3	2,4-二叔丁基苯酚	0.27
2	35.157 9	β -桉叶醇	0.64
3	46.827 2	亚油酸	3.86
4	49.805 5	4-甲氧基苯基磷酸二乙酯	2.52
5	50.889 9	高香兰酸乙酯	25.25
6	51.507 3	4-乙基-2-甲氧基苯酚	1.75
7	53.390 8	2-甲基-3,4-苯并菲	39.97
8	54.091 3	3-甲基-3,4-苯并菲	0.86
9	54.371 5	反式-4'-氟-4-甲硫基查耳酮	9.44
10	55.886 5	癸二酸二异辛酯	7.34
11	56.348 3	5,6,7,8-四氢-2-甲氧基-5,5-二甲基萜-1,4-二酮	2.26

菲(39.97%)、高香兰酸乙酯(25.25%)、反式-4'-氟-4-甲硫基查耳酮(9.44%)、癸二酸二异辛酯(7.34%)和亚油酸(3.86%)等。研究^[18-19]发现高香兰酸乙酯、亚油酸等化合物能够有效地抑制微生物的生长。二氯甲烷萃取物中高含量的芳香族、酯、有机酸类化合物可能是其抑菌活性的物质基础^[20-21],但未知的是哪种或哪几种成分发挥主要作用,需进一步分离纯化,以筛选出更加明确有效的抑菌活性成分。本研究表明白及二氯甲烷萃取物有一定的药学研究价值和作为天然食品防腐抑菌剂的潜能。

参考文献

[1] 孙爱静, 庞素秋, 王国权. 中药白及化学成分与药理活性研究进展[J]. 环球中医药, 2016, 9(4): 507-511.

[2] HE Xi-rui, FANG Jia-cheng, WANG Xiao-xiao, et al. *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 195: 20-38.

[3] 马先杰, 崔保松, 韩少伟, 等. 中药白及的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1 578-1 584.

[4] WANG Li-ning, HE Yong-zhi, ZHAO Qi-duo, et al. Phenolic compounds from *Bletilla striata* [J]. Journal of Asian Natural

Products Research, 2017, 19(10): 981-986.

[5] BAE J Y, LEE J W, JIN Q H, et al. Chemical constituents isolated from *Bletilla striata* and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264.7 cells[J]. Chemistry & Biodiversity, 2017, 14(2): 1-5.

[6] QU Yan, LI Chun-xue, ZHANG Chen, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 345-353.

[7] 罗仕华, 郑传胜, 黎维勇, 等. 白及多糖体外抗肿瘤实验研究[J]. 中成药, 2014, 36(1): 165-168.

[8] SHI Ya, ZHANG Bing, LU Yi-yu, et al. Antiviral activity of phenanthrenes from the medicinal plant *Bletilla striata* against influenza A virus [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 273-286.

[9] 肖雄, 唐健波, 姚佳, 等. 白芨不同极性提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 山地农业生物学报, 2013, 32(2): 146-149.

[10] 韩莹, 张岩, 王兴焱, 等. 白芨水提物对黑素瘤与角质形成细胞共培养模型黑素合成的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39(1): 77-79.

[11] SONG Yi, ZENG Rui, HU Ling-li, et al. *In vivo* wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 93: 451-461.

[12] OISHI S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system [J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(12): 1 807-1 813.

[13] SAATCI C, ERDEM Y, BAYRAMOV R, et al. Effect of sodium benzoate on DNA breakage, micronucleus formation and mitotic index in peripheral blood of pregnant rats and their newborns[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016, 30(6): 1 179-1 183.

[14] 吴永祥, 王祥, 江海涛, 等. 不同极性柳叶蜡梅叶萃取物总酚含量及其抗氧化、抑菌能力研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(8): 150-154.

[15] 李钟美, 黄和. 高良姜提取物抑菌活性及稳定性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 55-59.

[16] 吴永祥, 杨庆, 李林, 等. 豆腐柴叶挥发油化学成分及其抗氧化和抑菌作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 45-51.

[17] 杨柳, 陈宇飞. 番茄茎叶提取物抑菌试验[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 126-128.

[18] NYAITONDI O D. Anti-bacterial properties and GC-MS analysis of extracts and essential oils of selected plant products [D]. Kenya: Kenyatta University, 2013: 73.

[19] CHOI J S, PARK N H, HWANG S Y, et al. The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens[J]. Journal of Environmental Biology, 2013, 34(4): 673-676.

[20] YOSHIKAWA K, KOKUDO N, TANAKA M, et al. Novel abietane diterpenoids and aromatic compounds from *Cladonia rangiferina* and their antimicrobial activity against antibiotics resistant bacteria [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 56(1): 89-92.

[21] 邱松山, 姜翠翠, 周如金, 等. 反丁烯二酸酯类物质结构与抑菌性能关系[J]. 化工进展, 2016, 35(3): 879-883.