

白骨壤果实抗菌活性部位筛选及低极性成分 GC-MS 分析*

Antibacterial Activities Evaluation and GC-MS Analysis of the Low Polar Components from the Fruits of *Avicennia marina* (Forsk) Vierh

孙雪萍¹, 徐 艳², 刘布鸣¹

SUN Xueping¹, XU Yan², LIU Buming¹

(1. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022;
2. 广西壮族自治区海洋研究所海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:【目的】研究白骨壤 *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. 果实的抗菌活性部位及其有效成分。【方法】以 6 株致病菌为抗菌活性部位筛选模型, 采用有机溶剂萃取法将白骨壤果实的乙醇提取物分为石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相等不同极性部位, 通过测定抑菌圈直径(Diameter of inhibition zone, DIZ)和最小杀菌浓度(Minimum bactericidal concentration, MBC)进行抗菌活性研究, 并采用 GC-MS 技术对经过甲酯化后的石油醚相进行化学成分分析。【结果】白骨壤果实乙醇提取物的石油醚相对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和藤黄八叠球菌 3 株指示菌株表现出一定的抑菌活性; 从白骨壤果实石油醚相中鉴定出 19 个化合物, 主要为脂肪类, 均为首次从白骨壤果实中鉴定出。【结论】白骨壤果实石油醚相具有良好的抗菌活性, 其中的脂肪酸类是主要抗菌活性物质。

关键词: 白骨壤果实 抗菌活性 石油醚相 GC-MS

中图分类号: Q949.761.7, R282.77 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2016)04-0245-05

Abstract: 【Objective】The antibacterial fractions and constituents of the fruits of *Avicennia marina* were screened. 【Methods】The antibacterial activities of the ethanolic extract and organic fractions of the fruits of *Avicennia marina* from the South China Sea were evaluated by diameter of inhibition zone (DIZ) and the minimum bactericidal concentration (MBC). And the low-polar compounds in the petroleum ether fraction were also analysed by GC-MS after methyl esterification. 【Results】The petroleum ether fraction showed antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus*. And 19 compounds

were firstly identified from the fruits of *Avicennia marina* by GC-MS, most of which were lipids. 【Conclusion】It was proposed that lipids should be the main antibacterial substances in the petroleum ether fraction of the fruits of *Avicennia marina*.

Key words: fruits of *Avicennia marina*, antibacterial activity, petroleum ether fraction, GC-MS

收稿日期: 2016-04-18

作者简介: 孙雪萍(1982—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药用生物资源研究。

* 广西中药质量标准研究重点实验室自主研究课题(桂中重系 201509) 和广西自然科学基金资助项目(2016GXNSFBA380011)资助。

0 引言

【研究意义】红树植物白骨壤 *Avicennia marina* (Forsk) Vierh., 又名海榄雌^[1], 为马鞭草科 Verbenaceae 白骨壤属 *Avicennia*。该属植物我国只有一种, 主要分布于福建、广东、广西、海南 4 省及台湾、香港、澳门地区沿海有红树林生长的滩涂。白骨壤果实俗称“榄钱”、“海豆”, 味甘、微苦、性凉, 具有清热、利尿、凉血败火的功效, 是降压通血管的民间食疗植物^[2]。白骨壤果实全国年产量在 30 万 t 以上, 是一种尚未规模开发利用的食用、保健和药用新资源^[3], 具有较高的学术研究价值和开发利用价值。**【前人研究进展】**白骨壤果实含有丰富的营养成分^[4], 并含有酚苷类^[5-6]和生物碱类等^[7]化合物。7 种溶剂的白骨壤果实提取液显示出一定的自由基清除能力^[3]。黄丽莎等^[1]对白骨壤果实精油化学成分进行了 GC-MS 分析。高秀梅等^[8]研究发现白骨壤果实的水提物属实际无毒级物质。熊拯等^[9]发现白骨壤种子总黄酮对大豆油有一定的抗氧化效果, 且具有量效关系。**【本研究切入点】**目前国内外主要是对红树植物枝叶部分化学成分进行研究^[2, 10-14], 对白骨壤果实缺乏系统充分的药效物质基础研究。**【拟解决的关键问题】**对白骨壤果实的乙醇提物以及不同极性部位进行抗菌活性检测, 研究白骨壤果实对 6 株致病菌的抑制活性, 并应用 GC-MS 技术对活性部位石油醚相浸膏进行甲酯化后的化学成分分析, 为进一步研究白骨壤果实药效物质奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

白骨壤果实样品于 2014 年 8 月采自广西北海, 由海南东寨港国家级红树林自然保护区管理局钟荣才副教授鉴定。

5 株人体致病菌指示菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、和藤黄八叠球菌 (*Micrococcus luteus*); 1 株海洋致病菌: 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)。菌株均为海南师范大学化学化工学院郑彩娟副教授赠送。

LB 液体培养基和 LB 平板: 根据文献^[15]进行制备。

药品与仪器: 甲醇、乙醇、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯、二甲基亚砜 (DMSO)、氢氧化钾、无水硫酸钠

等均为国产分析纯; Thermo Trace GC ultra DSQ II 色质联用仪 (Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 供试样品的制备

鲜白骨壤果实 (1.5 kg), 经 95% 乙醇 (V/V) 超声波提取 5 次, 每次 30 min, 浓缩提取液得浸膏 69.0 g, 浸膏用水混悬后, 分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 减压浓缩后得到石油醚相 (28.0 g), 乙酸乙酯相 (13.0 g), 正丁醇相 (17.0 g), 剩余水相蒸干得浸膏 (5.5 g)。

1.2.2 初筛

初筛采用纸片扩散法 (Disk-diffusion method)^[16-17] 测试抑菌圈直径 (Diameter of inhibition zone, DIZ, mm)。

1.2.3 最小杀菌浓度的测定

采用试管稀释法 (Tube dilution method)^[18-19] 测定初筛有活性的样品的最小杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC, mg/mL)。

1.2.4 甲酯化处理

取石油醚相浸膏 1 g, 置于 50 mL 具塞烧瓶中, 加石油醚 20 mL 使其溶解, 加 0.4 mol/L KOH-CH₃OH 溶液 10 mL 摇匀, 置于 40℃ 恒温水浴 1 h, 加入 20 mL 蒸馏水摇匀, 静置待分层清晰后取上层清液, 经无水硫酸钠脱水, 过滤, 滤液作为供试品溶液。

1.2.5 GC-MS 分析

Thermo Trace GC ultra DSQ II 色质联用仪, 色谱柱: VF-5MS (30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm); 进样量 1.0 μL, 溶剂延迟 2.00 min; 分流比为 50 : 1; 载气为高纯 He, 流速为 1.0 mL/min; 石油醚相的升温程序: 50℃ 保持 2 min, 以 5℃/min 升至 130℃, 保持 5 min, 再以 5℃/min 升至 300℃, 保持 10 min。电离源 EI; 电子能量 70 eV; 操作系统: Xcalibur; 谱库 NIST02。

2 结果与分析

2.1 5 种提取物的抑菌活性

白骨壤果实 5 种提取物对指示菌株的抑菌作用表现不同 (表 1 和表 2)。白骨壤果实乙酸乙酯相对 6 株指示菌株表现出较好的抑菌活性; 石油醚相对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和藤黄八叠球菌 3 株指示菌株表现出一定的抑菌活性; 正丁醇相对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌 3 株指示菌株抑菌活性较弱; 乙醇提取物对 4 株指示菌株表现

表 1 不同提取物的抗菌活性

Table 1 The antimicrobial activity of different extracts against various bacteria

样品 Sample	指示菌株抑菌圈直径 DIZ of indicator strain(mm)					
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	藤黄八叠球菌 <i>M. luteus</i>
乙醇提取物 Ethanol extract	7	—	7	7	—	6.5
石油醚相 Petroleum ether fraction	8	—	—	8	—	7
乙酸乙酯相 Ethyl acetate fraction	8	8	8	8	7	8
正丁醇相 n-Butanol fraction	7	7	8	—	—	—
水相 Aqueous phase	—	—	—	—	—	—

注:抑菌圈直径以平均值表示;“—”表示无活性

Note:DIZ expresses in average;“—”means no activity

表 2 白骨壤果实乙醇提取物及各相的最小杀菌浓度

Table 2 The MBC of different extracts against various bacteria

样品 Sample	指示菌株最小杀菌浓度 (MBC, mg/mL)					
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	藤黄八叠球菌 <i>M. luteus</i>
乙醇提取物 Ethanol extract	>100	/	>100	100	/	100
石油醚相 Petroleum ether fraction	50	/	/	50	/	50
乙酸乙酯相 Ethyl acetate fraction	25	50	50	50	50	25
正丁醇相 n-Butanol fraction	>100	>100	100	/	/	/

注:“>100”表示最小杀菌浓度大于 100 mg/mL;“/”表示未测

Note:“>100” means MBC>100 mg/mL;“/” means not detect

出一定的抑菌活性;水相对指示菌株没有明显的抑菌活性。由此可见,白骨壤果实乙酸乙酯相的抑菌效果最好,其次是石油醚相。

2.2 石油醚相甲酯化后的 GC-MS 分析

在本实验中,利用 GC-MS 技术探讨石油醚相中抗菌活性物质的组成。对经甲酯化处理后的石油

醚相进行 GC-MS 分析,得到白骨壤果实石油醚相总离子流谱(图 1),对各峰通过 Xcalibur 工作站 NIST 标准质谱图库进行检索,用峰面积归一化法计算出各组分的相对百分含量,共鉴定出 19 个化合物,占石油醚相总峰面积的 77.22%(表 3)。石油醚相中主要为低级

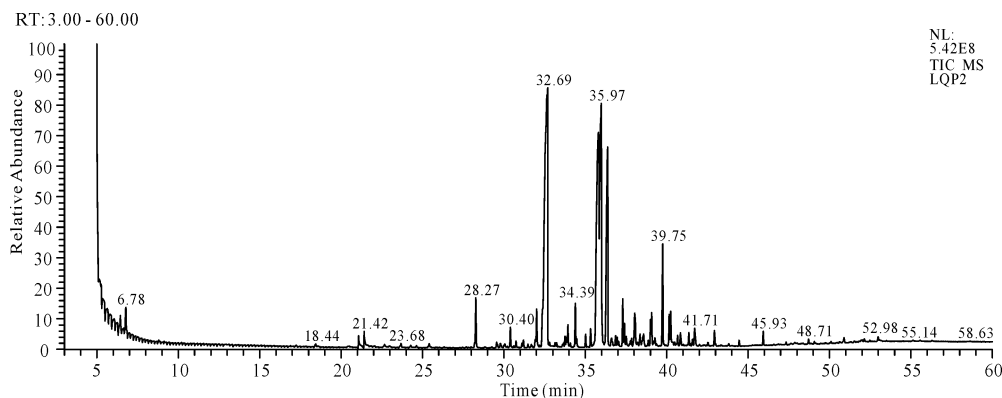


图 1 白骨壤果实石油醚相气质分析总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion current figure of petroleum ether extract from the fruits of *Avicennia marina*

表3 白骨壤果实石油醚相中低极性化合物 GC-MS 分析

Table 3 GC-MS analysis of low-polar compounds in the petroleum ether fraction from the fruits of *A. marina*

序号 No.	保留时间 (RT min)	化合物 Compound	相对质量分数 Relative content(%)
1	18.44	异十六烷 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-nonane	0.18
2	20.49	2-苯基丙烯酸甲酯, methyl 2-phenylprop-2-enoate	0.13
3	22.67	1,1,1-三氟-5-甲基-2,4-二庚酮 1,1,1-trifluoro-5-methyl-2,4-heptanedione	0.17
4	23.68	癸酸甲酯 Decanoic acid methyl ester	3.06
5	24.28	壬二酸二甲酯 Nonanedioic acid dimethyl ester	0.13
6	28.27	十一烷酸甲酯 Undecanoic acid methyl ester	3.75
7	29.56	1-乙酰基-2,7-萘二酚 1-acetyl-2,7-naphthalenediol	0.24
8	31.69	14-甲基十五烷酸甲酯 14-methyl-pentadecanoic acid methyl ester	0.13
9	32.01	(Z)-十六烯酸甲酯 Methyl palmitoleate	1.30
10	32.66	棕榈酸甲酯 Methyl hexadecanoate	23.00
11	33.93	11-棕榈烯酸甲酯 15-methyl-11-hexadecenoic acid methyl ester	1.30
12	35.03	2-甲基-4-三甲基硅基-1-丁烯-3-炔 2-methyl-4-trimethylsilyl-1-buten-3-yne	0.32
13	35.96	反油酸甲酯 Methyl trans-9-octadecenoate	30.30
14	36.35	硬脂酸甲酯 Methyl stearate	9.30
15	37.30	棕榈酸丁酯 Butyl hexadecanoate	1.20
16	38.08	癸酸甲酯 Methyl n-caprate	1.50
17	40.67	硬脂酸丁酯 Butyl stearate	0.28
18	41.71	三甲基苯氧基硅基 Trimethyl(phenoxy)-silane	0.82
19	47.34	10-甲基-月桂酸甲酯 10-methyl-dodecanoic acid methyl ester	0.11

性化合物,其中脂肪酸类化合物占总比重的74.06%,主要成分有油酸甲酯(30.30%)、饱和的及不饱和的棕榈酸甲酯(共26.60%)、硬脂酸甲酯(9.30%)、十一酸甲酯(3.75%)和癸酸甲酯(3.06%)等。

3 结论

抗菌实验结果显示,白骨壤果实石油醚相对其中3株菌都有一定的抑制活性,最小杀菌浓度为50 mg/mL。乙酸乙酯相浸膏抗菌活性也较好,有进一步对其做活性物质基础研究的必要性。油醚相甲酯化处理后进行GC-MS分析,共鉴定出19个化合物,为首次从白骨壤果实中鉴定出,其中油酸和棕榈酸占50%以上。石油醚相中鉴定出的油酸可以调节血脂、预防肿瘤、改善记忆等,棕榈酸可以抑制胰岛葡萄糖转运蛋白2、胰岛素、胰腺十二指肠同源异型盒因子1和rRNA的表达,显著改善对胰岛的脂毒性作用^[20]。研究白骨壤果实的营养价值和药理活性,对开发相关产品的高值化利用,提升红树林的经济价值具有重大的现实意义。

参考文献:

[1] 黄丽莎,朱峰,黄美珍.白骨壤果精油化学成分 GC/MS 分析[J].精细化工,2009,26(3):255-257.
HUANG L S,ZHU F,HUANG M Z. GC/MS analysis

of the chemical constituents of the essential oil from the fruits of *Avicennia marina* [J]. Fine Chemicals, 2009,26(3):255-257.

- [2] 贾睿,郭跃伟,侯惠欣.中国红树林植物白骨壤化学成分的研究[J].中国天然药物,2004,2(1):16-19.
JIA R,GUO Y W,HOU H X. Studies on the chemical constituents from leaves of *Avicennia marina* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines,2004,2(1):16-19.
- [3] 杨维,夏杏洲,韩维栋,等.白骨壤果实7种溶剂提取液的自由基清除作用[J].食品工业科技,2011,32(6):102-104,106.
YANG W,XIA X Z,HAN W D, et al. Free radical scavenging activity of seven different extracts from the fruits of *Avicennia marina* [J]. Science and Technology of Food Industry,2011,32(6):102-104,106.
- [4] 韩维栋,黄剑坚,蔡俊欣.白骨壤果实的营养成分及含量[J].林业科技,2007,32(3):51-52.
HAN W D,HUANG J J,CAI J X. The contents of fruit nutrient components of *Avicennia marina* [J]. Forestry Science & Technology,2007,32(3):51-52.
- [5] 谢文佩,高程海,易湘茜,等.红树白骨壤果实中酚苷类化学成分研究[J].广西植物,2014,34(3):398-401.
XIE W P,GAO C H,YI X X, et al. Study on phenolic glycosides from fruit of the mangrove plant *Avicennia marina* [J]. Guihaia,2014,34(3):398-401.
- [6] 易湘茜,谢文佩,颜栋美,等.白骨壤果实中抗氧化活性成分研究[J].广西科学院学报,2014,30(4):253-256.

- YI X X, XIE W P, YAN D M, et al. Antioxidative chemical constituents from the fruits of *Avicennia marina* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2014, 30(4): 253-256.
- [7] 高程海, 张荣灿, 许铭本, 等. 红树白骨壤果实中生物碱类化学成分研究[J]. 广西科学院学报, 2014, 30(2): 104-106.
- GAO C H, ZHANG R C, XU M B, et al. Alkaloids from the mangrove *Avicennia marina* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2014, 30(2): 104-106.
- [8] 高秀梅, 韩维栋, 于增杰. 白骨壤果实水提物的急毒试验及致突变性评价[J]. 林业科技开发, 2008, 22(4): 98-99.
- GAO X M, HAN W D, YU Z J. Urgent toxicity testing, and the evaluation of mutagenicity of aqueous extract from the fruit of *Avicennia marina* [J]. China Forestry Science and Technology, 2008, 22(4): 98-99.
- [9] 熊拯, 钟秋平, 林美芳, 等. 白骨壤种子中总黄酮的提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 81-84.
- XIONG Z, ZHONG Q P, LIN M F, et al. Extraction technology and antioxidation of total flavonoids from mangrove plant *Avicennia marina* seed [J]. Food Research and Development, 2012, 33(8): 81-84.
- [10] BANDARANAYAKE W M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants [J]. Wetlands Ecology and Management, 2002, 10(6): 421-452.
- [11] SHARAF M, EL-ANSARI M A, SALEH N A M. New flavonoids from *Avicennia marina* [J]. Fitoterapia, 2000, 71: 274-277.
- [12] ANJANEYULU A S R, RAO V L. Five diterpenoids (agallochins A-E) from the mangrove plant *Excoecaria agallocha* Linn [J]. Phytochemistry, 2000, 55(8): 891-901.
- [13] BANDARANAYAKE W M. Traditional and medicinal uses of mangroves [J]. Mangroves and Salt Marshes, 1998, 2(3): 133-148.
- [14] 郭先霞, 陶震, 宋文东. 红树植物白骨壤树叶挥发油化学组成特点及气相色谱/质谱分析 [J]. 热带海洋学报, 2008, 27(1): 57-59.
- GUO X X, TAO Z, SONG W D. Characteristics of chemical constituents of volatile oil from leaves of mangrove plant *Avicennia marina* by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2008, 27(1): 57-59.
- [15] 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2008: 1932.
- HUANG P T, WANG J X, ZHU H C. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd edition. Beijing: Science Press, 2008: 1932.
- [16] ESPINEL-LNGROFF A, WHITE T, PFALLER M A. Antifungal Agents and Susceptibility Tests. Manual of Clinical Microbiology [M]. 7th edition. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 1640-1652.
- [17] BARRY A L, COYLE M B, THORNSBERRY C, et al. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer - Kirby disk susceptibility test [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1979, 10(6): 885-889.
- [18] SYDNEY M M, FINEGOLD M D, ELLEN BARON J O. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology [M]. 7th edition. St Louis: Mosby, 1986: 176.
- [19] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 248.
- FANG Z D. Methodology for Plant Pathology [M]. 3rd edition. Beijing: China Agricultural Press, 1998: 248.
- [20] 张丽, 高聆, 梁军, 等. 棕榈酸对胰岛的脂毒性及非诺贝特的保护作用 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21(2): 155-158.
- ZHANG L, GAO L, LIANG J, et al. Lipotoxicity of palmitic acid on islets and protecting effect of fenofibrate [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2005, 21(2): 155-158.

(责任编辑: 陆 雁)