

美洲大蠊乙酸乙酯提取物的分离和抑菌活性分析

王奎, 冯颖*, 孙龙, 何钊, 陈智勇

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室 云南 昆明 650224)

摘要: 采用活性追踪法和柱层析法,以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等 5 种细菌为供试菌种,对美洲大蠊乙酸乙酯提取物进行分离和抑菌试验。研究发现:美洲大蠊乙酸乙酯提取物对供试的革兰氏阳性菌具有一定的抑制作用,其中,对枯草芽孢杆菌的抑菌活性最好;经硅胶柱层析初分离后,从乙酸乙酯提取物获得了 9 个具有抑菌活性的组分,其中组分 Fr7 对 5 种供试菌均显示了较好的抑菌活性;组分 Fr7 及其相邻组分 Fr8 经硅胶和凝胶柱层析进一步分离纯化后,得到了 7 个具有抑菌活性的不饱和脂肪酸类化合物,均对藤黄微球菌表现出最好的抑菌活性。结果表明:美洲大蠊乙酸乙酯提取物的抑菌活性物质为不饱和脂肪酸类化合物,对供试的革兰氏阳性菌的抑菌活性较强。

关键词: 美洲大蠊; 乙酸乙酯提取物; 抑菌活性; 不饱和脂肪酸

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

Isolation of Ethyl Acetate Extract from *Periplaneta americana* and Its Antimicrobial Activity

WANG Kui, FENG Ying, SUN Long, HE Zhao, CHEN Zhi-yong

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resources Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Antimicrobial chemical components, which isolated from the ethyl acetate extract of *Periplaneta americana* L., were tested for the ability to inhibit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc., based on bioassay-guided method. The results indicated that the ethyl acetate extract of *P. americana* showed some inhibiting effects to all gram-positive bacteria tested, and the best inhibition effect was against *Bacillus subtilis*. Nine factions were obtained after silica gel column chromatography. Among them, the faction Fr7 showed inhibiting effects to all bacteria tested. Applying the isolation method of silica gel column and gel chromatography, seven unsaturated fatty acids compounds were isolated from the faction Fr7 and Fr8. All these compounds showed the best inhibiting effects against *Micrococcus luteus*. The results suggested that unsaturated fatty acids were antimicrobial chemical components of the ethyl acetate extract from *P. americana*. The inhibition effects of the unsaturated fatty acids against gram-positive bacteria were stronger than against gram-negative bacteria.

Key words: *Periplaneta americana*; ethyl acetate extract; antimicrobial activity; unsaturated fatty acid

昆虫是动物界中最大的类群,长期的进化形成了一套高效快速抵抗各种病原菌的本领,是寻找新型抗菌物质的重要来源之一。除研究最为广泛的抗菌肽^[1],昆虫体内还有众多的小分子代谢产物具有抗菌活性。Zhengwei 等^[2]在长白山红蚁(*Tetramori-*

um sp.) 的抗菌物质研究中获得了 2 个新的具有抑菌活性的香豆素类化合物。Jae Yoon Leem 等^[3]从帕克阿扁叶蜂(*Acantholyda parki* Shinohara and Byun) 中分离得到的对羟基肉桂醛表现出了广谱的抗菌活性。李蕾等^[4]在云南琵琶甲(*Balaps japonen-*

收稿日期: 2012-11-23

基金项目: 国家林业局“西南特色昆虫资源及经济树种种质资源收集保存与良种繁育基地建设”项目

作者简介: 王奎(1985—),男,河北保定人,硕士研究生,主要从事药用昆虫活性成分研究。

* 通讯作者。

sis yunnanensis Mars.) 的抑菌化学成分研究中得到的 2-甲基-4-苯二醇和对苯二酚具有广谱抗菌活性。Stephen 等^[5]对澳大利亚白蚁(*Nasutitermes triodiae*) 的抗菌物质进行了研究,发现了一族具有抗菌活性且骨架新奇的二萜类化合物,具有很好的开发价值。这些研究结果表明,昆虫体内的小分子代谢产物对筛选新型抗菌物质具有重要意义。

美洲大蠊(*Periplaneta americana* L.) 是一种传统药用昆虫,为蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫,研究表明,美洲大蠊有促进血管增生、组织修复、强心升压、改善微循环、抗菌抗炎、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫等作用,目前已开发出“康复新”、“隆肝胶囊”、“心脉隆”等多种药物,临床上用于治疗烫伤、烧伤、肝癌、心血管等疾病,其药效成分主要为水溶性成分^[6-11],还未见其脂溶性成分的药效研究。本文研究发现美洲大蠊乙酸乙酯提取物具有一定抑菌活性,为了阐明其活性物质基础,通过活性追踪法和柱层析法从乙酸乙酯提取物中分离得到了7个有抑菌活性的长链不饱和脂肪酸类化合物。本研究为美洲大蠊小分子抑菌物质研究奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫 美洲大蠊购自云南省腾冲制药有限公司,经中国林业科学研究院资源昆虫研究所陈晓鸣研究员鉴定为大蠊属昆虫(*Periplaneta americana* L.)。

1.1.2 供试菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为革兰氏阳性菌;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为革兰氏阴性菌;购自云南大学微生物中心,4℃保存;供试菌种使用前接种到 pH 值 7.2 的 LB 固体培养基上,37℃恒温培养 16~18 h,备用。

1.1.3 主要仪器和试剂 Bruker AM-400 核磁共振光谱仪(TMS 为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz)。Agilent 5975C 质谱仪。柱色谱硅胶(200~300目)和薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂生产;凝胶为 Sephadex LH-20(Pharmacia Fine Chemical Co. Ltd);石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 提取物的制备 美洲大蠊干燥虫体(13 kg)粉碎,分别用石油醚 10 L 浸泡提取 4 次,每次静置

24 h 后,过滤,残渣晾干后,分别用乙酸乙酯 10 L 浸泡提取 4 次,过滤,合并滤液,减压浓缩得乙酸乙酯提取物。

1.2.2 抑菌活性物质的分离 乙酸乙酯提取物(400 g)经硅胶拌样,干法上硅胶柱层析,以石油醚、石油醚/乙酸乙酯(15:1,8:1,5:1,3:1,1:1)、乙酸乙酯、乙醇梯度洗脱,每种洗脱液 3 000 mL,每 500 mL 收集一个馏分,经硅胶薄层层析(TLC)合并相同的馏分得组分 Fr1~Fr9,对各组分进行减压浓缩和抑菌活性测定。抑菌谱较广、活性较好的组分 Fr7 及相邻组分 Fr8 经硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(氯仿/甲醇 1:1)进一步分离纯化后,从组分 Fr8 中分离得到了化合物 1~4,从组分 Fr7 中分离得到了化合物 5~7,检测化合物的抑菌活性并采用核磁共振、质谱测定其结构类型。

1.2.3 抑菌活性测定方法 抑菌活性测定采用平板滤纸片法^[12],根据抑菌圈直径大小来判断抑菌能力。细菌培养采用 LB 培养基,取牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 5.0 g、氯化钠 5.0 g、琼脂 17.0 g,加蒸馏水至 1 000 mL,调 pH 值至 7.2,高温灭菌后趁热倒入直径 9 cm 的培养皿中,每皿倒入约 25 mL,制成平板。供试菌种培养复苏后,用 0.9% 的生理盐水将培养至对数期细菌配成 1×10^6 CFU \cdot ml⁻¹ 菌液,每皿取 400 μ L 菌液均匀涂布于平板上。将灭菌干燥后的滤纸片(直径 6.0 mm)放在平板上,将样品配置成一定浓度的 DMSO 样液,每个滤纸片加 10 μ L 溶液样品,在 37℃下培养 24 h 后测量并记录抑菌圈大小,抑菌圈测量采用十字交叉法,每个样品做 3 次重复,取平均值,扣除滤纸片大小,阴性对照为 DMSO。抑菌圈直径 ≥ 3.00 mm 为抑菌作用强,抑菌圈直径在 2.00~3.00 mm 间为抑菌作用较强,抑菌圈直径在 1.00~2.00 mm 间为抑菌作用较弱,抑菌圈直径 ≤ 1.00 mm 为抑菌作用微弱,抑菌圈直径为 0.00 mm 为无抑菌作用。

2 结果与分析

2.1 提取物的抑菌活性

美洲大蠊乙酸乙酯提取物在 1 g \cdot mL⁻¹ 条件下对 5 种供试菌的抑菌作用见表 1。由表 1 可知:乙酸乙酯提取物对供试的革兰氏阳性菌均有抑制作用,其中,对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强,对金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌的抑制作用微弱,对供试的革兰氏阴性菌无活性。

表1 美洲大蠊乙酸乙酯提取物的抑菌活性

提取物	供试菌种抑菌圈直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	绿脓杆菌
	乙酸乙酯提取物	0.30	0.10	2.00	0.00
阴性对照	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: 抑菌圈直径已扣除滤纸片大小。

2.2 组分 Fr1 ~ Fr9 的抑菌活性

美洲大蠊乙酸乙酯提取物经硅胶柱层析初分离得到9个组分 Fr1 ~ Fr9 极性由小到大,在 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下对5种供试菌的抑菌活性见表2。由表2可知:组分 Fr1 ~ Fr9 对供试菌的抑菌活性并没有随着极性改变出现规律性变化,同一组分对不同供试菌的抑菌活性也存在明显差异。组分 Fr3、Fr6、Fr7 和 Fr8 对金黄色葡萄球菌表现出了抑菌活性,其中组分 Fr3 的抑菌活性最强,组分 Fr6 的抑菌活性最弱。组分 Fr2 ~ Fr8 均对藤黄微球菌表现出了抑菌活性,其中,组分 Fr3 的抑菌活性最强,组分 Fr2 的抑菌活性最弱。除组分 Fr9 外,其他组分均对枯草芽孢杆菌表现出了抑菌活性,其中,组分 Fr7 的抑菌活性最强,组分 Fr1 的抑菌活性最弱。组分 Fr4、Fr7 和 Fr9 对大肠杆菌的抑菌活性较弱。组分 Fr4 和 Fr7 对绿脓杆菌表现出微弱的抑菌活性。

表2 组分 Fr1 ~ Fr9 的抑菌活性

组分	供试菌种抑菌圈直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	绿脓杆菌
	组分 Fr1	0.00	0.00	0.20	0.00
组分 Fr2	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00
组分 Fr3	3.80	5.10	3.22	0.00	0.00
组分 Fr4	0.00	1.04	2.90	1.46	1.30
组分 Fr5	0.00	1.80	2.40	0.00	0.00
组分 Fr6	0.90	3.00	2.94	0.00	0.00
组分 Fr7	2.60	4.00	3.94	1.50	1.80
组分 Fr8	2.30	2.90	2.90	0.00	0.00
组分 Fr9	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00
阴性对照	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: 抑菌圈直径已扣除滤纸片大小。

2.3 化合物的抑菌活性

经反复硅胶和凝胶柱层析,从组分 Fr7 和 Fr8 中分离得到7个化合物,在 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下对5种供试菌的抑菌活性见表3。由表3可知:除化合物3外,其他化合物均对金黄色葡萄球菌显示了不同程度的抑菌活性,其中,化合物6的抑菌活性最强,化合物1的抑菌活性最弱。化合物1~7均对藤黄

微球菌显示了强的抑菌活性,其中,化合物2的抑菌活性最强,化合物7的抑菌活性最弱。化合物1~7均对枯草芽孢杆菌显示了不同程度的抑菌活性,其中,化合物3的抑菌活性最强,化合物1的抑菌活性最弱。除化合物5外,其他化合物均对大肠杆菌显示的抑菌活性较弱,其中,化合物2和3的抑菌活性最强,化合物7的抑菌活性最弱。化合物1~7均对绿脓杆菌显示了不同程度的抑菌活性,其中,化合物6和7的抑菌活性最强,化合物5的抑菌活性最弱。同一化合物对不同供试菌的抑菌活性存在一定差异,但所有化合物均对藤黄微球菌显示了最好的抑菌活性。

表3 化合物的抑菌活性

化合物	供试菌种抑菌圈直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	绿脓杆菌
	化合物1	1.00	6.74	0.82	1.20
化合物2	2.10	19.70	3.10	1.34	1.26
化合物3	0.00	12.20	6.00	1.34	1.06
化合物4	3.00	13.00	4.03	1.00	1.26
化合物5	2.00	17.54	3.00	0.00	0.18
化合物6	3.52	8.50	4.00	0.44	2.20
化合物7	3.20	5.44	2.20	0.40	2.20
阴性对照	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: 抑菌圈直径已扣除滤纸片大小。

2.4 化合物的结构分析

经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS谱图分析,化合物1~7均为不饱和脂肪酸及其衍生物,结构有待鉴定。

3 结论与讨论

美洲大蠊乙酸乙酯提取物对供试的革兰氏阳性菌具有一定抑菌活性,经硅胶柱层析初分离后得到了9个具有抑菌活性的组分,其中,组分 Fr3 对供试的革兰氏阳性菌表现出了强的抑菌活性,组分 Fr7 对5种供试菌均表现出了抑菌活性;经反复硅胶和凝胶柱层析从组分 Fr7 和 Fr8 中分离纯化得到了7个有抑菌活性的化合物,均对藤黄微球菌表现出最强抑菌活性;经核磁共振、质谱分析,化合物均为极性较大的不饱和脂肪酸类化合物。

采用活性追踪法研究天然产物过程中,由于原料多是粗提取物,测试的干扰因素太多,常常得到假阳性或者假阴性的结果^[13];本文研究中发现,美洲大蠊乙酸乙酯提取物对供试的革兰氏阴性菌无抑菌活性,经初分离后有组分表现出了抑菌活性;组分

Fr8 对供试的革兰氏阴性菌无抑菌活性,而从中分离得到的化合物 1~4 均表现出了抑菌活性;孙龙等^[14]在喙尾琵琶甲幼虫抗菌肽的研究中也得到了类似的结果;分析原因可能是乙酸乙酯提取物和组分 Fr8 中对供试的革兰氏阴性菌具有抑菌活性的物质含量较低,经分离后具有抑菌活性的物质得到了富集,从而显示出抑菌活性。组分 Fr7 和 Fr8 分别对藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性相当,但从中分离得到化合物 1~7 对藤黄微球菌的抑菌活性均明显强于对枯草芽孢杆菌的抑菌活性,原因可能是对枯草芽孢杆菌有最好抑菌活性的化学成分在分离纯化过程中丢失^[15],或者是这些化学成分间存在协同作用,增加了组分对枯草芽孢杆菌的抑菌活性^[16]。比较提取物、组分、化合物对供试菌种的抑菌活性,推测对枯草芽孢杆菌具有最好抑菌活性的化学成分可能在组分 Fr3 中。组分 Fr3 含量较大,15% 硫酸无水乙醇 TLC 薄层显色为紫色条带,极性相似,分离难度较大,其抑菌活性成分有待进一步研究。

不饱和脂肪酸广泛存在于植物、微生物、昆虫中,具有降低血糖、调节血脂、减少胆固醇含量、保护心脏和防止记忆下降等多种生理功能^[17-18];研究表明,具有 10~28 个碳的不饱和脂肪酸具有广谱抑菌活性,通过多种不同机制对细菌起到抑制甚至杀灭作用,但抑菌作用机制还不完全清楚,认为主要是作用于细菌的细胞膜并影响细胞膜的各种生理功能;因此,不饱和脂肪酸具有开发成抗菌药物的潜在价值^[19]。本研究发现:从美洲大蠊乙酸乙酯提取物中分离得到的不饱和脂肪酸在体外表现出了抑菌活性;在该虫体内是否具有抑菌活性有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Bulet P, Hetru C, Dimarcq J L *et al.* Antimicrobial peptides in insects; structure and function[J]. *Developmental and comparative immunology*, 1999, 23(4-5): 329-344
- [2] Song Zhengwei, Yin Weiping, Liu Pu, *et al.* Isolation and identification of antibacterial neo-compounds from red ants of Chang-Bai Mountain *Tetramorium* sp. [J]. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 2012, 22(6): 2175-2181
- [3] Leem J Y, Jeong I J, Park K T *et al.* Isolation of *p*-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S. [J]. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 1999, 442(1): 53-56
- [4] 李 蕾, 罗岚芸, 刘 勇. 云南琵琶甲抗菌活性成分研究[J]. *中草药* 2001, 32(3): 197-199
- [5] Zhao C, Trowell S C, Rodney R W *et al.* Antibiotics from Australian terrestrial invertebrates. part1: antibacterial trinervitadienes from the termite *nasutitermes triodiae* [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(47): 10753-10759
- [6] 南京中医药大学. 中药大辞典(第2版) [M]. 上海: 上海科技出版社 2006: 3784-3785
- [7] 何正春, 彭 芳, 宋丽艳, 等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志* 2007, 21(32): 2326-2331
- [8] 高永翔, 扈晓宇, 钟 森, 等. 蟑螂提取物抗肝损伤及抗病毒作用探讨[J]. *国际中医中药杂志* 2006, 28(3): 155-158
- [9] 李洪文, 耿 玲, 刘光明, 等. 美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物体外抗菌活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(11): 159-161
- [10] 焦春香, 刘光明, 周 萍. 天然药物康复新的研究进展[J]. *时珍国医国药* 2008, 19(11): 2623-2624
- [11] 吴建新, 钮荣祥, 黄秀群, 等. 心脉龙注射液抗衰老作用的实验研究[J]. *贵阳医学院报* 2002, 27(2): 125-127
- [12] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程(第3版) [M]. 南京: 东南大学出版社 2006: 890
- [13] 姚新生. 中药天然药物活性成分的研究方法[J]. *药学服务与研究* 2003, 3(4): 205-209
- [14] 孙 龙, 冯 颖, 何 钊, 等. 诱导和非诱导条件下喙尾琵琶甲幼虫抗菌肽分离及抑菌活性比较[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(3): 373-377
- [15] 史清文, 李力更, 霍长虹, 等. 天然药物化学研究与新药开发[J]. *中草药* 2010, 41(10): 1583-1589
- [16] Tallarida R J. Drug synergism: its detection and applications[J]. *Pharmacology and experimental* 2001, 289(3): 865-872
- [17] 王 炜, 张伟敏. 单不饱和脂肪酸的功能特性[J]. *中国食物与营养* 2005(4): 44-46
- [18] 蔡双莲, 李 敏. 多不饱和脂肪酸研究进展[J]. *生命科学研究*, 2003, 7(4): 289-292
- [19] Desbois A P, Smith V J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential[J]. *Applied Microbiol and Biotechnology* 2010, 85(6): 1629-1642