

李宇, 刘海华, 刘翠君, 等. 老鹳草乙醇提取物中黄酮类化合物和挥发性组分及其抗菌活性 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (12): 1397-1404.

LI Y, LIU H H, LIU C J, et al. Volatiles, Flavonoids, and Antibacterial Activity of Ethanol-extract from *Geranium wilfordii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (12): 1397-1404.

老鹳草乙醇提取物中黄酮类化合物和 挥发性组分及其抗菌活性

李宇¹, 刘海华¹, 刘翠君¹, 由金文¹, 赵仁君¹, 石爱华², 何美军^{1*}

(1. 湖北省农业科学院中药材研究所, 湖北 恩施 445000; 2. 恩施职业技术学院, 湖北 恩施 445000)

摘要:【目的】研究老鹳草乙醇提取物对 12 株临床致病菌的抑菌活性, 为开发新型植物来源的抗生素提供重要的参考。【方法】以老鹳草全草乙醇提取物为研究对象, 运用气相色谱-质谱联用仪、高效液相色谱仪研究其化学成分; 运用滤纸片法测试 12 株临床致病菌的抑菌活性。【结果】从老鹳草乙醇提取物中鉴定出: 18 个挥发性组分包括脂肪烃、脂肪酸和生物碱, 3 个黄酮化合物杨梅苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖、花旗松素。老鹳草乙醇提取物对粪链球菌 (MIC 1.0 mg·mL⁻¹)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MIC 1.0 mg·mL⁻¹)、大肠杆菌 (MIC 1.0 mg·mL⁻¹) 及鲍曼不动杆菌 (MIC 2.0 mg·mL⁻¹) 有高敏抑制活性。【结论】恩施地区老鹳草乙醇提取物主要挥发性组分为脂肪烃、脂肪酸、生物碱; 含有杨梅苷、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖、花旗松素 3 个黄酮类化合物; 对常见临床致病菌具有优良抗菌活性和较广的抗菌谱覆盖面。

关键词: 老鹳草; 乙醇提取物; 挥发组分; 临床致病菌; 黄酮

中图分类号: Q 939.13; R 914.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 12-1397-08

Volatiles, Flavonoids, and Antibacterial Activity of Ethanol-extract from *Geranium wilfordii*

LI Yu¹, LIU Haihua¹, LIU Cuijun¹, YOU Jinwen¹, ZHAO Renjun¹, SHI Aihua², HE Meijun^{1*}

(1. Institute of Chinese Herbal Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Enshi, Hubei 445000, China;

2. Enshi Polytechnic, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: 【Objective】Antibacterial activity and mechanism of the ethanol-extract of *Geranium wilfordii* Maxim on clinical pathogens were studied for development of a natural antibiotic. 【Method】The chemical compositions of the extract were analyzed by GC-MS and HPLC. The filter paper method was used to test the antimicrobial activity of the extract against 12 clinical samples of the resistant bacteria. 【Result】GC-MS detected 18 volatile substances, including aliphatic hydrocarbons, fatty acids, and alkaloids (1.15%). The 3 flavonoid compounds identified were myricitrin, quercetin-3-O-β-D-glucose, and taxifolin. High antibacterial activities against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIC 1.0 mg·mL⁻¹), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC 1.0 mg·mL⁻¹), *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC 1.0 mg·mL⁻¹), and *Acinetobacter baumannii* ATCC 29212 (MIC 2.0 mg·mL⁻¹) of the extract were observed. 【Conclusion】In the *G. wilfordii* ethanol-extract, aliphatic hydrocarbons, fatty acids, and alkaloids were the major volatiles, and myricitrin, quercetin-3-O-β-D-glucose, and taxifolin the 3 substantial flavonoid compounds found. The extract demonstrated a significant antibacterial activity with wide spectrum against the commonly known clinical pathogens.

Key words: *Geranium wilfordii* Maxim; ethanol-extract; volatile substances; clinical resistant bacteria; flavonoids

收稿日期: 2020-03-06 初稿; 2020-08-28 修改稿

作者简介: 李宇 (1990-), 男, 研究方向: 中药材天然产物研究 (E-mail: 977956996@qq.com)

* 通信作者: 何美军 (1974-), 男, 副研究员, 研究方向: 中药材天然产物研究 (E-mail: 840940513@qq.com)

基金项目: 湖北省农业科学院中药材研究所 2019 年青年科学基金项目 (2019ZYCJJ05)

0 引言

【研究意义】抗生素滥用导致大量耐药菌如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、多耐铜绿假单胞菌等病原菌出现,极大威胁人类健康。有文献报道全球每年约 70 万人死于耐药菌感染,预计到 2050 年死亡人数可达到 1000 万,仅在美国死于 MRSA 感染的人数就超过艾滋病和结核病的总和^[1,2]。抗生素耐药性问题已成为威胁全球人类健康的紧迫问题,新型抗生素研发迫在眉睫。【前人研究进展】老鹳草 (*Geranium wilfordii* Maxim) 是老鹳草属 (*Geranium*) 植物,味辛、苦;性平;有祛风湿、通经络、止泻痢的功效;用于风湿痹痛、麻木拘挛、筋骨酸痛、泄泻痢疾等症^[3]。现代药理研究发现老鹳草具有消炎抗氧化、降糖保肝等多种生理功能。鼠掌老鹳草 (*Geranium sibiricum* L.) 水煎液对经番泻叶水煎液处理的小鼠有止泻作用,对正常小鼠小肠运动有抑制作用,对推进机能亢进的小鼠小肠运动也有抑制作用^[4]。老鹳草提取物可显著降低大鼠幽门结扎型、乙酸灼伤型、乙醇及吲哚镁辛诱导型的胃溃疡,能抑制幽门结扎型胃溃疡大鼠胃酸分泌、抑制胃蛋白酶活性^[5]。野老鹳草 (*Geranium carolinianum* L.) 水浸提取液对玉米、花生和大豆都具有化感作用,其中对玉米的化感作用最大^[6]。为进一步研究老鹳草的生理活性,已有学者从老鹳草中分离鉴定了 13 个具有多种生理活性的次级代谢产物:β-谷甾醇、1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖、短叶苏木酚羧酸、原儿茶酸、没食子酸、对羟基苯甲酸、胡萝卜苷、槲皮素、1,3,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖、老鹳草素和 corilagin^[7-10]。XU 等^[11] 研究发现 corilagin 通过激活 caspase-8、caspase-9、caspase-3 和 poly ADP-ribose 聚合酶蛋白诱导胃癌细胞凋亡,corilagin 能通过诱发胃癌细胞自噬 (autophagy) 和增加细胞活性氧 (ROS) 等方式抑制胃癌细胞生长。老鹳草素具有抗病毒、抗高血压、抗高血糖、保护肝脏、抗糖尿病和诱导细胞凋亡等多种生物活性,老鹳草素能通过抑制 FAK/Src、ERK1/2 途径衰减 MMP-2 的表达和活性,抑制口腔癌细胞 SCC-9 和 SCC-14 的迁移和入侵^[12]。【本研究切入点】目前尚无文献报道老鹳草乙醇提取物对临床常见致病菌的抑菌活性、抑菌机理,以及老鹳草乙醇提取物的挥发组分、黄酮类化合物种类。【拟解决的关键问题】本研究拟鉴定恩施产区老鹳草乙醇提取物的挥发性组分和黄酮类化合物种类;检测恩施产区老鹳草乙醇提取物对 12 株临床致病菌肺炎克雷伯菌、金黄色葡

萄球菌、粪链球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、苏云金芽孢杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、多耐铜绿假单胞菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度 (MIC) 值,以期为新型抗生素的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

老鹳草样品采集于湖北省恩施市华中药用植物园,经纬度坐标为 109°45'24" E, 30°10'51" N, 经湖北省农业科学院中药材研究所高级农艺师由金文鉴定为老鹳草 (*G. wilfordii*)。老鹳草是全草入药,所以本研究以老鹳草全草为研究对象。12 株临床致病菌为:肺炎克雷伯 (*Klebsiella pneumonia* ATCC 13883)、粪链球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)、多耐铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* XSBZ14)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌 (*Methicillin-resistant staphylococcus epidermidis*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213), 由中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室鉴定提供。Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配 DAD 检测器), Phenomenex 色谱柱 (50 mm × 4.6 mm, ODS 5 μm), imark 酶标仪 (Bio-Rad 美国伯乐), Thermo Fisher 世尔电导仪 (型号: 3-star), aglient Technologies 7890A/5975C GC-MS 联用仪, RE-200A 旋转蒸发器 (广州市星烁仪器有限公司), 黄酮标准品杨梅苷、花旗松素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖均购自阿拉丁试剂公司,其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基配制: 酵母提取物 5 g·L⁻¹, 胰蛋白胨 10 g·L⁻¹, NaCl 10 g·L⁻¹, pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 30 min (固体 LB 培养基加入琼脂 20 g·L⁻¹)。

MH 液体培养基配制: 牛肉粉 2 g·L⁻¹, 可溶性淀粉 1.5 g·L⁻¹, 酸水解酪蛋白 17.5 g·L⁻¹, pH 7.2~7.6, 121 °C 灭菌 30 min。

1.2 试验方法

1.2.1 老鹳草乙醇提取物获得 10 g 新鲜老鹳草样品粉碎, 为充分提取鞣质和黄酮类化合物, 以 60% 乙醇溶液为提取溶剂^[13]。料液比 1:50, 250 mL 乙醇溶液 (60%) 浸泡 18 h, 200 w 超声浸提 30 min。10 000

$\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心取上清, 减压蒸馏得浸膏 1.862 g, 浸膏得率 18.62%。

1.2.2 老鹳草乙醇提取物挥发性成分与黄酮化合物检测 气相色谱条件: agilent 19091S-433 毛细管柱 (HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox, 30 $\text{m}\times 250\text{ }\mu\text{m}$); 升温程序: 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 然后 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 总运行时间 23 min; 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 载气为氮气 (99.999%); 流速为 1.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量为 5 μL 不分流。质谱条件: 电子轰击 (EI) 离子源; 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 电子能量 70 eV, 接口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 质量扫描范围 30~500 amu。检索谱库为 NIST08.LIB 标准谱库, 匹配度 ≥ 900 , 鉴定为同一个化合物, 运用面积归一化法计算老鹳草乙醇提取物各组分相对含量^[14]。样品处理: 老鹳草乙醇提取物用甲醇溶解, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清进样分析, 以分析纯甲醇进样作空白对照组, 每组样品重复进样 3 次。

高效液相色谱进样条件: 时间 0~20 min, A 相 95%~20%; 时间 20~25 min, A 相 20%~0%; 时间 25~27 min, A 相 0%~0%; 时间 27.1~30 min, A 相 95%~95%。A 相: 95% H_2O 、5% 甲醇、0.1% 乙酸, B 相: 100% 甲醇、0.1% 乙酸。老鹳草乙醇提取物用甲醇溶解, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清进样分析, 以分析纯甲醇进样作空白对照组, 每组样品重复进样 3 次。利用 HPLC 外标法^[15]测定老鹳草乙醇提取物各黄酮组分含量, 将 3 个标准品杨梅苷、花旗松素、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖配制成 6 个质量浓度梯度 (1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的混标, 测定仪器信噪比 (S/N), 当各标准溶液稀释至信噪比 $3 < \text{S/N} < 10$ 时, 以该溶液浓度计算仪器检出限 ($\text{S/N}=3$) 和定量限 ($\text{S/N}=10$), 得到 3 个标准品的标准曲线、 R^2 、检出限和定量限。对各标准品进行精密度和重复性实验, 每个混标重复检测 6 次, 计算相对标准偏差 (S)。检测加入标量的各样品的黄酮组分含量, 计算回收率和相对标准偏差, 重复检测 6 次。外标法检测老鹳草乙醇提取物中各黄酮组分的含量计算公式:

$$C = \frac{n \times 2.500}{1000 \times m}$$

C: 老鹳草样品中黄酮组分含量; n: HPLC 检测浓度; m: 老鹳草样品干重

1.2.3 老鹳草乙醇提取物抗菌活性测试 用滤纸片法^[16]测试老鹳草乙醇提取物对 12 株临床致病菌的抑菌活性, 取 20 μL 培养至 OD_{600} 为 0.6 的测试菌菌液与 20 mL LB 固体培养基混合均匀倒平板。取 5 μL 老

鹳草乙醇提取物 (二甲基亚砜 DMSO 溶解) 于滤纸片上, 使滤纸片完全吸收, 将滤纸片置于混有菌液的培养基上, 另设氨苄青霉素 (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作阳性对照、DMSO 作阴性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 测抑菌圈。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 测抑菌圈。参照抗生素药敏标准: 高敏 (抑菌圈直径 $> 16\text{ mm}$)、中敏 (10~16 mm)、轻敏或耐药 ($< 10\text{ mm}$)。采用微量肉汤稀释法测定老鹳草乙醇提取物对致病菌的 MIC 值, 按美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) M07-A9^[17] 的标准操作程序, 在 12 列 8 行规格的 96 孔板上依次添加以下内容: 第 3~12 列的每孔加入含乙醇提取物样品的 MH 液体培养基 100 μL , 设置乙醇提取物终质量浓度分别为 128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。第 1 列加入 200 μL MH 液体培养基, 第 2 列加入 100 μL MH 液体培养基 (阳性生长组), 将培养好的菌液稀释 1000 倍, 2~12 每孔加入稀释菌液 100 μL 。另设氨苄青霉素 (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作药物阳性对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 后使用 imark 酶标仪检测 OD_{600} , 根据 CLSI M100-S26^[18] 标准: 与阳性生长对照管比较抑制 80% 细菌生长的药物浓度为受试菌的 MIC 值。

1.2.4 数据处理 所有试验数据运用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, 试验数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 老鹳草乙醇提取物分挥发性成分鉴定与相对含量测定

通过 GC-MS 分析共从老鹳草乙醇提取物中检测到 223 个离子峰, 通过 NIST08.LIB 标准谱库检索, 共从老鹳草乙醇提取物中鉴定出 18 个挥发性物质 (表 1), 主要为脂肪烃 (5.72%)、脂肪酸 (17.09%)、生物碱 (1.15%)。脂肪烃类化合物有 6-methyloctadecane (0.56%)、2,6,10-trimethyltetradecane (0.62%)、octadecane (0.97%)、octacosane (1.85%)、(E)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol (1.50%)、2-methylhexadecan-1-ol (0.52%)、10-octylnonadecane (0.32%) 共 8 个 (表 1)。脂肪酸类化合物有 docosyl docosanoate (0.42%)、methyl 1-(3-pentylloxiran-2-yl) undecanoate (0.96%)、(Z)-7-methyltetradec-8-en-1-yl acetate (0.92%)、methyl palmitate (7.91%)、palmitic acid (0.45%)、methyl (E)-octadec-9-enoate (4.93%)、methyl 12-methyltetradecanoate (0.53%)、oleic acid (0.97%) 共 8 个, 其中化合物 methyl (E)-octadec-9-enoate、methyl (E)-octadec-9-enoate、oleic acid 为不饱和脂肪酸 (表 1), 饱和脂肪酸类化合物具有供应

能量、增加胆固醇浓度及调节低密度脂蛋白（LDL）
代谢等多种生理功能，不饱和脂肪酸类化合物具有

降低胆固醇、调节血脂、降低血压、抗肿瘤、保护
视力等多种生理功能^[19]。

表 1 老鹳草乙醇提取物组分挥发性成分及其含量测定结果
Table 1 Volatiles in *G. wilfordii* ethanol-extract

化合物 Compounds	保留时间 Retention time/min	化学式 Chemical formula	分子质量 Molecular mass	相对含量 Relative amount/%	匹配度 Matching rate/%
二十二烷酸二十二烷基酯(1) docosyl docosanoate	5.157	C ₄₂ H ₈₄ O ₂	621.13	0.42	93.5
6-甲基-正十八烷(2) 6-methyloctadecane	5.934	C ₁₉ H ₄₀	268.53	0.56	94.5
2, 6, 10-三甲基-正四十烷(3) 2,6,10-trimethyltetradecane	6.757	C ₁₇ H ₃₆	240.48	0.62	95.6
11-(3-戊氧基-2-乙基)十一酸甲酯(4) methyl 11-(3-pentyloxiran-2-yl)undecanoate	8.610	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	312.49	0.96	98.2
十八烷(5) Octadecane	9.004	C ₁₈ H ₃₈	254.50	0.97	93.8
二十八烷(6) Octacosane	9.075	C ₂₈ H ₅₈	394.45	1.85	97.2
聚十八烷基乙烯基醚(7) 1-(Vinylxy)octadecane	9.310	C ₂₀ H ₄₀ O	296.54	1.50	93.7
2-溴十八醛(8) 2-bromooctadecanal	9.492	C ₁₈ H ₃₅ BrO	347.38	1.56	92.8
顺-7-甲基-十四碳8-烯-1-乙酸酯(9) (Z)-7-methyltetradec-8-en-1-yl acetate	9.616	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.44	0.92	91.8
10-辛基-十九烷(10) 10-octylnonadecane	9.704	C ₂₇ H ₅₆	380.75	0.32	99.0
棕榈酸甲酯(11) methyl palmitate	9.992	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.46	7.91	95.2
(5β)孕烷-3,20-β-二醇, 14α, 18α-[4-甲基-3-氧基-(1-oxa-4-氮杂丁烷-1,4-二基)]-二乙酸酯(12) (5.β.)Pregnane-3,20.β.-diol, 14α., 18.α.-[4-methyl-3-oxo-(1-oxa-4-azabutane-1,4-diy)]-, diacetate	10.210	C ₂₈ H ₄₃ NO ₆	489.65	1.15	98.9
2-甲基-十六烷-1-醇(13) 2-methylhexadecan-1-ol	10.439	C ₁₇ H ₃₆ O	256.47	0.52	90.3
棕榈酸(14) palmitic acid	10.710	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43	0.45	93.6
甲基(E)-十八烷基-9-烯酸酯(15) Methyl (E)-octadec-9-enoate	11.469	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296.50	4.93	98.2
12-甲基十四烷酸甲酯(16) Methyl 12-methyltetradecanoate	11.663	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43	0.53	99.5
油酸(17) oleic acid	13.333	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.47	0.97	90.1
邻苯二甲酸二辛酯(18) dioctyl phthalate	21.603	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.56	0.43	92.3

(5.β.) Pregnane-3,20.β.-diol, 14.α., 18.α.-[4-methyl-3-oxo-(1-oxa-4-azabutane-1,4-diy)]-, diacetate (1.15%) 是首次在老鹳草乙醇提取物中鉴定的挥发性生物碱，生物碱具有抗肿瘤、消炎、抗病毒、抗血小板凝集、抗心律失常及抗高血压等重要生理功能^[20]。

2.2 老鹳草乙醇提取物黄酮化合物鉴定与含量测定

通过 HPLC 检测得到黄酮标准品杨梅苷 (Rt 16.498 min)、花旗松素 (Rt 17.508 min)、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖 (Rt 17.978 min) 与老鹳草乙醇提取物中 3 个吸收峰 (1) Rt 16.506 min、(2) Rt 17.503 min、(3) Rt 17.981 min 保留时间一致 (图 1)。

黄酮标准品杨梅苷、花旗松素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖与老鹳草乙醇提取物中 3 个吸收峰 (1、2、3) 的吸收光谱分别对应一致 (图 2)，通过保留

时间和吸收光谱数据鉴定这 3 个吸收峰分别为杨梅苷、花旗松素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖。

HPLC 外标法测量 3 个标准品的标准曲线、重复性、检出限、定量限如表 2 所示，线性相关性好 ($R^2\geq 0.999\ 0$)。通过配制本底含量标准品浓度溶液，加入定浓度的标准品，HPLC 检测，获得标准品的加标回收率为 98.56%~101.05%，相对标准偏差为 0.55%~1.50% (表 2)。

利用 HPLC 外标法检测老鹳草乙醇提取物各黄酮化合物含量：花旗松素 (3.72 mg·g⁻¹)、杨梅苷 (2.56 mg·g⁻¹)、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖 (5.56 mg·g⁻¹)，加标回收率为 99.24%~101.98%，相对标准偏差为 0.85%~1.12% (表 3)。

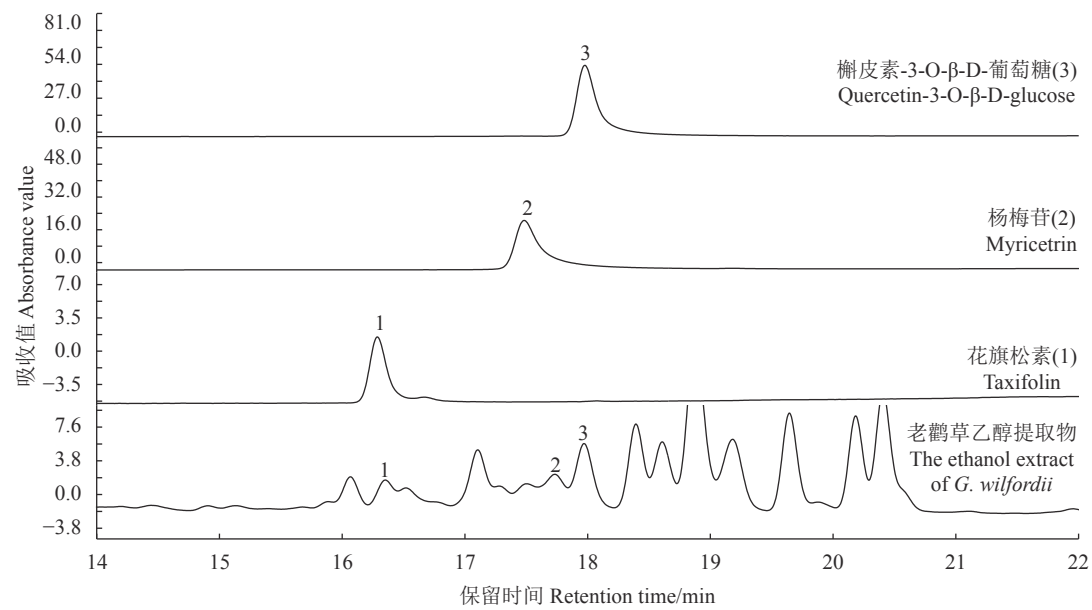


图 1 老鹳草乙醇提取物与黄酮标准品保留时间对比

Fig. 1 Retention times of *G. wilfordii* ethanol-extract and flavonoid standards

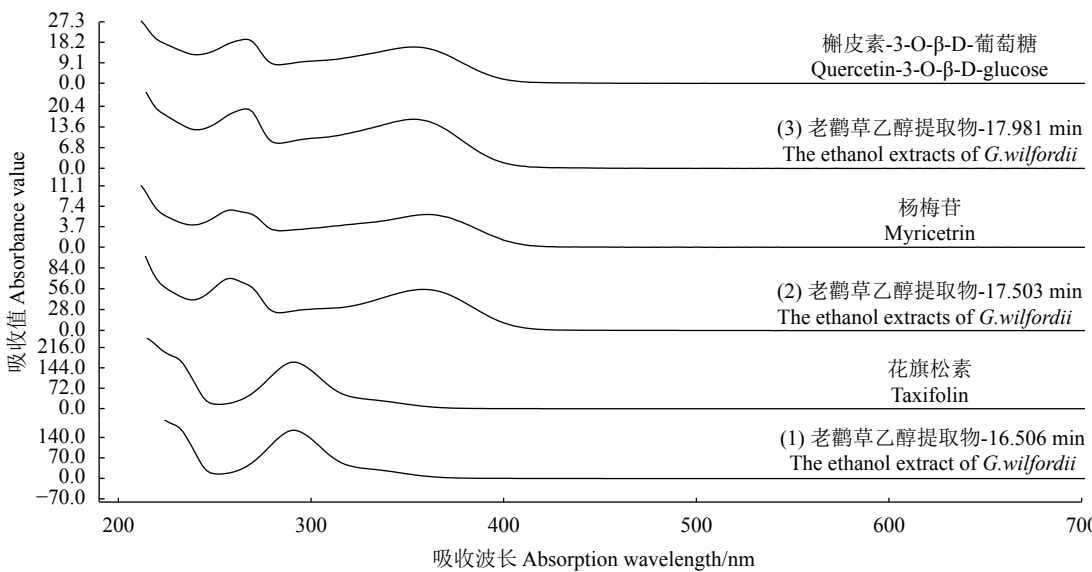


图 2 老鹳草乙醇提取物与黄酮标准品光谱对比

Fig. 2 Spectrograms on *G. wilfordii* ethanol-extract and flavonoid standards

表 2 标准曲线、重复性及检测限 (means±SD, n=6)

Table 2 Regression equation, correlation coefficient, and detection limit on measurements (means±SD, n=6)

标准品 Standard substance	标准曲线 Standard curves	R^2	检出限 Detection limit	定量限 Limit of quantitation	回收率 Recovery/%	S/%
花旗松 Taxifolin	$y=4.16\times A-2.77$	0.9996	0.136	0.725	98.56	1.50
槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖 Quercetin-3-O-β-D-glucose	$y=3.13\times A-6.88$	0.9994	0.128	0.915	101.05	1.23
杨梅苷 Myricetrin	$y=3.44\times A-4.08$	0.9991	0.153	0.817	99.26	0.55

注：A为峰面积，单位mAU；y为浓度，单位 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；S为相对标准偏差。
Note: A was the peak area, unit was mAU; y was the concentration, unit was $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; S is the relative standard deviation.

2.3 老鹳草乙醇提取物抗菌活性粗筛

滤纸片活性测试结果显示老鹳草乙醇提取物对 12 株临床致病菌具有良好的抗菌效果，老鹳草乙醇

提取物对粪链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及鲍曼不动杆菌有高敏抑制活性（抑菌圈 $\geq 16\text{ mm}$ ），其 MIC 值分别为 1.0、1.0、1.0、2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 3 老鹳草乙醇提取物各黄酮化合物含量表 (means±SD, n=6)
Table 3 Flavone contents in *G. wilfordii* ethanol-extract

黄酮组分 Flavonoid components	<i>n</i> ^b / (μg·mL ⁻¹)	回收率 Recovery/%	S/%	C ^a / (mg·g ⁻¹)
花旗松素 Taxifolin	7.44±0.48	101.70	1.12	3.72
槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖 Quercetin-3-O-β-D-glucose	11.12±0.73	101.98	0.85	5.56
杨梅苷 Myricitrin	5.12±0.33	99.24	1.05	2.56

注: a: 以各黄酮组分质量与老鹳草样品的干重质量比, b: HPLC检测浓度
Note: a: individual flavone content in *G. wilfordii* (dry weight); b: concentration detected by HPLC.

对肺炎克雷伯菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、多耐铜绿假单胞菌、溶藻弧菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌有中敏抑制活性(抑菌圈直径: 11~15 mm), 其MIC 值分别为 4.0、4.0、4.0、4.0、8.0、4.0、4.0 mg·mL⁻¹。对藤黄微球菌有微弱抑菌活性(抑菌圈≤10 mm), 其MIC 值为 16.0 mg·mL⁻¹(表 4)。

表 4 老鹳草乙醇提取物的抗菌活性 (means±SD, n=3)
Table 4 Antibacterial activity of *G. wilfordii* ethanol-extract

细菌 Bacteria	抑菌圈 Inhibition zone/mm	阳性对照 Positive control/mm	MIC/mg·mL ⁻¹
克雷伯氏肺炎菌 <i>K. pneumonia</i> ATCC 13883	11.18±0.30	14.07±0.09	4.0
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> ATCC 29213	14.95±0.26	16.26±0.28	4.0
粪肠球菌 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	19.35±1.24	6.50±0.26	1.0
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	12.66±0.58	14.36±0.16	4.0
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	8.77±0.16	17.35±0.87	16.0
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	11.06±0.28	21.41±0.27	4.0
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 <i>methicillin-resistant S. aureus</i>	16.77±0.95	—	1.0
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	11.23±0.97	14.23±0.44	4.0
抗甲氧西林表皮葡萄球菌 <i>methicillin-resistant S. epidermidis</i>	14.32±0.45	20.86±1.76	4.0
大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i> ATCC 25922	20.30±0.30	27.74±0.32	1.0
鲍曼不动杆菌 <i>A. baumannii</i> ATCC 19606	18.24±0.50	20.44±0.32	2.0
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> XSBZ14	14.91±0.34	12.08±0.19	8.0

注: “—”表示无抑菌圈; 阳性对照为氨苄青霉素(100 mg·mL⁻¹)
Note: “—” indicates no inhibition zone, ampicillin (100 mg·mL⁻¹) was the positive control

3 讨论与结论

细菌耐药性问题的日益恶化和我国限抗和禁抗政策的落地, 让抗生素替代品的研究越发迫切^[21]。Kim 等^[22]学者曾用 239 种中草药乙醇提取物对 7 株多重耐药金黄色葡萄球菌的广谱抑菌活性进行系统评价, 发现了 74 种中草药具有良好的抑菌活性, 说明传统中草药来源的活性成分具有开发成为抗菌药物替代物的良好潜力。

老鹳草乙醇提取物被发现具有多种生物活性, 对结肠癌细胞的增殖具有抑制作用^[23], 能抑制幽门

结扎型胃溃疡大鼠胃酸分泌、抑制胃蛋白酶活性^[5, 11], 对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、停乳链球菌、鸡沙门氏杆菌的抑菌效果良好^[24]。老鹳草乙醇提取物的主要活性成分为鞣质类、黄酮类、有机酸和挥发油类化合物^[25, 26], 程小伟等^[27]进一步研究发现老鹳草乙醇提取物中的山柰酚、没食子酸衍生物和黄酮类化合物对金黄色葡萄球菌具有较好的抑菌活性。杨秀芳等从老鹳草属植物中共分离、鉴定了约 39 个鞣质类化合物、35 个黄酮类化合、8 个有机酸类化合物^[28]。研究表明老鹳草中鞣质具有抗菌、抗病毒、抗氧化、降糖保肝等作用^[29]。

本研究首次发现恩施地区老鹳草乙醇提取物具有优良抗菌活性和广谱性,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、粪链球菌、大肠杆菌及鲍曼不动杆菌有高效抑制活性,对肺炎克雷伯菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、多耐铜绿假单胞菌、溶藻弧菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌有中效抑制活性。本研究首次鉴定了恩施地区老鹳草乙醇提取物的挥发成分主要为脂肪烃(5.72%)、脂肪酸(17.09%)、生物碱(1.15%)。首次测定了恩施地区老鹳草乙醇提取物中的 3 个黄酮类化合物的含量:花旗松素(3.72 mg·g⁻¹)、杨梅苷(2.56 mg·g⁻¹)、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖(5.56 mg·g⁻¹)。

恩施地区老鹳草乙醇提取物具有优良抗菌活性和广谱性,为开发新型植物来源的抗生素提供了重要参考。但是老鹳草乙醇提取物中发挥抑菌功能的活性成分和抑菌机制,还有待进一步分析研究。

参考文献:

- [1] 李耿, 刘晓志, 高健, 等. 新型抗生素的研发进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43 (12): 1463–1468.
LI G, LIU X Z, GAO J, et al. Research progress and development of novel antibiotics [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43 (12): 1463–1468. (in Chinese)
- [2] HOOPER D C, JACOBY G A. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, 1354: 12–31.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 126.
- [4] 何静, 尹海波, 安晔. 鼠掌老鹳草与老鹳草抗腹泻药理作用的比较研究 [J]. *山西医药杂志*, 2017, 46 (24): 3016–3018.
HE J, YIN H B, AN Y. A comparative study on the antidiarrheal pharmacological effects of *Geranium SPP* [J]. *Shanxi Medical Journal*, 2017, 46 (24): 3016–3018. (in Chinese)
- [5] 李祎, 刘利民, 李超, 等. 老鹳草提取物抗胃溃疡作用实验研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32 (1): 54–57.
LI Y, LIU L M, LI C, et al. Experimental study on the anti-gastric ulcer action of the extract of *Geranium wilfordii* Maxim [J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 32 (1): 54–57. (in Chinese)
- [6] 李建波, 方丽, 郝雨, 等. 野老鹳草水提取物对大豆、玉米、花生的化感作用 [J]. *杂草学报*, 2018, 36 (1): 31–36.
LI J B, FANG L, HAO Y, et al. Allelopathic effect of aqueous extracts from *Geranium carolinianum* L. on soybeans, corn, and peanut [J]. *Weed Science*, 2018, 36 (1): 31–36. (in Chinese)
- [7] 赵锐, 郭安军, 李新路, 等. 老鹳草的化学成分研究 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20 (3): 262–264, 277.
ZHAO R, GUO A J, LI X L, et al. Study on chemical constituents of *Geranium wilfordii* Maxim [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2018, 20 (3): 262–264, 277. (in Chinese)
- [8] LIU D, MA Y, GU M, et al. Liquid-liquid/solid three-phase high-speed counter-current chromatography, a new technique for separation of polyphenols from *Geranium wilfordii* Maxim [J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35 (16): 2146–2151.
- [9] LIU D, MA Y, WANG Y, et al. One-step separation and purification of hydrolysable tannins from *Geranium wilfordii* Maxim by adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose gel [J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34 (9): 995–998.
- [10] LIU D, SU Z G, WANG C H, et al. Separation and purification of hydrolyzable tannin from *Geranium wilfordii* Maxim by reversed-phase and normal-phase high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33 (15): 2266–2271.
- [11] XU J J, ZHANG G Y, TONG Y P, et al. Corilagin induces apoptosis, autophagy and ROS generation in gastric cancer cells in vitro [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43 (2): 967–979.
- [12] YEH C M, HSIEH M J, YANG J S, et al. Geraniin inhibits oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-2 activation through the FAK/Src and ERK pathways [J]. *Environmental Toxicology*, 2019, 34 (10): 1085–1093.
- [13] 刘利民, 姚松梅, 李洋. 老鹳草鞣质与总黄酮的提取工艺研究进展 [J]. *山东化工*, 2019, 48 (20): 75–77.
LIU L M, YAO S M, LI Y. Research advances in extraction of tannins and flavonoids from *Geranium wilfordii* Maxim [J]. *Shandong Chemical Industry*, 2019, 48 (20): 75–77. (in Chinese)
- [14] PAN W, LIU W J, WEI H, et al. Qualitative and quantitative analysis of fragrance components from different varieties of passion fruit [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (1): 1–12.
- [15] MANDRIOLI M, TURA M, SCOTTI S, et al. Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in *Cannabis sativa* L [J]. *Molecules*, 2019, 24 (11): 2113.
- [16] 侯敏娜, 成昕玥, 赵明光, 等. 浙贝母挥发油提取工艺优选及抑菌活性实验研究 [J]. *西部林业科学*, 2019, 48 (1): 87–92.
HOU M N, CHENG X Y, ZHAO M G, et al. Optimized extraction process of volatile oil from *Fritillaria thunbergii* Miq. and its antibacterial activity [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2019, 48 (1): 87–92. (in Chinese)
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition: M07-A10[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement: M100-S25[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [19] MA L. Comprehensive development and utilization of *Camellia oleifera* Seeds [J]. *Nonwood Forest Research*, 2009, 27 (4): 117–120.
- [20] 李永芳. 生物碱的提取和分离方法综述 [J]. *中山大学研究生学刊 (自然科学与医学版)*, 2015 (2): 7–13.

- LI Y F. Review on Alkaloid extraction and separation methods [J]. *Journal of the Graduates Sun YAT-SEN University (Natural Sciences. Medicine)*, 2015 (2) : 7-13. (in Chinese)
- [21] 宫国栋, 方菁. 我国关于抗生素生产与应用的政策法规研究分析 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2014, 25 (5) : 80-81.
- GONG G D, FANG J. Research and analysis of policies and regulations on antibiotic production and application in China [J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2014, 25 (5) : 80-81. (in Chinese)
- [22] Gowoon Kim, 张丹, Arakkaveetil Kabeer Farha, 等. 239种传统中草药提取物对多重耐药金黄色葡萄球菌的广谱抗菌效果研究[C]. //中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十六届年会论文集. 2019: 24-25.
- [23] 万春霞, 黄国栋, 杨香生. 老鹳草乙醇提取液对结肠癌细胞增殖和凋亡的实验观察 [J]. *中成药*, 2012, 34 (3) : 558-560.
- WAN C X, HUANG G D, YANG X S. Effect of geranium ethanol extract on proliferation and apoptosis of colon cancer cells [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2012, 34 (3) : 558-560. (in Chinese)
- [24] 罗永江, 胡振英, 秦哲, 等. 老鹳草乙醇提取物的体外抑菌试验[C]. //中国畜牧兽医学会、华东区中兽医研究会. 纪念中国畜牧兽医学会中兽医分会成立30周年、中国畜牧兽医学会中兽医分会2009年学术年会暨华东区第十九次中兽医科研协作与学术研讨会论文集. 2009: 125-127.
- [25] 秦哲. 野老鹳草有效成分含量测定及其乙醇提取物的毒性试验研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008: 1-12.
- QIN Z. *Assaying of active components from Geranium carolinianum L. and toxicity test of its alcohol extract*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008: 1-12. (in Chinese)
- [26] 罗宏, 尹海波. 中药老鹳草的研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2010, 26 (2) : 285-286.
- LUO H, YIN H B. Study on Geranium Herb [J]. *Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 26 (2) : 285-286. (in Chinese)
- [27] 程小伟. 老鹳草化学成分及其生物活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- CHENG X W. *Chemical compositions of Geranium wilfordii maxim. and their bioactivities*[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2014. (in Chinese)
- [28] 杨秀芳, 程小伟, 马养民, 等. 老鹳草化学成分研究 (II) [J]. *陕西科技大学学报 (自然科学版)*, 2015, 33 (1) : 95-98.
- YANG X F, CHENG X W, MA Y M, et al. Study on chemical compositions of *Geranium wilfordii* Maxim. (II) [J]. *Journal of Shaanxi University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2015, 33 (1) : 95-98. (in Chinese)
- [29] 吴悦涛, 金哲雄. 老鹳草中鞣质类化学成分及其药理活性研究进展 [J]. *黑龙江医药*, 2008, 21 (1) : 67-68.
- WU Y T, JIN Z X. Studies on chemical compositions and their pharmacological activities in *Geranium wilfordii* Maxim [J]. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2008, 21 (1) : 67-68. (in Chinese)

(责任编辑: 吴宇琳)