

文章编号: 1003-8701(2008)03-0050-05

大蒜抑菌成分提取方法及抑菌活性的研究

徐文静¹, 郑陪和², 杜茜¹, 周义发², 董英山¹, 李启云^{1*}

(1. 吉林省农业科学院生物技术中心, 长春 130033; 2. 东北师范大学生命科学院, 长春 130024)

摘 要: 以番茄早疫病菌(*Alternaria solani* (Ellis et Mmartin))为供试菌, 以抑菌圈法检测抑菌活性, 系统地研究了大蒜(*Allium sativum* L.)抑菌有效成分的提取方法, 发现鲜蒜在室温粉碎后, 放入 28℃ 培养箱中酶解 30~60 min, 然后加入乙酸乙酯试剂在 28℃ 振荡提取 12 h 获得的提取物抑菌活性最佳; 通过大蒜提取物抑菌活性与 TLC 和 HPLC 检测结果比较, 证实大蒜提取物中的抑菌活性成分是大蒜在粉碎过程中产生的, 主要为大蒜酶酶解蒜氨酸产生的大蒜素和大蒜素进一步分解产生的其他含硫化合物, 其成分多达 18 种以上, 且易挥发成分抑菌活性最好。

关键词: 大蒜; 提取物; 番茄早疫病菌; 抑菌活性

中图分类号: S633.5

文献标识码: A

Studies of Extraction Method and Activities of Antifungal Compounds from Garlic

XU Wen-jing¹, ZHENG Pei-he², DU Qian¹, ZHOU Yi-fa², DONG Ying-shan¹, LI Qi-yun^{1*}

(1. Centre of Biotechnology, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033;

2. College of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024 China)

Abstract: Using microbe bacteriostatic ring method, the extraction methods of garlic activity compounds antagonistic to tomato early blight (*Alternaria solani*) was studied. The results showed that the optimal extract conditions were as follows: First, the fresh garlic was crushed and digested by alliinase for 30~60 minutes incubation at 28℃. Then, the digested garlic was extracted by ethyl acetate at 28℃ for 12 hours with simultaneous shaking. Results of TLC and HPLC detection indicated that the main antifungal components were allicin and the volatile components have the highest antifungal activity.

Key words: Garlic; Extract; *Alternaria solani*; Antifungal activity

大蒜是百合科葱属(*Allium sativum*)多年生草本植物, 在我国种植面积广泛, 在医学和农业上有重要的应用^[1,2]。大蒜对农业上多种植物病原菌具有抑制活性, 也可以作为植物的生长调节物质, 同时起到抗病增产的效果。

大蒜提取物是大蒜重要的生物活性物质, 其含硫化合物是其主要生物活性成分, 沈联慈等报道大蒜挥发油中含有 8 个已知含硫化合物, 有 3 个报道说含有 9 个已知含硫化合物和 2 个新发现的含硫化合物^[4,5]; 后来也有报道说含有 18 种含硫

化合物^[6]。大蒜提取物中的含硫化合物主要为二烯丙基一硫化物、二烯丙基二硫化物、二烯丙基三硫化物和甲基烯丙基三硫化物等, 其中二烯丙基三硫化物和二烯丙基二硫化物含量最丰富, 具有强烈的抗菌消炎作用^[3,6]。

以番茄早疫病病原菌(*Alternaria solani*)为指示菌, 通过不同的提取方法与提取试剂提取大蒜成分, 并对所获得的成分进行了活性和成分分析, 为进一步分离有效活性成分和开发天然高效有机农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

市售白皮鲜蒜(*Allium sativum* L.);

收稿日期: 2008-03-11

作者简介: 徐文静(1977-)女, 硕士, 副研究员, 研究方向为生物农药。

通讯作者: 李启云, 博士, E-mail: qyli@jjaas.com

番茄早疫病病原真菌(*Alternaria solani*)为指示菌, 吉林省农业科学院生物农药研究室分离、鉴定和保存。

1.2 方法

1.2.1 依次提取方法

200 g 去皮鲜蒜用组织匀浆机粉碎后, 在 28 ℃ 分别用 600 mL 石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、75%乙醇、50%乙醇和水依次振荡提取 8 h, 其中前 5 种提取液 28 ℃ 浓缩至 20 mL; 水提液用 2 倍无水乙醇沉淀, 上清液 30 ℃ 浓缩至 20 mL。

1.2.2 分别提取方法

1 200 g 去皮鲜蒜粉碎后 (或 600 g 大蒜干粉) 平均分成 6 份, 在 28 ℃ 分别用依次提取法中的 6 种试剂提取, 并在 28 ℃ 浓缩至 20 mL。

1.2.3 萃取提取方法

200 g 去皮鲜蒜粉碎后, 在 28 ℃ 600 mL 水提取 8 h, 提取上清液用石油醚和乙酸乙酯依次萃取, 萃取液和水相分别在 28 ℃ 浓缩至 20 mL。

1.2.4 回流提取法

200 g 去皮鲜蒜粉碎后放入回流提取装置, 在 80 ℃ 下乙酸乙酯提取 8 h, 提取液在 28 ℃ 浓缩至 20 mL。

1.2.5 大蒜酶酶解方法

1 000 g 去皮鲜蒜粉碎后平均分成 5 份, 在 28 ℃ 酶解蒜氨酸, 分别在酶解 0、30、60、120 和 300 min 时加入乙酸乙酯提取, 提取液在 28 ℃ 浓缩至 20 mL。

1.2.6 大蒜酶失活方法

500 g 带皮鲜蒜在 80 ℃ 30 min 灭活蒜氨酸后, 分别取两份 200 g, 在 28 ℃ 用 80 mL 乙酸乙酯和水提取 30 min, 提取上清液用乙酸乙酯和水分别定容至 100 mL。未灭活蒜氨酸的去皮鲜蒜 400 g, 同步提取为对照。

1.2.7 抑菌圈活性检测方法^[7]

将沾有 2 μL 或 10 μL 提取成分的滤纸片 (直径为 5mm) 放入含有病原菌孢子的 PDA 培养基平板, 在 28 ℃ 培养箱培养 48 h 后, 观察滤纸片周围病原菌的生长情况, 并记录抑菌圈直径 (不包括滤纸片直径 5 mm)。

抑菌圈平均直径 = 抑菌圈直径之和 / 抑菌圈总数

1.2.8 薄层层析分析方法

以硅胶 G 板为层析板, 以石油醚、石油醚 - 氯仿 (5 : 5)、氯仿、氯仿 - 甲酸 (10 : 0.5)、氯仿 -

丙酮 - 甲酸 (5 : 5 : 0.5) 和丙酮 - 甲酸 (10 : 0.5) 为流动相, 以含有碘的氯仿饱和溶液为显色剂, 对提取液进行层析分析。

1.2.9 高效液相色谱分析方法

采用美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器; 色谱条件: ZORBAX SB- C18 柱 (4.6×150 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流速 1 mL/min; 检测波长: 208 nm 和 254 nm; 流动相为 A 和 B 成分 {A: 20 mM NaH₂PO₄ + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1; B: 乙腈 - 20 mM NaH₂PO₄ + 10 mM heptanesulfonic acid, pH 2.1 (50 : 50, v/v)}, 梯度洗脱; 样品用甲醇溶解和稀释。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂和方法对提取物抑菌活性的影响

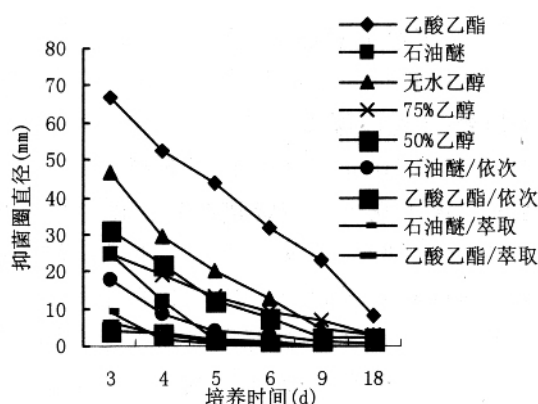


图 1 提取方法与抑菌活性的关系

大蒜提取物中含有很多具不饱和键的硫化物, 很不稳定, 因此不同提取方法和提取试剂获得提取物的抑菌活性可能不一样^[6, 7]。通过抑菌圈活性检测结果 (图 1), 发现不同试剂依次提取方法获得鲜蒜提取物中, 石油醚提取物的抑菌活性明显高于乙酸乙酯提取物的抑菌活性, 其他提取物没有明显的抑菌活性, 说明石油醚和乙酸乙酯均能提取出大蒜的有效抑菌活性成分, 但石油醚不能完全提取出大蒜中的抑菌活性成分。

在不同试剂萃取提取方法中获得的鲜蒜提取物, 石油醚提取物的抑菌活性与乙酸乙酯提取物的抑菌活性相近, 但略小于乙酸乙酯提取物的抑菌活性, 其他提取物没有明显的抑菌活性, 这进一步验证了石油醚不能完全提取出大蒜的抑菌活性成分。

在不同试剂分别提取方法中获得的鲜蒜提取物, 乙酸乙酯提取物抑菌活性最高, 石油醚提取物

抑菌活性其次,其他提取物有明显的抑菌活性,但抑菌活性较低,说明5种试剂均能提取出大蒜的有效抑菌活性成分,其中乙酸乙酯提取效率最高。

通过以上3种不同提取试剂和方法获得提取物的抑菌活性研究可以得出,不同试剂分别提取的方法能更有效的提取出大蒜的有效抑菌活性成分,而乙酸乙酯则是大蒜有效抑菌活性成分的最佳提取试剂,其提取物的抑菌活性明显高于其它提取试剂。

2.2 提取材料对提取物抑菌活性的影响

抑菌圈活性检测结果显示:大蒜干粉不同试剂分别提取方法中得到的提取液浓缩物中没有表现出明显的抑菌活性,而鲜蒜提取物在该提取方法中表现出明显的抑菌活性(图1),说明鲜蒜提取物的抑菌成分远远高于干蒜提取物的抑菌成分,同时也表明大蒜提取物抑菌成分可能不稳定。

2.3 提取温度对提取物抑菌活性的影响

大蒜提取物抑菌活性物质很不稳定,据报道大蒜提取物对提取温度非常敏感,60℃处理100 min,100℃处理10 min,其活性显著降低^[10]。通过不同提取温度下获得提取物进行抑菌圈活性检测发现,温度对石油醚、乙酸乙酯和无水乙醇鲜蒜提取物抑菌活性有明显影响,28℃下鲜蒜提取物抑菌活性明显高于80℃下鲜蒜提取物抑菌活性。因此,提取大蒜抑菌活性成分时要注意提取温度不能太高,以室温为宜。

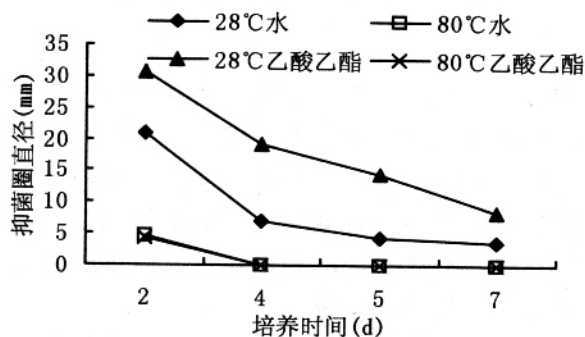


图2 蒜酶失活与抑菌活性的关系

2.4 大蒜酶处理对提取物抑菌活性的影响

大蒜酶酶解蒜氨酸产生含硫化合物是目前大蒜提取物中报道最多的成分,也是大蒜提取物中主要的抑菌活性成分^[11, 12]。本文对大蒜酶高温失活后获得的提取物进行抑菌圈活性检测,发现大蒜酶80℃失活后乙酸乙酯提取物几乎没有抑菌活性;而未失活(28℃)大蒜酶乙酸乙酯提取物抑菌

活性则很强(图2),说明提取物中的主要抑菌活性成分不是完整大蒜本身含有的,是在大蒜粉碎过程中大蒜酶的作用下产生的。同时发现未失活大蒜酶乙酸乙酯和水提取物均有非常好的抑菌活性,且乙酸乙酯提取物的抑菌活性明显好于水提取物,这进一步说明乙酸乙酯是大蒜抑菌活性成分的最佳提取试剂。

根据HPLC结果可以看到大蒜酶失活前后大蒜水提取物成分有明显的差别。大蒜酶失活后,提取物中保留时间为4.939 min的化合物,含量非常高,且在大蒜酶没有失活的提取物中几乎不含有,是大蒜酶失活前特有的产物,结合前人报道^[9]和抑菌活性分析,该化合物可能为蒜氨酸;大蒜酶未失活时,提取物中保留时间为3.692 min和14.236 min的化合物,在大蒜正常提取产物中含量非常高,而大蒜酶失活后几乎不含有,根据蒜氨酸在大蒜酶作用下的反应过程和前人报道^[8, 13]分析这两种化合物可能为丙酮酸和大蒜素,丙酮酸是大蒜素产生时的副产物;大蒜油标品只有一个主峰,保留时间为15.960 min,是化合物为稀丙基二硫化物,其是大蒜挥发油和提取物的主要成分。这些结果表明,大蒜素是蒜氨酸在大蒜酶的作用下产生的,是大蒜的主要活性成分。根据结果,大蒜提取物中的成分随提取条件变化改变很大,原因是大蒜活性成分中含有不稳定的氧或硫,在提取过程中不断发生化学反应,生成一些新的化合物,并进一步影响到提取产物的抑菌活性。

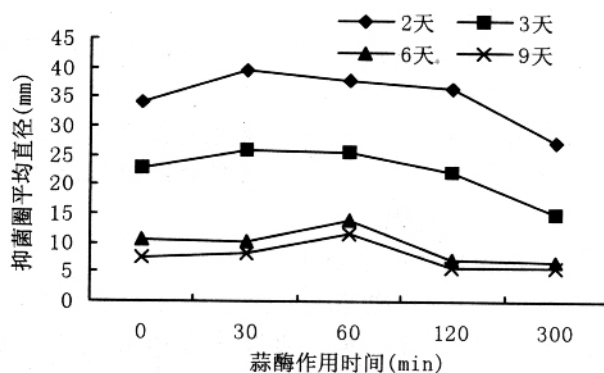


图3 大蒜酶酶解时间和抑菌活性的关系

在大蒜粉碎或受到病原物等侵入时,大蒜中含有的蒜氨酸或S-烯丙基半胱氨酸亚砷,遇大蒜酶分解产生大蒜素,大蒜素进一步分解产生各种硫醚化合物,有报道25℃时大蒜酶最佳酶解时间为60 min,也有报道23℃时大蒜酶30 s内可酶解97%的蒜氨酸,还有报道常温时大蒜酶酶解蒜

氨酸只需要几分钟, 可见大蒜有效活性成分提取过程中大蒜酶的作用时间会影响大蒜提取物的抑菌活性。通过大蒜酶不同作用时间下获得的提取物进行抑菌圈活性检测, 发现 28 时大蒜酶酶解大蒜组织碎片 120 min 后大蒜乙酸乙酯提取物抑菌活性明显降低; 大蒜酶酶解大蒜组织碎片 0 ~ 120 min 之间时, 大蒜乙酸乙酯提取物抑菌活性差别不大; 大蒜酶酶解大蒜组织碎片 30 ~ 60 min 时, 大蒜乙酸乙酯提取物抑菌活性偏高。所以, 在 28 提取大蒜抑菌活性成分时, 大蒜酶酶解大蒜组织碎片 30 ~ 60 min 为宜(图 3), 这与前述报道^[9]基本吻合。

2.5 抑菌活性与提取物成分的关系

大蒜提取物中的抑菌活性成分非常复杂, 包括大蒜素、烯丙基二硫化物、烯丙基三硫化物、阿

霍烯和二噻烯等成分, 但通过实验分析发现, 大蒜提取物中不仅仅是这些成分具有抑菌活性。通过提取物抑菌活性(图 1)和 TLC 结果(表 1)分析, R1 ~ R18 及以后成分是大蒜提取物的主要抑菌活性成分, 因为蒜酶失活后的提取物几乎没有抑菌活性(图 2), 也没有 R1 ~ R18 及以后成分; R1 ~ R7 是主要的抑菌活性物质, 但其挥发性或易分解性很强, 抑菌圈随时间延长降低很快(图 1); R8 以后的成分也有抑菌活性, 且抑菌作用比较稳定, 抑菌圈随时间延长变化缓慢(图 1); 因此, 大蒜提取物中的抑菌活性成分非常复杂, 是多个成分的共同抑菌作用, 其中包括易挥发和易分解的化合物, 也包括稳定和不易挥发的化合物, 其中易挥发含硫化合物是主要的抑菌活性成分。

表 1 大蒜提取物 TLC 结果

提取试剂	R1 ~ R3	R4	R5 ~ R7	R8 ~ R11	R12 ~ R18	R18 及以后
挥发油	++	+++	++	+	-	-
石油醚	++	+++	++	++	-	-
乙酸乙酯	++	+++	++	+++	++	+
无水乙醇	+	+	+	++	++	++
75%乙醇	-	-	-	++	++	+
50%乙醇	-	-	-	++	+	+
蒜酶失活 / 水	-	-	-	-	-	-
蒜酶 / 水	-	-	-	+	+	++
蒜酶失活 / 乙酸乙酯	-	-	-	-	-	-
蒜酶 / 乙酸乙酯	-	+++	+	++	++	+

注:“-”代表没有,“+”代表含量少,“++”代表含量一般,“+++”代表含量很高。

3 结 论

以番茄早疫病病原菌为指示菌, 抑菌圈法为提取物活性检测方法, 筛选大蒜材料、大蒜提取方法及提取试剂等条件, 发现鲜蒜在室温粉碎后, 放入 28 培养箱使大蒜酶酶解 30 ~ 60 min, 然后加入乙酸乙酯试剂在 28 震荡提取 12 h, 30 旋转蒸发器浓缩提取物, 这样获得的提取物抑菌活性最好。

同时, 通过抑菌活性与 TLC 和 HPLC 检测结果比较分析, 证实大蒜提取物中的抑菌活性成分是大蒜在粉碎过程中产生的, 主要为大蒜酶酶解蒜氨酸产生的大蒜素和大蒜素进一步分解产生的其他含硫化合物, 其成分多达 18 种以上, 且易挥发成分抑菌活性最好。

参考文献:

[1] 林辰壹, 程智慧. 大蒜提取液对食用菌杂菌的抑制作用[J]. 食用菌学报, 2000, 7(1): 62- 64 .
[2] 赵凤岭, 陆明旦, 于 慧, 等. 大蒜的保健作用及大蒜素的提

取[J]. 山东轻工业学院学报, 1997, 11(1): 68- 70 .
[3] 沈联慈, 潘炯光, 徐植灵, 等. 大蒜挥发油的化学成分与质量研究[J]. 中草药, 1993, 24(2): 66- 68 .
[4] 陆茂松, 闵吉梅, 王 夔. 大蒜有机硫化物的研究() [J]. 中草药, 2001, 32(10): 867- 870 .
[5] 陆茂松, 闵吉梅, 王 夔. 大蒜有机硫化物的研究() [J]. 中草药, 2002, 33(12): 1059- 1061 .
[6] O Calvo- Gómez, J. Morales- L ópez, Mercedes G. L ópez. Solid- phase microextraction - gas chromatographic - mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation, Journal of Chromatography A, 2004.1036:91- 93.
[7] 徐任生. 天然产物化学 [M]. 北京: 科学出版社 (第二版), 2003 .
[8] E. A. O'Gara, D. J. Hill, D. J. Maslin. Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against Helicobacter pylori, Applied and Environmental Microbiology, 2000. 66 (5): 2269- 2273.
[9] I.Arnault, J.P. Christid ès, N. Mandon, et al . High- performance ion- pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, dextroalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection, Journal of Chromatography A, 2003, (991):69- 75.
[10] 陈 彬, 王艳辉, 马润宇. 提取大蒜有效成分- 有机硫化物[J]. 北

京化工大学学报, 2004, 31(2): 24- 27 .

[11] 曹庆穗, 徐为民, 严建民, 等. 大蒜的功能成分及其保健功效[J]. 江苏农业科学, 2004(6): 134- 136 .

[12] Serge Ankri, David Mirelman, Antimicrobial properties of allicin from garlic, *Microbes and infection*, 1999, 2: 125- 129 .

[13] I. Arnault, T. Haffner, M.H. Siess, et al. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, (37): 963- 970 .

(上接第 40 页)也较丰富。草原红牛是有计划地引入优秀国外品种与本地蒙古牛杂交而育成的培育品种, 通过有效的选择和淘汰, 在保持本地蒙古牛的优秀遗传物质基础上又吸收了国外品种的优秀基因, 从而造成了草原红牛有较高的遗传多样性。夏洛来牛、西门塔尔牛和利木赞牛属国外优秀品种, 经过长期近交和人工选育产生基因分离并使部分等位基因丢失, 座位多态性降低, 从而使多态信息含量降低。当位点不多、多态性不高时相应的样本群体需要较大的取样个体数目。由于长期的近交和人工选育产生近交分化, 群体中不断淘汰不利基因, 纯化有利基因, 使群体基因型趋于一致和纯合, 而导致了遗传基因多样性的低水平。

3.2 5 个群体间的亲缘关系分析

关于群体间遗传距离, 从遗传学观点来看, 遗传距离最适宜测度应是单位长度核苷酸或密码子的差数, Nei 提出了一个从大量位点基因频率数据估算每个位点平均密码子差数的统计方法。群体间遗传距离是测定不同群体亲缘关系的标准, 弄清群体间亲缘关系远近又对了解群体间的分化程度、利用杂种优势理论指导实际生产有着重要意义。本实验通过计算出 5 个品种牛间的遗传距离, 从表 4 可以看出, 草原红牛与蒙古牛间遗传距离最近, 仅有 0.278 6; 与夏洛来牛的遗传距离为 0.305 9; 与利木赞牛的遗传距离为 0.389 2; 与西门塔尔牛的遗传距离最大, 为 0.418 4。证实了草原红牛是由蒙古牛培育而成的, 故草原红牛先和蒙古牛聚为一类, 再与夏洛来聚为一类, 然后再与利木赞聚为一类, 最后与西门塔尔聚为一类。查阅历史文献可知, 以上结果与实际育种事实相符。草原红牛是由短角牛和蒙古牛培育而成的。夏洛来牛原产于法国中部、西部、东南部, 1850 年从英国引入白短角牛进行杂交。利木赞原产于法国中部, 1850 年开始培育。由于地理位置缘故, 夏洛来和利木赞二者亲缘较近。而西门塔尔牛原产于阿尔卑斯山区, 以瑞士西部居多。公元前 5 世纪, 瑞典向瑞士西方移民, 带来勾特牛, 经与当地牛杂交和

选育, 培育成现代品种, 由于离中国距离较远故与草原红牛遗传距离也最远。

4 结 论

本研究以草原红牛、蒙古牛、夏洛来牛、利木赞牛和西门塔尔牛等 5 个群体为研究对象, 经过牛血液或肝脏基因组 DNA 的提取、8 对微卫星引物的 PCR 扩增、扩增产物的聚丙烯酰胺电泳分型、PPAP3.0 和 SPSS10.0 软件分析等步骤分析了各位点等位基因大小、基因频率、标记基因型、多态信息含量和杂合度。结果表明: 8 个微卫星位点均属于高度多态性位点, 用于微卫星的遗传标记研究是较理想的; 草原红牛与西门塔尔牛之间遗传距离最大, 为 0.418 4; 与蒙古牛之间遗传距离最小, 为 0.278 6, 与夏洛来牛、利木赞牛遗传距离分别是 0.305 9 和 0.389 2。故草原红牛先和蒙古牛聚为一类, 再与夏洛来牛聚为一类, 然后再与利木赞牛聚为一类, 最后与西门塔尔牛聚为一类。

参考文献:

- [1] Botstein D, White R L, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic linkage map on men using restriction fragment length polymorphisms *Am.J.Hum.Genet.*, 1980, (32): 314- 331 .
- [2] Valsangiacom, C.Baggi, F.GainV., et al. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies *Clin. Microbiol.*, 1995, 33: 1717- 1719 .
- [3] 吴伟, 王栋, 曹红鹤. 微卫星 DNA 标记对 5 个中外黄牛品种/群体遗传结构的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000(4): 5- 10 .
- [4] J.萨姆布鲁克, E F 佛里奇, 等著(美), 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 《分子克隆实验指南》第二版. 北京: 科学出版社, 1999, 188- 197 .
- [5] Wetton J H. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 1987, 327: 147- 149 .
- [6] Jongeneel, CV. A polymorphic microsatellite in the tumor necrosis factor alpha promoter identifies an allele unique to the NZW mouse strain. *Experimental Medicine*, 2003, 171(6): 2141- 2146 .
- [7] Van Zeveren A, Peelman L, Van de Weghe A, et al. A genetic study of four Belgian pig population by means of seven microsatellite loci. *J Anim Breed Gent*, 1995, 112(3): 191- 204 .