

菜芙蓉总黄酮提取物抑菌作用及其稳定性研究

仇 燕, 王明珠, 赵紫华

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘 要:以菜芙蓉花为试材,采用乙醇回流法提取菜芙蓉总黄酮,并利用 AB-8 大孔树脂进行纯化,通过滤纸片扩散法研究了菜芙蓉总黄酮提取物的抑菌作用及温度、pH 值和紫外光对抑菌活性的影响。结果表明:纯化后菜芙蓉的提取物中总黄酮含量达 46.5%,菜芙蓉总黄酮提取物对细菌的抑制效果较强,对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)均为 0.125 mg/mL,提取物的抑菌活性具有很好的热稳定性和紫外光稳定性,随 pH 值升高抑菌效果大大降低。

关键词:菜芙蓉;总黄酮;抑菌;稳定性

中图分类号:R 284 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0150-04

菜芙蓉 (*Abelmoschus manihot* (L.) Medic.) 属锦葵科秋葵属一年生草本植物,又称金花葵,多分布于河北、山东、河南、陕西等地区,常生于山谷草丛,田边或沟旁灌丛间。菜芙蓉花具有通淋、消肿、解毒等功效,是我国典籍记载的传统药食两用资源^[1],近年来的研究表明,菜芙蓉富含天然黄酮类化合物、维生素 E、不饱和脂肪酸,其中菜芙蓉花中的生物黄酮含量达干重的 5.6%^[2],具有很高的开发价值。植物次生代谢物生物活性的研究能够得到具有实用价值的化合物^[3]。植物黄酮类化合物是植物次生代谢产物,广泛存在于植物体中。黄酮类化合物通过破坏细胞膜,抑制核酸合成,抑制能量代谢,抑制细胞壁和细胞膜的合成,具有直接的抗菌活性,也可协同抗生素耐药性调节活性,干扰细菌的致病因子(包括酶、毒素和信号受体)^[4],从而对自然界中的很多病原微生物具有广泛的抑制和杀灭作用。

目前,有关菜芙蓉黄酮类化合物抑菌活性及其稳定性的研究尚鲜见报道。现以经 AB-8 大孔树脂纯化的菜芙蓉总黄酮提取物为研究对象,采用滤纸片扩散法考察其对大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及啤酒酵母抑菌效果,以 2 倍稀释法确定其最低抑菌浓度并分析了其抑菌稳定性,以期菜芙蓉总黄酮的开发利用提供理论依据。

第一作者简介:仇燕(1977-),女,博士,副教授,现主要从事植物次生代谢物生物活性等研究工作。E-mail:qiuyan2015@126.com.

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2014208084)。

收稿日期:2015-12-23

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菜芙蓉花产自河北井陉县。

供试试剂为 AB-8 大孔吸附树脂(天津光复精细化工研究所),金丝桃苷标准品(批号:111521-200303)、芦丁标准品(批号:100080-200707,中国药品生物制品检定所)。石油醚、无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠和氢氧化钠等均为分析纯。

供试菌种为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),均由河北科技大学微生物实验室提供。细菌采用营养琼脂培养基,真菌采用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

试验仪器为 RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),Avanti J-26 贝克曼高速离心机(美国贝克曼公司),UV-2000 分光光度计(尤尼柯(上海)有限公司),Waters1525 高效液相色谱仪(美国沃特世公司),SW-CJ-2FD 超净工作台(苏净安泰技术有限公司);CoolSafe 110-4 超低温冷冻干燥机(丹麦 labogene-Scanvac 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菜芙蓉总黄酮提取物制备 干燥至恒重的菜芙蓉花粉末过 100 目筛,称取 50 g,以 80%乙醇,90℃回流提取 2 次^[5],第 1 次以料液比 1:15 g/mL 提取 2 h,第 2 次以料液比 1:7.5 g/mL 提取 1 h,合并抽滤得到滤液。滤液经 12 000 r/min 离心 15 min,真空减压旋干,得粗制菜芙蓉花总黄酮粗提物浸膏,冷冻干燥后得菜芙蓉总黄酮粗提物 A。将 A 水溶液过预处理的 AB-8 大孔树脂

柱,用去离子水洗脱,至流出液不再含糖,与 2% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 无显色反应,然后用 75% 乙醇洗脱至流出液与 2% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 无显色反应,收集洗脱液,减压旋蒸至无醇味而后冷冻干燥,得到菜芙蓉总黄酮精制物 B。

1.2.2 菜芙蓉总黄酮测定 称取干燥至恒重的芦丁标准品,80%乙醇溶解至最终浓度为 0.4 mg/mL。分别准确吸取芦丁标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 到 10 mL 容量瓶,依次加入 0.3 mL 80%乙醇,0.3 mL 5% NaNO_2 溶液,摇匀,静置 6 min;再次加入 0.3 mL 5% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,静置 6 min;最后加入 4 mL 4% NaOH 溶液,摇匀,用 80%乙醇定容到 10 mL,室温下静置 10 min。用可见分光光度计在 508 nm 处测定吸光度^[2],得到的结果通过最小二乘法做出线性回归,得到标准曲线方程为 $y=14.154x-0.0011$ (x 为芦丁浓度 mg/mL, y 为吸光度),相关系数 $r=0.9996$ 。取一定体积的待测液样于 10 mL 容量瓶中,用 80%乙醇水溶液补加至 5 mL,按 1.2.1 方法测定吸光度值,重复 3 次取平均值,由回归方程计算总黄酮含量。

1.2.3 高效液相色谱法检测精制菜芙蓉总黄酮 将 A 和 B 用甲醇溶解,经 0.45 μm 滤膜过滤后经高效液相色谱仪分析,以金丝桃苷为标准品。色谱条件^[6]: Waters Symmetry C18(4.6 mm \times 250 mm,5 μL);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B);洗脱条件:梯度洗脱:0~40 min,体积分数 A 10%~15%;40~60 min,体积分数 A 15%~40%;检测波长:360 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL ,理论塔板数不低于 3 000。

1.2.4 菌种的活化及菌悬液的制备 供试菌活化:采用划线法将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌置 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h;啤酒酵母置 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h。菌悬液制备:挑取活化好的菌落,用无菌生理盐水 10 倍稀释法制得不同浓度的菌悬液,通过平板计数法使最终菌悬液所含菌体浓度为 $10^6\sim10^7$ CFU/mL。

1.2.5 菜芙蓉总黄酮提取物的抑菌作用-滤纸片扩散法 打孔器将滤纸加工成直径为 6 mm 的圆形滤纸片,高压灭菌后备用。用 70%乙醇溶解 B,按 1.2.2 方法测定总黄酮浓度,稀释成不同浓度总黄酮提取物溶液,备用。将灭菌后滤纸片分别浸泡入不同浓度的菜芙蓉总黄酮提取物溶液浸泡 1 h 后取出,挥发除去乙醇^[7]。吸取 200 μL 菌悬液分别均匀涂布于已灭菌的各个平皿上,将浸泡过样品溶液的滤纸片隔一定距离平铺在培养皿上^[8],每平皿贴全所有浓度滤纸片及对照,每菌种设 3 个重复,以无菌水作为对照。将各培养皿置于恒温培养箱(细菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 12 h,酵母菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h)。用游标卡尺十字交叉法测量抑菌圈直径,取其平均值。

1.2.6 菜芙蓉总黄酮提取物对供试菌的最低抑菌浓度(MIC)测定 将一定量的 B 溶液加入到已灭菌置 45 $^{\circ}\text{C}$

下恒温培养基中,使总黄酮提取物的终浓度分别为 1.000、0.500、0.400、0.250、0.125、0.075、0.050、0.025 mg/mL,充分混合均匀,倾注平皿待冷却凝固后,每平板注入 200 μL 菌悬液并涂布均匀,以无菌水为空白对照。观察菌体的生长情况,无菌生长的平皿中所含药物最小的质量浓度即为最低抑菌质量浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[9-10]。

1.2.7 菜芙蓉总黄酮提取物稳定性研究 选取菜芙蓉总黄酮提取物抑菌性能最为显著的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌进行抑菌稳定性的研究。1)酸碱稳定性的研究:参照文献[11],用不同 pH 值的 70%乙醇溶解 B 使总黄酮终浓度为 1.000 mg/mL,调节溶液的 pH 值分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0,将滤纸片浸泡其中 1 h,挥干乙醇,备用。注入 0.2 mL 菌悬液并均匀涂布到培养基上,把浸入不同 pH 的菜芙蓉总黄酮提取物的滤纸片隔一定距离放到培养基上,以抑菌圈直径为指标测定其抑菌效力,试验重复 3 次。2)温度对菜芙蓉提取物稳定性的研究:将 B 分别在 4、20、40、60、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下各处理 30 min,另一组在 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温条件下加热 30 min^[12]。70%乙醇溶解不同条件处理的样品使总黄酮浓度为 1.000 mg/mL。将滤纸片浸泡于菜芙蓉花总黄酮提取物 1 h,挥发除去乙醇,用滤纸片法测定处理样品的抑菌状况,试验重复 3 次。3)紫外光对菜芙蓉总黄酮提取物稳定性的研究:将 B 分别在紫外灯下各处理 5、10、15、20、25 min 后,同时以未经紫外灯照射的菜芙蓉总黄酮提取物为对照。用 70%乙醇溶解上述样品使菜芙蓉花总黄酮提取物浓度为 1.000 mg/mL,用滤纸片法测定处理样品的抑菌状况,重复 3 次。

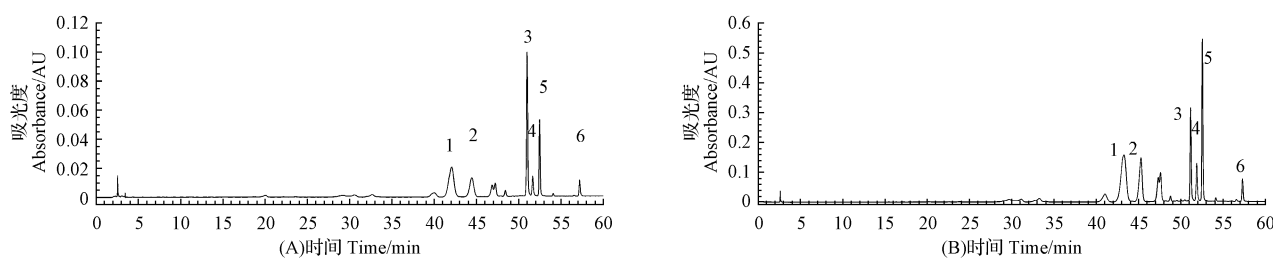
2 结果与分析

2.1 菜芙蓉总黄酮纯化前后高效液相色谱比较

在相同条件下,金丝桃苷的保留时间为 42.07 min,其它 5 种物质均有黄酮特征吸收峰。由纯化前后的液相色谱图(图 1)可知,AB-8 大孔树脂对菜芙蓉花提取液中黄酮类物质有一定的富集作用。以芦丁为标准品,按 1.2.2 比色法测定经 AB-8 大孔树脂纯化后精制物总黄酮,纯度提高到 46.5%,说明该方法对菜芙蓉花总黄酮有一定的纯化作用,可用于后续菜芙蓉总黄酮抑菌活性的研究。

2.2 菜芙蓉总黄酮提取物对供试菌的抑制作用

从表 1 可知,菜芙蓉总黄酮对所选细菌的抑菌效果好,在该试验所设浓度下菜芙蓉总黄酮的抑菌活性都明显高于对照。总黄酮浓度为 0.375 mg/mL 时具有抑菌现象,其中对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制效果较高,随着浓度的增加,其抑菌效果也呈上升趋势,当总黄酮浓度达 10.000 mg/mL 时对枯草芽孢杆菌抑制效果最高,抑菌圈直径达 34.5 mm。但是菜芙蓉花总黄酮对啤酒酵母则不显示抑菌效应。



注:1,金丝桃苷;2~6,未知物。

Note:1, hyperoside. 2~6, unknown compounds.

图1 菜芙蓉总黄酮粗提物(A)与精制物(B)HPLC 色谱图比较

Fig. 1 The comparison of HPLC between crude total flavonoids extract (A) and purified total flavonoids extract (B) from *Abelmoschus manihot*

表 1

菜芙蓉总黄酮浓度对供试菌种抑菌圈直径的影响

Table 1

The effect of concentration of total flavonoids of *Abelmoschus manihot* on the inhibitory zone diameter

试验菌种 Test bacteria	总黄酮浓度 Concentration of total flavonoids/(mg · mL ⁻¹)						对照 Control
	10.000	5.000	2.500	1.250	0.750	0.375	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	20.2±0.2	16.5±0.1	14.5±0.1	13.7±0.1	11.2±0.2	8.7±0.2	0
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	23.5±0.1	20.2±0.1	17.8±0.3	14.5±0.2	8.3±0.1	7.8±0.2	0
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	26.2±0.3	22.1±0.2	18.6±0.4	16.8±0.1	14.8±0.2	10.9±0.3	0
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	34.5±0.2	32.4±0.3	29.5±0.1	23±0.2	18.2±0.1	12.6±0.2	0
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0	0	0	0

2.3 菜芙蓉总黄酮提取物的最低抑菌浓度(MIC)

由表 2 可知,菜芙蓉总黄酮提取物对 4 种供试细菌的 MIC 分别为:大肠杆菌 0.250 mg/mL,蜡状芽孢杆菌

0.250 mg/mL,枯草芽孢杆菌 0.125 mg/mL,金黄色葡萄球菌 0.125 mg/mL。对啤酒酵母而言,菜芙蓉花无抑菌活性,这一结果与前述滤纸片法测定抑菌圈的结果一致。

表 2

菜芙蓉总黄酮对供试菌最低抑菌浓度的影响

Table 2

MIC of total flavonoids of *Abelmoschus manihot* on tested strains

试验菌种 Test bacteria	总黄酮浓度 Concentration of total flavonoids/(mg · mL ⁻¹)								对照 Control
	1.000	0.500	0.400	0.250	0.125	0.075	0.050	0.025	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	—	—	—	—	—	+	+++	+++	+++
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注:“—”表示无菌生长;“+”表示菌生长少;“++”表示菌生长较多;“+++”表示菌生长很多。

Note:“—” means no bacterial growth,“+” means less bacterial growth,“++” means more bacterial growth,“+++” means much bacterial growth.

2.4 菜芙蓉总黄酮抑菌活性的稳定性研究

2.4.1 菜芙蓉总黄酮在不同温度下的抑菌活性的变化

以枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为试验菌种,测定热处理后的菜芙蓉总黄酮提取物的抑菌活性。由图 2

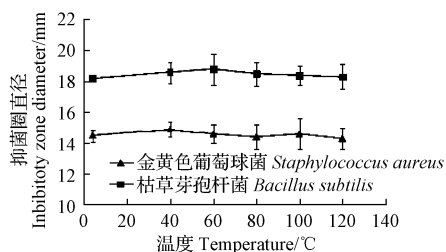


图 2 温度对菜芙蓉总黄酮提取物抑菌圈直径的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the diameter of inhibitory zone of *Abelmoschus manihot* total flavonoids extract

可以看出,不同温度处理后,菜芙蓉总黄酮提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径维持在 14~15 mm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径维持在 18~19 mm。即使在高温 121℃处理 30 min 后菜芙蓉总黄酮提取物仍具有很高的抑菌活性。这表明菜芙蓉总黄酮提取物的抑菌活性具有较好的热稳定性。

2.4.2 酸碱稳定性对菜芙蓉总黄酮提取物抑菌活性的影响 由图 3 可知,随着 pH 值升高,菜芙蓉总黄酮提取物对细菌的抑制能力不断降低。菜芙蓉总黄酮在酸性条件下表现出较强的抑菌活性,而在 pH 值大于 8 时抑菌活性较弱,抑菌圈直径在 6~7 mm,可能是由于碱性环境破坏了菜芙蓉总黄酮提取物中抑菌性物质的结构(或活性),导致抑菌活性降低的缘故^[13]。

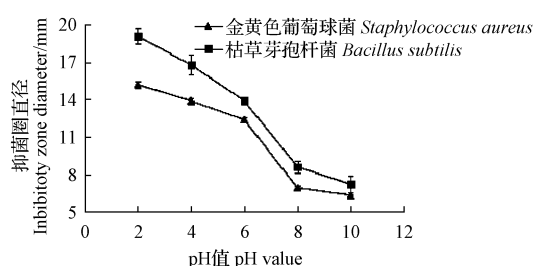


图3 pH值对菜芙蓉总黄酮提取物抑菌圈直径的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the diameter of inhibitory zone of *Abelmoschus manihot* total flavonoids extract

2.4.3 紫外光照射对菜芙蓉总黄酮提取物抑菌的稳定性研究 以枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为试验菌种,把等量的菜芙蓉黄酮提取物经不同时间的紫外光照射后,测定其抑菌活性的变化。由图4可知,不同紫外光照射时间下,菜芙蓉总黄酮提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径维持在14~15 mm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径均在18 mm左右,结果表明随紫外光处理菜芙蓉花提取物的时间变化,菜芙蓉黄酮提取物的抑菌活性基本保持不变。由此可见,菜芙蓉花提取物对紫外光具有极高的稳定性。

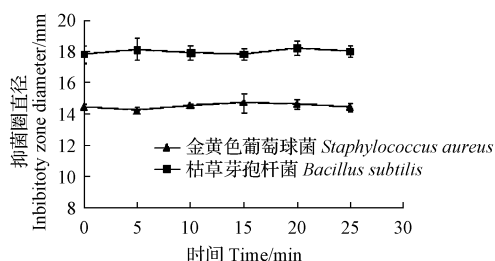


图4 紫外线照射对菜芙蓉总黄酮提取物抑菌圈直径的影响

Fig. 4 Effect of ultraviolet radiation on the diameter of inhibitory zone of *Abelmoschus manihot* total flavonoids extract

3 结论

菜芙蓉花总黄酮粗提物经 AB-8 大孔树脂纯化后得到总黄酮精制物, HPLC 检测结果表明, AB-8 大孔树脂

对菜芙蓉花提取液中黄酮类物质有一定的富集作用,纯化后菜芙蓉提取物中总黄酮含量为 46.5%。菜芙蓉总黄酮精制物对所选细菌的抑菌效果明显强于对照,而对酵母菌没有抑制作用。菜芙蓉总黄酮对 4 种供试细菌的 MIC 分别为大肠杆菌 0.250 mg/mL, 蜡状芽孢杆菌 0.250 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 0.125 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 0.125 mg/mL。菜芙蓉总黄酮对温度和紫外光具有良好的稳定性,但是随着 pH 值升高,其抑菌活性明显下降。该研究主要考察了菜芙蓉花总黄酮提取物的抑菌活性及其稳定性,课题组下一步将进行菜芙蓉主要抑菌活性物质的分离纯化与结构分析研究,从而明确抑菌的物质基础进而探究其抑菌机制。

参考文献

- [1] WANG Z Y, WANG S Z. Natural nutritional supplementary food of *Abelmoschus manihot* (LINN.) Medius; China, WO/2009/052680[P]. 2009-04-30.
- [2] 仇燕. 菜芙蓉花中总黄酮的提取及含量测定[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2006, 30(6): 713-715.
- [3] 陈建中, 葛水莲, 肖玉菲. 菊科植物鬼针草浸提物抑菌活性研究[J]. 北方园艺, 2012(21): 83-85.
- [4] 柯春林, 任茂生, 王娣, 等. 黄酮化合物抗菌机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 388-391.
- [5] GUO J M, XUE C F, DUAN J A, et al. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components *in vivo* [J]. Phytomedicine, 2011, 18(14): 1250-1254.
- [6] 李永, 葛兆宏, 段琼辉. 黄蜀葵中活性成分含量测定[J]. 亚太传统医药, 2014(10): 16-18.
- [7] 廖鹏飞, 廖艳桃, 吴福恒. 鼠曲草提取液黄酮类化合物抗菌及抗氧化性能[J]. 食品科技, 2014, 39(3): 193-197.
- [8] 孟良玉, 兰桃芳, 卢佳琨, 等. 蜂胶提取物中抑菌成分稳定性研究[J]. 食品科学, 2010, 3(21): 98-100.
- [9] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检测手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 陆雪莹, 热依木古丽·阿布都拉, 李艳红, 等. 新疆石榴皮总多酚有效部位的氧化、抗菌及抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 26-30.
- [11] 郝淑贤, 刘欣, 赵力超, 等. 荸荠英提取物抑菌成分稳定性的探讨[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 71-74.
- [12] 滕蓉, 李清禄, 张温玲. 鬼针草抑菌物质提取及抑菌活性研究[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2014, 43(6): 637-641.
- [13] 陈佳佳, 刘凡, 廖森泰, 等. 桑叶提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 88-91.

Study on Antimicrobial Activity and Stability of Total Flavonoid From *Abelmoschus manihot*

QIU Yan, WANG Mingzhu, ZHAO Zihua

(College of Bioscience and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract: Taking *Abelmoschus manihot* flowers as test material, the total flavonoids was extracted by the ethanol refluxing and purified by AB-8 macroporous resin. The inhibition effect of extracts on microorganisms and the effect of temperature, pH value and ultraviolet radiation on its antimicrobial activities were studied by the method of filter paper dispersion. The results showed that the total flavonoids content of *Abelmoschus manihot* extracts was 46.5% after purifying and the extracts exhibited inhibition effects on bacteria. MIC values of total flavonoids against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were both 0.125 mg/mL. The antibacterial activity of *Abelmoschus manihot* extracts was stable under heating and ultraviolet radiation but decreased with the increasing of pH value.

Keywords: *Abelmoschus manihot*; total flavonoids; antimicrobial activity; stability