

doi:10.11937/bfyy.20164461

## 地枇杷抑菌物质提取及抑菌活性研究

杜银香, 胡泽华

(湖北民族学院 医学院, 湖北 恩施 445000)

**摘 要:**以地枇杷为试材,在单因素试验基础上,采用正交实验方法优化地枇杷中抑菌物质的乙醇回流提取工艺,利用牛津杯法检测提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、宋内志菌、白假丝酵母菌的抑菌效果,探讨了热力、紫外线对其抑菌活性的影响。结果表明:乙醇回流法的最佳提取工艺为65%乙醇、料液比1:10 g·mL<sup>-1</sup>,75℃水浴加热0.5 h。提取物对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好,对白假丝酵母菌无抑菌作用。随着提取物浓度的增加,其抑菌作用随之增强,对热力、紫外线有一定的稳定性。

**关键词:**地枇杷;抑菌物质;正交实验;回流法;抑菌活性

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)14-0150-06

地枇杷(*Ficus tikoua* Bur.)属桑科榕属植物,又名地石榴、地板藤、过山龙、地果等,生长在海拔500~2 650 m山坡、草丛或岩石缝隙,在我国主要分布在湖北、湖南、云南等地<sup>[1-2]</sup>。地枇杷能固土保水,绿化环境,是一种优秀的园林护坡植物<sup>[3]</sup>,全株可入药,具有清热利湿、活血通络、解毒消肿等作用<sup>[4]</sup>。

地枇杷在恩施地区较常见,是当地土家族、苗族等少数民族常用的民族药。研究发现地枇杷主要含有黄酮类、三萜类、多酚类及甾体类化合物等多种成分<sup>[5-8]</sup>。在以往研究中,考虑到民间用药习惯,通常采用水煎煮法提取地枇杷中的抑菌物质,地枇杷水提取物有一定的选择性抑菌作用<sup>[9]</sup>。但关于地枇杷醇提取物抗菌作用的研究尚鲜见报道。为了更加全面的研究地枇杷的抗菌作用,该试验以乙醇为溶剂,利用常见的回流法提取地枇

杷抑菌物质,通过单因素试验、正交实验确定地枇杷抑菌物质提取的最佳工艺条件,并对其抑菌作用进行研究,以期地为地枇杷在抗菌作用方面的研究提供参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试地枇杷新鲜藤叶采自湖北民族学院校园,经自来水冲洗干净后,置于50℃干燥箱内烘干,粉碎成粗粉后备用。供试菌种金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠埃希菌(*E. coli*)、宋内志贺菌(*S. sonnei*)、白假丝酵母菌(*C. albicans*)由湖北民族学院医学院微生物实验室提供。供试培养基为MH琼脂、沙保氏培养基。无水乙醇为分析纯。

生物安全柜(NU-425-400S型,美国NuAire公司生产);高压蒸汽灭菌器(CL-32L型,日本ALP公司生产);电热恒温恒湿培养箱(XMT-9017型,重庆永恒试验仪器厂);微电脑电热恒温水槽(SSW型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂);循环水式真空泵(SHZ-D,巩义市予华仪器设备有限公司);旋转蒸发器(RE-3000,上海亚荣生化仪器厂);牛津杯(不锈钢小管,内径

**第一作者简介:**杜银香(1976-),女,本科,实验师,研究方向为中草药抗菌作用。E-mail:yinxiangdu@163.com.

**责任作者:**胡泽华(1975-),男,博士,副教授,研究方向为中草药化学成分与药理。E-mail:hzh75418427@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81560703)。

**收稿日期:**2017-02-04

6 mm, 外径 8 mm, 高 10 mm, 两端平滑, 各管质量相同)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 地枇杷提取物的制备

取地枇杷粗粉适量→热回流→抽滤→浓缩蒸干(回收溶剂)→加入适量生理盐水溶解→不同浓度提取液(以生药计算)→用孔径 0.2  $\mu\text{m}$  无菌薄膜滤菌器过滤后备用。

### 1.2.2 抑菌试验

培养基制备: 细菌采用 MH 培养基, 酵母菌采用沙保氏培养基。菌液制备: 配成浓度为 0.5 号麦氏标准浓度, 再用无菌生理盐水按 1 : 10 稀释, 使其菌液浓度为  $1 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在 15 min 内将指示菌悬液接种到培养基上。采用牛津杯法测定抑菌活性: 用十字交叉法测量其抑菌圈直径, 结果取平均值。抑菌圈直径越大说明抑菌活性越强<sup>[10]</sup>。

### 1.2.3 单因素试验

乙醇体积分数: 称取地枇杷粗粉适量, 按料液比 1 : 10  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  加入不同体积分数的乙醇, 75  $^{\circ}\text{C}$  水浴中加热回流提取 1 h, 得到不同乙醇体

积分数的提取物, 按照 1.2.2 方法测定抑菌活性。料液比: 称取地枇杷粗粉适量, 分别按料液比 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  加入 55% 乙醇, 75  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热回流提取 1 h, 比较得到提取物的抑菌效果。提取时间: 称取地枇杷粗粉适量, 按料液比 1 : 10  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  加入 55% 乙醇, 75  $^{\circ}\text{C}$  水浴分别加热回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 比较得到提取物的抑菌效果。提取温度: 称取地枇杷粗粉适量, 按料液比 1 : 10  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  加入 55% 乙醇, 分别在 45、55、65、75、85、95  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热回流提取 1 h, 比较得出提取物的抑菌效果。

### 1.2.4 正交实验优化

在单因素试验基础上, 以料液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、乙醇体积分数(D)为考察因素, 每个因素选择 3 个水平, 采用  $L_9(3^4)$  正交实验设计。

### 1.2.5 验证试验

在优化工艺的条件下提取地枇杷中的抑菌物质, 按照 1.2.2 抑菌试验方法测定抑菌活性。

表 1

因素与水平

Table 1

Factors and levels

水平	A 料液比	B 提取温度	C 提取时间	D 乙醇体积分数
Level	Solid-liquid ratio/( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Extraction temperature/ $^{\circ}\text{C}$	Extraction time/h	Solvent concentration/%
1	1 : 5	65	0.5	45
2	1 : 10	75	1.0	55
3	1 : 15	85	1.5	65

### 1.2.6 不同浓度地枇杷提取物对不同细菌的抑菌作用

采用牛津杯法测定不同浓度地枇杷提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、宋内志贺氏菌、白假丝酵母菌的抑菌效果。

### 1.2.7 地枇杷提取物抑菌活性稳定性试验

热稳定性试验: 将地枇杷提取物置于 90、100、121  $^{\circ}\text{C}$  处理 20 min 测定抑菌活性。紫外线稳定性试验: 将 5 mL 提取物分装于 90 mm 培养皿内, 置于紫外线灯下照射不同时间后, 采用牛津杯法测定抑菌活性。

## 1.3 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对试验数据进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 乙醇体积分数对抑菌作用的影响

由图 1 可知, 当乙醇体积分数为 35% ~ 55%, 随着乙醇体积分数提高, 提取物的抑菌效果越好, 当乙醇体积分数为 55% 时, 抑菌效果达到最佳, 随着乙醇体积分数的进一步提高, 抑菌效果逐渐减弱。根据相似相溶的原理推测乙醇体积分数 55% 比较合适。

#### 2.1.2 料液比对抑菌作用的影响

由图 2 可知, 在料液比为 1 : 10  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 1 : 25  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 提取物抑菌效果比较好。通常随着溶剂量增加, 提取物浸出的有效成分越多,

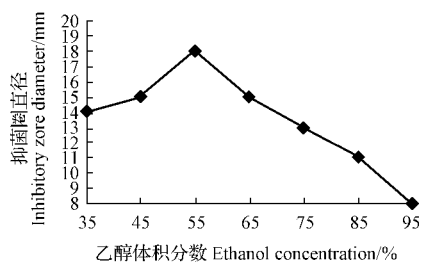


图1 乙醇体积分数对地枇杷抑菌作用的影响

Fig. 1 Effect of different ethanol concentration on antibacterial activity

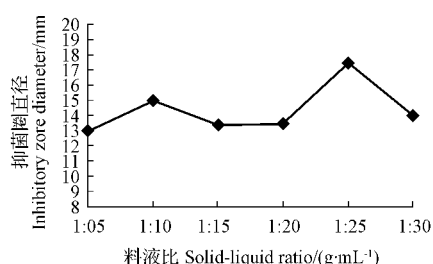


图2 料液比对地枇杷抑菌作用的影响

Fig. 2 Effect of different solid-liquid ratio on antibacterial activity

同时浸出的杂质也就越多,造成溶剂浪费,也会给后面浓缩工作带来麻烦。从经济方面考虑,选择料液比  $1:10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  比较合适。

### 2.1.3 提取时间对抑菌作用的影响

由图3可知,提取时间为1.0 h时,抑菌圈直径最大,提取物的抑菌效果最好。但随着提取时间延长,抑菌圈直径逐渐减小,可能是提取物中的有些抑菌活性成分在长时间的加热过程中活性被破坏了,因此提取时间选择1.0 h比较合适。

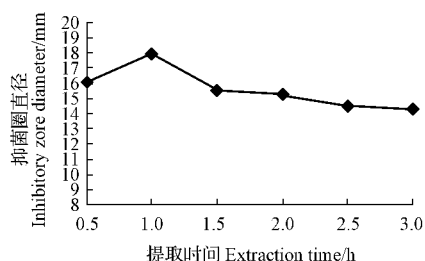


图3 提取时间对地枇杷抑菌作用的影响

Fig. 3 Effect of different extraction time on antibacterial activity

### 2.1.4 提取温度对抑菌作用的影响

由图4可知,随着提取温度升高,抑菌效果逐

渐增强,提取温度为75℃时,抑菌效果达到最佳,但之后随着提取温度升高,抑菌效果逐渐降低。可能是高温破坏了提取物中的有效抑菌成分,因此选择75℃比较合适。

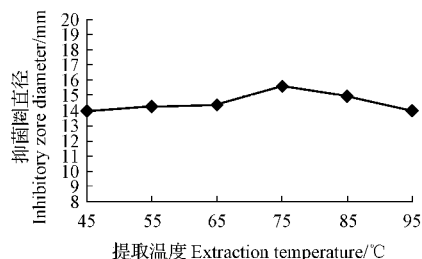


图4 提取温度对地枇杷抑菌作用的影响

Fig. 4 Effect of different extraction temperature on antibacterial activity

## 2.2 正交实验优化

从表2、3可知,影响地枇杷提取物抑菌效果的因素大小顺序依次为料液比(A)>提取温度(B)>乙醇体积分数(D)>提取时间(C)。其中料液比、提取温度各水平之间差异极显著( $P < 0.01$ ),乙醇体积分数各水平之间差异显著( $P < 0.05$ ),这3个因素都选择其最好水平,即  $A_2$ 、 $B_2$ 、 $D_3$ 。提取时间各水平之间差异不显著( $P > 0.05$ ),从节约资源、提高经济效益方面考虑,提取时间选择  $C_1$ ,即提取0.5 h。综合极差和方差分析结果,从地枇杷中提取抑菌物质的优化工艺为  $A_2B_2C_1D_3$ ,即料液比  $1:10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,提取温度75℃,提取时间0.5 h,乙醇体积分数65%,此工艺条件下的提取物抑菌效果最好。

## 2.3 验证试验

在优化工艺条件下,提取地枇杷中的抑菌物质,测定金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径平均值为15.67 mm,高于正交实验中的最高值,说明该工艺条件可以很好的提取出地枇杷中的有效抑菌成分。后续试验的提取物均是在此优化工艺条件下得到的。

## 2.4 不同浓度地枇杷提取物对不同细菌的抑菌作用

由表4可知,地枇杷提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,对白假丝酵母菌没有抑菌作用。同时随着浓度的增加,提取物的抑菌效果逐渐增强。

表 2  
Table 2  
正交实验结果  
Result of orthogonal test

试验编号 No.	因素水平 Factors and levels				金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 提取温度 Extraction temperature	C 提取时间 Extraction time	D 乙醇体积分数 Solvent concentration	抑菌圈直径平均值 Inhibition zone mean diameters/mm
1	1	1	1	1	10.750
2	1	2	2	2	13.000
3	1	3	3	3	13.750
4	2	1	2	3	13.250
5	2	2	3	1	14.750
6	2	3	1	2	14.750
7	3	1	3	2	13.500
8	3	2	1	3	14.500
9	3	3	2	1	12.625
$k_1$	12.500	12.500	13.333	12.708	
$k_2$	14.250	14.083	12.958	13.750	
$k_3$	13.542	13.708	14.000	13.833	
$R$	1.750	1.583	1.042	1.125	

表 3  
Table 3  
方差分析结果  
Result of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
Sources of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	$F$ value	$P$ value
A 料液比 Solid-liquid ratio	18.597	2	9.299	8.829	0.001
B 提取温度 Extraction temperature	16.431	2	8.215	7.800	0.002
C 提取时间 Extraction time	6.681	2	3.340	3.171	0.058
D 乙醇体积分数 Solvent concentration	9.431	2	4.715	4.477	0.021
误差 Error	28.438	27	1.053		
总和 Sum	6 573.250	36			

表 4  
Table 4  
不同浓度的地枇杷提取物抑菌作用  
Antibacterial activity of different extract concentration

试验菌种 Test bacteria	提取液浓度 Extract concentration/(mg · mL <sup>-1</sup> )			阴性对照
	2 000	1 000	500	Negative control
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	18.38±0.54	15.67±0.41	13.38±0.77	—
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	11.00±0.89	9.42±0.58	8.62±0.58	—
宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i>	9.25±0.52	8.67±0.37	—	—
白假丝酵母菌 <i>C. albicans</i>	—	—	—	—

注：—表示无抑菌圈，下同。  
Note: — means no inhibition zone, the same below.

2.5 地枇杷提取物的热稳定性试验

由表 5 可知，经不同温度处理后的提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和宋内志贺菌的抑菌圈直径无显著性变化( $P>0.05$ )，对白假丝酵

母菌仍然无抑菌作用。提取物在 121 ℃处理 20 min 后其抑菌活性都无明显变化，说明提取物中的抑菌活性成分对热力具有相当高的稳定性。

表 5  
Table 5  
热处理后的提取物抑菌作用  
Antibacterial activity of the extract with heating treatment

试验菌种 Test bacteria	处理的温度 Treatment temperature/℃			未处理	阴性对照
	90	100	121	No heating	Negative control
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15.50±0.45	15.33±0.52	15.25±0.52	15.67±0.41	—
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	9.25±0.48	9.33±0.61	9.16±0.68	9.42±0.58	—
宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i>	8.46±0.45	8.45±0.46	8.48±0.44	8.67±0.37	—
白假丝酵母菌 <i>C. albicans</i>	—	—	—	—	—

## 2.6 地枇杷提取物的紫外线稳定性试验

由表6可知,提取物经紫外线照射不同时间后,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和宋内志贺菌

的抑菌圈直径无显著性变化( $P>0.05$ ),对白假丝酵母菌仍然无抑菌作用。说明提取物中的抑菌活性成分对紫外线稳定。

表6  
Table 6 紫外线处理后的提取物抑菌作用  
Antibacterial activity of the extract with UV treatment

试验菌种 Test bacteria	紫外线处理时间 UV treatment time/min				阴性对照 Negative control
	0	20	40	60	
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15.67±0.41	16.17±0.61	16.08±0.80	15.92±0.59	—
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	9.42±0.58	9.58±0.38	9.58±0.38	9.33±0.41	—
宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i>	8.67±0.37	8.53±0.41	8.50±0.32	8.38±0.38	—
白假丝酵母菌 <i>C. albicans</i>	—	—	—	—	—

## 3 结论与讨论

在传统的中药制剂中乙醇是一种常用的提取溶剂<sup>[1]</sup>,该研究选择了以乙醇为溶剂,采用回流法来提取地枇杷中的抑菌物质。通过正交实验发现,考察的因素中除提取时间对其抑菌作用影响不显著外,料液比、提取温度、乙醇体积分数对其抑菌作用的影响均显著。综合极差和方差分析结果,从节约资源、提高经济效益方面考虑,乙醇回流法提取地枇杷中抑菌物质的优化工艺条件为65%乙醇、料液比1:10 g·mL<sup>-1</sup>、75℃水浴加热0.5 h。

优化工艺条件下得到的提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、宋内志贺菌均有一定的抑菌效果,对白假丝酵母菌没有抑菌作用。同时随着提取物浓度的增加,抑菌效果逐渐增强。由于抗菌药物的广泛甚至不合理使用,使得耐药性细菌逐渐增多,很多原来有效的抗生素都发现了其耐药菌株<sup>[12]</sup>,中草药的抗菌机制和西药抗生素不一样,是从整体水平发挥作用,且不易产生耐药性<sup>[13]</sup>,地枇杷提取物对细菌的抗菌作用,也为临床上预防耐药菌株的产生提供了一个新思路。热力和紫外线是常用的消毒灭菌方法,优化工艺条件下得到的提取物对热力、紫外线具有一定的稳定性,提示提取物可以采用这2种方法来进行灭菌。该研究仅对地枇杷提取物的抗菌作用进行了初步研究,在后续的研究中,将对在最佳工艺条件

下得到的提取物进一步分离、纯化,以期能够探索出其抑菌作用机制。

## 参考文献

- [1] 张秀实,吴征镒. 中国植物志:被子植物门. 双子叶植物纲. 桑科[M]. 北京:科学出版社,1997.
- [2] 方志先,廖朝林. 湖北恩施药用植物志[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2006.
- [3] 冯义龙,万涛,朱华明. 优良的护坡植物:地瓜果榕[J]. 南方农业,2011,5(12):10.
- [4] 吴家荣,邱德文. 中国常用中草药彩色图谱[M]. 贵阳:贵阳科技出版社,1993.
- [5] 郭良君,谭兴起,郑巍,等. 地瓜藤化学成分研究[J]. 中草药,2011,42(9):1709-1711.
- [6] 杨世波,张润芝,江志勇,等. 地板藤根的化学成分研究[J]. 中成药,2014,36(3):554-558.
- [7] 徐蔚,王培,李尚真,等. 地果根茎化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2011(23):270-272.
- [8] 田民义,彭礼军,俸婷婷,等. 地枇杷石油醚层化学成分研究[J]. 山地农业生物学报,2014,33(2):89-91.
- [9] 杜银香. 恩施地枇杷水提取物及其萃取成分的抑菌活性研究[J]. 湖北民族学院学报(医学版),2016,33(2):37-39.
- [10] 曾超珍,刘志祥. 枸骨叶抑菌物质的提取及抑菌作用研究[J]. 北方园艺,2009(8):129-131.
- [11] 周晶,冯淑华. 中药提取分离新技术[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [12] 闫绍悦,林树乾,傅剑,等. 五味子提取液抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(10):142-146.
- [13] 李娟,麻晓雪,李顺祥,等. 湖南产石菖蒲和水菖蒲乙醇提取物及其萃取组分抑菌活性的比较研究[J]. 中成药,2014,36(2):393-395.

## Study on Extraction and Antibacterial Activity of Antibacterial Substance From *Ficus tikoua* Bur.

DU Yinxiang, HU Zehua

(Medical College, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

doi:10.11937/bfyy.20165007

## 桑寄生顽拗性种子发芽影响因素研究

韦树根<sup>1,2</sup>, 付金娥<sup>1</sup>, 潘丽梅<sup>1</sup>, 马小军<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院药用植物研究所广西分所, 广西南宁 530023; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**摘要:**以桑寄生种子为试材,参考《国际种子检验规程》和《种子学》中种子发芽试验的方法,研究了不同发芽床、不同温度、不同光照、不同抑菌处理及不同批次等对种子发芽的影响。结果表明:种子最佳发芽床是纸床;不同温度处理种子发芽率之间差异显著,最佳发芽温度是 25~30 ℃变温培养;光照对种子的萌发无影响;种子不消毒,用灭菌水处理效果最好;不同批次的种子质量有差异,春季的种子优于秋冬季的种子。

**关键词:**桑寄生;发芽;发芽势;温度

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)14-0155-05

桑寄生(*Taxillus chinensis* (DC.) Danser), 植物学名“广寄生”<sup>[1]</sup>,是传统的常用大宗中药材,

**第一作者简介:**韦树根(1980-),男,广西灵山人,硕士,副研究员,现主要从事药用植物资源与繁殖及育种等研究工作。E-mail:weishugen2@163.com.

**责任作者:**马小军(1958-),男,北京人,博士,研究员,博士生导师,现主要从事药用植物遗传育种等研究工作。E-mail:mayixuan10@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81403045, 81660637);广西自然科学基金资助项目(2016GXNSFDA380012, 2014GXNSFBA118204);国家科技重大专项中药材种子种苗和种植(养殖)标准平台资助项目(2012ZX09304006)。

**收稿日期:**2017-02-17

具有补肝肾、祛风湿、强筋骨、安胎等功效<sup>[2]</sup>,为历版《中国药典》收载药材。全国与桑寄生有关的成药有几十种,其中 2015 年版《中国药典》<sup>[2]</sup>收载 22 种,如人参再造丸、平肝舒络丸、孕康合剂、壮骨关节丸、参茸保胎丸、独活寄生合剂、调经促孕丸、清脑治瘫丸、舒筋活络酒、壮骨关节丸等,涉及众多家生产企业,年需求量巨大。

目前桑寄生药材主要以野生资源为主,但由于其寄生于林木、果树等经济林上且影响寄主的生长,人们不得不将其除掉。桑寄生果实为浆果,具有丰富的果肉,在野生状态下其传播与繁殖主要通过一些食果肉鸟吞食果实、消化果肉、排出种子来实现。但由于自然环境遭到破坏,桑寄生自

**Abstract:** Taking *Ficus tikoua* Bur. as test material, based on the single factor experiment, the ethanol reflux extraction technology of antibacterial substance from *Ficus tikoua* Bur. was optimized by orthogonal experiment. Bacteriostatic effect of the extracts was detected by Oxford Cup method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, antibacterial effect of *Candida albicans*, and the effect of heat and ultraviolet radiation on its antibacterial activity were also investigated. The results showed that the optimum extraction process of ethanol reflux were 65% ethanol, solid-liquid ratio 1 : 10 g · mL<sup>-1</sup>, 0.5 hours heating in 75 ℃ water bath. The antibacterial effect of the extracts on *Staphylococcus aureus* was the best, and *Candida albicans* had no antibacterial effect. With the increase of the concentration of the extract, its antibacterial effect was enhanced, and it had a certain stability to the heat and ultraviolet radiation.

**Keywords:** *Ficus tikoua* Bur.; antibacterial substances; orthogonal test; reflux method; antibacterial activity