

# 枸骨叶抑菌物质的提取及抑菌作用研究

曾超珍, 刘志祥

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 采用正交试验法探讨枸骨叶抑菌物质的最佳提取条件, 以杯碟法对枸骨叶提取物进行体外抗菌作用以及 pH、温度、时间因素对其抗菌活性的影响。结果表明: 枸骨叶抑菌物质的最佳提取条件为: 以乙酸乙酯为溶剂, 提取温度为 40℃, 料液比为 1:10, 浸提时间为 2.5 h; 枸骨叶提取物对金色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌都有明显的抑菌效果, 最低抑菌浓度分别为 0.0625、0.5、0.5 mg/mL; 最小杀菌浓度为 0.125、1、0.5 mg/mL。该物质抑菌 pH 范围为 7~9, 热稳定性较差, 最佳抑菌时间为 24 h。

**关键词:** 枸骨叶; 正交试验; 抑菌作用

**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)08—0129—03

枸骨叶为冬青科植物枸骨(*Ilex Cornuta* Lindl)的叶, 具有清热解暑、止渴生津的功能, 可用于治疗风热头痛、目赤肿痛、疟疾、烫伤、鼻炎等症。药理学研究表明, 枸骨叶具有抗菌、抗氧化、降血糖、降血脂等多种生物活性<sup>[1]</sup>。近年来对枸骨叶成分的研究发现, 其富含多种具有广泛生物活性的化学物质, 如黄酮类、三萜皂甙类、多糖类、生物碱等<sup>[2-4]</sup>。关于枸骨叶抗菌特性的研究还很少, 该研究通过正交试验确定枸骨叶抑菌物质最佳条件, 并对其抑菌作用的特性进行探讨, 为枸骨叶进一步开发利用提供新的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

枸骨叶: 2008 年 9 月采于中南林业科技大学, 除去杂质, 晒干备用。供试菌种: 金色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌由该实验室保存并培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 枸骨叶抑菌物质的提取** 以溶剂 A、提取时间 B、提取温度 C、料液比 D 为因素, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)按表 1 方法进行枸骨叶抑菌活性成分的提取, 根据各处理对 3 种供试菌抑制作用, 确定最佳提取方法, 在该条件下进行大量提取, 得到的提取液, 减压浓缩, 得原液(浓度为 1 mg/mL)。制备方法: 枸骨叶→粉碎→过 80 目筛→加溶剂→恒温水浴浸提→离心、过滤→浓缩滤液→原液。

**1.2.2 菌悬液的制备** 3 种供试菌种用牛肉膏蛋白胨

培养基斜面活化, 扩大培养, 然后用无菌生理盐水配制成 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mL 菌悬液, 备用。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	溶剂 A	提取时间 B/h	提取温度 C/℃	料液比 D(w:v)
1	乙酸乙酯	2	40	1:10
2	正丁醇	2.5	60	1:20
3	95%乙醇	3	80	1:30

**1.2.3 枸骨叶提取物的抑菌试验** 采用杯碟法测定其抑菌作用, 取浓度 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mL 的各种待试菌悬液 0.2 mL, 与灭菌培养基 15 mL 混合制成混菌平板, 凝固后, 在平板上等距离放入 4 个灭菌牛津杯, 每个菌设置 3 个重复, 以无菌蒸馏水为对照, 取 0.1 mL 枸骨叶提取液加入牛津杯中, 细菌 37℃培养 18~24 h 后, 移去牛津杯, 量取抑菌圈直径, 直径越大抗菌活性越强。

**1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)** 用无菌水将枸骨叶提取液稀释, 终浓度分别为 1、0.5、0.25、0.0625、0.0313、0.0156 mg/mL。取 2 mL 提取液稀释液至 15 mL 培养基, 混匀后, 倒入平板, 凝固后加入 100 μL 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mL 的菌液, 涂布均匀, 37℃培养 24 h 后观察结果。菌落被完全抑制的最高稀释度提取物浓度即 MIC。培养 48 h 后, 菌落被完全抑制的最高稀释度提取物浓度为 MBC。

**1.2.5 酸碱稳定性试验** 用稀 HCl 和稀 NH<sub>3</sub> 溶液将在枸骨叶提取物 pH 分别调至 4、5、6、7、8、9, 保持药液生药浓度为 1 g/mL, 杯碟法测定抑菌效果。

**1.2.6 热稳定性试验** 枸骨叶提取液分别置于 80、90、100、121℃条件下处理 20 min 后, 按 1.2.3 方法进行抑菌试验。

**1.2.7 时间对枸骨叶提取液吸光度的影响** 向试管分别加入 10 mL 培养基、3 mL 提取液和 0.2 mL 菌悬液,

第一作者简介: 曾超珍(1978-), 女, 讲师, 现主要从事药用植物的教学与科研工作。E-mail: chaozhenzeng@sina.com。  
基金项目: 中南林业科技大学青年科学研究基金资助项目(06007B); 中南林业科技大学林木遗传育种学科资助项目。  
收稿日期: 2009-03-20

振荡使之混合均匀,在波长 560 nm 处定时(1、6、12、24、36 h)测定其吸光度,同时以培养基做空白对照,找出最大抑菌时间。

2 结果与分析

2.1 枸骨叶抑菌物质的提取

由表 2 可知,溶剂对提取枸骨叶抑菌物质的影响最大,提取温度与料液比次之,提取时间影响最小。最佳提取条件为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,即选用乙酸乙酯为溶剂,在浸提时间为 2.5 h,温度 40℃,料液比为 1:10 条件下枸骨叶抑菌物质抑菌作用最为显著。

表 2 正交试验结果								
因素 试号	A	B	C	D	抑菌圈直径/ mm			
					大肠杆菌	金色葡萄球菌	枯草杆菌	Tt
1	1	1	1	1	1.7	2.6	1.7	6
2	1	2	2	2	1.5	2.4	1.6	5.5
3	1	3	3	3	1.6	2.4	1.5	5.5
4	2	1	2	3	1.1	1.0	0.8	2.9
5	2	2	3	1	1.5	1.1	0.8	3.4
6	2	3	1	2	1.5	0.9	1.0	3.4
7	3	1	3	2	0.9	1.0	1.2	3.1
8	3	2	1	3	1.2	1.2	0.8	3.2
9	3	3	2	1	0.8	1.3	1.1	3.2
k1	5.67	4.0	4.2	4.2				
k2	3.23	4.03	3.87	4.0				
k3	3.17	4.03	4.0	3.87				
R	2.5	0.03	0.33	0.33				

2.2 枸骨叶的最低抑菌浓度和最小杀菌浓度

由表 3 可知,枸骨叶提取液对金色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌的最低抑菌浓度分别 0.0625、0.5、0.5 mg/mL;最小杀菌浓度为 0.125、1、0.5 mg/mL。

表 3 枸骨叶的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度							
试验号	提取物浓度 /mg·mL <sup>-1</sup>	金色葡萄球菌		枯草杆菌		大肠杆菌	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	1	—	—	—	—	—	—
2	0.5	—	—	—	+	—	—
3	0.25	—	—	+	+	+	+
4	0.125	—	—	+	+	+	+
5	0.0625	—	+	+	+	+	+
6	0.03130	+	+	+	+	+	+
7	0.0156	+	+	+	+	+	+

2.3 枸骨叶提取物抗热性测定

由表 4 可知,枸骨叶提取物经过不同的热处理后对各种供试菌的抑制能力明显下降,当温度达 90℃以上时,枸骨叶提取物无抑菌效果,说明枸骨叶抑菌活性的热稳定性较差。

2.4 枸骨叶提取物抑菌 pH 范围

由表 5 可看出,枸骨叶提取液在偏碱性条件的抑菌效果比在偏酸性条件下好。金色葡萄球菌受 pH 的影响最小,对大肠杆菌的影响最大, pH 最好控制在 7~9。

2.5 时间对枸骨叶提取液吸光度的影响

枸骨叶提取液在 560 nm 处的吸光度随时间的变化

如图 1 所示,培养时间在 12 h 以内,其抑菌作用不明显,在 12~24 h 时间范围内,抑菌作用与时间成正相关,在 24 h 时达到最强,而后有逐渐减弱趋势。而且对 3 种供试菌抑制作用的曲线变化相同,这进一步证实枸骨叶内含有抗菌物质。

表 4 热处理提取液后的抑菌直径的测定 mm			
处理温度/℃	金色葡萄球菌	枯草杆菌	大肠杆菌
80	1.5	1.0	1.1
90	—	—	—
100	—	—	—
121	—	—	—

表 5 不同 pH 条件的抑菌活性(抑菌圈直径 mm)							
供试菌种	pH 值						
	4	5	6	7	8	9	
金色葡萄球菌	0.8	0.8	0.9	0.9	1.0	1.0	
枯草杆菌	0.8	0.9	1.1	1.0	1.0	1.3	
大肠杆菌	0.9	1.2	0.9	1.1	1.3	1.5	

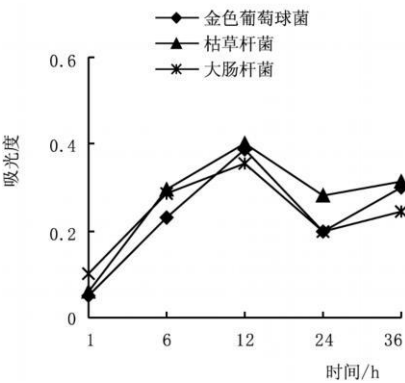


图 1 提取时间对枸骨叶提取液吸光度的影响

3 结论

枸骨叶对革兰氏阳性和阴性菌有较强的抑制作用,溶剂对抑菌物质的提取影响最大;枸骨叶抑菌物质的最佳提取条件为:溶剂为乙酸乙酯,提取温度 40℃,料液比为 1:10,浸提时间为 2.5 h;该物质抑菌 pH 范围为 7~9,热稳定性较差,最佳抑菌时间为 24 h。不同的提取方法对枸骨叶抑菌物质的提取率存在很大的差别,因此,有关枸骨抑菌物质的提取方法的研究,是今后研究的重点。

参考文献

[1] 洪艳平,上官新晨,刘楠,等.枸骨叶总黄酮提取与测定[J].江西农业大学学报,2008,30(3):529-534.  
[2] 杨雁芳,阎玉凝.中药枸骨叶的化学成分研究[J].中国中医药信息杂志,2002,9(4):33-34.  
[3] 罗源生,吴忠,梁松庆.苦丁茶中总黄酮及微量元素研究[J].广东微量元素科学,1995,5(2):65-67.  
[4] 周永红,王立升,韦藤幼.苦丁茶化学成分研究[J].广西大学学报,1999,24(3):203-204.

# 小檗碱和壳聚糖抗蔬菜病原真菌活性测定及复合膜制备

阎春琦<sup>1</sup>, 葛喜珍<sup>2</sup>, 田平芳<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 研究了小檗碱和壳聚糖对几种常见蔬菜病原真菌的抑制活性, 以及以小檗碱和壳聚糖为主料制备复合膜的方法, 并测定了该膜的药物释放效果。试验表明: 低浓度(0.234 mg/mL)小檗碱即可抑制辣椒炭疽病菌(*Vermicularia capsici*)等5种蔬菜病原真菌的生长。20 mg/mL 浓度壳聚糖对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抑制率高达65%, 而对其余4种果蔬病原真菌也有一定的抑制作用。为了集成这2种天然化合物的优点, 制备了小檗碱-壳聚糖复合膜, 该膜具有缓释功能, 在模拟外部环境(磷酸缓冲液, pH 6.8)条件下, 20 d小檗碱累计释放率接近25%, 提示其在果蔬贮藏抗菌中的应用价值。

**关键词:** 小檗碱; 壳聚糖; 复合膜; 蔬菜病原真菌

**中图分类号:** S 482.2<sup>+</sup>92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0131-03

随着环保和食品安全意识的增强, 采用天然物质防治植物病害成为现代农药研发的重要方向。壳聚糖又名β-1, 4-聚葡萄糖胺, 是迄今发现的唯一天然碱性多糖, 具有良好成膜性、生物降解性和生物亲和性。其无毒、抑菌等优越特性可用于果蔬保鲜。壳聚糖还可诱导植

物产生抗病性<sup>[1-2]</sup>, 并广泛用于缓控释制剂<sup>3-4</sup>。另一天然化合物小檗碱是中药黄连(*Coptis chinensis* Franch)中的抗菌活性成分, 对革兰氏阴性和阳性细菌以及许多真菌等均具有抑制或杀灭作用。该研究分别测定了小檗碱和壳聚糖对常见蔬菜病原真菌的抑制效果。基于集成两者优良性能的考虑, 制备了小檗碱-壳聚糖复合膜, 研究结果显示其缓释性能, 为两者进一步优化复配奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

88%脱乙酰度壳聚糖购自山东海德贝, 小檗碱购自中国药物鉴定所, 其余试剂均为分析纯。供试菌种番茄

**第一作者简介:** 阎春琦(1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物病理学。

**通讯作者:** 田平芳(1965-), 男, 博士, 副教授, 现从事分子植物病理学研究工作。E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn。

**基金项目:** 北京市科协金桥工程资助项目。

**收稿日期:** 2009-03-20

## Studies on Extraction and Antibacterial Activity of Antibacterial Material in *Folium Ilicis Cornutae*

ZENG Chao-zhen, LIU Zhi-xiang

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

**Abstract:** The optimum extractive conditions of bacteriostasis from *Folium Ilicis Cornutae* were studied by orthogonal experiment, then the bacteriostatic activity of *Folium Ilicis Cornutae* extracts and the effects of temperature, time, pH value on it were studied by cylinder plate method. The results showed the optimum extractive conditions of bacteriostasis from *Folium Ilicis Cornutae* was: ethyl acetate solvent, leaching-temperature 40 ℃, ratio of solid to liquid 1 : 10, extracting time 2.5 h. The substance extracted showed some antibiotic activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.0625, 0.5, 0.5 mg/mL, and minimum bactericidal concentrations (MBC) was 0.125, 1, 0.5 mg/mL respectively. The antibacterial effects was best at pH 7~9. The antibacterial activity of *Folium Ilicis Cornutae* extracts was unstable under heating, The optimum antibacterial time was 24 h.

**Key words:** *Folium Ilicis Cornutae*; Orthogonal experiment; Antibacterial activity