

不同溶剂对女贞子黄酮提取效果和抑菌活性的影响

王晓洁, 盛东峰

(周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466001)

摘要:以女贞子为试材,以 75% 甲醇、75% 乙醇、75% 丙酮、蒸馏水作为溶剂,利用分光光度法测定了不同溶剂浸提女贞子总黄酮的含量,并测定了各样品提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、根霉、曲霉的抑菌效果,研究不同溶剂对女贞子黄酮提取效果和抑菌活性的影响。结果表明:75% 甲醇对总黄酮的提取率较高,为 0.347 mg/g;女贞子的乙醇提取液对细菌具有较高的抑菌作用。

关键词:女贞子;总黄酮;提取率;抑菌活性

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)09-0137-03

女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)属木犀科女贞属多年生乔木,常作为园林绿化树种植于道路两旁。女贞子,也称女贞实、冬青子、白蜡树子等,是女贞树的干燥成熟果实,目前多未被有效利用,造成了资源的浪费^[1]。女贞子的主要成分为萜类、黄酮、多糖等化合物^[2-3]。中医认为女贞子味甘苦、性平,有滋补肝肾、明目等功效。现代医学表明,女贞子具有补腰膝、壮筋骨、强阴肾、乌须发、治疗神经衰弱和风湿热眼等作用,是一种营养和药理兼具的植物资源,极具开发价值^[4-5]。

黄酮是一类化合物的总称,普遍存在于自然界的植物和浆果中,主要包括水溶性成分(如黄酮苷)和脂溶性成分(如黄酮生物碱)两大类。黄酮有多种生物活性,具有防止高血压、抑菌消炎、抗病毒等作用^[6]。黄酮类化合物一般可用乙酸乙酯、乙醇、甲醇、水或某些极性较大的混合溶剂进行提取^[7]。近年来,随着研究方法的不断提高和人们对现有资源利用意识的增强,使女贞子的研究进入了新的阶段。该试验通过分析利用甲醇、乙醇、丙酮、蒸馏水 4 种不同溶剂对女贞子总黄酮的浸提效果及抑菌作用,研究浸提溶剂对女贞黄酮浸出率及对细菌和真菌抑菌作用的影响,以期对女贞子在食、药品领域的进一步开发利用奠定基础。

第一作者简介:王晓洁(1990-),女,河南濮阳人,本科,研究方向为饲料资源开发与利用。

责任作者:盛东峰(1978-),男,硕士,讲师,研究方向为饲料资源开发与利用。E-mail:shengdongfeng@126.com。

基金项目:河南省教育厅科学技术研究资助项目(14B230010)。

收稿日期:2013-10-22

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试女贞子,采自周口师范学院校园,由植物学教研室古红梅老师鉴定为木犀科女贞的成熟果实。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、根霉、曲霉由周口师范学院生命科学系微生物实验室提供。

供试试剂:芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所,乙醇、甲醇、丙酮均为分析纯,购自天津市双双化工有限公司;牛肉膏、蛋白胨、琼脂购自天津市英博生化试剂有限公司;马铃薯购自周口市菜市场。细菌培养基:牛肉膏 2.5 g,蛋白胨 5 g,NaCl 2.5 g,琼脂 8.5 g,500 mL 蒸馏水,pH 7.0~7.2;马铃薯培养基:马铃薯 20 g、蔗糖 2 g、蒸馏水 100 mL、琼脂 2 g,pH 7.0~7.2。

供试仪器:UV5100 紫外可见分光光度计(上海元析仪器厂);PL601-L 电子天平、SW-CJ-2F 超净工作台(瑞士梅特勒-托利多公司);DHG-9420A 电热恒温鼓风干燥箱(上海以恒科学仪器公司);LDZ-40KBS 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);DHP-9162 数显不锈钢电热培养箱(上海悦丰仪器表有限公司);恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);微波炉(顺德市格兰仕微波炉电器有限公司);FW-200 型万能粉碎机(齐家务科学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 提取液的制备与纯化 女贞子用清水洗净,沥干后,放入烘箱,50℃烘焙至恒重,用 FW-200 型万能粉碎机粉碎,过 60 目筛,放入干燥锅中,密封保存,备用。准确称取女贞子样品 50.0 g,按料液比 1:3 g/mL 分别加入 75% 乙醇、75% 丙酮、75% 甲醇、蒸馏水,中火微波 5 min,浸泡 25 h,抽滤,重复 4 次,合并滤液,减压旋

转蒸发除去浸提剂和部分水分,离心后分离上清液,得到不同溶剂提取的黄酮浓缩液。将不同方法提取的黄酮浓缩液用水稀释 5~10 倍,用恒流泵以 5 mL/min 的速度泵入装有大孔离子交换树脂 D101 的色谱柱(玻璃柱 500×38 mm,装柱量为 350 mL)。用去离子水冲洗色谱柱直至浓缩液清亮,最后用 75%乙醇冲洗并收集流出物。流出物用真空旋转蒸发器除去乙醇后,置于 50℃烘箱中浓缩至 50 mL 备用。

1.2.2 总黄酮含量的测定 采用比色法,以 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 为显色剂,测定浸提液在 510 nm 波长处的吸收光谱,以芦丁为标准品对照,得到待测物质的总黄酮含量^[8]。标准曲线的制作:精确吸取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的芦丁标准液并分别置于具塞试管中,各加 30%乙醇使其成 5 mL,然后分别加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,混匀,放置 6 min,再加 10%的硝酸铝 0.3 mL,混匀,放置 6 min,加 4%的氢氧化钠 4 mL,用蒸馏水定容至 10 mL,摇匀,放置 15~20 min,在 510 nm 波长处测定吸光度。每个浓度做 3 个平行试验,取平均值,作标准曲线(图 1)。以吸光值对芦丁浓度进行线性分析,求得回归方程: $y = -3.1 \times 10^{-3} + 13.257x$, $R^2 = 0.999$ 。样品中黄酮含量测定:从不同提取方法的粗提取液中各取出 1 mL,用蒸馏水将其稀释 5 倍,得到不同溶剂的备用液,从备用液中各取 1 mL 置于 10 mL 试管中,加 30%的乙醇 4 mL,加 5%亚硝酸钠 0.3 mL,静置 6 min,加 10%硝酸铝 0.3 mL,静置 6 min,加 4% NaOH 4 mL,再加蒸馏水至刻度,摇匀,放置 15~20 min,于 510 nm 处测吸收光度,做 3 次平行测定。根据回归方程算出测量液中总黄酮的浓度 $C(\text{mg/mL})$,按照以下公式计算提取物黄酮类化合物的含量(mg/g)。提取率(mg/g)= CVN/W ,其中: C -测量液总黄酮的浓度(mg/mL); V -粗提取液体积(mL); N -为稀释倍数; W -原料干重(g)。

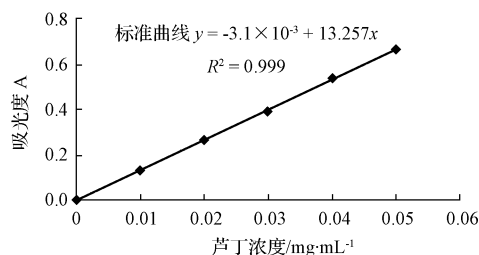


图 1 芦丁的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of rutin

1.2.3 抑菌试验 抑菌液的制备:将利用 4 种溶剂提取得到的提取液于紫外灯光下灭菌 40 min,将灭菌的滤纸片放入上述溶液浸泡 15 min,对照组的滤纸片置于无菌生理盐水中浸泡 15 min。菌种活化及菌悬液的制备:将

所有供测试的菌种移接入相应的试管斜面培养,每种接多次重复。细菌置 37℃恒温培养箱中培养 24 h;霉菌置 28℃恒温培养箱培养 48 h。将上述活化好的各种菌分别挑取一环制成初试菌悬液用生理盐水将其稀释成含菌量约为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的菌悬液。操作步骤:用滤纸片法,首先将已灭菌的固体培养基倒入无菌培养皿中,水平放置待凝固。用无菌吸管吸取 0.1 mL 菌悬液加入到凝固的培养皿上,用无菌三角涂布棒涂布均匀。将以涂布好的培养皿划分成 4 等分,作上标记,中间做对照。用无菌镊子将已灭菌的小圆滤纸片 5 mm 至于相对的部位。每个菌种做 3 次重复。最后细菌放于 37℃恒温培养箱中培养 24 h,霉菌置 28℃恒温培养箱中培养 48 h 后,观察是否产生抑菌圈^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同浸提剂对女贞子中总黄酮提取率的影响

由图 1 可知,各溶剂对女贞子中总黄酮的提取率由大到小依次为 75%甲醇>75%乙醇>蒸馏水>75%丙酮。其中 75%甲醇提取的总黄酮含量为 0.347 mg/g,75%乙醇为 0.340 mg/g,蒸馏水为 0.261 mg/g,75%丙酮提取的总黄酮含量最低为 0.204 mg/g。

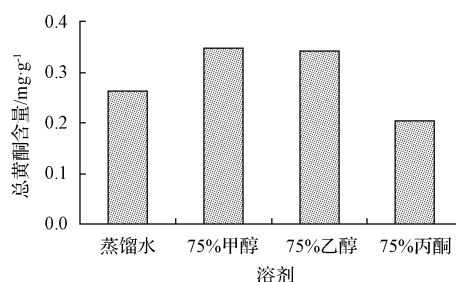


图 2 不同浸提剂对女贞子总黄酮含量的影响

Fig. 2 Effects of different extraction solvents on flavonoids content of *Ligustrum lucidum* Ait

2.2 抑菌试验结果

由表 1、2 可知,大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌的培养基产生明显的抑菌圈,根霉、曲霉没有抑菌圈。用 75%甲醇、75%乙醇、75%丙酮、蒸馏水 4 种溶剂浸提得到的提取液做抑制细菌的试验,各提取液的抑菌作用强度由大到小依次是 75%乙醇>75%甲醇>75%丙酮>蒸馏水。其中,同一种提取液对不同菌种的抑菌作用强度依次为枯草杆菌>大肠杆菌>金黄色葡萄球菌>根霉、曲霉,除 75%甲醇提取液外,其它提取液对大肠杆菌的抑菌作用比对金黄色葡萄球菌的抑菌作用强。总体而言,各种提取液对细菌的抑菌效果较好,对真菌却没有抑菌作用,对细菌的抑菌作用明显好于对真菌的抑菌作用。

表1 不同女贞子溶剂浸提液处理的抑菌圈

Table 1 Inhibiting zones of the extraction of *Ligustrum lucidum* Ait on five kinds of bacteria mm

菌种	蒸馏水	75%甲醇	75%乙醇	75%丙酮
金黄色葡萄球菌	9.83	13.33	15.33	12.17
大肠杆菌	11.00	13.17	16.67	14.00
枯草杆菌	13.67	17.33	20.00	15.33
根霉	—	—	—	—
曲霉	—	—	—	—

表2 不同女贞子溶剂浸提液的抑菌作用比较

Table 2 Inhibition effect of the extraction of *Ligustrum lucidum* Ait on five kinds of bacteria

菌种	蒸馏水	75%甲醇	75%乙醇	75%丙酮
金黄色葡萄球菌	---	+++	++++	+-
大肠杆菌	+-	+++	++++	+++
枯草杆菌	+++-	++++	++++	++++
根霉	---	---	---	---
曲霉	---	---	---	---

注:若<12 mm,则抑菌作用较弱,用“-”表示;若>12 mm,并且<16 mm,则抑菌作用中等用“+”;若>16 mm,则抑菌作用较强,用“++”表示。

3 结论

黄酮类化合物是植物的重要次生代谢产物之一,在植物体内起到抵抗紫外线的灼伤和病菌入侵等作用^[10]。该试验结果表明,女贞子黄酮对细菌有显著的抑制作用,但对真菌的抑制作用不显著。这与谷肆静等^[11]在蒲公英总黄酮的研究结果接近,女贞子黄酮类的抑菌作用可能与其复杂的成分组成有关,但具体抑菌作用机制还有待进一步研究。

该研究中甲醇的总黄酮提取率比乙醇的高,但是,抑菌试验结果却显示乙醇提取液的抑菌作用比甲醇提取液的强,这可能与2种提取液对女贞子黄酮类主要成分提取差异性有关。

女贞子黄酮对细菌具有显著地抑制效果,可将其广泛应用于植物病害防治,提高植物的抗逆性。同时,随着人们对食物安全意识的日益增强,迫切需要寻找一种安全、无毒的新型食品添加剂,其在作为植物源抗菌食品添加剂、水果保鲜剂和抗菌药物开发方面也具有潜在的应用价值和广阔的开发前景。

参考文献

- [1] 赵继霄,杨瑾,董根玲,等.女贞子研究进展[J].中华医学写作杂志,2004,11(18):1599-1601.
- [2] 高福军.女贞子提取物抑制人肝癌细胞血管生长因子表达作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011(2):139-142.
- [3] 姚卫峰,陈汀,张丽,等.女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011(12):138-140.
- [4] 杨静,魏彩霞.女贞属植物的研究概况[J].西北药物杂志,2005,20(6):278-280.
- [5] 李阳,孙文基.女贞子的药理作用研究[J].陕西中医学院学报,2006,29(5):58-60.
- [6] 宋晓凯.天然药物化学[M].2版.北京:化学工业出版社,2004.
- [7] 石锦芹,黄绍华,胡心恺,等.柿叶黄酮类化合物乙醇提取工艺的研究[J].南昌大学学报,1999(3):211-215.
- [8] 李众飞.黄瓜藤中黄酮的提取工艺研究[J].内蒙古农业科技,2005(1):20-21.
- [9] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1998:214.
- [10] 林丹,赵国玲,刘佳佳.中药金银花药用成分的提取及抑菌试验的研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(5):436-437.
- [11] 谷肆静,王立娟.蒲公英总黄酮的提取及其抑菌性能[J].东北林业大学学报,2007,35(8):43-45.
- [12] 陶阿丽,戴一,张国升.女贞子水提物中有效成分及多糖含量分析[J].安徽农业科学,2012(33):16120-16122.
- [13] 覃亮,路宽,董基,等.桐花树多糖提取及其抑菌活性研究[J].中成药,2012(7):1367-1369.

Effect of Different Solvents on Extraction of Effective Total Flavones and Antibacterial Activity of *Ligustrum lucidum*

WANG Xiao-jie, SHENG Dong-feng

(Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: Taking *Ligustrum lucidum* as material, the effect of different solvents on extraction of effective total flavones and antibacterial activity of *Ligustrum lucidum* were studied. The content of total flavones in *Ligustrum lucidum* was measured using the spectrophotometric method, and 75% methanol, 75% ethanol, 75% acetone and distilled water were chosen as the extraction solvents. The bacteriostasis activities of them were also compared by measuring the bacteriostasis activities of *Staphylococcus aureus*, *Hay bacillus*, *Escherichia coli*, *Rhizopus chinehsis* and *Aspergillus* of the sample extracts. The results showed that methanol extract had the highest extraction yield of total flavones, the content was 0.347 mg/g; the ethanol extract of *Ligustrum lucidum* had higher bacteriostasis activity on bacteria than fungi.

Key words: *Ligustrum lucidum*; total flavones; extraction rate; bacteriostasis activity