

文章编号: 1000-5692(2006)03-0306-05

# 珍稀濒危植物七子花提取物的抑菌活性

金则新, 李钧敏

(台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

**摘要:** 采用体积分数为 70%乙醇、60%丙酮及沸水 3 种溶剂对七子花 *Heptacodium miconioides* 叶片、花等器官进行提取, 并用提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*, 铜绿脓杆菌 *Pseudomonac aeruginosa* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 等 4 种细菌进行抑菌试验。结果表明: 叶片和花的不同溶剂提取物对 4 种细菌的抑菌圈大小来看, 乙醇提取物的抑菌活性最高, 丙酮提取物次之, 水提取物最低。七子花多数器官的乙醇提取物均具有一定的抑菌活性, 但花和叶的抑菌活性较高, 老根和老茎则较低。其中叶片乙醇提取物对 4 种细菌的抑菌圈大小分别为 7.67, 9.67, 10.00 和 10.00 mm; 花的乙醇提取物对 4 种细菌的抑菌圈大小分别为 10.00, 12.70, 11.00 和 11.00 mm。花和叶片乙醇提取物对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌最小抑菌质量浓度均为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对金黄色葡萄球菌均为  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对铜绿脓杆菌分别为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。七子花叶片和花的乙醇提取物抑菌效果大小为枯草芽孢杆菌 > 大肠杆菌 > 铜绿脓杆菌 > 金黄色葡萄球菌。表 4 参 14

**关键词:** 植物学; 七子花; 器官; 抑菌活性; 珍稀濒危植物

**中图分类号:** Q946      **文献标识码:** A

天然植物中存在许多生理活生物物质, 如生物碱类、黄酮类和醌类等, 具有抗菌作用<sup>[1]</sup>。近年来, 植物源的杀菌剂由于来源于自然, 具有对人畜安全, 不易引起抗药性等优点, 其研究开发倍受重视。宫霞等<sup>[2]</sup>发现银杏 *Ginkgo biloba* 叶的醇水提取物对食品中的常见微生物有强烈的抑制作用, 并认为酚类物质及漆树酸是抑菌的主要成分; 周建新等<sup>[3]</sup>也发现银杏叶提取物的抑菌作用显著, 其抑菌活性随着浓度增加而增强; 黄文等<sup>[4]</sup>发现竹叶提取物对细菌有较好的抑制效果, 而热处理对其抑菌效果有加强作用。植物不同提取物由于所含活性物质的成分与含量不同, 常具有不同的抑菌活性。如苏燕评等<sup>[5]</sup>发现多花野牡丹 *Melastoma affine* 的叶片的抑菌活性要高于枝条; Mackeen 等<sup>[6]</sup>在研究藤黄属 *Garcinia* 植物 *Garcinia atroviridis* 不同部位提取物的抗微生物活性时, 发现根、叶、茎、果实和树皮均具有不同程度的抑菌活性, 但根提取物具有最强的抑制细菌活性, 而果实和叶片则具有强的抑制真菌的活性。珍稀濒危植物往往生活在极端环境中, 它们对极端环境的适应为人类提供了极其宝贵的基因资源, 并且珍稀濒危植物常常拥有重要的生物分子(如次生代谢产物), 对生物分子的价值化有助于增强人们对保护珍稀濒危植物的认识和正确地利用这些资源。七子花 *Heptacodium miconioides* 为我国特有的落叶小乔木, 属忍冬科 Caprifoliaceae 的单种属植物, 为国家二级重点保护植物。它们多生于悬

收稿日期: 2005-09-20; 修回日期: 2005-12-19

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(399203); 浙江省台州市科技局资助项目(044205)

作者简介: 金则新, 教授, 硕士, 从事植物生态学等研究。E-mail: jzx@tzc.edu.cn

崖峭壁, 沟谷和山坡灌丛, 分布范围窄, 现资源极少。目前已有学者对七子花群落<sup>[7]</sup>、光合生理生态<sup>[8]</sup>、繁殖生物学<sup>[9]</sup>以及遗传多样性<sup>[10, 11]</sup>等方面进行了研究, 对其濒危现状以及机理有了初步的了解, 但对七子花生物分子价值等还很少涉及。作者对七子花提取物的抑菌活性进行了试验, 以期从中找到抑菌的活性物质, 有利于提高七子花的开发和保护价值, 可为合理开发和利用七子花资源提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用七子花的叶片、1 年生枝、老茎、幼根、老根和花等材料于 2004 年 7 月采自浙江省临海市括苍山。采回后经 105 °C 杀青 15 min, 于 70 °C 烘箱烘干, 研磨成细粉, 过 0.22 mm 筛子, 储存于广口瓶中, 干燥器储存, 备用。

### 1.2 实验菌株

实验用菌株枯草芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和铜绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由浙江省台州医院惠赠, 大肠杆菌 *Escherichia coli* 由临海市第一人民医院惠赠, 均为临床分离菌株。

### 1.3 菌液的制备

斜面菌种接入牛肉膏液体培养基中, 30 °C 活化 24 h, 再以体积分数为 1% 的接种量接入牛肉膏液体培养基中, 30 °C 培养 6 h, 取出稀释后涂平板, 30 °C 倒置培养 24 h, 计算菌落形成单位 (colony forming unit, cfu)。活化后的菌液储存于 4 °C 冰箱中备用。

### 1.4 七子花提取物的制备

1.4.1 乙醇提取液的制备 取 10 g 粉末加入体积分数为 70% 乙醇 50 mL, 于 90 °C 回流提取 6 h, 离心去残渣, 回收溶剂后用 10 mL 体积分数为 70% 乙醇重新溶解, 提取物质量浓度为 1 kg·L<sup>-1</sup>。

1.4.2 丙酮提取液的制备 取 10 g 粉末加入体积分数为 60% 丙酮 50 mL, 于 80 °C 回流提取 6 h, 离心去残渣, 回收溶剂后用 10 mL 体积分数为 60% 丙酮重新溶解, 提取物质量浓度为 1 kg·L<sup>-1</sup>。

1.4.3 水提取液的制备 取 10 g 粉末加入蒸馏水 50 mL, 于沸水浴回流提取 6 h, 离心去残渣, 回收溶剂后用 10 mL 蒸馏水重新溶解, 提取物质量浓度为 1 kg·L<sup>-1</sup>。

### 1.5 抑菌活性的测定

1.5.1 抑菌圈的测定 以纸片琼脂扩散法测定药液对实验菌株的抑菌效果。将经计数的菌液稀释后, 取 100 μL 菌液 (含 10<sup>5</sup> cfu) 涂平板。把 6 mm 直径大小的滤纸片浸入药液中, 浸泡 24 h, 把浸有药液的滤纸片放在上述已涂布微生物的牛肉膏琼脂糖凝胶平板上, 每种提取物做 6 个重复, 倒置于 37 °C 恒温箱中培养 24 ~ 48 h, 测量抑菌圈直径, 同时设体积分数为 70% 乙醇、60% 丙酮和水作阴性对照, 硫酸链霉素 (0.133 g·L<sup>-1</sup>) 为阳性对照。

1.5.2 最低抑菌质量浓度测定 以平板二倍稀释法测定七子花提取物的最低抑菌质量浓度<sup>[12]</sup>。菌液接种时每每一平皿的接种量为 10<sup>3</sup> cfu, 于 30 °C 倒置培养 24 ~ 48 h, 采用 GIS 凝胶图像处理系统的 Colon 软件进行平板摄影和菌落计数, 与对照相比计算抑菌率以及最低抑菌质量浓度。

### 1.6 数据的处理

平均数及标准差采用 Excel 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适溶剂的确定

采用中草药有效成分提取的常规溶剂丙酮、乙醇、沸水对七子花叶片和花进行了药液的提取, 并利用纸片琼脂扩散法对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿脓杆菌和大肠杆菌进行抑菌活性的测定 (表 1)。七子花叶片和花的提取液对 4 种细菌的抑菌活性均以乙醇提取物最高, 丙酮提取物次之, 水提取物最低。

表1 七子花不同溶剂提取物的抑菌圈大小

Table 1 The diameter of anti-bacterial circle of *Heptacodium miconioides* extracts with different solvents

器官	溶剂	抑菌圈/mm			
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿脓杆菌	大肠杆菌
叶	丙酮	6.58±0.45	9.33±0.94	9.70±0.50	9.67±0.50
	乙醇	7.67±0.75	9.67±0.47	10.00±0.00	10.00±0.00
	水	6.50±0.00	8.67±0.47	7.00±0.00	7.00±0.00
花	丙酮	8.08±0.61	10.50±0.41	10.00±0.50	10.33±0.50
	乙醇	10.00±0.82	12.70±0.47	11.00±0.00	11.00±0.00
	水	6.75±0.83	7.67±0.47	7.77±0.50	7.67±0.50
	硫酸链霉素	28.50±0.50	34.00±0.29	24.00±1.00	32.00±0.00

说明: 70%乙醇、60%丙酮和水阴性对照的抑菌圈大小为6.00 mm。

## 2.2 不同器官提取物的抑菌活性

利用纸片琼脂扩散法对七子花不同器官的乙醇提取物抑菌活性进行测定(表2)。对金黄色葡萄球菌的抑菌活性大小为花>幼根>1年生枝>叶>老茎>老根;对枯草芽孢杆菌的抑菌活性大小为花>叶>1年生枝>幼根>老根>老茎;对铜绿脓杆菌抑菌活性大小为花>叶>老茎,而1年生枝、老根和幼根则无抑菌活性;对大肠杆菌的抑菌活性大小为幼根>1年生枝>花>叶>老根>老茎。

表2 七子花不同器官提取物抑菌圈的大小

Table 2 The diameter of anti-bacterial circle of *Heptacodium miconioides* extracts from different organs

器官	抑菌圈/mm			
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿脓杆菌	大肠杆菌
叶	7.67±0.75	9.67±0.47	10.00±0.00	10.00±0.00
1年生枝	8.00±0.00	9.50±1.08	6.00±0.00	12.33±0.50
老茎	7.00±0.00	6.67±0.47	6.30±0.20	7.00±0.00
老根	6.67±0.40	7.00±0.00	6.00±0.00	9.00±0.80
幼根	9.67±0.47	8.67±0.47	6.00±0.00	14.00±0.90
花	10.00±0.82	12.70±0.47	11.00±0.00	11.00±0.00
硫酸链霉素	28.50±0.50	34.00±0.29	24.00±1.00	32.00±0.00

说明: 70%乙醇阴性对照的抑菌圈大小为6.00 mm。

## 2.3 七子花提取液的最小抑菌质量浓度

七子花的花和叶片提取物对4个菌株均具有明显的抑菌效果,而根和茎等器官对不同菌种的抑菌效果有所差异。选择叶片和花的乙醇提取物对4种细菌的最小抑菌质量浓度进行测定,以进一步确定七子花的抑菌活性(表3)。花和叶片对枯草芽孢杆菌的最小抑菌质量浓度均为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度均为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。花对铜绿脓杆菌的最小抑菌质量浓度为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,但叶的最小抑菌质量浓度为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。花、叶对大肠杆菌的最小抑菌质量浓度均为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。总体来说,花和叶片的抑菌效果为枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>铜绿脓杆菌>金黄色葡萄球菌。

## 2.4 七子花不同萃取物的抑菌活性

将七子花叶片用体积分数为70%乙醇 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流6h进行提取,离心去残渣,浓缩后用沸水定容至10 mL,混悬物经石油醚、氯仿、乙酸乙酯和水饱和的正丁醇依次萃取,萃取物溶于相应的溶剂,其对4种细菌的抑菌圈大小如表4所示。石油醚萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿脓杆菌无抑菌活性,但对大肠杆菌具有一定的活性。氯仿、乙酸乙酯和正丁醇的萃取物对4种细菌均具有一定的活性。萃取后的水相相对于未萃取的提取液,其活性有不同程度的下降。

表 3 七子花叶片和花提取物的最小抑菌质量浓度

Table 3 Minimum inhibitory concentration of the extracts from the leaves and flowers of *Heptacodium miconioides*

菌株	器官	不同质量浓度下的抑菌率/%					
		200.0	100.0	50.0	25.0	12.5	6.3 g·L <sup>-1</sup>
枯草芽孢杆菌	花	100.00	100.00	100.00	98.80	73.33	20.00
	叶	100.00	100.00	100.00	99.47	66.67	40.00
金黄色葡萄球菌	花	100.00	100.00	97.85	81.73	65.60	40.05
	叶	100.00	100.00	81.72	79.57	73.66	43.33
铜绿脓杆菌	花	100.00	100.00	100.00	96.00	91.50	65.00
	叶	100.00	100.00	96.00	92.35	91.20	62.50
大肠杆菌	花	100.00	100.00	100.00	78.73	43.82	8.18
	叶	100.00	100.00	100.00	80.00	38.91	23.64

表 4 七子花不同溶剂萃取物的抑菌活性

Table 4 The anti-bacterial activity of different *Heptacodium miconioides* extracts

萃取溶剂	抑菌圈/mm			
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿脓杆菌	大肠杆菌
石油醚(5.0 kg·L <sup>-1</sup> )	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.17±0.60
氯仿(5.0 kg·L <sup>-1</sup> )	8.00±0.00	7.17±0.85	6.30±0.20	7.70±0.90
乙酸乙酯(5.0 kg·L <sup>-1</sup> )	7.33±0.94	8.67±0.47	6.00±0.00	9.00±0.80
正丁醇(2.5 kg·L <sup>-1</sup> )	8.00±0.00	10.80±1.55	8.70±0.50	8.00±0.80
水相(1.0 kg·L <sup>-1</sup> )	7.58±0.00	8.33±0.94	8.80±0.60	7.00±0.00
未萃取(1.0 kg·L <sup>-1</sup> )	7.67±0.75	9.67±0.47	10.00±0.00	10.00±0.00

### 3 结论

植物的化学成分较为复杂,不同溶剂的提取液常有不同的药效。从七子花各器官提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿脓杆菌和大肠杆菌的抑菌圈大小来看,各器官提取物均具有一定的抑菌活性,但总体来说,以花和叶片的抑菌活性高,说明花和叶片中含有较多抑菌活性成分。花、叶片的提取液对 4 种细菌的抑菌活性均以乙醇提取物最高,丙酮提取物次之,水提取物最低。这反映出不同溶剂提取物所含有的抗菌有效成分存在差别,在一定程度上该类抗菌有效成分在乙醇中有较高的溶解度。

从花和叶片对 4 种细菌的最低抑菌质量浓度来看,乙醇提取物的抑菌效果为枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>铜绿脓杆菌>金黄色葡萄球菌。据有关文献报道,黄酮类化合物是药用植物的一大类有效成分,具有多种生物活性,主要作用之一是抑菌或杀菌,低质量浓度时能抑菌,高质量浓度时能杀菌<sup>[13]</sup>。作者曾对七子花不同器官总黄酮含量及成分进行了分析,首次发现七子花叶片的黄酮类化合物含量较高<sup>[14]</sup>,而黄酮类化合物可由醇提取液中获得,因此推测黄酮可能是七子花具有抑菌作用的有效成分之一,有关提取物中主要活性成分的结构及抑菌机理还有待进一步研究。用不同溶剂萃取,石油醚萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿脓杆菌无抑菌活性,但对于大肠杆菌具有一定的活性。氯仿、乙酸乙酯和正丁醇的萃取液对 4 种细菌均具有一定的活性;且萃取后的水相对于未萃取的提取液,其活性有不同程度的下降。从实验结果可知,七子花化学成分中抑制大肠杆菌的有效成分可能与抑制其他 3 种细菌的有效成分有所差异,抑制大肠杆菌的主要活性部位为乙酸乙酯和正丁醇部位,而抑制其他 3 种细菌的主要活性部位可能为正丁醇和水相部位。

### 参考文献:

[1] 吴传方,杜小凤,徐建明,等.植物源抑菌活性成分研究新进展[J].西北农业学报,2004,13(3):81-88.

[2] 宫露,姚淑敏.银杏叶提取物抑菌作用的研究[J].食品科学,1999,20(9):54-56.

- [ 3 ] 黄文, 王益, 胡筱波, 等. 竹叶提取物抑菌特性的研究[ J ]. 林产化学与工业, 2002, 22 (1): 68—70.
- [ 4 ] 周建新, 汪海峰, 姚朋吉, 等. 银杏叶提取物(EGb)抗菌特性的研究[ J ]. 食品科学, 2002, 23 (9): 118—121.
- [ 5 ] 苏燕评, 周孙英, 刘剑秋. 多花野牡丹的抑菌活性及总黄酮含量测定[ J ]. 植物资源与环境学报, 2005, 14 (1): 56—57.
- [ 6 ] MACKEN M M, ALI A M, LAJIS N H, *et al.* Antimicrobial, antioxidant, antitumor-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atrovirens* griff. Ex T. anders [ J ]. *J Ethnopharmacology*, 2000, 72 (3): 395—402.
- [ 7 ] 金则新. 浙江天台山七子花群落研究[ J ]. 生态学报, 1998, 18 (2): 127—132.
- [ 8 ] 金则新, 柯世省. 浙江天台山七子花群落主要植物种类的光合特性[ J ]. 生态学报, 2002, 22 (10): 1 645—1 652.
- [ 9 ] 边才苗, 金则新, 李钧敏. 七子花的繁殖生物学研究[ J ]. 云南植物研究, 2002, 24 (5): 613—618.
- [ 10 ] 金则新, 李钧敏. 七子花种群遗传多样性的 RAPD 分析[ J ]. 林业科学, 2004, 40 (4): 68—74.
- [ 11 ] 李钧敏, 金则新. 浙江省境内七子花天然种群遗传多样性研究[ J ]. 应用生态学报, 2005, 16 (3): 795—800.
- [ 12 ] 李钧敏, 虞优优, 金则新. 大血藤叶片提取物抑菌作用的初步研究[ J ]. 浙江中医学院学报, 2004, 28 (1): 55—57.
- [ 13 ] 俞佩芳. 3种常见药用植物抗菌作用的探讨[ J ]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1994 (3): 89—93.
- [ 14 ] 金则新, 李钧敏. 七子花总黄酮含量及成分分析[ J ]. 浙江林学院学报, 2003, 20 (4): 357—359.

## Anti-bacterial activity of extracts from *Heptacodium miconioides*

JIN Ze-xin, LI Jun-min

(Ecology Institute, Taizhou University, Linhai 317000, Zhejiang, China)

**Abstract:** *Heptacodium miconioides* is a rare and endangered plant. Different organs of *Heptacodium miconioides* including flowers, leaves, and so on, were extracted with different solvents such as 70% ethanol, 60% acetone and boiled water. The anti-bacterial activity of the extracts was detected on 4 experimental strains, such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The results showed that in terms of the diameter of anti-bacterial zone of extracts from leaves and flowers with different solvents, the anti-bacterial activity of ethanol extract was the highest, while that of acetone extract took the second place and that of boiled water extract was the lowest. Anti-bacterial activity could be detected in the extracts of different organs of *Heptacodium miconioides*, and those from leaves and flowers were relatively higher while those from old stem and old root were relatively lower. The diameter of the anti-bacterial zone of ethanol extracts from leaves on 4 experimental strains was 7.67, 9.67, 10.00 and 100.00 mm, respectively, while that from flowers was 10.00, 12.70, 11.00 and 11.00 mm, respectively. Minimum inhibitory concentration (MIC) of flowers and leaves on *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* were all  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and those on *Staphylococcus aureus* were all  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Those on *Pseudomonas aeruginosa* were 50 and  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The anti-bacterial activity of ethanol extracts from leaves and flowers ranked in turns: *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. [ Ch, 4 tab. 14 ref. ]

**Key words:** botany; *Heptacodium miconioides*; organs; anti-bacterial activity; rare and endangered plants