

文章编号: 1000-5692(2007)03-0369-03

七子花不同时期叶片提取物的体外抑菌活性

张俊会, 金则新

(台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

摘要: 为调查七子花 *Heptacodium miconioides* 生长过程中叶片提取物抑菌活性的变化规律, 采集不同时期七子花叶片, 以乙醇为溶剂提取活性物质, 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 为检定菌株, 以琼脂扩散法检测不同时期七子花叶片提取物的抑菌活性。结果表明, 与煮沸法和索氏提取法相比, 超声波提取简单易行, 不影响叶片的体外抑菌活性, 1 g 提取物稀释 80 倍后对大肠杆菌的抑制率仍超过 60%, 适用于大量样本的快速分析。在整个叶片生长期, 七子花叶片均表现较高的抑菌活性, 抑制率超过 50%, 且对金黄色葡萄球菌抑杀作用强于对大肠杆菌的抑杀作用, 但以 4 月上旬、7 月中旬和 9 月下旬的抑菌活性最强。图 1 表 1 参 7

关键词: 植物学; 七子花叶片; 提取物; 抑菌活性

中图分类号: Q946.887 **文献标志码:** A

七子花 *Heptacodium miconioides* 为我国特有的落叶小乔木, 属忍冬科 Caprifoliaceae 单种属植物, 是我国第 1 批公布的二级珍稀濒危保护的植物, 同时也是中国生物多样性保护行动计划中优先保护的物种。目前, 有关七子花的研究主要集中在遗传多样性^[1]、种群结构^[2,3]、生理生态^[4]及成分分析^[5]等。在前期研究中发现七子花具有一定的抑菌作用^[6], 为此, 在建立有效提取方法的前提下, 对七子花不同时期叶片的抑菌活性进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

七子花叶片, 于 2004 年采于浙江省台州市括苍山(海拔为 950 m)。

1.2 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923, 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922。

1.3 提取方法

取叶片 50 g, 低温烘箱烘干, 粉碎备用。取叶片粉末 1 g, 以体积分数 75% 的乙醇为提取剂, 分别用超声波提取(40 Hz, 30 min)、煮沸提取和索氏提取。其中, 超声波提取和煮沸提取料液比为 1/10, 索氏提取法料液比 1/50, 反复提取 3 次, 每次 30 min, 过滤收集提取液, 合并后减压蒸馏回收溶剂, 低温浓缩到体积 3~4 mL 备用。

收稿日期: 2006-08-06; 修回日期: 2006-11-03

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

作者简介: 张俊会, 讲师, 硕士, 从事微生物学研究。E-mail: liuzhe2000_2005@163.com

1.4 抑菌能力测定^[9]

菌种活化2次后转入肉汤培养基, 37℃, 150 r·min⁻¹培养6 h后用无菌肉汤调节 $D_{600}=0.1$ (控制菌液浓度约为 10^7 个·L⁻¹) 备用。将适当浓度的提取液添加到50℃水浴保温的无菌牛肉膏固体培养基中, 混匀倒平板, 涂布新鲜菌液100 μL, 37℃倒置培养, 24 h, 计数菌落形成单位(x_1), 同时相应溶剂做对照(x_2)。抑杀能力以对菌落的抑制能力表示, 即: 抑菌率(%) = $[1 - (\lg x_1 / \lg x_2)] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 预实验

为确定适宜稀释比例对七子花叶片抑菌能力进行分析, 以9月份叶片为代表, 超声波提取活性物质, 对倍稀释配制生药比例为1/20, 1/40, 1/80和1/160的含药平板, 分别以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为检定菌株进行了抑菌实验。实验发现比例为1/20和1/40的含药平板对供试菌株的抑杀能力非常强, 可将含1000个细胞菌液完全杀死。比例1/80的含有提取液的培养基的抑菌活性非常明显, 菌落数较对照明显减少, 而比例1/160的平板未表现抑杀能力, 因此采用最低抑菌比例1/80作为生药检测稀释比例对七子花提取物进行抑菌活性分析。

2.2 提取方法

为确定一种快速提取方法适用于大量样本的分析, 以9月份叶片为代表, 采用3种不同的提取法(超声波提取法、煮沸提取法和索氏提取法), 配制生药稀释比例为1/80的含药平板, 观察提取液的抑菌效果。结果如表1所示, 在1/80生药比例, 七子花叶片提取物对大肠杆菌具有较强的体外抑菌能力, 以超声波提取法最佳, 煮沸提取法次之, 索氏提取法最差。考虑到超声波提取法简单易行, 适用于多样本同时处理, 故笔者的实验采用超声波提取法提取七子花叶片活性物质。

2.3 不同时期七子花叶片抑菌效果

为了调查不同时期的七子花叶片抑菌效果, 以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为供试菌株, 对采摘于不同时期的七子花叶片的提取物进行了体外抑菌活性观察, 结果

表1 不同提取方法对大肠杆菌的抑菌效果

Table 1 Effect of different extract methods on the anti-bacterial activity of leaves of *Hepatocodium miconoides*

提取方法	$\lg x_1$	$\lg x_2$	抑菌率/%
超声波提取法	4.11	10.81	61.95
煮沸提取法	4.38	10.81	59.49
索氏提取法	5.10	10.81	52.83

菌株: 大肠杆菌 *Escherichia coli*; 生药比例: 1/80; 检样: 七子花叶片提取物。

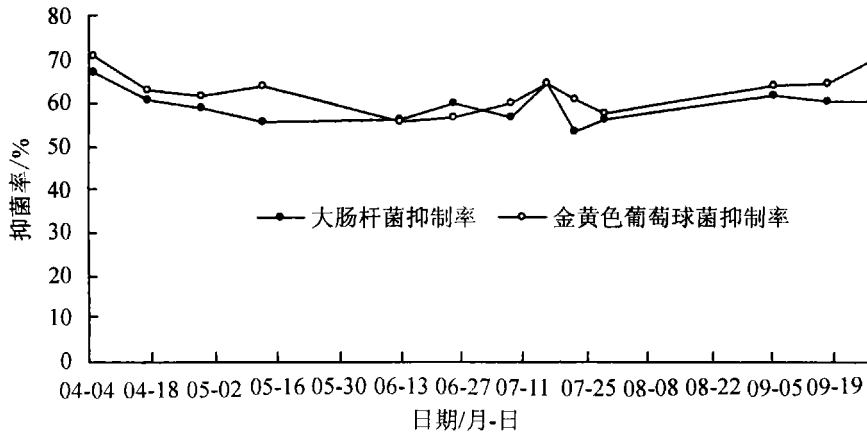
见图1。总体来看, 在生药稀释比例为1/80时, 七子花叶片的抑菌活性均较强, 但有小幅度波动。对大肠杆菌的抑菌活性在4月上旬最强, 抑制率高达67.52%, 之后逐步下降, 到6月又开始上升, 到7月中旬达到第2高峰(64.89%)后稍有回落, 之后基本稳定在60%左右。对金黄色葡萄球菌的抑制能力稍强于大肠杆菌, 抑制能力较强的时期分别在4月上旬(70.99%)和9月下旬(71.28%), 4月份之后抑菌活性持续下降, 至6月中旬后达到波谷(55.94%)后缓慢上升, 7月中旬略有升高(64.87%), 后缓慢下降, 7月下旬后又逐渐升高。

3 结论与讨论

在前期研究中发现, 相比根和茎而言, 七子花的花和叶片具有较强的抑菌活性^[7]。为调查抑菌活性的动态分布规律, 以超声波提取法提取七子花叶片活性物质并进行了体外抑菌活性观察。结果表明, 七子花对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有较强的抑杀能力(低浓度抑制, 高浓度则杀死), 最低抑菌浓度比例为1/80。在整个叶片生长时期, 七子花叶片提取物均具有较高的抑菌活性, 但以4月上旬、7月中旬和9月中下旬较高。七子花叶片提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性稍强于大肠杆菌。从曲线波动可以推测, 随着七子花叶片的生长发育, 其抑菌活性物质会有所变化, 但基本保持稳定。

天然植物往往存在许多具有抑菌活性的生理活性物质, 如丹参酮II和绿原酸等。七子花含有一定的黄酮成分^[4]。由于七子花叶片的抑菌活性主要存在于乙酸乙酯和正丁醇提取组分中^[7], 因此, 可初

步判断其抑菌活性成分与其所含某种黄酮成分相关, 但具体抑菌活性物质的分离提取尚在研究之中。



菌株: 大肠杆菌 *Escherichia coli*; 生药比例: 1/80

图 1 不同时期七子花叶片抑菌活性的比较

Figure 1 Comparison of anti-bacterial activity of *Heptacodium miconioides*'s leaves at different times

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 金则新. 浙江天台山七子花群落分布格局研究[J]. 广西植物, 1999, 19(1): 47-521.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 柯世省, 金则新, 李钧敏, 等. 七子花苗期光合生理生态特性研究[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(2): 125-130.
- [6] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 金则新, 李钧敏. 珍稀濒危植物七子花提取物的抑菌活性[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 306-310.

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

ZHANG Jun-hui, JIN Ze-xin

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

Abstract: The anti-bacterial activity of *Heptacodium miconioides* (sevenseedflower tree) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were studied by a disc diffusion test with leaves picked at different dates (4th Apr, 18th Apr, 2nd May, 16th May, 30th May, 30th Jun, 27th Jun, 11th Jul, 25th Jul, 8th Aug, 22nd Aug, 5th Sep, 19th Sep). Compared with boiling or Soxhlet's extraction methods, ultrasound was suitable for analysis of larger quantities of samples. When diluted 80 times, 1 g ultrasound extraction still had a strong anti-bacterial rate ($> 60\%$). Furthermore, a strong anti-bacterial rate ($> 50\%$) was observed during the entire leaf growing period with *S. aureus* having a higher susceptibility than *E. coli*. Although it fluctuated with time, leaves of *H. miconioides* displayed the highest anti-bacterial activity the first 10 d of April, the middle 10 d of July, and the last 10 d of September. [Ch, 1 tab. 1 fig. 7 ref.]

Key words: botany; *Heptacodium miconioides* (sevenseedflower); extract; anti-bacterial activity