

文章编号: 1000-5692(2007)05-0604-04

## 山核桃叶片提取物的抑菌作用

殷舒, 毛胜凤, 杨琼霞, 黄佩龙, 朱栋奎, 胡军祥

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 研究了山核桃 *Carya cathayensis* 叶片提取物对几种常见菌种的抑制作用。采用滤纸片法, 检测不同浓度山核桃叶片乙醇和水提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*, 黑曲霉菌 *Aspergillus niger*, 黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 和青霉菌 *Penicillium* sp. 的抑制效果。结果表明, 培养 12 h, 乙醇提取物对 5 个供试菌种表现出显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 其效果优于水提取物。培养 24 h, 乙醇提取物和水提取物对黄曲霉菌的抑制作用明显 ( $P < 0.05$ ), 而对金黄色葡萄球菌和酵母菌的抑制作用较 12 h 前有所降低。培养 36 h, 乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和酵母菌仍保持一定的抑制作用。表 2 参 9

**关键词:** 植物保护学; 山核桃; 叶片; 提取物; 抑菌效果

**中图分类号:** S789.4      **文献标志码:** A

从植物中寻求更为环保和安全的农药与药物替代品越来越受到人们的重视。提取植物的有效成分开发生物农药和药品已成为当前的研究热点之一。胡桃科 Juglandaceae 植物含有黄酮类、萜类、蒽醌苷类、多酚类和有机酸类等成分, 具有抑制醛糖还原酶, 抑制细菌 DNA 起始复合物的形成, 抗肿瘤, 镇痛消炎等作用<sup>[1-3]</sup>。其主要生物毒性成分为胡桃醌等<sup>[1]</sup>, 具有较好抑菌活性<sup>[4]</sup>。胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* 提取物对白色念珠菌 *Candida albicans* 的抑制作用与氟康唑(FCZ)相当<sup>[5]</sup>。对华东野核桃 *Juglans cathayensis* var. *formosana* 叶片提取物的研究也表明, 对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 具明显的抑制作用<sup>[6]</sup>。但关于胡桃科山核桃的相关研究, 国外也只是主要对美国山核桃 *Carya illinoensis* 的营养学进行了研究, 有关抑菌效果的研究还少见报道。主产于我国浙西以及安徽南部的山核桃 *Carya cathayensis* 目前已有较大的种植面积并形成了产业, 但对于山核桃叶片的抑菌作用研究, 目前国内外未见文献报道。

### 1 材料与方法

#### 1.1 山核桃叶片提取物的制备

实验所用的山核桃鲜叶片采于浙江省临安市昌化栽培山核桃树。取山核桃叶片, 烘干后用 DJ 型粉碎机粉碎至 40~60 目, 加入体积分数为 95% 乙醇, 浸泡 24 h 后过滤。重复提取 1 次, 合并 2 次滤液。用旋转蒸发仪回收溶剂, 得到膏状乙醇提取物。相同方法用无菌水提取, 得到膏状水提取物。使

收稿日期: 2006-11-15; 修回日期: 2007-01-16

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y304053); 浙江省临安市科技局资助项目(05064)

作者简介: 殷舒, 从事森林副产品综合利用研究。E-mail: yinsh1997@yahoo.com.cn。通信作者: 胡军祥, 教授, 博士, 从事细胞生物学等研究。E-mail: hjxy@hznc.com

用时将上述膏状提取物用无菌水稀释成 0.25, 0.05, 0.01 和 0.002  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  4 种质量浓度。

## 1.2 提取物滤纸片的制备

将滤纸片分别浸入不同质量浓度的乙醇提取物、水提取物和无菌水中, 密封保存 24 h。以无菌水作为阴性对照组。

## 1.3 菌悬液制备

取活化的菌种一环, 放入盛有 6 mL 无菌水的试管中, 充分振荡, 使之均匀分布, 静置备用。

## 1.4 菌种

所用菌种为金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*, 黄曲霉菌 *Aspergillus flavus*, 青霉菌 *Penicillium* sp. 和黑曲霉菌 *Aspergillus niger*, 由浙江林学院森林保护实验室提供。

## 1.5 抑菌活性测定

在无菌操作的条件下, 将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌悬液各 0.2 mL, 分别涂布在牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 每个平板放置 3 片含相同质量浓度提取物的滤纸片, 3 个平板作为平行对照的一组, 并分成 0.25, 0.05, 0.01 和 0.002  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙醇提取物和水提取物各 4 组和阴性对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养。培养 12, 36 和 72 h, 用十字交叉法测量抑菌圈直径 (cm), 以各组重复的平均值作为试验结果。用上述相同方法将酵母菌、黄曲霉菌、黑曲霉菌和青霉菌菌悬液各 0.2 mL, 分别涂布在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基平板上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养。大肠杆菌、黄曲霉菌、黑曲霉菌和青霉菌培养 12 h, 黄曲霉菌培养 24 h, 同样用十字交叉法测量抑菌圈直径, 求平均值作为试验结果。

## 1.6 统计学分析

结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以阴性对照组为对照进行 *t* 检验。

# 2 结果与分析

## 2.1 山核桃叶片提取物对金黄色葡萄球菌和酵母菌的抑制作用

我们用山核桃叶片提取物对金黄色葡萄球菌和酵母菌的抑制作用进行了研究, 结果见表 1。

表 1 山核桃叶片提取物对金黄色葡萄球菌和酵母菌的抑制作用

Table 1 The restraining effect of the extracts from the leaves of carya on *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*

处理质量 浓度/ ( $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	抑菌圈直径/cm					
	培养 12 h		培养 24 h		培养 36 h	
	金黄色葡萄球菌/cm	酵母菌	金黄色葡萄球菌/cm	酵母菌	金黄色葡萄球菌/cm	酵母菌
0.25 (醇提取物)	1.438 $\pm$ 0.237**	1.492 $\pm$ 0.452**	1.056 $\pm$ 0.221**	0.793 $\pm$ 0.078**	0.877 $\pm$ 0.138**	0.729 $\pm$ 0.042**
0.25 (水提取物)	0.852 $\pm$ 0.358**	0.850 $\pm$ 0.103*	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000
0.05 (醇提取物)	1.027 $\pm$ 0.140**	1.212 $\pm$ 0.300**	0.824 $\pm$ 0.107**	0.766 $\pm$ 0.091**	0.709 $\pm$ 0.081**	0.703 $\pm$ 0.086**
0.05 (水提取物)	0.500 $\pm$ 0.000	0.744 $\pm$ 0.218	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000
0.01 (醇提取物)	0.927 $\pm$ 0.134**	1.051 $\pm$ 0.531*	0.811 $\pm$ 0.087**	0.620 $\pm$ 0.106**	0.776 $\pm$ 0.074**	0.500 $\pm$ 0.000
0.01 (水提取物)	0.677 $\pm$ 0.140**	0.777 $\pm$ 0.234	0.621 $\pm$ 0.123**	0.500 $\pm$ 0.000	0.594 $\pm$ 0.098**	0.500 $\pm$ 0.000
0.002 (醇提取物)	0.823 $\pm$ 0.126**	1.191 $\pm$ 0.343**	0.793 $\pm$ 0.173**	0.545 $\pm$ 0.067**	0.669 $\pm$ 0.070**	0.500 $\pm$ 0.000
0.002 (水提取物)	0.592 $\pm$ 0.135**	0.924 $\pm$ 0.180**	0.500 $\pm$ 0.000	0.601 $\pm$ 0.155**	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000
阴性对照组	0.500 $\pm$ 0.000	0.702 $\pm$ 0.254	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000

说明: \*\*表示  $P < 0.01$ , 差异极显著, \*表示  $0.01 < P < 0.05$  差异显著;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

从表 1 可见, 山核桃叶片乙醇提取物对培养 12 和 24 h 的金黄色葡萄球菌和酵母菌与阴性对照组比较有极显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 并且抑制效果基本随提取物质量浓度的增加而提高, 但随培养时间的延长而有所降低。在本试验中, 培养 36 h 后, 乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的最低抑制质量浓度 (MIC) 为 0.002  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而对酵母菌的 MIC 为 0.05  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。表明乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用大于对酵母菌的抑制作用。

水提取物对培养 12 h 的金黄色葡萄球菌有极显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 也呈现正相关的剂量—效应关系, 但对酵母菌, 0.05 和 0.01  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  组无抑制作用。培养 24 h 后, 水提取对金黄色葡萄球菌和酵母菌几乎无抑制作用。说明的水提取物的作用不及乙醇提取物。

## 2.2 山核桃叶提取物对黑曲霉菌、青霉菌、大肠杆菌和黄曲霉菌的抑制作用

我们用山核桃叶片提取物对黑曲霉菌、青霉菌、大肠杆菌和黄曲霉菌的抑制作用进行了研究, 结果见表 2。

表 2 山核桃叶片提取物对黑曲霉菌、青霉菌、大肠杆菌和黄曲霉菌的抑制作用

Table 2 The restraining effect of the extracts from the leaves of carya on *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus*

处理质量 浓度/ $(\text{kg} \cdot \text{L}^{-1})$	抑菌圈直径/cm			
	培养 12 h			培养 24 h
	黑曲霉菌	青霉菌	大肠杆菌	黄曲霉菌
0.25 (醇提取物)	1.447±0.348 **	0.876±0.242 **	0.875±0.337 **	1.140±0.358 **
0.25 (水提取物)	0.621±0.137 **	0.804±0.121 **	0.500±0.000 **	0.500±0.000
0.05 (醇提取物)	0.932±0.142 **	0.932±0.142 **	0.942±0.190 **	1.147±0.300 **
0.05 (水提取物)	0.748±0.151 **	0.883±0.111 **	0.500±0.000 **	0.713±0.182 **
0.01 (醇提取物)	0.819±0.285 **	0.819±0.285 **	0.802±0.155 **	0.647±0.126 **
0.01 (水提取物)	0.940±0.178 **	0.749±0.136 **	0.500±0.000 **	0.500±0.000
0.002 (醇提取物)	0.677±0.219 **	0.677±0.219 **	0.589±0.194	0.631±0.086 **
0.002 (水提取物)	0.813±0.239 **	0.752±0.219 **	0.565±0.115	0.561±0.118 **
阴性对照组	0.500±0.000	0.500±0.000	0.551±0.079	0.500±0.000

说明: \* 表示  $P < 0.01$ , 差异极显著, \*\* 表示  $0.01 < P < 0.05$  差异显著;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

从表 2 可见, 山核桃叶片乙醇提取物对培养 12 h 的大肠杆菌、青霉菌和黑曲霉菌均有极显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 抑制效果基本随提取物质量浓度的增加而提高。水提取物对大肠杆菌、青霉菌、黑曲霉菌的作用与阴性对照组差异极显著。培养 24 h 后, 乙醇提取物对黄曲霉菌抑制作用与阴性对照组差异极显著, 0.05  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度对黄曲霉的作用最佳。水提取物 0.05 和 0.002  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组对黄曲霉菌的抑制作用与阴性对照组差异相比极显著。其中, 水提取物 0.05  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理对黄曲霉菌的抑制效果最佳。

## 3 讨论

有关报道称, 胡桃科的胡桃 *Juglans regia* 青皮对巴豆油所致的小鼠 *Mus musculus* 耳壳肿胀、大鼠角叉菜胶性足肿胀、醋酸引起的小鼠腹腔毛细血管通透性增高均有明显的抑制作用, 对热传导及化学刺激引起的拟痛反应有明显镇痛作用<sup>[7]</sup>。山核桃外果皮提取液对小鼠的辐射防护作用研究, 也显示了提取液对辐射引起的氧化损伤有较好的防护作用<sup>[8]</sup>。胡桃的树皮在阿拉伯半岛被用来洁牙和妇女口唇染色, 可以提高唾液 pH 值, 对口腔感染中起重要作用的各种病原体具有广谱抗微生物活性<sup>[9]</sup>。

本实验结果显示, 山核桃叶片提取物对细菌和真菌均有抑制作用, 乙醇提取物的抑菌作用大于水提取物, 而且比水提取液的作用时间更为持久。对于山核桃叶片、树皮、青果皮等提取物的抑菌作用的研究, 将为杀菌剂、生物农药、除草剂、生物实验抑制剂、降压药物等一系列相关产品的开发提供实验依据, 但成分分析和作用机制及相关产品的开发有待进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] 易醒, 谢明勇, 肖小年. 胡桃科植物化学及生物活性研究概况[J]. 中草药, 2001, 32(6): 559—561.
- [2] CHAO S H, GREENLEAF A L, PRICE D H. Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription[J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(3): 767—773.
- [3] 王春玲, 包永明, 段彦龙, 等. 胡桃楸对 HeLa, PC-3 细胞作用的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2003, 9(3): 144—146.

- [4] 翟梅枝, 李晓明, 林奇英, 等. 核桃叶抑菌成分的提取及其抑菌活性[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(4): 89-91.
- [5] 闻平, 陈蕾. 胡桃楸提取物对白色念珠菌生长的抑制作用[J]. 中国微生物学杂志, 2005, 17(5): 335-338.
- [6] 蒋剑, 熊耀康, 姚振生, 等. 华东野核桃叶提取物体外抗菌作用研究[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(3): 75-76.
- [7] 宛蕾, 陈秀芬, 杜江. 胡桃青皮抗炎及镇痛作用的研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 29-30.
- [8] 杨琼霞, 殷舒, 申屠垠, 等. 山核桃外果皮提取液对小鼠的辐射防护作用[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(6): 604-607.
- [9] 王晓青. 胡桃抗微生物活性的研究[J]. 国外医学中医中药分册, 1999, 21(1): 39-40.

## Bacteriostasis and fungistasis with extracts from *Carya cathayensis* leaves

YIN Shu, MAO Sheng-feng, YANG Qiong-xia, HUANG Pei-long, ZHU Dong-kui, HU Jun-xiang

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** Environmentally-safe pesticides extracted from plants are paid more attention. The plants of Juglandaceae have some antibiotic substances, as flavonoid, polyphenols and terpenoid. This research was to study the bacteriostasis and fungistasis from extracts of *Carya cathayensis* leaves. A filter paper method was used to determine whether alcohol (95%) extract or water (sterilized) extract from the leaves of *C. cathayensis*, diluted with sterile water in different concentrations (0.25, 0.05, 0.01, 0.002 kg<sup>o</sup>L<sup>-1</sup>), had an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, and *Penicillium* sp. Results indicated that after a 12 h culture inhibition with the alcohol extract on the six strains was significantly greater ( $P < 0.05$ ). After a 24 h culture, inhibition on *A. flavus* with both the alcohol extract and water extract was significantly greater ( $P < 0.05$ ) than on the other bacteria and fungi. Moreover, after 24 h culture, water extract nearly had no inhibitory effect on *S. aureus* and *S. cerevisiae* than at 12 h. After a 36 h culture, however, the alcohol extract still had a significant inhibitory effect ( $P < 0.01$ ) on *S. aureus* and *S. cerevisiae*. [Ch, 2 tab. 9 ref.]

**Key words:** plant protection; *Carya cathayensis*; leaves; extract; bacteriostasis and fungistasis