

梁 梓, 杜 兵, 汪淑芳, 等. 九节龙总黄酮的抑菌作用[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 294–295.

九节龙总黄酮的抑菌作用

梁 梓¹, 杜 兵², 汪淑芳¹, 杨瑶君¹, 范 晶¹, 张维敏¹, 王 容¹

(1. 乐山师范学院生命科学学院林竹生态研究中心, 四川乐山 614000; 2. 四川宁氏牧业有限公司, 四川彭山 610046)

摘要:采用纸片扩散法和二倍稀释法对九节龙总黄酮提取物进行体外抑菌试验, 并测定了 pH 值、温度对其抑菌效果的影响。结果显示: 九节龙总黄酮对细菌的抑制效果明显, 但对霉菌和酵母菌的抑制效果不明显。pH 值和温度均对总黄酮抑菌活性有一定的影响。

关键词:九节龙; 总黄酮; 二倍稀释法; 抑菌作用

中图分类号: S567.239 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)06–0294–02

九节龙(*Ardisia pusilla* A. DC.)系紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia*)植物, 主要分布在我国南部及四川等地, 具有直立灌木和匍匐生根的根茎, 常见于海拔 1 200 m 以下的山间林下或竹林下阴湿的地方。九节龙的全株及根可供药用, 主要具有清热利湿、活血化瘀、舒筋活络、强筋壮骨等功效^[1]。黄酮类化合物一般呈弱酸性, 能使蛋白质凝固或变性而具有杀菌和抑菌作用。有人对斑地锦^[2]、板栗壳^[3]、金橘^[4]、柚皮^[5]等植物材料中的黄酮类物质体外抑菌作用进行了研究, 并取得了很好的效果。黄酮类化合物是紫金牛属植物中重要的活性物质, 目前对其黄酮类化合物的研究主要集中在提取、化学成分及黄酮类组分等方面^[6], 对其抑菌作用的研究还未见报道, 因此, 笔者对九节龙总黄酮抑菌活性进行了初步探究, 为九节龙的药用价值评定和开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

九节龙叶片鲜品于 2010 年 5 月采于乐山师范学院绿心林下, 采集全株叶片。菌种主要包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 均由乐山师范学院生命科学学院微生物实验室提供。

1.2 主要仪器

K1901 紫外可见分光光度计; 植物组织捣碎机; 01000160 型高压蒸汽灭菌锅; ZK–82A 型真空干燥箱; 芸香苷标准品为 Sigma 公司生产; 其他试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 九节龙黄酮提取流程 称取经 70 ℃干燥粉碎的九节龙叶片, 过 40 目筛, 然后以料液比 1 g: 40 mL(40% 乙醇为溶剂)进行超声处理, 处理温度为 80 ℃、超声时间为 10 min、超声功率为 300 W。浸提液离心, 减压浓缩, 得到总黄酮粗提物。总黄酮含量的测定采用紫外–可见分光光度法, 以芸

香苷作标准物^[7]。

1.3.2 培养基及无菌平板的制备 固体培养基及无菌平板的制作参照文献[8]。

1.3.3 菌种的活化及菌悬液制备 取 5 支已灭过菌的试管, 每支试管倒入一定量(不超过试管的 1/5)的培养基, 制成斜面(斜面不超过试管的 1/2), 取供试菌种 1 环划线培养, 细菌于 32 ℃培养 48 h, 真菌于 30 ℃培养 48 h, 待用。将各个试验活化细菌分别接种于培养基斜面, 37 ℃培养 24 h, 随后用 0.9% 无菌生理盐水配制菌悬液, 采用血细胞计数板法计数, 使菌悬液浓度约为 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 个/mL, 备用。

1.3.4 含菌平板的制备 将上述各培养基灭菌后倒于培养皿内, 每个培养皿约 20 mL。待培养基凝固后, 用灭菌移液枪准确吸取上述各种菌悬液 0.2 mL 注入培养皿内, 再用灭过菌的涂布棒迅速将菌液涂抹均匀, 制成指示含菌平板。

1.3.5 抑菌活性的测定 将灭过菌的、直径为 6 mm 的圆形滤纸片分别置于 0.5、1.0 mg/mL 总黄酮溶液中浸泡 1 h, 用已灭过菌的镊子取浸泡过的滤纸片, 放置于含菌平板中, 每个浓度 3 个重复板, 空白对照为无菌蒸馏水。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 37 ℃培养 24 h, 霉菌、酿酒酵母菌分别于 30、28 ℃下培养 48 h, 取出, 观察是否有抑菌圈, 若有, 则用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定 用二倍稀释法^[8]将九节龙总黄酮溶液稀释成 2、1、0.25、0.125、0.062 5 mg/mL 等 5 个浓度。在每支试管中加入 2 mL 液体培养基, 然后分别加入 2 mL 2、1、0.25、0.125、0.062 5 mg/mL 总黄酮溶液, 并设阳性对照, 每支试管中加入 0.2 mL 菌悬液, 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、霉菌、酿酒酵母分别置于 37、37、30、28 ℃下培养, 每个浓度重复 3 次, 以完全不长菌的浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

1.3.7 酸碱性对总黄酮抑菌活性的影响 用 0.1 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl 将九节龙总黄酮溶液的 pH 值分别调至 4、5、6、7、8、9, 根据“1.3.5”节的测定结果选择适当的总黄酮抑菌浓度, 重复“1.3.5”节步骤比较不同的 pH 值对总黄酮抑菌活性的影响。

1.3.8 温度对总黄酮抑菌活性的影响 分别取 1 mL 九节龙总黄酮放入 5 个不同的灭菌试管中, 将试管分别置于 60、70、80、90 ℃下水浴和 120 ℃湿热条件下处理 15 min, 根据“1.3.5”测定结果选择适当的总黄酮抑菌浓度, 重复“1.3.5”

收稿日期: 2012–12–06

作者简介: 梁 梓(1980—), 女, 辽宁人, 硕士, 从事生理生化研究。

E-mail: 120564533@qq.com。

通信作者: 杨瑶君, 男, 博士, 教授, 主要从事林竹生态研究。

E-mail: rsjyy@126.com。

的步骤比较不同的温度对总黄酮抑菌活性的影响。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性

九节龙总黄酮对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用很强,当其浓度为 0.5 mg/mL 时,抑菌圈直径分别为 9.50、14.44 mm;当其浓度为 2 mg/mL 时,抑菌圈直径分别为 12.16、17.20 mm。九节龙总黄酮对黑曲霉和酿酒酵母均未产生抑菌作用(表 1)。

表 1 九节龙总黄酮的抑菌活性情况

菌种	抑菌圈直径(mm)		
	空白对照	0.5 mg/mL 总黄酮	2 mg/mL 总黄酮
大肠杆菌	0	9.50	12.16
枯草芽孢杆菌	0	14.44	17.20
黑曲霉	0	0	0
酿酒酵母菌	0	0	0

2.2 九节龙总黄酮最小抑菌浓度(MIC)

九节龙总黄酮对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用很强,最低抑菌浓度分别为 0.25、0.125 mg/mL(表 2)。

表 2 九节龙总黄酮对供试菌种的最低抑菌浓度

总黄酮浓度 (mg/mL)	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
2.000 0	-	-
1.000 0	-	-
0.500 0	-	-
0.250 0	-	-
0.125 0	+	-
0.062 5	+	+

注:“+”表示长菌;“-”表示没有长菌。

2.3 酸碱性和九节龙总黄酮抑菌活性的影响

在偏酸性条件下,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑制效果都较好。由表 3 可知,当 pH 值为 5 时,九节龙总黄酮提取物抑菌活性最好;当 pH 值大于 7 时,九节龙总黄酮提取物的抑菌效果就不明显了。这可能是由于总黄酮分子中含有多个酚性羟基,故一般显弱酸性,当 pH 值开始增大时,总黄酮化合物的溶解度增大,抑菌活性增强;当 pH 值偏碱性后,总黄酮结构发生变化,因此抑菌活性减弱。

表 3 酸碱性对九节龙总黄酮抑菌活性的影响

培养基的 pH 值	抑菌圈直径(mm)	
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
5	14.50	16.23
6	8.12	9.25
7	7.50	7.85
8	0	0

2.4 温度对总黄酮抑菌活性的影响

不同处理温度对九节龙总黄酮提取物的抑菌作用有一定影响,随着对九节龙总黄酮提取物处理温度的升高,其抑菌作用明显呈先上升后下降的趋势。这与总黄酮的性质有关,当温度高于 80℃后,总黄酮就容易分解,因此抑菌作用又有所降低(图 1)。

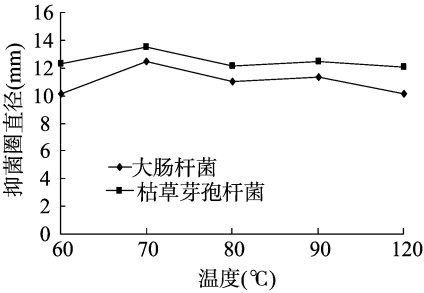


图 1 温度对总黄酮抑菌活性的影响

3 结论

用纸片扩散法对九节龙总黄酮抑菌性进行测定,结果显示,九节龙总黄酮对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌很强,最低抑菌浓度分别为 0.25、0.125 mg/mL,说明九节龙有较强的药用开发潜力;对黑曲霉和酿酒酵母抑菌作用不明显。九节龙总黄酮在偏酸性环境下有较好的抑菌效果,随着对九节龙总黄酮提取物处理温度的升高,其抑菌作用明显呈先上升后下降的趋势。本研究所用的九节龙总黄酮是粗提物,为了进一步了解九节龙活性物质的抑菌机理,可对提取物进行分离纯化,深入探讨其活性物质的抑菌机理。

参考文献:

[1]赵亚,刘合刚. 紫金牛属植物研究近况[J]. 中草药,1999,30(3):228-231.
[2]邵留,沈益绿,郑曙明. 斑地锦总黄酮的提取及抑菌作用[J]. 西南农业学报:自然科学版,2005,27(6):902-905.
[3]李云雁,宋光森. 板栗壳提取物抑菌作用研究[J]. 林产化学与工业,2004,24(4):61-64.
[4]黎继烈,张慧,王卫,等. 金橘黄酮抑菌作用研究[J]. 食品与机械,2008,24(5):38-41.
[5]戴玉锦,冯玲,卢明. 柚皮提取物的抗氧化性及抑菌作用研究[J]. 江苏农业科学,2007(1):178-180.
[6]汤昊,何海洋,宋良科,等. 四川紫金牛属药用植物的黄酮类活性组分的含量分析[J]. 特产研究,2011,33(3):48-51.
[7]梁梓,汪淑芳,范晶,等. 超声波辅助法对四川九节龙总黄酮提取工艺的研究[J]. 北方园艺,2012(4):156-158.
[8]沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,1999:215.