

黄仁术, 易 凡. 金荞麦( - )表儿茶素类活性物质体外抑菌试验[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 308 - 310.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.103

# 金荞麦( - )表儿茶素类活性物质体外抑菌试验

黄仁术<sup>1,2</sup>, 易 凡<sup>2</sup>

(1. 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心, 安徽六安 237012; 2. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽六安 237012)

**摘要:**为了探讨金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)提取液的抑菌效果, 试验测得其乙醇提取液中( - )表儿茶素类活性物质含量达到 10.019 mg/mL, 占其块根干物质重的 1.85%; 牛津杯法表明金荞麦( - )表儿茶素类活性物质对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、大肠杆菌均有抑制作用, 但对黑曲霉、灰绿青霉没有抑制作用; 二倍稀释法表明( - )表儿茶素类活性物质对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母的 MIC 分别为 1.252、2.505、5.010、5.010 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌的 MBC 为 5.010 mg/mL。

**关键词:**金荞麦; ( - )表儿茶素; 体外抑菌

**中图分类号:** S482.2<sup>+</sup>92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0308-03

植物是抑菌活性物质的天然宝库, Grange 等报道约有 2 400 种植物具有防治有害生物的活性<sup>[1]</sup>。金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)作为一种具有开发前途的资源植物, 目前有关其抑菌方面的研究较少, 且未涉及具体的抗菌活性物质成分。如有关文献报道金荞麦乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链球菌、沙门氏菌等有抑制作用<sup>[2-5]</sup>; 而陈福勇等发现金荞麦乙醇提取物对鸡白痢沙门氏菌、金黄色葡萄球菌有较好的抑菌作用, 对大肠杆菌无抑制作用<sup>[6]</sup>; 张永仙等则报道金荞麦乙醇提取物对猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢

沙门氏菌、猪与鸡的致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、猪链球菌、克氏肺炎球菌等几乎无抗菌作用, 但在体内却有明显的抗感染作用<sup>[7]</sup>。实际上, 金荞麦乙醇提取物为一类含原花色素的缩合性单宁混合物, 主要由( - )表儿茶素及其二聚体组成, 其中( - )表儿茶素单元的含量占 65% ~ 70%<sup>[8]</sup>。为此, 本研究对金荞麦乙醇提取物——( - )表儿茶素类活性物质的含量进行测定, 并在此基础上确定其对一些代表性细菌和真菌的抗菌效果, 从而为无残留、无毒副作用及细菌不易产生耐药性的抗菌药物开发奠定基础。

收稿日期: 2014-02-18

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2012A280); 国家级大学生创新创业训练计划(编号: 201210376004)。

作者简介: 黄仁术(1976—), 女, 新疆阿克苏人, 硕士, 副教授, 主要从事天然活性物质研究。E-mail: ahlrs@126.com。

取法提取花生壳中黄酮类化合物的抗氧化活性明显高于索氏萃取法提取花生壳中黄酮类化合物的抗氧化活性。可见, 超声波辅助提取法是一种提取天然活性成分的有效方法。

## 参考文献:

- [1] Zhong S Y, Ma C W, Lin Y C, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by - product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry[J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1636 - 1642.
- [2] Goli A H, Barzegar M, Sahari M A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio(*Pistachia vera*) hull extracts[J]. Food Chemistry, 2005, 92(3): 521 - 525.
- [3] 张守媛, 李太村, 栾 波, 等. 响应面优化茄子皮色素的提取及抗氧化性研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(4): 118 - 122.
- [4] 蔡奕文, 赵谋明, 彭志英. 天然抗氧化剂发展近况[J]. 中国油脂, 1999, 24(4): 45 - 47.
- [5] 周向军, 高义霞, 谢天柱, 等. 天然抗氧化剂茶多酚的研究进展[J]. 资源开发与市场, 2010, 26(11): 1034 - 1036.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

金荞麦采集于安徽省潜山县; ( - )表儿茶素纯度为 98% (中国药品生物制品检定所); 试验菌株包括革兰阳性菌、革兰阴性细菌和真菌, 其中革兰阳性细菌以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为代

- [6] 许 晖, 孙兰萍, 张 斌, 等. 花生壳黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2008, 3(3): 11 - 15.
- [7] 杨国峰, 周建新, 汪海峰, 等. 花生壳提取物的制备及其抗氧化与抗菌活性的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 97 - 101.
- [8] 张伟敏, 张盛林, 钟 耕. 木犀草素的研究概况[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 11 - 16.
- [9] Hatano T, Kawaga H, Yasuhara T, et al. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1988, 36(6): 2090 - 2097.
- [10] Li X C, Lin J, Gao Y X, et al. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma cimicifugae*[J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6: 140 - 149.
- [11] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex. Specific application to the determination of vitamin E[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 269(2): 337 - 341.

表,革兰阴性菌以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为代表,真菌以黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰绿青霉(*Penicillium glaucum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)为代表;牛肉膏蛋白胨培养基,PDA 培养基。

1.2 仪器设备

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),202-1 型电热恒温干燥箱(上海浦东英丰科学仪器有限公司),HH-2/HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),YX-450 电热蒸汽压力消毒器(上海三申医疗器械有限公司),PYX-150HA 恒温恒湿培养箱(科立仪器),SW-CJ-1C 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的提取与测定 建立香荚兰素-盐酸分光光度法对(-)表儿茶素类活性物质含量的测定标准曲线: $D=0.2262C-0.0126$ , $R=0.9993$ ,其中, $D$ 为吸光度, $C$ 为测定液浓度( $\mu\text{g/mL}$ )。称取 20.0 g 金荞麦根部粉碎物,70%乙醇浸泡 24 h,提取物用布氏漏斗抽滤提取得到上清液,上清液继续用旋转蒸发仪旋转蒸发得到浓缩提取液,直至冷凝装置不再有液体滴出,倒出提取液,量出为 37 mL,封口冷藏保存。提取液测定时,用移液枪取 10  $\mu\text{L}$  提取液和 10 mL 乙醇于 50 mL 容量瓶中,用 1% 香荚兰-浓盐酸定容,测定吸光度,根据标准曲线计算测定液中(-)表儿茶素类活性物质的浓度<sup>[9]</sup>,试验重复测定 3 次。

1.3.2 供试菌株的复苏与纯化 无菌条件下用接种环接种金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 1 d。接种酿酒酵母、黑曲霉、灰绿青霉于 PDA 培养基,28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 3 d。再用接种环挑取单个菌落接种培养,如此重复 4 次,得到纯种菌体。用接种铲刮下纯种菌体,无菌水稀释备用。

1.3.3 牛津杯法测定(-)表儿茶素类活性物质抑菌效果 在倒好的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上分别加入 100  $\mu\text{L}$  金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌菌液,在 PDA 培养基上分别加入 100  $\mu\text{L}$  酿酒酵母、黑曲霉、灰绿青霉菌液,涂抹均匀。用镊子夹取已经灭菌的牛津杯置于平板中央,用已灭菌的移液枪移取 200  $\mu\text{L}$  浓缩物加入牛津杯中。细菌在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 1 d,真菌在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件细培养 3 d,观察并测量抑菌圈。

1.3.4 (-)表儿茶素类活性物质的 MIC、MBC 测定 每组取灭菌小试管 10 支,按照 1~10 编号,细菌每管加入牛肉膏汤 1 mL,真菌每管加入马铃薯葡萄糖液 1 mL;采用二倍稀释法,用吸管吸取提取液 1 mL 放入第 1 管,并反复吹匀;接着从第 1 管吸出 1 mL 放入第 2 管同样吹匀后吸出 1 mL 放入第 3 管,依次逐管进行稀释到第 8 管;然后各管加入 0.5 mL 供试菌液。第 9 管为加入 1 mL 提取液但不加菌液的阴性对照管,第 10 管为不加提取液只加 0.5 mL 供试菌液的阳性对照管。细菌在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 1 d,真菌在 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d,根据各管菌液生长情况测定最低抑菌浓度(MIC)。

进一步将未见细菌或真菌生长的各试管内的培养液种到牛肉膏蛋白胨琼脂培养基或 PDA 培养基上,细菌在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 1 d,真菌在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 3 d,根据培养皿中

菌落生长情况测定最小杀菌浓度(MBC)。

2 结果与分析

2.1 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的含量

由表 1 可见,金荞麦的乙醇提取物经旋转蒸发浓缩后,其(-)表儿茶素类活性物质含量达到 10.019 mg/mL,总提取量占其块根干物质质量的 1.85%。

表 1 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质含量测定情况

重复	测定液吸光度	测定液中活性物质含量( $\mu\text{g/mL}$ )	提取液中活性物质含量( $\text{mg/mL}$ )
I	0.439	1.996	9.982
II	0.440	2.001	10.004
III	0.443	2.014	10.071
平均	0.441	2.004	10.019

2.2 (-)表儿茶素类活性物质抑菌效果

由图 1 可知,金荞麦(-)表儿茶素类活性物质在 10.019 mg/mL 浓度时对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、大肠杆菌均形成抑菌圈,表明有明显的抑菌作用;但对黑曲霉、灰绿青霉没有形成抑菌圈,表明没有抑菌作用。进一步测量表明,相同浓度下,金荞麦(-)表儿茶素类活性物质对上述菌群的抑菌圈直径为:金黄色葡萄球菌>酿酒酵母>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌(表 2)。

2.3 (-)表儿茶素类活性物质的 MIC、MBC

从表 3 中可知,金荞麦(-)表儿茶素类活性物质对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)为 1.252 mg/mL,最小杀菌浓度(MBC)为 5.010 mg/mL;对大肠杆菌的 MIC 为 2.505 mg/mL,对枯草芽孢杆菌、酿酒酵母的 MIC 为 5.010 mg/mL。

3 讨论

金荞麦乙醇提取物原液——(-)表儿茶素类活性物质含量在 10.019 mg/mL 浓度时,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、大肠杆菌有抑菌作用,对黑曲霉、灰绿青霉没有抑制作用。(-)表儿茶素类活性物质对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母的 MIC 分别为 1.252、2.505、5.010、5.010 mg/mL,对金黄色葡萄球菌的 MBC 为 5.010 mg/mL;因提取液原液的浓度关系,未测定出大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母的 MBC。金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的抑菌活性不同,主要原因是活性成分对不同菌种的菌丝或孢子的生长抵制能力不同所致<sup>[10]</sup>。同时,试验结果与前人对金荞麦乙醇提取物的抑菌情况报道不一,可能与提取液中的活性物质浓度不同相关。

香荚兰素比色法测定(-)表儿茶素时,所测物质应包括(-)表儿茶素、(+ )儿茶素,以及二者的二聚体和没食子酸酯等(-)表儿茶素类物质总含量<sup>[11]</sup>。此类含原花色素的缩合性单宁混合物可以通过结合细菌细胞壁蛋白质,聚集细胞脂质,以及单宁自氧化产生过氧化氢,干扰细菌细胞膜的通透性,进一步改变细菌细胞壁脂肪酸的组成,从而减缓细菌的生长<sup>[12]</sup>。

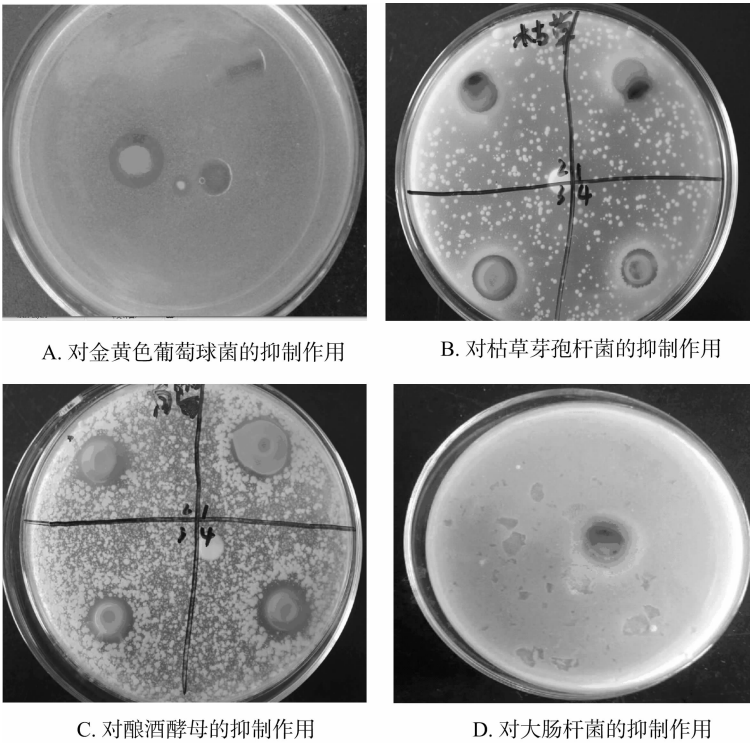


图1 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的抑菌作用

表 2 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质对供试菌的抑菌圈的影响

供试菌	抑菌圈直径(mm)
金黄色葡萄球菌	13
枯草芽孢杆菌	10
酿酒酵母	12
大肠杆菌	9
黑曲霉	-
灰绿青霉	-

注：“-”表示未见明显抑菌圈。

表 3 金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的 MIC、MBC

浓度 (mg/mL)	供试菌生长情况			
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	酿酒酵母	大肠杆菌
5.010	-/○	-/●	-/●	-/●
2.505	-/●	+ /●	+ /●	-/●
1.252	-/●	+ /●	+ /●	+ /●
0.626	+	+	+	+
0.313	+	+	+	+
0.157	+	+	+	+
0.078	+	+	+	+
0.039	+	+	+	+
阴性对照	-	-	-	-
阳性对照	+	+	+	+

注：“-”表示试管中细菌生长受抑制、培养液清亮，“+”表示细菌生长、培养液浑浊；“○”表示转种于培养皿后菌落数小于 5 个，“●”表示转种于培养皿后菌落数多于 5 个。

参考文献：

[1] Grange M, Ahmed S. Handbook of plant with pest control properties [M]. New York: John Wiley & Sons INC, 1988: 41.

[2] 中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 629-632.

[3] 冯黎莎, 陈放, 白洁. 金荞麦的抑菌活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(3): 240-244.

[4] 艾群, 王斌, 王国清. 金荞麦制剂的抑菌研究[J]. 黑龙江医学, 2002, 26(9): 666.

[5] 周玉岩, 乔红杰, 李春玲, 等. 金荞麦提取物体外抗菌活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2009(5): 44-46.

[6] 陈福勇, 甘孟侯, 何静荣, 等. 金荞麦对几种致病菌的体外抑菌作用[J]. 中兽医学杂志, 1987(4): 5-7.

[7] 张永仙, 王权. 金荞麦有效成分的抗菌抗感染作用[J]. 云南畜牧兽医, 1996(2): 22.

[8] 姚黎成, 黄梅芬, 吴友仁, 等. 云南产金荞麦根茎抗肿瘤有效部位的化学研究[J]. 云南植物研究, 1989, 11(2): 215-218.

[9] 黄仁术, 王得胜, 何晓梅, 等. 分光光度法测定金荞麦(-)表儿茶素含量的方法研究[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(3): 36-39.

[10] 冯黎莎, 付先龙, 陈放, 等. 金荞麦提取物对植物病原菌的抑菌活性初探[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2006, 43(3): 688-691.

[11] 黄仁术, 尹汪斌, 何晓梅, 等. 乙醇提取金荞麦(-)表儿茶素类活性物质的工艺[J]. 生物加工过程, 2011, 9(4): 35-40.

[12] 刘秀丽. 植物缩合单宁对大肠杆菌的抑制作用及抑菌机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.