

枸骨不同部位不同溶剂萃取物的抗菌与抗氧化活性研究^Δ

李艳芝*, 刘树玲, 李岩, 郭卿卿, 王胜楠(济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1776-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.14

摘要 目的:研究枸骨叶、茎枝、果实萃取物的抗菌与抗氧化活性。方法:采用纸片扩散法,分别测定枸骨叶、茎枝、果实的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、伤寒杆菌的抗菌活性;选取对3种菌的抑菌圈直径均不小于10 mm且相对较大的萃取物,采用倍比稀释法测量其最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。采用分光光度法测定过氧化值(POV),比较猪油(空白对照)和不同溶剂萃取物加样16 d内的抗氧化作用。结果:除石油醚萃取物无抗菌活性,所有萃取物对伤寒杆菌无抗菌活性外,叶、茎枝、果实的抑菌圈直径分别为8~26、7~21、7~21 mm。针对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌,枸骨叶氯仿萃取物的MIC、MBC分别为0.125、0.5、0.5 mg/ml,0.25、1.0、0.5 mg/ml;枸骨叶乙酸乙酯萃取物的MIC、MBC分别为0.062 5、0.25、0.25 mg/ml,0.062 5、0.5、0.5 mg/ml。枸骨不同溶剂萃取物的POV曲线均在空白对照曲线的下方。结论:枸骨叶乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性最强,枸骨叶、茎枝、果实的萃取物均有抗氧化作用。

关键词 枸骨;抗菌活性;抗氧化活性

Study on the Antibacterial and Antioxidant Activities of Extracts from Different Parts of *Ilex cornuta* by Different Solvents

LI Yan-zhi, LIU Shu-ling, LI Yan, GUO Qing-qing, WANG Sheng-nan (School of Pharmacy, Jining Medical College, Shandong Rizhao 276826, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the antibacterial and antioxidant activities of the leaves, stems and branches and fruits of *Ilex cornuta*. METHODS: Disk diffusion method was used to detect the antibacterial activities of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, *N*-butanol and water soluble extracts from the leaves, stems and branches and fruits of *I. cornuta* against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. The strains with a bacteriostatic ring no less than 10 mm in diameter and relatively large were selected, for which doubling dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC). Spectrophotometry was used to determine the peroxide value (POV) to compare the antioxidation between the lard (blank control) and extracts by different solvents within 16 d. RESULTS: Except the petroleum ether extract, all extracts had an antibacterial activity, but none of them had the antibacterial activity against *Salmonella typhi*. The bacteriostatic rings of the extracts from the leaves, stems, branches and fruits were 8-26, 7-21 and 7-21 mm respectively. The MIC and MBC of the chloroform extract from the leaves of *I. cornuta* against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were 0.125, 0.5, 0.5 mg/ml, and 0.25, 1.0, 0.5 mg/ml, respectively. The MIC and MBC of the ethyl acetate extract from the leaves of *I. cornuta* were 0.062 5, 0.25, 0.25 mg/ml, and 0.062 5, 0.5, 0.5 mg/ml, respectively. The POV curves of all extracts from *I. cornuta* by different solvents were all below those of the blank control. CONCLUSIONS: The ethyl acetate extract from the leaves of *I. cornuta* has the highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, and all extracts of leaves, stems, branches and fruits of *I. cornuta* have antioxidation.

KEYWORDS *Ilex cornuta*; Antibacterial activity; Antioxidant activity

枸骨(*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.)为冬青科冬青属植物,又名鸟不宿、猫儿刺和老虎刺^[1],主要分布于我国长江中下游地区,为苦丁茶主要来源植物之一^[2]。有研究表明,枸骨叶主要含有三萜类、黄酮类等化学成分^[3-5],具有抗菌、抗氧化、降血脂等活性^[6],但笔者未见有关枸骨不同部位不同溶剂萃取物的抗菌及抗氧化活性研究报道。本研究对枸骨不同部位(叶、茎枝、果实)不同溶剂萃取物的抗菌及抗氧化活性进行了研究,以确定其抗菌及氧化的有效部位,为枸骨药理活性的进一步研究、活性成分的分离及资源的充分利用提供实验依据。

1 材料

^Δ 基金项目:日照市应用技术研究与开发计划项目(No.2013JH-SZ017);济宁医学院重点科研项目(No.JY2013KJ011)

* 讲师,硕士。研究方向:中药化学成分及生物活性。E-mail: 461328261@qq.com

1.1 仪器

TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DH-202型电热干燥箱(上海申光仪器仪表有限公司);SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);DHP-420型电热恒温培养箱(天津市中环实验电炉有限公司);LDZX-50KB型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 药材与试剂

枸骨药材采于济宁医学院日照校区本草园,经济宁医学院中药学教研室王建安副教授鉴定为冬青科冬青属植物枸骨;试验中所用试剂均为分析纯。

1.3 菌种

大肠埃希菌(ATCC 8099)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538-1)、枯草芽孢杆菌(ATCC 06002)、伤寒杆菌(ATCC

14028)均购自山东省防疫站。

2 方法与结果

2.1 枸骨不同部位不同溶剂萃取物的制备

准确称取枸骨叶、茎枝、果实粉末各60 g,分别用8倍量95%乙醇浸泡过夜,回流提取3次,合并滤液,回收溶剂得浸膏。将浸膏溶解于适量蒸馏水中,分别用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、饱和正丁醇和水萃取3次,回收各萃取液,得枸骨叶、茎枝、果实的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物,干燥得粉末。枸骨不同部位萃取物的得率见表1。

表1 枸骨不同部位不同溶剂萃取物的得率($n=3, \%$)

Tab 1 Yield of extracts from different parts of *I. cornuta* by different solvents ($n=3, \%$)

枸骨部位	萃取溶剂				
	石油醚	氯仿	乙酸乙酯	正丁醇	水
叶	5.1	3.6	0.67	4.0	11.0
茎枝	3.2	1.6	0.60	2.7	6.9
果实	4.7	1.5	0.68	2.8	15.0

2.2 抗菌试验^[7-9]

采用纸片扩散法和倍比稀释法^[9]进行抗菌试验,考察枸骨不同部位不同溶剂萃取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和伤寒杆菌的抗菌活性。用蒸馏水分别溶解各萃取物制备成质量浓度为1 mg/ml的溶液,测量抑菌圈直径,结果见表2(表中“×”表示没有抑菌圈出现)。

表2 枸骨不同部位不同溶剂萃取物对4种菌的抑菌圈直径(mm)

Tab 2 Diameters of bacteriostatic rings of extracts from different parts of *I. cornuta* against 4 kinds of bacteria by different solvents (mm)

枸骨部位	萃取溶剂	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	伤寒杆菌
叶	石油醚	×	×	×	×
	氯仿	15	24	13	×
	乙酸乙酯	17	26	16	×
	正丁醇	16	12	9	×
	水	13	10	8	×
茎枝	石油醚	×	×	×	×
	氯仿	12	18	9	×
	乙酸乙酯	15	21	14	×
	正丁醇	14	11	10	×
	水	9	10	7	×
果实	石油醚	×	×	×	×
	氯仿	11	20	10	×
	乙酸乙酯	13	21	12	×
	正丁醇	12	13	8	×
	水	8	10	7	×

选取表2中对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径均不小于10 mm且相对较大的萃取物,即枸骨叶氯仿萃取物和枸骨叶乙酸乙酯萃取物,用倍比稀释法测量其对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),结果见表3。

2.3 抗氧化试验^[10]

2.3.1 碘标准曲线的绘制 称取2.798 g碘与7.608 g碘化钾,溶于少量水中,转移入100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。准确量取20 ml碘液,用0.109 2 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定近终点时,加3 ml 0.5%淀粉作为指示剂,继续滴定直到溶液

表3 枸骨叶氯仿和乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的MIC和MBC(mg/ml)

Tab 3 MIC and MBC of chloroform and ethyl acetate extracts from the leaves of *I. cornuta* against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* (mg/ml)

萃取物	金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		大肠埃希菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
枸骨叶氯仿萃取物	0.125	0.25	0.5	1.0	0.5	0.5
枸骨叶乙酸乙酯萃取物	0.062 5	0.062 5	0.25	0.5	0.25	0.5

的蓝色消失作为滴定终点,标定得碘液浓度为0.098 8 mol/L^[10]。取9支25 ml比色管,编号1~9,分别称取0.1 g猪油,分别加入3 ml三氯甲烷-冰乙酸溶液,在1~9号管依次加入0、1.0、2.0、3.0、5.0、8.0、10.0、12.0、14.0 ml碘液,各加入1 ml淀粉溶液,摇匀,加水稀释至刻度,以第1份为空白对照,在549 nm波长处测定吸光度(A)。以A为纵坐标、碘浓度(c)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $A=0.100 2c+0.004 0$ ($r=0.999 3$)^[10]。

2.3.2 枸骨不同部位不同溶剂萃取物过氧化值(POV)的测定

精密称定枸骨不同部位不同溶剂萃取物0.01 g,分别加入到50 g新鲜熬制的猪油中,搅拌均匀;同时设立空白对照,空白对照只加50 g猪油。将16个油样放入60 °C烘箱中,加样1、2、4、7、9、11、14、16 d后,精密称取油样0.1 g于干燥的25 ml量瓶中,加入3 ml氯仿-冰乙酸溶液(40:60)溶解,加入3 ml饱和碘化钾溶液混匀,暗处放置10 min后,取出加水稀释,加入新鲜制备的5%淀粉溶液1 ml,加水至刻度,轻轻摇匀,静置。取上清液在549 nm波长处测定吸光度,计算 $\text{POV}=[\text{样品中含碘量}(\text{mg})\times 100]/[\text{样品量}(\text{g})\times 1 000]\times 100\%$ 。枸骨不同部位萃取物的POV曲线见图1。

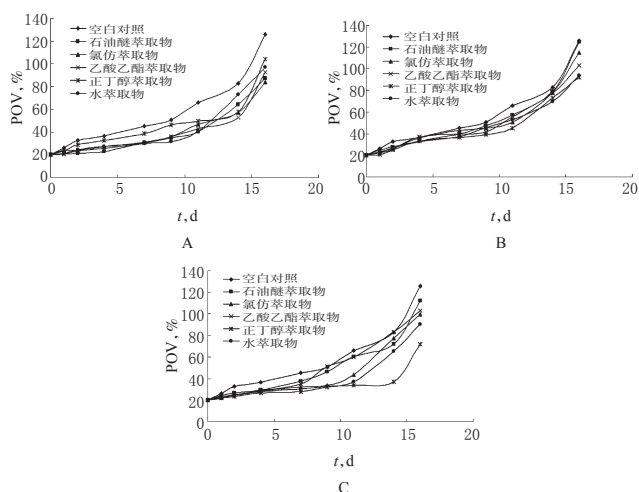


图1 枸骨不同部位不同溶剂萃取物的POV曲线
A.叶;B.茎枝;C.果实

Fig 3 POV curves of all extracts from different parts of *I. cornuta* by different solvents

A.leaves;B.stems and branches;C.fruits

3 讨论

抗菌试验结果显示,枸骨叶、茎枝、果实除石油醚萃取物没有抗菌活性外,其他溶剂萃取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌均有不同程度的抗菌活性。总体来看,枸

骨叶抗菌活性最强,其次为茎枝、果实。枸骨不同部位萃取物的抗菌活性研究表明,不同溶剂萃取物对金黄色葡萄球菌抗菌活性大小依次为乙酸乙酯>氯仿>正丁醇>水;不同溶剂萃取物对大肠埃希菌抗菌活性大小依次为乙酸乙酯>正丁醇>氯仿>水。枸骨叶和果实不同溶剂萃取物对枯草芽孢杆菌抗菌活性大小依次为乙酸乙酯>氯仿>正丁醇>水;枸骨茎枝不同溶剂萃取物对枯草芽孢杆菌抗菌活性大小依次为乙酸乙酯>正丁醇>氯仿>水。试验结果显示,枸骨叶、茎枝、果实的乙酸乙酯萃取物抗菌活性最强。枸骨叶氯仿萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的MIC和MBC分别为0.125、0.5、0.5 mg/ml和0.25、1.0、0.5 mg/ml,枸骨叶乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的MIC和MBC分别为0.062 5、0.062 5、0.25 mg/ml和0.5、0.25、0.5 mg/ml。总体而言,枸骨不同部位不同溶剂萃取物对金黄色葡萄球菌抗菌活性最强。

抗氧化结果显示,枸骨不同部位萃取物的POV曲线均在空白对照曲线的下方,说明不同溶剂萃取物均有一定的抗氧化能力。总体来看,枸骨叶的抗氧化能力较强,随着时间的延长,POV增大。由图1可以看出,前5 d,枸骨叶、茎枝、果实均有较强的抗氧化能力,枸骨叶不同溶剂萃取物的抗氧化能力大小为石油醚>乙酸乙酯>氯仿>水>正丁醇;枸骨茎枝和果实的POV有交叉,抗氧化能力大小由曲线判断比较难。5~10 d,枸骨不同溶剂萃取物POV变化较平缓,但存在交叉,从曲线很难比较其抗氧化能力大小。10 d以后,POV增长较快,说明不同溶剂萃取物的抗氧化能力降低。

本研究的抗菌、抗氧化试验均是考察粗提物的活性,今后有必要在此基础上对活性强的乙酸乙酯部位进行化合物分

离,并进行相关活性测试,以寻求枸骨抗菌及抗氧化的有效成分,为枸骨抗菌及抗氧化药效物质基础的确定及天然防腐剂的开发提供依据。

参考文献

- [1] 周曦曦,许琼明,周英,等.枸骨根的化学成分研究[J].中药材,2013,36(2):233.
- [2] 洪艳平,上官新晨,刘楠,等.枸骨叶总黄酮提取与测定[J].江西农业大学学报,2008,30(3):529.
- [3] 左文健,梅文莉,曾艳波,等.枸骨的化学成分和药理活性研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(27):16 560.
- [4] 田建平,李娟玲,胡远艳,等.冬青属苦丁茶叶总黄酮含量测定与资源评价[J].食品科技,2014,39(1):278.
- [5] 何翔,黄荣增,范彦博,等.苦丁茶总黄酮不同提取方法的比较[J].湖北中医杂志,2010,32(4):74.
- [6] 章剑扬,曾荣今.枸骨中活性化学成分及其提取工艺[J].湘潭师范学院学报:自然科学版,2008,30(2):36.
- [7] 左国营,韩峻,余巍,等.47种中草药提取物的体外抗菌活性筛选研究[J].中国药房,2005,16(10):798.
- [8] 尹璐,胡仁火,丘日光,等.7种中草药醇提取物抑菌杀菌作用的研究[J].安徽农业科学,2014,42(28):9 722.
- [9] 张均田.现代药理实验方法:下册[M].北京:北京医科大学和中国协和医科大学出版社,1998:1 413.
- [10] 李遂勤.可见分光光度法与碘量法测定食用植物油过氧化值的比较[J].河南预防医学杂志,2001,12(3):147.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2014-12-27)

(编辑:邹丽娟)

2015年全国卫生计生科教工作会议在北京召开

本刊讯 2015年4月1日,2015年全国卫生计生科教工作会议在京召开。国家卫生计生委副主任刘谦同志出席会议并讲话。

刘谦指出,卫生计生科教工作涉及科技、民生、产业三大领域,处在医改、科改和教改的交汇点,是全面落实创新驱动发展战略,凸显健康中国的重要支撑。过去一年,卫生计生科教工作按照深化医改的总体布局,紧密围绕卫生计生事业发展大局,以提高支撑保障能力为目标,加强机制创新和制度建设,各项工作取得显著进展。初步建立了适应行业特点的临床医师培养制度,住院医师规范化培训制度建设取得了重要进展,以全科医师为重点的基层及紧缺人才培养力度进一步加大。科技工作注重需求导向,国家科技重大专项产出了一批重点药物,突破了一批传染病防治关键技术,建立了一批重要科研基地,为重大疾病防治和新发突发传染病应对提供了有力保障。

刘谦强调,2015年卫生计生科教工作要以创新驱动和深化改革为主题,紧密围绕国家战略目标和重大需求,完善适应行业特点的人才培养制度,落实科技体制改革任务,加快创新突破、提升服务大局、驱动发展的能力,确保完成“十二五”规划任务,为实现“健康中国”提供有力的科技和人才支撑。

刘谦指出,要重点做好以下三方面工作:一是紧扣需求,服务医改,加快完善适应行业特点的人才培养制度。大力推进全科医师培养工作,启动“3+2”助理全科医师培训,继续实施全科医师转岗培训和农村订单定向医学生免费培养。全面落实住院医师规范化培训制度建设。加大儿科、精神科等急需紧缺专业的招收培养力度。启动专科医师规范化培训试点。二要实施健康科技惠及民生行动,提升创新驱动发展能力。积极推进卫生计生科技体制改革,构建适应行业特点的新型创新体系,加快科技重大专项创新突破,产出一批重大产品,集成一批重要技术,转化应用一批实用成果。编制“十三五”行业科技发展规划,组织实施国家重点研发计划项目。加强适宜技术推广政策,提升卫生计生服务水平。三是完善实验室生物安全监管体系,提升安全保障能力,落实干细胞临床研究管理办法,探索新兴卫生技术研发监管新模式。

刘谦要求,要坚决按照党中央国务院的战略部署,站在全局战略高度谋划科教工作。进一步解放思想,变“谋小局”为“谋大局”;要主动转变职能,变“抓项目”为“抓制度”;要创新工作机制,变“出成果”为“出成效”。同时要要加强队伍建设,提升宏观研判和落实执行能力,建设一支政治坚定、业务精湛、风清气正、勤政廉洁、充满正能量的干部队伍。