

合欢荚果提取物的抑菌作用研究

陈长毅

(淮安市产品质量监督检验所, 江苏淮安 223301)

摘要: 用石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇等不同有机溶剂分别对经酒精浸泡处理后的合欢荚果浸膏进行萃取。采用滤纸片法对各种萃取物进行6种细菌的抑菌试验。结果表明, 各萃取物对试验菌具有选择性的抑制作用。不同溶剂萃取物的抑菌能力不同, 其中乙醚萃取物的抑菌能力最强, 对金色葡萄球菌的抑菌圈直径达20.3 mm, 大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑菌圈直径达14.3 mm和14.0 mm。经逐级萃取后留在水相中的提取物无抑菌能力。

关键词: 合欢荚果; 提取物; 抑菌作用

文章编号: 1673-9078(2013)2-274-276

Study on the Bacteriostasis of the Extracts from Legume of *Albizia julibrissn Durazz*

CHEN chang-yi

(Huaian Institute of Supervision & Inspection on Product Quality, Huaian 223001, China)

Abstract: The ethanol extracts from legume of *Albizia julibrissn Durazz* were further exacted with different solvents, including petroleum ether, ethyl ether, ethyl acetate and n-butanol. The crude extracts were tested for activities against six species of bacteria of pathogenic bacteria by means of disk agar diffusion method. The results showed that different extracts have selectivity effects on testing microbial. The different solvent extracts of *Albizia julibrissn Durazz* have different effects. The activity of ethyl ether extract was the strongest, and (*S. aureus*, $d=20.3\text{mm}$. *E. coli*, $d=14.3\text{mm}$. *S. typhi*, $d=14.0\text{mm}$) water extract was the weakest.

Key words: legume of *Albizia julibrissn durazz*; extracts; antimicrobial activities

合欢(*Albizia julibrissn Durazz*), 又名绒花树、马缨花等, 属豆科含羞草亚科植物, 《神农本草经中药彩色图谱》记载: 它的树皮、花枝均可入药, 但以皮为主^[1]。据《中华人民共和国药典2005年版》记载合欢花和皮可解郁安神, 用于心神不安, 忧郁失眠等症; 合欢皮有抗生育、抗过敏和抗肿瘤作用^[2]。现代科学研究表明, 合欢皮还有活血消肿之功效, 用于肺痈疮肿, 跌扑伤痛^[3]。合欢种子含油10%, 树皮及叶含单宁, 树皮及花可用做安神、活血、止痛药; 合欢花具有治神经衰弱、失眠健忘、郁结胸闷, 合欢叶具有治创伤、治痛肿作用。吕金顺^[4]等在合欢荚果中共鉴定出68种化合物, 其主要成分的功用与已知的合欢花和皮的功用相近。其中在合欢荚果的挥发油中占0.5%的水杨酸甲酯是止痛的主要成分, 占3.74%的乙醇、2.55%的苯甲醇是消肿、消炎与局部止痛的主要化学成分, 丁香酚(0.12%)除具有抗菌、麻醉作用外, 还和氢化苯并呋喃酮(0.2%)一样, 具有抗惊厥等治疗精神

收稿日期: 2012-09-17

作者简介: 陈长毅(1964-), 男, 高级工程师, 从事食品检测和生物技术研究

病方面的作用^[5-6]及抗癌作用^[3], 吡嗪类(1.67%)具有治疗肺结核的功能^[5-7]。伍颜贞等^[8]用水为溶剂, 从银合欢种子中提取获得大量的纯度达95%的含羞草素。已有实验证实, 合欢皮乙醇提取物三萜皂甙(J4、J5、J6)对HCT、KB和Bel等癌细胞具有显著的体外细胞毒活性^[3]。田维毅^[9]等对合欢皮乙醇提取物体内抗肿瘤实验证实, 其对C₅₇BL/6小鼠T细胞增殖能力和吞噬细胞吞噬作用具有明显增强效应, 说明该药体内抗癌作用与其免疫增强效应有关。金玉兰^[10]等研究发现, 在供试浓度为5.0 mg/mL时, 合欢叶乙醇提取物对苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)和辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)的抑菌活性较高, Villasenor Irene M等研究了白头银合欢(*Leucaena leucocephala*)种子中生物碱的氯仿可溶性生物碱提取物(CS)和乙酸乙酯可溶性生物碱提取物(ES)的生物活性, 具有镇痛和抗虫作用^[11]。本文对合欢种子的不同浸提条件下的提取物的抑菌效果进行了比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料

合欢荚果。2007年10月于甘肃天水,采集完整、无病虫害的合欢荚果,洗净,沥干水分,置阴凉通风处自然风干后备用。

1.2 药品与仪器

石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、氯仿等均为市售分析纯。

RE-52A 旋转蒸发器(上海亚华生化仪器厂),真空抽虑装置,T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析),LGJ-10D 普通型冷冻干燥机(北京四环科学仪器有限公司),灭菌锅。

1.3 供试菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),沙门氏菌(*Salmonella sp.*),巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),短杆菌(*Bacillus brevis*),铜绿假单胞菌(*Salmonella typhi*),以上菌种均由淮安市药品检验所提供。

1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基。

1.5 合欢荚果抑菌物质制备

将4.7 kg干燥合欢荚果粉碎,过20目筛,用95%工业酒精浸泡72 h,分离过滤得滤液。滤渣继续浸泡72 h,合并滤液,减压回收溶剂,得浸膏600 g。将浸膏用4%热盐水分散后,依次用石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取三次,残液为水溶性部分。分别减压回收溶剂,浸膏冷冻干燥,得到石油醚萃取物(PE)、乙醚萃取物(ETE)、乙酸乙酯萃取物(ETA)、正丁醇萃取物(BU)。分别定容,制成生药浓度为100 mg/mL的提取液备用。

1.6 抑菌实验方法

1.6.1 供试菌液的制备

供试菌种经牛肉膏蛋白胨斜面培养基接种、培养后,采用比浊法和血球计数板法制得浓度为 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL的菌悬液。

1.6.2 抑菌实验过程

采用滤纸片法测定抑菌效果,将已灭菌的直径6 mm的滤纸片,分别浸入上述制备的提取液中,使其充分吸收。从稀释好的各供试菌液中分别取出100 μ L的菌悬液,均匀涂布在牛肉膏蛋白胨平板培养基表面,制成含菌平板。每皿均匀分贴同种滤纸片3片,相应溶剂空白对照滤纸片3片,重复5组。然后将平板置37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养16 h~18 h,取出观察并记录抑菌圈大小,取其平均值。以抑菌圈直径 >15 mm为高度敏感、10~15 mm为中度敏感,7~9 mm为低度敏感,低于7 mm视为没有抑菌效果^[12~13]。

1.7 最低抑菌浓度(MIC)的测定

采用改进的液体稀释管法^[14]。将各提取液稀释成原提取液浓度的1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32各种浓度,在各培养皿内分别加入1 mL不同浓度的合欢荚果各提取液的稀释液,然后每个培养皿中倒入15 mL已溶化的固体培养基,充分混匀,待冷却凝固后,每个培养皿加入100 μ L菌悬液涂匀,于37 $^{\circ}$ C恒温箱中培养16~18 h,观察结果。不长菌的合欢荚果提取液稀释液最低浓度即为合欢荚果提取物最小抑菌浓度(MIC)^[15]。

1.8 合欢荚果不同溶剂提取物主要成分定性检测方法^[16]

1.8.1 蒽醌及甙类定性检测

向提取物中加10% NaOH若有红色现象,加入30% H₂O₂,加热后红色褪去显淡黄色,加酸无反应。判断可能含有此类物。

1.8.2 黄酮类化合物定性检测

采用盐酸-镁粉法。在样品溶液中加入少许镁粉振荡,再滴加几滴浓盐酸,1 min~2 min(必要时水浴上加热)显色者可能含有黄酮类化合物。

1.8.3 鞣质和酚性成份检测

采用FeCl₃试剂法。向提取物中加FeCl₃试液时,有紫色现象产生,说明有鞣质和酚性成份。

1.8.4 生物碱类定性检测

采用Meyer实验。若产生淡黄色沉淀。说明提取物可能有生物碱存在。

2 结果

2.1 合欢荚果不同提取物的抑菌结果

表1结果显示,合欢荚果的正丁醇、乙酸乙酯、乙醚和石油醚提取物对试验用菌均有一定的抑菌效果。其中乙醚提取物对全部试验用菌的作用都十分显著,尤其对金色葡萄球菌的抑菌圈达20.3 mm左右,效果为极显著。合欢荚果的正丁醇、乙酸乙酯和石油醚提取物对试验用菌大都有抑菌效果,其中正丁醇和乙酸乙酯的提取物对短杆菌的抑菌效果较明显,而合欢荚果经上述各溶剂萃取后水相中的提取物对试验用菌都无抑菌效果。

2.2 合欢荚果提取物的最低抑菌浓度

由表2可得出结论,即合欢荚果的乙醚提抽液对全部试验用菌的最低抑菌浓度都为3.13 mg/mL;正丁醇提取液对大肠杆菌和巨大芽孢杆菌的最低抑菌浓度为25 mg/mL左右,对短杆菌和铜绿假单胞菌最低抑菌浓度为6.25 mg/mL左右;乙酸乙酯的提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球和短杆菌的最低抑菌浓度为25

mg/mL 左右,对铜绿假单孢菌的最低抑菌浓度为 50 mg/mL 左右;石油醚对沙门氏菌和铜绿假单孢菌的最低抑菌浓度为 50 mg/mL 左右,对金黄色葡萄球菌、

巨大芽孢杆菌和短杆菌的最低抑菌浓度为 50 mg/mL 左右。

表 1 合欢荚果提取物的抑菌结果

Table 1 Bacteriostatic activity of the *Albizzia julibrissn* Durazz primary extracts

萃取物 种类	抑菌圈直径/mm					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. brevis</i>	<i>S. typhi</i>
BU	8.0±0.1	7.0±0.03	-	8.0±0.08	8.5±0.09	7.0±0.03
ETA	7.7±0.03	6.8±0.03	-	-	9.7±0.1	0.72±0.03
ETE	14.3±0.06	20.3±0.23	11.3±0.06	12.7±0.06	10.7±0.06	14.0±0.1
PE	-	7.0±0.05	7.7±0.06	7.3±0.06	7.0±0.05	7.0±0.03
Water	-	-	-	-	-	-

注:表中“-”表示无抑菌现象;*Escherichia.coli*-大肠杆菌;*Staphylococcus .aureus*-金黄色葡萄球菌;*Salmonella. sp*-沙门氏菌;*Bacillus. megaterium*-巨大芽孢杆菌, *Bacillus. brevis*-短杆菌, *Salmonella. typhi*-铜绿假单孢菌

表 2 合欢荚果提取物的最低抑菌浓度 (MIC)

Table 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) of the *Albizzia julibrissn* Durazz primary extracts

萃取物 种类	最低抑菌浓度(MIC)/(mg/mL)					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp.</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. brevis</i>	<i>S. typhi</i>
BU	25.00	12.50	-	25.00	6.25	6.25
ETA	25.00	25.00	-	-	25.00	50.00
ETE	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
PE	-	12.50	50	12.50	12.50	50.00

注:表中“-”表示无抑菌现象;*Escherichia.coli*-大肠杆菌;*Staphylococcus .aureus*-金黄色葡萄球菌;*Salmonella. Sp*-沙门氏菌;*Bacillus. megaterium*-巨大芽孢杆菌; *Bacillus. brevis*-短杆菌; *Salmonella. typhi*-铜绿假单孢菌。

2.3 合欢荚果不同溶剂提取物的抑菌谱比较

从表 2 看出,合欢荚果乙醚提取物的抑菌谱最广,对试验用菌都有显著的抑菌效果;其次为正丁醇和石油醚提取物,正丁醇提取物对沙门氏菌无抑菌现象,石油醚提取物对大肠杆菌无抑菌现象;在提液稀释到浓度为 3.13 mg/mL 时对所有供试菌种还均有抑制作用;乙酸乙脂提取物对沙门氏菌和巨大芽孢杆菌无抑菌效果,合欢荚果水提液对试验用菌全无抑菌现象。

2.4 不同溶剂提取物的几种主要成分定性检测

表 3 合欢荚果提取物的主要成分

Table 3 Chemical compositions of the *Albizzia julibrissn* Durazz primary extracts

萃取物 种类	蒽醌及甙类	黄酮类	鞣质及酚类	生物碱类
BU	+	+	-	+
ETA	+	-	+	+
ETE	+	-	+	+
PE	-	-	-	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

由表 3 可知,合欢荚果正丁醇提取物中含有鞣质及酚类和生物碱类物质;乙酸乙脂提取物中含有蒽醌

及甙类、鞣质及酚类和生物碱类物质;乙醚提取物中含有蒽醌及甙类、鞣质及酚类和生物碱类物质;石油醚提取物中含有生物碱类物质。

3 结论

3.1 合欢荚果有机溶剂提取物的中具有天然抑菌成分存在。其中合欢荚果乙醚提取物中含有的抑菌成分表现出极强的抑菌效果,其中既有革兰氏阴性菌,也有革兰氏阳性菌,既有球菌,也有杆菌,既有芽孢细菌也有无芽孢细菌,说明该提取液对细菌有广泛的抑制作用。

3.2 化学成分系统预试结果表明,合欢荚果有机溶剂提取物中含有黄酮及其苷类物质、生物碱、酚类成分、鞣质等多种成分,但其中究竟哪种物质抑菌活性最强目前尚不明确。合欢荚果不同提取液的抑制效果有差别,可能与提取液中化合物种类、含量以及结构上的差异有关,化学成分的定性分析结果的部分相似性是因为,萃取物中的化合物有交叉缘故。本试验仅限于对合欢荚果有机溶剂粗提物抑菌活性的研究,因此对合欢荚果提取物中抑菌活性成分的进一步分离纯化及其抑菌机理尚需进一步研究和探讨。

3.3 本实验是以食品中常见的多种污染微生物为供试菌,首次从食品安全保藏学的角度,对合欢荚果中的抑菌活性进行了较为系统的研究,这为合欢荚果在食品安全保藏方面的应用提供了理论参考。

参考文献

- [1] 沈连生.1996.神农经本草中药彩色图谱[M].北京:中国中医药出版社:388-390
- [2] 国家药典委员会.2005.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社:4.319-4.323
- [3] 邹坤,陈四平,赵玉英,等.合欢属植物茎皮的化学成分与药理活性[J].国外医药(植物药分册),1997,12(5):200-206
- [4] 吕金顺,朱巧军,王亚平,等.合欢荚果挥发油的化学成分研究[J].兰州大学学报(自然科学版),2003,Vol.39(1):59-62
- [5] 马养民,毛远,傅建熙.鸡屎藤挥发油化学成分的研究[J].西北植物学报,2000,20(1):145-148
- [6] 胡高云,向阳.异苯并呋喃酮-3-乙酰胺类化合物的合成及其抗惊活性构效关系的初步探讨[J].中国药物化学杂志,1998,8(3):169-173
- [7] 何国钧.抗结核药物的研究进展[J].临床肺科杂志,2000,5(3):157-160
- [8] 伍颜贞,黎仕钊.从银合欢种子提取高纯度含羞草素的研究[J].热带农业科学,1995,16(2):51-56
- [9] 田维毅,尚丽江,白惠卿,等.合欢皮乙醇提取物对荷瘤小鼠 IL-2 生物活性的影响[J].贵州医药,2002,26(5):392-393
- [10] 金玉兰,曲田丽,肖琳.合欢叶乙醇提取物对植物病原真菌的抑菌活性测定[J].中国农学通报.2009,25(03):202-205
- [11] 刘国生.白头银合欢种子生物碱提取物的生物活性研究[J].国外医学中医中药分册,1998,20(5):43-44
- [12] 肖新生,林倩英.枇杷叶提取物抑菌作用研究[J].现代食品科技,2010,26(1):59-62
- [13] 王储炎,艾启俊,范涛,等.鹿蹄草提取物抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2011,27(1):26-28
- [14] 张育正.微生物学(供中药专业用)[M].上海,上海科学技术出版社,2000
- [15] 吕翠玲,巫中德,戴欣,等.常用食品防腐剂抗菌作用研究[J].微生物学通报,1995,(1):36-41
- [16] 张贵君.中药鉴定学实验[M].北京,科学出版社,2005