

构树叶提取物抑菌活性的初步观察

刘晓军¹, 刘铀², 陈绍红², 刘艳芬^{1*}

(1. 广东海洋大学农学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学生化中心, 广东 湛江 524088)

[摘要] **目的:**研究构树叶提取物的抑菌活性。**方法:**采用有机溶剂萃取、硅胶柱层析等方法从构树叶提取活性成分, 观察其对金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏埃希菌、大肠杆菌、沙门氏菌和鸭疫里默氏杆菌等病原菌的抑制作用、最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)。**结果:**水、70% 乙醇和 50% 丙酮提取物对鸭疫里默氏杆菌外的病原菌均有较好的抑菌活性, 水提取物对其他几种菌的 MIC 分别为 6.75, 25, 6.75, 12.5 g·L⁻¹, 有机溶剂分步萃取构树叶水提取物, 抑菌成分主要存在于乙酸乙酯和正丁醇萃取物中; 用硅胶柱层析从乙酸乙酯和正丁醇萃取物中均分离到 3 个具有抑菌活性的组分。**结论:**构树叶中含有多种抑菌成分, 其理化性质、抑菌活性和抑菌机制各不相同; 进一步分离、鉴定上述抑菌成分并测定其化学结构可望为开发新型抗菌药物提供依据。

[关键词] 构树叶; 提取; 抑菌活性; 最小抑菌浓度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0283-04

[doi] 10.11653/syjf2013190283

Preliminary Observation of Antibacterial Activity of *Broussonetia papyrifera* Leaf Extracts

LIU Xiao-jun¹, LIU You², CHEN Shao-hong², LIU Yan-fen^{1*}

(1. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Biochemistry Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

[Abstract] **Objective:** In order to study the antibacterial activity of the *Broussonetia papyrifera* leaf extracts. **Method:** The active components of *B. papyrifera* leaf were extracted by organic solvent, and silica gel column chromatography. The antibacterial effect *in vitro* of the extracts above on several pathogenic bacteria stains such as *Staphylococcus aureus*, *Pasteurellamultocida*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* and *Riemerella anatipestifer* were observed, and the minimum inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) were also determined. **Result:** The result indicated that water, 70% ethanol and 50% acetone extracts of *B. papyrifera* leaf extracts showed better antibacterial activity, and the MIC of the water extract against *S. aureus*, *Pasteurellamultocida*, *E. coli* and *Salmonella sp* were 6.75, 25, 6.75, 12.5 g·L⁻¹ respectively. The bacteriostatic constituents mainly exist in ethyl acetate and n-butanol extract as the *B. papyrifera* leaf water extract were extracted by organic solvent step by step. Moreover, 3 components had antibacterial activity against the pathogenic bacteria were isolated from ethyl acetate and n-butanol extract respectively. **Conclusion:** *B. papyrifera* leaf contains a variety of antibacterial ingredients, which vary in physicochemical properties, antibacterial activity and mechanism; further study on separation, identification and chemical structure determination of the compounds is expected to provide the basis for development of new antimicrobial drugs.

[Key words] *Broussonetia papyrifera* leaf; extract; antibacteria activity; MIC

[收稿日期] 20121211(008)

[基金项目] 广东省农业厅科技项目(0809035)

[第一作者] 刘晓军, 在读硕士, 从事动物营养与免疫方面研究, Tel:13058368261, E-mail:logicboy2010@163.com

[通讯作者] * 刘艳芬, 硕士, 教授, 从事动物营养与免疫方面研究, Tel:13828289890, E-mail:lyf9314@163.com

构树是 1 种传统中草药,含有丰富的黄酮类化合物(以游离态或与糖结合成苷形式存在^[1])具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降血糖、降血压、增强免疫力、延缓衰老等药理活性^[2]。在民间广泛用于治疗多种疾病,具有较好的疗效,且在我国分布较广,有较大的开发价值^[3]。目前的研究集中于构树的根皮部位^[4],从构树叶里提取其辅酶 Q₁₀具有较好的抑制表面真菌及抗腐败的效果^[5],以及构树叶乙醇粗提物具有良好的抑菌活性^[6],但对于果实和树叶的化学成分、生物活性、抑菌作用、抑菌活性成分以及抑菌机制缺乏系统和深入的研究,且提取制备工艺较为繁琐,昂贵。

为了开发新型植物源杀菌剂和充分利用构树资源,寻找廉价简易提取工艺,本研究探讨了构树叶 3 种粗提物对细菌的体外抑菌活性,在此基础上,采取生物活性追踪法对构树叶水提取物进行了活性部位的筛选和活性成分的分离纯化研究。为阐明构树叶药理作用和为今后新型药物开发提供依据。

1 药物及试剂

1.1 材料 新鲜构树叶,经广东海洋大学现代生物化学实验中心刘海博士鉴定为桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent 的叶,洗净阴干,备用;丙酮(批号 20120212)、乙醚(AR,批号 20120215),衡阳市凯信化工试剂有限公司,乙醇(AR,广东兴华化学厂有限公司,批号 20110125),乙酸乙酯(AR,广州化学试剂厂,批号 20071001-2)、正丁醇(AR,批号 T20110725)、柱层析用硅胶(100-200 目,批号 20120208),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC25922)、鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, ZJ2007)、沙门氏菌 (*Salmonolla sp*, 50041)、多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurellamultocida*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, ATCC35218),广东海洋大学微生物实验室保存。

2 方法

2.1 构树叶提取物的制备和分离纯化 构树叶含有丰富的黄酮类化合物,参照文献[9]方法进行提取。
①构树叶水提取物:称取构树叶粉,沸水煮 2 h,过滤,滤液于 55 °C 减压蒸馏,冷冻干燥,用双蒸水配成 100 g·L⁻¹ 溶液,备用。
②75% 乙醇提取物:称取构树叶粉,75% 乙醇浸泡 3 h,过滤,滤液于 55 °C 减压蒸馏,55 °C 真空干燥,用双蒸水配成 100 g·L⁻¹ 溶液,备用。
③50% 丙酮提取物:称取构树叶粉,

50% 丙酮浸泡 3 h,过滤,滤液于 55 °C 减压蒸馏,55 °C 真空干燥,用双蒸水配成 100 g·L⁻¹ 溶液,备用。提取流程见图 1。将每种溶剂 3 次所得的药液真空减压浓缩得各提取物,称重,计算粗提物得率。

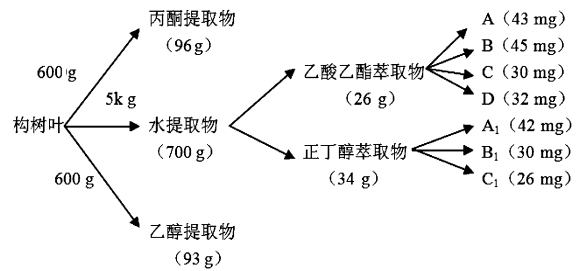


图 1 构树叶提取流程

$$\text{粗提率} = \frac{\text{粗提物浸膏质量}}{\text{构树叶干燥粉末质量}} \times 100\%$$

2.2 构树叶水提取物中抑菌成分的分离 ①有机溶剂萃取:称取水提取物 700 g,经水溶解后定容至 10 mL,依次经乙醚,乙酸乙酯,正丁醇(1:1)萃取,所得各组分于 55 °C 减压蒸馏,55 °C 真空干燥,用双蒸水配成 100 g·L⁻¹ 溶液,4 °C 保存,备用。②硅胶柱层析分离抑菌成分:参照文献[9]方法,将由水提取物经乙醚,乙酸乙酯,正丁醇萃取获得的乙酸乙酯和正丁醇萃取部位^[9],分别进行硅胶柱层析,乙酸乙酯部分别用 40:1,30:1,20:1 和 15:1 氯仿/甲醇洗脱,得 A, B, C, D 4 个组分,正丁醇部分别用 20%, 30% 和 40% 甲醇洗脱得 A₁, B₁, C₁ 3 个组分^[7]。各组分用三蒸水溶解,调整质量浓度为 100 g·L⁻¹, 4 °C 保存,备用。

2.3 菌悬液的制备 将各供试菌菌种接种于营养琼脂斜面培养基上进行活化,置 37 °C 恒温箱中培养 18 ~ 24 h,然后分别挑取单个菌落分别接种于新鲜营养肉汤培养基中,37 °C 培养 18 ~ 24 h,采用平板菌落计数法,用肉汤稀释菌悬液至含菌体约 1 × 10⁵ ~ 10⁶ CFU·mL⁻¹,备用。

2.4 提取物体外抑菌活性测定^[7]

2.4.1 抑菌实验(牛津杯法) 取生长对数期菌液,用肉汤培养基调整至含菌体约 1 × 10⁵ ~ 10⁶ CFU·mL⁻¹,备用。取 100 μL 菌液涂于琼脂肉汤培养基上,37 °C 培养 15 min 至菌液被吸收,牛津杯中分别添加 50 μL 100 g·L⁻¹ 的构树叶提物液,37 °C 培养 16 ~ 18 h,测定抑菌圈直径,重复 3 组,取平均值。

2.4.2 最小抑菌浓度(MIC,试管法) 以 2 倍稀释法测定 MIC,各管浓度依次为 100, 50, 25, 12.5, 6.25 g·L⁻¹,向上述各管中分别加入 50 μL 菌液,设添加

无菌水为对照组,置 37 ℃ 培养箱中培养 16 ~ 18 h,肉眼观察试管内液体澄清为 MIC。

2.4.3 最小杀菌浓度(MBC) 在 MIC 的基础上,分别将上述无细菌生长试管中的肉汤划线接种于琼脂肉汤平板,37 ℃ 恒温箱中培养 18 ~ 24 h 后取出,以平板上无菌落生长的最低药物浓度为其 MBC。

2.5 统计与分析 采用 EXCEL2003 软件进行数据统计,用 SPSS 19.0 进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 构树叶粗提物的提取率 5 kg 构树叶经水提取得 700 g 稠膏,提取率 14%;600 g 构树叶经 75% 乙醇提取得 93 g 稠膏,提取率 15.5%;600 g 构树叶经 50% 丙酮提取得 160 g 稠膏,提取率 16%。

3.2 构树叶粗提物的抑菌活性 构树叶的水提取物、75% 乙醇提取物、50% 丙酮提取物对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌以及埃希氏大肠杆菌具有较强的抑菌活性。上述病原菌对构树叶水提取物均达到中度或高度敏感,供试菌中既有革兰阴性菌,也有革兰阳性菌,既有球菌,也有杆菌,提示构

树叶提取物抗菌谱较宽;另外,不同提取方法对构树叶抑菌活性成分的提取效率有较大影响。构树叶提取物对鸭疫里默氏杆菌无明显抑菌活性。MIC 和 MBC 的测定结果表明,构树叶水提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏杆菌的 MIC, MBC 达到 6.75, 12.5 $g \cdot L^{-1}$;75% 乙醇和 50% 丙酮提取物对金黄色葡萄球菌的 MIC, MBC 均为 12.5, 25 $g \cdot L^{-1}$,进一步证实构树叶提取物对鸭疫里默氏杆菌以外的病原菌具有较强的抑菌活性。见表 1。

3.3 抑菌活性组分的筛选 构树叶水提取物经乙醚、乙酸乙酯和正丁醇等不同极性的溶剂萃取,抑菌活性成分主要存在于乙酸乙酯提取部和正丁醇提取部,对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌以及埃希氏大肠杆菌抑菌圈直径达到 16 ~ 24.5 mm,其中正丁醇部表现出更强的抑菌活性,对埃希氏大肠杆菌的抑菌圈直径达到 24.5 mm。正丁醇萃取部具有较强的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌、巴氏杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌的 MIC 分别为 6.75, 12.5, 12.5, 25 $g \cdot L^{-1}$ 。乙酸乙酯萃取部对各病原菌的 MIC 分别为 25, 25, 25 和 50 $g \cdot L^{-1}$ 。见表 2。

表 1 3 种构树叶粗提物对不同病原菌的抑菌活性、MIC 和 MBC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌种	提取物								
	水提取物			75% 乙醇提取物			50% 丙酮提取物		
	抑菌圈 /mm	MIC / $g \cdot L^{-1}$	MBC / $g \cdot L^{-1}$	抑菌圈 /mm	MIC / $g \cdot L^{-1}$	MBC / $g \cdot L^{-1}$	抑菌圈 /mm	MIC / $g \cdot L^{-1}$	MBC / $g \cdot L^{-1}$
金黄色葡萄球菌	17.50 ± 0.5 ^b	6.75	12.5	18.00 ± 0.5 ^b	12.5	25	12.50 ± 0.5 ^b	12.5	25
巴氏杆菌	17.50 ± 0.5 ^b	25	50	17.50 ± 0.5 ^b	25	50	12.50 ± 0.5 ^b	50	100
大肠埃希菌	21.50 ± 0.5 ^a	6.75	12.5	20.50 ± 0.5 ^a	12.5	25	17.50 ± 0.5 ^a	25	50
沙门氏菌	15.50 ± 0.5 ^c	12.5	25	15.00 ± 0.5 ^c	12.5	25	14.00 ± 0.5 ^c	25	50
鸭疫里默氏杆菌	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-

注:同列内肩标不同表示差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 2-4 同)。

表 2 构树叶水提物不同萃取部位的抑菌活性、MIC 和 MBC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌种	提取物						
	乙醚		乙酸乙酯		正丁醇		
	抑菌圈/mm	抑菌圈/mm	MIC/ $g \cdot L^{-1}$	MBC/ $g \cdot L^{-1}$	抑菌圈/mm	MIC/ $g \cdot L^{-1}$	MBC/ $g \cdot L^{-1}$
金黄色葡萄球菌	6.00	18.00 ± 0.5 ^b	25	50	19.00 ± 0.5 ^b	6.75	12.5
巴氏杆菌	6.00	18.00 ± 0.5 ^b	25	50	17.00 ± 0.5 ^c	12.5	25
大肠埃希菌	6.00	22.00 ± 0.5 ^a	25	50	24.50 ± 0.5 ^a	12.5	25
沙门氏菌	6.00	15.00 ± 0.5 ^c	50	100	16.00 ± 0.5 ^c	25	50

3.4 抑菌活性部位有效成分的分离与筛选

3.4.1 乙酸乙酯部抑菌成分的分离与筛选 经乙酸乙酯部进行硅胶柱层析得到的 A, B, C, D 4 个组分抑菌。试验结果表明,组分 A, B, C 均有较强抑菌活性;对金黄色葡萄球菌、巴氏杆菌、大肠埃希菌的 MIC, MBC 基本一致, MIC 为 25 $g \cdot L^{-1}$, MBC 为 50

$g \cdot L^{-1}$;上述组分对沙门氏菌的抑制作用稍弱, MIC 和 MBC 分别为 50, 100 $g \cdot L^{-1}$ 。见表 3。

3.4.2 正丁醇部抑菌成分的分离与筛选 经正丁醇萃取部位硅胶柱层析获得 3 个洗脱组分 A₁, B₁, C₁ 抑菌试验结果表明,上述 3 个组分均对埃希氏大肠埃希菌有较强的抑菌活性,对金黄色葡萄球

菌的抑菌活性次之 ($P < 0.05$), 对多杀性巴士杆菌和鸡白痢沙门氏菌的抑菌活性稍弱 ($P < 0.05$); 组分 A₁, C₁ 对金黄色葡萄球菌 MIC 和

MBC 均为 6.75, 12.5 g·L⁻¹; 3 个组分对大肠埃希菌、巴氏杆菌的 MIC 和 MBC 均为 12.5, 25 g·L⁻¹。见表 4。

表 3 乙酸乙酯部位不同活性成分的抑菌活性, MIC(g·L⁻¹) 和 MBC(g·L⁻¹) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

菌种	构树叶提取物								
	A			B			C		
	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹
金黄色葡萄球菌	14.50 ± 0.5 ^b	25	50	15.50 ± 0.5 ^a	25	50	14.50 ± 0.5 ^b	25	50
巴氏杆菌	14.50 ± 0.5 ^b	25	50	14.50 ± 0.5 ^a	25	50	14.50 ± 0.5 ^b	25	50
大肠埃希菌	17.00 ± 0.5 ^a	25	50	15.50 ± 0.5 ^a	25	50	16.50 ± 0.5 ^a	25	50
沙门氏菌	12.50 ± 0.5 ^c	50	100	13.50 ± 0.5 ^b	50	100	11.50 ± 0.5 ^c	50	100
鸭疫里默氏杆菌	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-

表 4 正丁醇部位不同活性成分的抑菌活性, MIC 和 MBC($\bar{x} \pm s, n=3$)

菌种	构树叶提取物								
	A ₁			B ₁			C ₁		
	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹	抑菌圈 /mm	MIC /g·L ⁻¹	MBC /g·L ⁻¹
金黄色葡萄球菌	15.5 ± 0.5 ^b	6.75	12.5	15.50 ± 0.5 ^b	12.5	25	14.50 ± 0.5 ^b	6.75	12.5
巴氏杆菌	13.50 ± 0.5 ^c	12.5	25	14.50 ± 0.5 ^b	12.5	25	13.50 ± 0.5 ^b	12.5	25
大肠埃希菌	18.00 ± 0.5 ^a	12.5	25	17.50 ± 0.5 ^a	12.5	25	18.50 ± 0.5 ^a	12.5	25
沙门氏菌	12.50 ± 0.5 ^c	25	50	12.00 ± 0.5 ^c	25	50	11.50 ± 0.5 ^c	25	50
鸭疫里默氏杆菌	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-	6.00 ± 0.5	-	-

4 讨论

本试验比较了不同提取方法对构树叶有效成分和抑菌效果的影响。结果表明, 水、75% 乙醇、50% 丙酮提取率分别为 14%, 15.5%, 16%, 但以水提取物抑菌活性最强, 75% 乙醇提取物次之。其中构树叶水提取物对一般致病菌的 MIC 可达到 6.75 g·L⁻¹, MBC 可达到 12.5 g·L⁻¹。构树叶水提取物经乙醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取后, 其抑菌杀菌成分主要存在于乙酸乙酯和正丁醇部位, 其中正丁醇相对于乙酸乙酯表现出较强的抑菌活性。选择不同梯度的洗脱液对具有抑菌活性的乙酸乙酯、正丁醇有机溶剂萃取物进行硅胶柱层析洗脱筛选, 不同组分对于不同病原菌具有一定的抑菌活性, 但抑菌效果不尽相同。参照构树叶化学成分分析抑菌活性成分主要集中在含有生物碱、有机酸和黄酮类化合物的部位^[10], 因此, 不同提取方法、不同溶剂对构树叶抑菌成分的提取效率存在较大差异。由此推测, 构树叶中含有多种具有抑菌活性的化合物, 这些化合物在化学结构、溶解性及抑菌机制并不相同, 未来有必要分离、纯化上述化合物, 测定其化学结构, 为进一步研究、开发新型抗菌药物奠定基础。

[参考文献]

[1] 涂华, 陈碧琼, 张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17

(6): 277.

[2] 朱开梅, 刘建楠, 顾生玖, 等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 198.

[3] 杨小建, 王玉锡, 胡庭兴. 中国构树资源的综合利用[J]. 四川林业科技, 2007, 28(1): 39.

[4] Sohn H Y, Son K H, Kwon C S, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants; *Morus alba* L, *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *sophora flavescens* ait and *echinosophora koreensis* nakai [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11(7/8): 666.

[5] 李万仓. 构树叶活性成分分析及抑菌作用研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.

[6] 黄涛, 王丽, 程林, 等. 构树叶提取物抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18761.

[7] Kuwano K, Tanaka N, Shimizu T, et al. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 26(5): 396.

[8] 徐小花, 钱士辉, 卞美广, 等. 构树叶的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 190.

[9] 殷志琦, 巢剑非, 张雷红, 等. 构树化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(13): 420.

[10] 冯卫生, 李红伟, 郑晓珂. 构树叶的化学成分[J]. 药学学报, 2008, 43(2): 173.

[责任编辑 李玉洁]