

# 细叶桉果实提取物抑菌活性及光谱鉴别的研究

周燕园<sup>1,2\*</sup>, 黄燕<sup>1</sup>, 梁臣艳<sup>1</sup>, 梁子宁<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** **目的:**探讨细叶桉果实的体外抑菌作用及光谱的鉴别方法。**方法:**采用连续稀释法对细叶桉果实不同溶剂提取物进行抑菌实验研究,并进行紫外-可见光谱的测定。**结果:**细叶桉果实的不同溶剂提取物在体外对供试菌(金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌耐药株、大肠杆菌、绿脓杆菌、伤寒杆菌、腐生葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌)均有一定程度的抑制作用。经紫外-可见光谱扫描发现具有明显的特征吸收峰。**结论:**细叶桉果实提取物具有明显的体外抑菌作用;紫外-可见光谱研究为药材鉴别提供了实验依据。

**[关键词]** 细叶桉果实;抑菌;最小抑菌浓度;鉴别

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0059-04

**[收稿日期]** 20110210(013)

**[基金项目]** 广西教育厅科研项目(200911LX243);广西中医学院校级科研课题(P2009057)

**[通讯作者]** \*周燕园,副教授,硕士,研究方向:药物、天然药物、中药及民族药的质量与成分分析,药理活性的研究, Tel:0773-5891880, E-mail:zhou-yanyuan@163.com

本品中用量较大且含相关药效成分较多的药味是柴胡、茵陈、板蓝根和五味子,而根据已有的研究表明,柴胡中的柴胡皂苷、五味子中的木脂素类和板蓝根中的抗病毒成分表告依春等<sup>[2]</sup>均在修复肝组织损伤、降低转氨酶、抑制肝细胞纤维化及抗肝炎病毒方面有确切疗效。因此在建立指纹图谱时,首先对上述 3 类有效成分群的共有吸收波长进行选择。由于柴胡皂苷 a, c, d 不稳定,在药液煎煮过程中易转化为在 250 nm 吸收较好的柴胡皂苷 b<sub>2</sub><sup>[3]</sup>,结合 3D 全波长 HPLC 图谱,最终确定 3 类成分均有较强吸收的 250 nm 作为检测波长。

由于柴胡皂苷及茵陈、板蓝根中的主要成分极性较大而五味子中木脂素类极性却较小,因此最终选择甲醇作为提取溶剂,以较简便易行的超声提取法提取。

在建立指纹图谱方法时发现,15~23 min 的峰是由柴胡、茵陈、板蓝根 3 味药的许多极微量成分堆积而成,峰面积均极小且峰形不好。因此,若将其视为一组峰或几个峰进行匹配,则误差很大,匹配也不准确,易造成最终相似度判断的错误。因此本实验对 15~23 min 的峰去除积分且使用相似度评价软件中的剪切功能,对前 6 min 来自各味药的大极性成分的堆积峰作剪切处理,以保证相似度计算前匹配的准确性。但须指出的是,15~23 min 的峰仍然

属于此张特征指纹图谱中的特征之一,因其体现了柴胡、茵陈、板蓝根中微量成分群的特征,不可忽略。而对其去除积分仅因其在相似度计算时无法准确匹配的缘故。

本实验对 14 个厂家产品指纹图谱的相似度分析表明整体相似性较高,但也不难发现来源于柴胡、板蓝根的 1~3 号共有峰及五味子醇甲等个别标志性成分的含量差异显著。对五味子中有效成分的含量测定也证实了这一点。因此,有必要将指纹图谱的相似度计算与含量测定方法相结合,以求既全面又细致地评价产品的内在质量<sup>[4]</sup>。此外,有必要进一步研究建立护肝片的第 2 张指纹图谱,可重点对上述提到的柴胡、茵陈、板蓝根中的未知微量成分尝试进行富集分离,使护肝片特征指纹图谱更加完善。

## [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:760.
- [2] 徐丽华,黄芳,陈婷,等.板蓝根中的抗病毒活性成分[J].中国天然药物,2005,3(6):359.
- [3] 陈帅,李燕,孙秋实,等.柴胡炮制后皂苷成分的变化分析[J].中成药,2010,32(5):793.
- [4] 詹雪艳,史新元,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.

[责任编辑 蔡仲德]

## Studies on Antibacterial Activities and Spectroscopic Identification of Extracts of Fruits of *Eucalyptus tereticornis*

ZHOU Yan-yuan<sup>1,2\*</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, LIANG Chen-yan<sup>1</sup>, LIANG Zi-ning<sup>1</sup>

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antibacterial activities of different solvent extracts of the fruits of *Eucalyptus tereticornis* and research identification methods by UV-VIS spectroscopy. **Method:** Minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined by dilution method. And UV-VIS spectroscopy was used for the determination to provide the basic data for the identification of this plant. **Result:** The antibacterial activity of the extracts was different to different microbes. Characteristic peaks in the UV-VIS spectrum were identified. **Conclusion:** Extracts of the fruits of *E. tereticornis* have good antibacterial activity *in vitro*. The results of UV-VIS spectrum test provide evidence for the plant identification.

**[Key words]** the fruits of *Eucalyptus tereticornis*; antibacterial; MIC; identification

细叶桉系桃金娘科植物细叶桉 *Eucalyptus tereticornis* Smith 的果实,细叶桉原产澳大利亚,我国福建、广东、广西有栽培<sup>[1-2]</sup>。具有宣肺利气,止咳平喘,活血散瘀,清热解毒,消炎杀菌,收敛杀虫之功效;用于治疗感冒发热、咳喘痰嗽、脘腹胀痛、泻痢、钩端螺旋体病、跌打损伤、疮疡、丹毒、乳痈、疥疮、癣痒等病<sup>[3]</sup>。细叶桉果实还具有祛痰截疟的功效,可防治疟疾<sup>[4]</sup>。本实验通过对细叶桉果实的几种溶剂提取物抑菌活性及光谱鉴别的研究,为阐明其抗菌特性、细叶桉果实药材的鉴别以及进一步开发利用和寻找新的抗菌药物提供基础。

### 1 材料

**1.1 药材** 2010 年 3 月采自广西南宁郊外(野生品),经广西中医学院药用植物教研室刘寿养副教授鉴定为桃金娘科植物桉树属细叶桉 *E. tereticornis* 的果实。

**1.2 试剂** 醋酸乙酯、氯仿、正丁醇、乙醚、丙酮、乙醇均为分析纯,购于北京化工厂。

**1.3 培养基** 水解酪蛋白(Mueller-Hinton, MH),肉汤(北京陆桥商检新技术公司,批号 20081030),营养肉汤(国药集团化学试剂有限公司,批号 20080926),营养琼脂(国药集团化学试剂有限公司,批号 20081029)。

**1.4 菌种** 金黄色葡萄球菌(ATCC26003)、金黄色葡萄球菌耐药株、大肠杆菌(ATCC44102)、绿脓杆菌(ATCC27853)、伤寒杆菌(ATCC50075)、腐生葡萄球

菌、甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌均购自中国药品生物制品检定所。实验菌种经血平板分离培养 16~24 h 后,挑取数个菌落置于生理盐水管中,校正浓度至 0.5 麦氏标准,再用 MH 肉汤 1:100 稀释,使含菌量达到  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>(本文凡甲、乙型溶血性链球菌实验用培养基均加入无菌兔血清)。**1.5 仪器** 无菌净化工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),电热恒温培养箱(上海医疗器械七厂),压力蒸汽灭菌器(上海医用核子仪器厂),电热蒸馏水器(北京市医疗设备厂),电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),UV-2401 型紫外-可见分光光度计(日本岛津)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 细叶桉果实提取物体外抑菌活性研究

**2.1.1 细叶桉果实不同溶剂提取物的制备方法** 将阴干的细叶桉果实粉碎过 40 目筛,称取等量的细叶桉果实 8 份,每份 25 g 分别置于 250 mL 的醋酸乙酯、氯仿、正丁醇、乙醚、丙酮、95% 乙醇、50% 乙醇中,浸渍 24 h 后,超声提取 1 h,滤过,各提取滤液浓缩至含生药 1 g·L<sup>-1</sup>。另取 25 g 置于 250 mL 的蒸馏水中,浸渍 24 h 后,水煮 1 h,滤过,提取滤液浓缩至含生药 0.5 g·L<sup>-1</sup>,灭菌后放入冰箱中保存备用。

**2.1.2 细叶桉果实不同溶剂提取物的抑菌活性检测方法** 用无菌 MH 肉汤分别将细叶桉果实不同溶剂提取物作 2 倍递减系列浓度稀释,分装于小试管内,每管各 1 mL。取浓度为  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup> 的细菌

工作液,于上述不同浓度药液内,每管加入细菌工作液 0.1 mL。各抗菌药物浓度各留 1 管作为药物对照管,不加细菌。另分装一小试管,加肉汤培养基 1 mL,再加入 0.1 mL 细菌工作液作为细菌对照管。将试验管和对照管置于 35 °C 培养箱内培养 18 h 检查结果,与药物稀释液对照管比较。如加入细菌的药液管仍为澄清,即表示无细菌生长,则表明该药物有抗菌作用。以完全无细菌生长的最低药物浓度作为细菌对

该药物的敏感度,即为该药物的最低抑菌浓度(MIC)<sup>[5]</sup>。

**2.1.3 细叶桉果实不同溶剂提取物的抑菌活性检测结果** 采用试管稀释法对细叶桉果实 8 种溶剂提取物的最低抑菌浓度进行测定,结果表明细叶桉果实的 8 种溶剂提取物对供试的菌种具有不同的抑制作用(表 1)。

表 1 细叶桉果实不同溶剂提取物最低抑菌浓度

提取物	g·L <sup>-1</sup>							
	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌耐药株	腐生葡萄球菌	大肠杆菌	绿脓杆菌	伤寒杆菌	甲型溶血性链球菌	乙型溶血性链球菌
乙醚提取物	3.125	3.125	3.125	50	25	50	50	50
乙酸乙酯提取物	3.125	3.125	3.125	>100	12.5	50	25	25
氯仿提取物	3.125	3.125	3.125	>100	25	50	>100	>100
丙酮提取物	1.563	1.563	1.563	50	25	50	25	25
正丁醇提取物	3.125	3.125	3.125	>100	25	50	50	50
95% 乙醇提取物	1.563	1.563	1.563	50	25	50	50	50
50% 乙醇提取物	1.563	1.563	1.563	50	12.5	25	50	50
水提取物	5.188	5.188	5.188	41.5	5.188	5.188	>83	>83

从各种供试菌对细叶桉果实浸提物的敏感性上来看,不同菌种对不同溶剂提取物的敏感性不同:金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌耐药株、腐生葡萄球菌对细叶桉果实的丙酮提取物、95% 乙醇提取物、50% 乙醇提取物较为敏感,最低抑菌浓度均为 1.563 g·L<sup>-1</sup>;大肠杆菌、绿脓杆菌、伤寒杆菌对于细叶桉果实的水提取物较为敏感,最低抑菌浓度分别为 41.5,5.188,5.188 g·L<sup>-1</sup>;甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌对细叶桉果实的乙酸乙酯提取物、丙酮提取物较为敏感,最低抑菌浓度均为 25 g·L<sup>-1</sup>;而大肠杆菌对细叶桉果实的乙酸乙酯提取物、氯仿提取物、正丁醇提取物的 3 种溶剂浸提物均不敏感,最低抑菌浓度均大于 100 g·L<sup>-1</sup>;甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌对细叶桉果实的氯仿提取物、水提取物的 2 种溶剂浸提物均不敏感,最低抑菌浓度分别 >100 g·L<sup>-1</sup>, >83 g·L<sup>-1</sup>。

## 2.2 细叶桉果实提取液的紫外-可见吸收光谱研究

取 2.1.1 项下的细叶桉果实的乙醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、50% 乙醇、水不同溶剂提取液少量,适当稀释,照《中国药典》紫外-可见分光光度法<sup>[6]</sup> 试验。以乙醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、50% 乙醇、水作空白对照,分别在 190~800 nm 波长测定光谱图。结果乙醚、氯仿提取液在 280,346 nm

处有吸收峰;乙酸乙酯、乙醇和 50% 乙醇提取液在 280 nm 处有吸收峰;丙酮提取液在 416,672 nm 处有吸收峰;水提取液无吸收峰(图 1~7)。

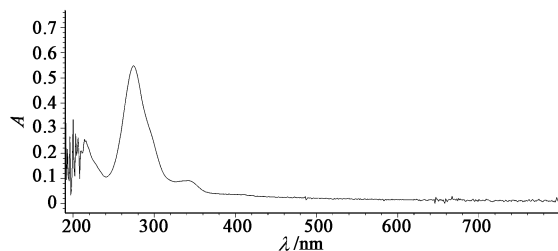


图 1 细叶桉果实乙醚提取液 UV-VIS 吸收光谱

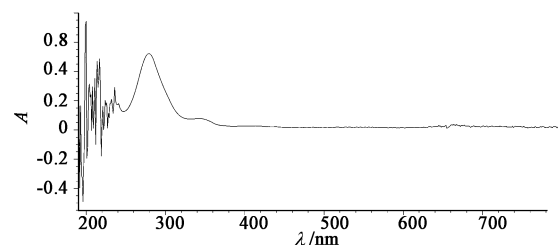


图 2 细叶桉果实氯仿提取液 UV-VIS 吸收光谱

## 3 讨论

药物抗菌效力的测定对于抗菌药物的筛选具有重要意义。由于药物含有抗菌物质,能干扰和抑制细菌代谢(如蛋白质代谢、糖代谢)的各个环节,使细菌的生长受到抑制,故可通过观察试管内细菌生

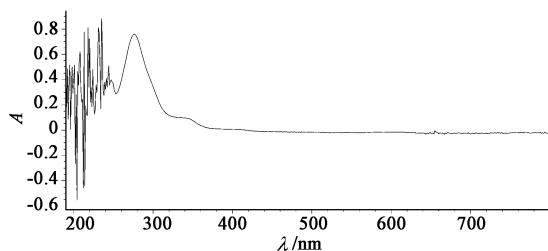


图 3 细叶桉果实乙酸乙酯提取液 UV-VIS 吸收光谱

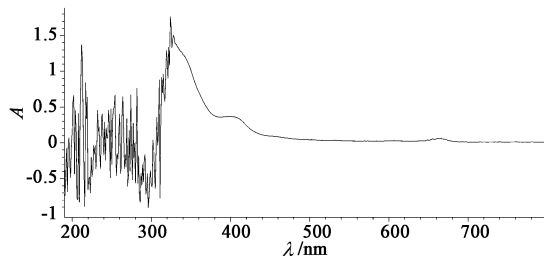


图 4 细叶桉果实丙酮提取液 UV-VIS 吸收光谱

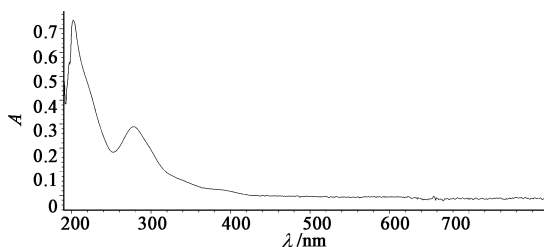


图 5 细叶桉果实 95% 乙醇提取液 UV-VIS 吸收光谱

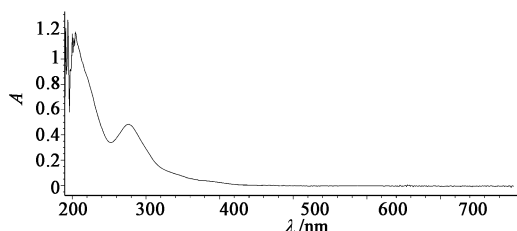


图 6 细叶桉果实 50% 乙醇提取液 UV-VIS 吸收光谱

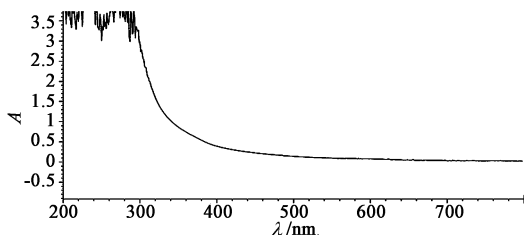


图 7 细叶桉果实水提取液 UV-VIS 吸收光谱

长情况来判定药物有无抗菌作用。测定抗菌药物在体外对病原微生物有无抑制作用的方法,称为药物

敏感实验。以抑制细菌生长为评定结果时,常以最低抑菌浓度(MIC)表示。

由于抗生素的滥用,耐药性细菌引起的传染性疾病越来越来严重,寻找新的抗菌药物已成为药物研究的热点。从少数民族本土传统中草药中筛选新的抗菌药物是药物研究与开发的有效途径,并已取得了进展<sup>[7]</sup>。本实验首次对细叶桉果实的 8 种溶剂提取物的抑制部分细菌的作用进行了研究。我们采用体外微生物敏感试验测定方法,评价和比较了细叶桉果实不同溶剂提取物的体外抑菌效果,实验结果表明细叶桉果实不同溶剂提取物均有明显的体外抑菌作用。因此,本研究为其抗菌活性和抗菌机理的研究打下基础,并为开发新的抗菌药物奠定了科学基础。

此外,经紫外-可见光谱扫描发现细叶桉果实的 7 种溶剂提取液具有各自特征吸收峰或无吸收,对药材的鉴别有一定意义,为民间用药的品种鉴定、品质评价和资源的开发利用提供科学依据。

#### [参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第 2 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1972: 998.
- [2] 刘玉明, 李素芳, 吴玉田. 桉属药用植物资源调查 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 957.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 753.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 5 册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 638.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 88.
- [6] 中国药典. 一部 [S]. 2005: 附录 28.
- [7] Olukoya D K, Idiaka N, Odugbemi A. Antibacterial activities of some plants in Nigeria [J]. J Ethnopharm, 2003, 4: 15.

[责任编辑 蔡仲德]