

红欏木花红色素提取物抑菌活性研究

卢成英, 唐克华, 黄早成, 张敏, 曹庸

(湖南省林产化工工程重点实验室 吉首大学张家界校区, 湖南 张家界 427000)

摘要: 采用 20% 乙醇加微波处理提取红欏木花红色素, 用正丁醇: 石油醚等对粗提液进行纯化, 检测花红色素粗提物及色素各级提取物的抑菌活性, 并对粗提物的最小抑菌浓度及抑菌稳定性进行研究。结果表明红欏木花红色素粗提物及各级提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和痢疾杆菌生长有明显的抑制作用。红欏木花红色素粗提物对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌的最小抑菌浓度均为 0.1g/ml, 对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.5g/ml。提取物经高温、pH2~7 处理或紫外照射后仍具有较强的抑菌活性。

关键词: 红欏木花; 红色素; 抑菌活性

Study on Bacteriostasis of the Red Pigment Extracts from the *L.chinense* Var.*rubrum* Flower

LU Cheng-ying, TANG Ke-hua, HUANG Zao-cheng, ZHANG Min, CAO Yong

(The Key Laboratory For Forest Products Chemical Industry Engineering of Hunan,

Ji Shou University, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract : The red pigment in *Lorpetalum.chinense* Var. *rubrum*'s flowers was extracted with microwave treatment and 20% ethanol, step-purified with alcohol butyl, petroleum ether and ethyl acetate. The antibacterial activities of the extract and its diferent extracts against the three kinds of bacteria were determined by Oxford Cup method. Then the bacteriostasis coefficient in contrast with norfloxacin were gotten. The results show was that the extracts inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escheichia coli* and *Shigella dysenteriae* efficaciously. The MIC of the extract were about 0.1~0.5g/ml against *Staphylococlus aureus*, and *Shigella dysenteroae*. The extract was stable when treat at high temperature, or at pH2~7, or at ultraviolet.

Key words: flower of *L.chinense* Var.*rubrum*; red pigments; antibacterial activity

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0107-04

红欏木(*LoropetaLum chinense* Var.*rubrum*)属金缕梅科欏木属白花欏木变种, 常绿灌木或小乔木, 原产湖南浏阳, 野生红欏木 1978 年发现后被广泛栽培^[1]。红欏木多分枝, 小枝被星毛; 花 4~8 朵簇生, 成头状或短穗状花序, 有短花梗, 肉红色, 花序长约 1cm, 被毛; 苞片线形, 长 0.3cm; 萼片卵形, 长约 0.2cm, 花后脱落; 花瓣 4~5 瓣, 带状线形, 长 1~2cm, 先端圆或钝, 呈淡紫红色。红欏木一年内能多次开花^[2], 花叶俱美, 是优良的园林盆景树种^[3]。

当前对红欏木的研究多在分类、进化、品系筛选、遗传育种、遗传工程, 以及生理、组织培养和园林观赏植物学方面。文献报道红欏木枝条中含鞣质, 种子含多种脂肪酸, 花中含异槲皮甙, 叶中含鞣质、还原糖、甙类、黄酮类、酚类物质及有机酸, 具有

止血、消炎、镇痛等作用, 湘西民间也有红欏木药用偏方, 红欏木花红色素色泽优良, 其花色素苷的含量比欏木高 4~7 倍^[4~6], 有研究证实其多种色素具抗氧化, 抗菌活性^[7,8], 为此我们对红欏木花红色素的抑菌活性进行了研究, 旨在深入的开发利用我省丰富的红欏木资源。

1 材料与方法

1.1 材料

红欏木花 2004 年 4 月采于校园花坛, 低温保藏备用。

试剂 蛋白胨(BR), 牛肉浸膏(BR), 琼脂(BR), 诺氟沙星胶囊(市售), 其它均为 AR 试剂。

菌种 金黄色葡萄球菌(*Saphylocolus aureus*), 大

收稿日期: 2004-09-24

基金项目: 湖南省张家界市高新技术引导资金项目(04HT023)

作者简介: 卢成英(1952-), 女, 教授, 主要从事应用微生物学教学与科研工作。

肠杆菌(*Escheichia coli*), 痢疾杆菌(*Shigella dysenteroae*)
购自湖南省疾病预防控制中心, 我室冻藏;

培养基 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 仪器

旋转蒸发仪(RE540 yamato)、格兰仕微波炉(Galan WD700A 型 顺德)、pH 计(HM-205 TOA)、冷冻干燥机(FD-1)、培养箱(PW/10-002)、超净工作台(CCV-1311)、高压蒸汽灭菌器(SM-52)、1/ 万天平(AEG-220)。

1.3 方法

1.3.1 红欖木花红色素粗提物的制备

冻藏鲜红欖木花 50g, 加 750ml 20% 乙醇溶液、微波中档火力处理 4min、室温浸提 1h, 取滤液静置 24h, 再过滤、取滤液 60℃下浓缩至 50ml, 使其生药浓度为 1g/ml。

1.3.2 红欖木花红色素各级提取物的制备

提取物 I 红欖木花红色素粗提物 40ml, 加正丁醇: 石油醚(V:V/1:4)混合溶剂 40ml, 混匀、静置 30min, 取下层色素液, 重复三次、合并滤液得红欖木花色素提取物 I, 无菌水定容至 40ml(使生药浓度为 1g/ml, 下同)。

提取物 II 红欖木花红色素提取物 I 30ml, 加乙醚 30ml, 充分摇匀, 静置 30min, 取下层色素液, 重复三次、得红欖木花红色素提取物 II, 无菌水定容至 30ml, 备用。

提取物 III 提取物 II 20ml, 加乙酸乙酯 20ml, 充分振摇后静置 30min, 取下层液、重复三次、得红欖木花红色素提取物 III, 无菌水准确定容到 20ml, 备用。

各级提取物用无菌水配成含生药浓度 1、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05g/ml 的试液, 备检测用。

1.3.3 抑菌活性检测^[9~11]

取牛肉膏蛋白胨琼脂平板, 每皿加 10⁷ 个 /ml 活化供试菌种菌悬液 0.1ml 菌悬液, 涂布涂匀, 每皿等距离放置牛津杯 4 个, 牛津杯内加入各提取液 0.2ml, 37℃、24h 后观测记录结果, 用游标卡尺测量抑菌圈的大小,

取平行实验抑菌圈的平均值。另设 0.1g/L 诺氟沙星液为对照。

1.3.4 最小抑菌浓度(MIC)测定

红欖木花色素粗提液稀释成不同浓度, 取药液 0.1ml 加入到盛有 0.8ml 的牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管中, 接入 0.1ml 的菌悬液, 充分摇匀, 使各试管的菌液浓度为 10⁷cfu/ml, 含生药量分别为 1、0.75、0.5、0.25、0.1、0.075、0.05g/ml, 37℃下培养 24h, 观察细菌生长情况。另设蒸馏水阴性对照, 不加药液的培养管作空白对照及四环素作阳性对照。

1.3.5 红欖木花色素粗提物抑菌活性的稳定性检测

1.3.5.1 酸碱稳定性试验

用 HCl 和 NH₃ 溶液将色素粗提液 pH 值分别调至 2、3、4、5、6、7、8 保持药液浓度为 1g/ml, 采用 K-B 纸片扩散法测定抑菌效果。

1.3.5.2 热稳定性试验

用试管分装色素粗提物, 置不同温度处理后采用 K-B 纸片扩散法测定抑菌效果。

1.3.5.3 紫外光照稳定性试验

用培养皿分装色素粗提物, 置紫外灯(256nm, 15W, 样距 10cm)下照射不同时间, K-B 纸片扩散法测定抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 红欖木花红色素粗提物抑菌活性

对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌和大肠杆菌均有较好的抑制作用, 含量 1g/ml 的红欖木花红色素的粗提物对三种菌的抑菌系数依次分别为 0.646、0.655 和 0.629(参见表 1)。

2.2 红欖木花红色素提取物 I 抑菌活性

经过正丁醇和石油醚处理后的提取物 I 对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌和大肠杆菌仍有抑制作用, 但活性低于粗提液(参见表 2)。

表 1 红欖木花色素粗提液的抑菌活性
Table 1 Bacteriostatic activity of the red pigment primary extracts

样液生药浓度 (g/ml)	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		痢疾杆菌	
	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数
1.0	16.48	0.646	17.57	0.629	18.12	0.655
0.8	16.50	0.647	17.36	0.621	18.25	0.660
0.4	15.00	0.588	16.23	0.581	15.63	0.565
0.2	13.02	0.510	13.87	0.496	12.38	0.441
0.1	12.50	0.490	±	0	12.15	0.439
0.05	12.23	0.479	±	0	11.03	0.399
诺氟沙星	25.52	1.000	27.94	1.000	27.67	1.000

注: 抑菌系数 = 提取物抑菌圈直径 / 诺氟沙星的抑菌圈直径; “±” 表示抑菌圈不明显, 但牛津杯周围菌落较少, 下同。

表2 红色素提取物 I 的抑菌活性
Table 2 Bacteriostatic activity of the red pigment extracts I

样液生药浓度 (g/ml)	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		痢疾杆菌	
	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数
1.0	14.60	0.572	13.55	0.485	14.27	0.516
0.8	14.79	0.579	12.25	0.438	14.22	0.514
0.4	14.47	0.567	11.87	0.425	13.97	0.505
0.2	11.50	0.450	±	0	13.00	0.470
0.1	±	0	±	0	10.87	0.393
0.05	±	0	±	0	±	0
诺氟沙星	25.52	1.000	27.94	1.000	27.67	1.000

表3 红色素提取物 II 抑菌活性
Table 3 Bacteriostatic activity of the red pigment extracts II

样液生药浓度 (g/ml)	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		痢疾杆菌	
	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数
1.0	11.32	0.444	14.49	0.519	17.43	0.630
0.8	11.64	0.456	12.97	0.464	15.18	0.549
0.4	11.01	0.431	±	0	14.76	0.533
0.2	10.85	0.425	±	0	±	0
0.1	±	0	±	0	±	0
0.05	±	0	±	0	±	0
诺氟沙星	25.52	1.000	27.94	1.000	27.67	1.000

表4 红欖木花红色素提取物 III 抑菌活性测定
Table 4 Bacteriostatic activity of the red pigment extracts III

样液生药浓度 (g/ml)	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		痢疾杆菌	
	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数	抑菌圈直径(mm)	抑菌系数
1.0	11.28	0.442	±	0	12.05	0.435
0.8	10.89	0.428	±	0	11.59	0.419
0.4	±	0	±	0	±	±
0.2	—	0	±	0	±	0
0.1	—	0	±	0	±	0
0.05	—	0	—	0	±	0
诺氟沙星	25.52	1.000	27.94	1.000	27.67	1.000

注： — 表示无抑菌圈。

2.3 红欖木花红色素提取物 II 抑菌活性

提取物 II 对三种菌都有抑制作用，且其对痢疾杆菌、大肠杆菌的抑制活性高于提取物 I (参见表 3)。

2.4 红欖木花色素提取物 III 抑菌活性

经过正丁醇、石油醚、无水乙醚和乙酸乙酯萃取后的提取液，对金黄色葡萄球菌和痢疾杆菌生长仍有较高的抑制活性，对大肠杆菌抑制作用已不明显(参见表 4)。

2.5 色素粗提物最小抑菌浓度(MIC)

红欖木花色素提取物对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌的最小抑菌浓度均为 0.1g/ml，对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.5g/ml(参见表 5)。

2.6 红欖木花红色素粗提液稳定性检测

2.6.1 酸碱稳定性

红欖木花红色素提取物在 pH2~7 时保持较强的抑菌活性，说明红欖木花红色素提取物在酸性和中性时稳定

表5 红欖木花色素提取物的最小抑菌浓度测定
Table 5 MIC test of ethanol extract of *L.chinense* Var.*rubrum* Flower

菌种	提取物的生药浓度(g/ml)						
	1	0.75	0.5	0.25	0.1	0.075	0.05
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	+	++
大肠杆菌	—	—	—	+	+	++	++
痢疾杆菌	—	—	—	—	—	+	++

注 “—” 无菌生长，“+” 菌体较少，“++” 菌体较多。

性较好。但在 pH ≥ 8 时，红欖木花红色素提取物变为绿色，其对三种细菌的抑制活性亦丧失(参见表 6)。

2.6.2 热稳定性

经高温处理后提取物对三个受试菌仍具有较强的抑菌活性，仅经 121℃ 下 20min 处理后抑菌活性稍有降低(参见表 7)。

2.6.3 紫外稳定性

表 7 热处理提取物的抑菌活性(抑菌圈直径 mm)
Table 7 Bacteriostatic activity of *L.chinense* Var.*rubrum* Flower treated at different temperature
(diameter of the inhibition zone mm)

菌种	热处理温度与时间					
	未处理	85℃ 15min	85℃ 1h	100℃ 15min	100℃ 1h	121℃ 20min
金黄色葡萄球菌	15.5	15.3	15	15.6	15	14.3
大肠杆菌	14.3	14.2	13.8	14.5	14	12.6
痢疾杆菌	14.8	15	14	14.2	14.3	12.3

表 6 酸碱处理提取物的抑菌活性(抑菌圈直径 mm)
Table 6 Bacteriostatic activity of *L.chinense* Var.*rubrum* Flower at different pH(diameter of the inhibition zone mm)

菌种	酸碱处理 pH 值							
	未处理	2	3	4	5	6	7	8
金黄色葡萄球菌	15.5	16	15.4	14.7	15.3	15.5	15	—
大肠杆菌	14.3	15.2	14.8	14.5	14	14.5	14.5	—
痢疾杆菌	14.8	15	14.6	14.2	14.7	15.2	14.6	—

经紫外光照处理后提取物对三个受试菌仍具有较强的抑菌活性(参见表 8)。

3 结论与讨论

实验表明,红欖木花红色素提取液及各级提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和痢疾杆菌均有较强抑制作用,其最大抑菌系数依次分别为 0.646、0.629 和 0.655。提取物 I 主要用溶剂去除了粗提液中的非极性 & 弱极性的脂类物质,提取物 II 在提取物 I 的基础上主要去除了黄酮甙元类,提取物 III 则主要去除了黄酮甙类,从各提取物中分离除去的物质类群和各提取物抑菌活性逐步有所下降的现象分析,红欖木花中脂类、黄酮甙元类 & 黄酮甙类可能具有抗菌活性,亦可能有增强红色素抑菌活性的作用,为此我们拟对上述物质的单体分离、单体抗菌活性或抗菌协同作用作深入研究。

最小抑菌浓度(MIC)测定表明,红欖木花色素提取物对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌的最小抑菌浓度均为 0.1g/ml,对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.5g/ml。

稳定性试验表明,热处理对红欖木花色素提取物抑菌活性的影响不明显,经高温处理后提取物对三个受试菌仍具有较强的抑菌活性。酸碱处理对提取物抑菌活性有一定的影响,其在 pH2~7 时保持较强的抑菌活性,pH8 时对三种细菌的抑制活性消失,提示提取物耐酸不耐碱,紫外光照处理对提取物抑菌活性的影响不明显。

红欖木花红色素各级提取物具有强而稳定的抑菌活性,除可用于开发抗菌消炎药物外,还可探索用作食品抗菌防腐剂、增色剂及其它产品的添加剂,具有广

表 8 紫外光照处理提取物的抑菌活性(抑菌圈直径 mm)
Table 8 Bacteriostatic activity of *L.chinense* Var.*rubrum* Flower treated at ultraviolet (diameter of the inhibition zone mm)

菌种	紫外光照处理时间				
	未处理	5 min	15min	30min	60min
金黄色葡萄球菌	15.5	15	15.7	15.3	15
大肠杆菌	14.3	14.5	14.8	14	14.5
痢疾杆菌	14.8	14.3	14.8	14.7	15

阔的开发利用前景。

参考文献:

[1] 表政德,付爱华.浏阳红欖木产业现状和发展趋势探讨[J].湖南农业科学,2003,(1): 80-81.

[2] 黄瑞康,杨金桂,贺中华,等.红欖木资源调查研究[J].湖南农业科学,1998,(4): 44-45.

[3] 贺中华.红欖木的园林应用及栽培管理技术[J].湖南农业科学,1998,36(3): 67-68.

[4] 李晨东,唐前瑞,陈德富,等.不同来源红欖木材料的 RAPD 分析及分类学探讨[J].园艺学报,2002,29(3): 358-362.

[5] 唐前瑞,周朴华.红欖木不同变异类型形态特征与色素含量的比较[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2001,27(5): 362-363.

[6] 唐前瑞,陈友云,周朴华.红欖木色素苷稳定性及叶片细胞液 pH 值变化的研究[J].湖南农业科学,2003,(12): 24-25.

[7] 童群义,高孔荣,周正宏.红曲色素抑菌作用的研究[J].食品工业科技,1997,(5): 5-6.

[8] 王允祥.葡萄色素抑菌作用的研究[J].食品科学,1998,19(9): 23-24.

[9] 汤杰,施春阳,徐晗,等.板蓝根抑菌抗炎活性部位的评价[J].中国医院药学杂志,2003,23(6): 327-328.

[10] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].复旦大学出版社,1993.191-206.

[11] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999.