

红松针叶乙醇提取物与水提取物的抗菌活性研究

吴楠, 王微, 夏莹莹, 祖元刚*

(东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 本实验采用琼脂扩散法和微量肉汤稀释法研究红松针叶 80% 乙醇提取物及水提取物对 6 种细菌(表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌)和 2 种真菌(白色念珠菌和黑曲霉)的抗菌活性。研究了该提取物对热、紫外光的稳定性。结果表明: 红松针叶乙醇提取物及水提取物对各种阳性菌均敏感, 且乙醇提取物的抗菌活性明显强于水提取物。乙醇提取物对革兰氏阳性菌的 MIC 范围为 1.03~4.11mg/ml, 而水提取物对革兰氏阳性菌的 MIC 范围为 2.06~4.11mg/ml。提取物对 100℃ 以下温度不敏感, 经 121℃ 高温处理, 仅对个别菌种的抗菌活性产生微弱影响, 随着紫外照射时间的延长, 抗菌活性不变。因此可将提取物加入到食品中, 延长加工食品的保存时间。同时发现红松针叶抗菌活性成分在高浓度乙醇中较水中溶解度大, 为临床上应用红松提取物作为抗菌制剂提供了科学依据。

关键词: 红松; 乙醇提取物; 水提取物; 抗菌活性

Antimicrobial Activities of Ethanol Extract and Water Extract from *Pinus koraiensis* Needle

WU Nan, WANG Wei, XIA Ying-ying, ZU Yuan-gang*

(Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: The ethanol extract and the water extract from *Pinus koraiensis* (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) needle were examined for the antimicrobial activities against six bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus vulgaris*) and two fungi (*Candida albicans*, and *Aspergillus niger*) by disc diffusion method and micro broth dilution method. The extracts were also studied on their stabilities to temperature and ultraviolet. Results showed that the ethanol extract and the water extract exhibit high susceptibility to gram-positive bacteria, except gram-negative bacteria and fungi. And the ethanol extract shows higher susceptibility than the water extract. The range of minimal inhibitory concentration (MIC) of ethanol extract against gram-positive bacteria is 1.03 to 4.11 mg/ml, while that of the water extract is 2.06 to 4.11 mg/ml. The two extracts from *Pinus koraiensis* needle are stable to temperature ($\leq 100^\circ\text{C}$) and ultraviolet. When the temperature reaches 121°C , only few microorganisms are affected. So they can be added into food in order to prolong the preservation time. It was also found antibacterial components of *Pinus koraiensis* needle dissolves in high concentration ethanol, which provides scientific basis for the application of ethanol and water extract from *Pinus koraiensis* needle as antibacterial preparation in clinic.

Key words: *Pinus koraiensis*; ethanol extract; water extract; antimicrobial activity

中图分类号: S791.247; TQ455.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)11-0080-04

红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)为松科植物, 又名海松、新罗松、果松、红果松、朝鲜五叶松、柏子木等, 为常绿大乔木, 高达 30m。树皮灰褐色, 鳞片裂开。小枝暗褐色, 密生锈褐色茸毛, 新枝棕黄色, 密被茸毛。叶针形, 5 针一束, 粗硬, 三角形, 长 8~12cm, 外侧暗绿色, 内侧具 5~7 排白色气孔线,

边缘有细锯齿。生长于湿润的缓山坡, 多与阔叶树成混交林, 广泛分布于北半球^[1-3]。近年来对于植物提取物及精油的研究引起了科学界广泛的兴趣^[4-5]。随着科学技术的发展, 新技术和新理论的不断涌现, 对红松的研究也在不断地广泛深入。关于红松针叶化学成分的研究, 国内已有报导^[6]。为了进一步开发利用红松植物资

收稿日期: 2007-07-17

作者简介: 吴楠(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物化学与植物药。E-mail: bao_doubao@163.com

* 通讯作者: 祖元刚(1954-), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物学。E-mail: zygorl@public.hr.ho.cn

源,本研究对红松针叶乙醇及水提取物的抗菌活性进行对比研究,为红松制剂的进一步研制及其在临床上的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3年生红松针叶 黑龙江东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室夏莹莹硕士提供,经本室毛子军教授鉴定为红松(*Pinus koraiensis* Sieb.et Zucc.)。牛肉膏、蛋白胨、琼脂等皆为生化试剂。无水乙醇和二甲基亚砜均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

DL2CJ22N 超净工作台、DK29821 电子恒温水浴锅、SHB2 III循环水式多用真空泵、RE252AA 旋转蒸发仪水浴槽、LDZX240B I 立式自动电热压力蒸汽灭菌器、HZQ2F 全温振荡培养箱。

1.3 菌种及培养条件

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*) 黑龙江省微生物研究所。前3种为革兰氏阳性菌,大肠杆菌、绿脓杆菌和变形杆菌为革兰氏阴性菌,后2种为真菌。除黑曲霉需用察氏培养基于28℃培养5d外,其余菌种均于营养琼脂培养基37℃培养24h^[7]。

1.4 方法

1.4.1 植物提取物的制备

取干燥的红松针叶10g,粉碎,过40目筛,分别用80%乙醇溶液及蒸馏水在80℃水浴上回流提取,固液比为1:10,回流3h。滤过,滤液用旋转蒸发仪蒸干,称重,然后用10%二甲基亚砜(DMSO)溶液使其溶解并用灭菌蒸馏水稀释至一定体积。

1.4.2 菌悬液的制备^[7]

将上述供试菌种用适宜的斜面活化后,以无菌水制成含菌数约为 1×10^5 CFU/ml菌悬液。

1.4.3 抗菌活性实验

1.4.3.1 红松针叶乙醇提取物及水提取物抑菌直径的测定

抑菌直径的测定采用琼脂扩散法^[8-9]。用无菌棉签蘸取 10^5 CFU/ml的试验菌悬液,在营养琼脂平板表面均匀涂抹三次,然后绕平板边缘涂抹一周,盖好平皿,室温干燥5min,滤纸片(直径6.0mm)平放于无菌平皿内,每片滴加不同浓度乙醇提取液及水提取物20μl,室温自然晾干,用无菌镊子取样片轻轻贴放于平板表面,每个平板贴3片实验样片,1片10% DMSO为对照片。各

实验菌株在相应的培养条件下培养。测量抑菌直径,实验重复三次。

1.4.3.2 红松针叶乙醇提取物及水提取物 MIC 及 MBC 的测定

MIC 及 MBC 的测定采用微量肉汤稀释法^[8-9]。MIC (minimal inhibitory concentration)为最小抑菌浓度,即药物与一定浓度的菌液作用后,能够抑制可见菌生长的最低浓度, MBC (minimal bactericidal concentration)为最小杀菌浓度,即在 MIC 基础上,从每管吸取10μl溶液,点于固体培养基上,继续按 MIC 培养条件下培养,以杀灭99.9%细菌数量的最低浓度为最小杀菌浓度。采用二倍稀释法将药液用无菌生理盐水稀释系列浓度(0.064 ~ 65.8mg/ml),在96孔板上每孔加100μl不同浓度的药液和100μl菌液,使最终菌液浓度为 1×10^5 CFU/ml,以无菌生理盐水加菌液做为阳性对照,每个实验重复三次。

1.4.4 提取物热稳定性的测定

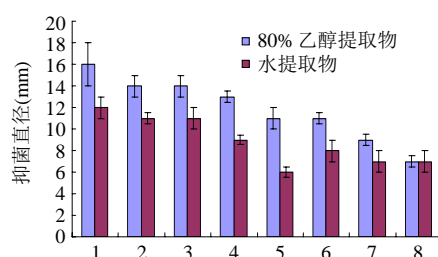
将不同稀释度的提取物分别置于30、50、80、100℃水浴和121℃湿热条件下处理10min后,测定其抑菌活性。

1.4.5 提取物紫外稳定性的测定

将提取物分别在紫外灯下处理10、20、30、40、50、60min后测定其抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 红松针叶乙醇及水提取物的抑菌直径



1.表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*); 2.金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 3.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 4.大肠杆菌(*Escherichia coli*); 5.绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*); 6.变形杆菌(*Proteus vulgaris*); 7.白色念珠菌(*Candida albicans*); 8.黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

图1 红松针叶提取物的抑菌直径对比

Fig.1 Comparison of inhibition zones of ethanol extract and water extract from *Pinus koraiensis* needle

由图1可以看出,红松针叶乙醇提取物对同一种细菌其抑菌直径比水提取物的抑菌直径大。两种提取物对革兰氏阳性菌比对革兰氏阴性菌敏感,对真菌则不敏感。10% DMSO无抑菌活性。由此可见,同一浓度的红松80%乙醇提取物比水提取物的抑菌活性强。

2.2 红松乙醇提取物及水提取物的 MIC 和 MBC

表 1 红松针叶乙醇及水提取物的 MIC 和 MBC 结果 (mg/ml)
Table 1 MICs and MBCs of ethanol extract and water extract from *Pinus koraiensis* needle (mg/ml)

试样		菌种							
		Se	Sa	Bs	Ec	Pa	Pv	Ca	An
80%乙醇 提取物	MIC	2.06	4.11	1.03	4.11	8.23	4.11	>65.8	>65.8
	MBC	4.11	4.11	4.11	8.23	8.23	16.45	>65.8	>65.8
水提取物	MIC	4.11	2.06	2.06	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
	MBC	4.11	4.11	4.11	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8

注: Se. *Staphylococcus epidermidis*(表皮葡萄球菌); Sa. *Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌); Bs. *Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌); Ec. *Escherichia coli*(肠杆菌); Pa. *Pseudomonas aeruginosa*(绿脓杆菌); Pv. *Proteus vulgaris*(变形杆菌); Ca. *Candida albicans*(白色念珠菌); An. *Aspergillus niger*(黑曲霉)。下同。

由表 1 可以看出, 红松乙醇提取物对革兰氏阳性菌及阴性菌抗菌活性较强, 而对真菌在 65.8mg/ml 范围内没有抗菌作用, 水提取物对革兰氏阳性菌的抗菌活性较强, 而阴性菌及真菌在 65.8mg/ml 范围内没有抗菌作用。同时还可以看到, 红松针叶 80% 乙醇提取物比水提物的 MIC 及 MBC 小。

2.3 热处理对提取物抗菌效力的影响

表 2 热处理对 80% 乙醇提取物抗菌效力的影响
Table 2 Effects of temperature on antimicrobial activity of 80% ethanol extract from *Pinus koraiensis* needle

菌种	25℃	30℃	50℃	80℃	100℃	121℃
Se	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Sa	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	8.23
Bs	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	2.06
Ec	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11
Pa	8.23	8.23	8.23	8.23	8.23	8.23
Pv	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11
Ca	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
An	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8

表 3 热处理对水提取物抗菌效力的影响
Table 3 Effects of temperature on antimicrobial activity of water extract from *Pinus koraiensis* needle

菌种	25℃	30℃	50℃	80℃	100℃	121℃
Se	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	8.23
Sa	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Bs	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Ec	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pa	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pv	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Ca	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
An	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8

提取物的热稳定性良好, 经 30、50、80、100、121℃处理 15min 后, 80% 乙醇提取物经 121℃处理后抗金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌效力降低了一倍, 分别

由 4.11 变为 8.23, 由 1.03 变为 2.06, 其余仍保持其原有的抗菌效力。而水提取物经 121℃处理后抗表皮葡萄球菌的 MIC 由 4.11 变为 8.23, 其余都保持不变。由此可见, 红松针叶乙醇提取物及水提取物对 100℃以下温度不敏感, 经 121℃高温处理, 仅对个别菌种的抗菌活性产生微弱影响。因此可将提取物加入到食品中, 延长加工食品的保存时间。

2.4 紫外稳定性的测定

将提取物分别在紫外灯下处理 10、20、30、40、50、60min 后测定其抑菌活性。结果表明随紫外处理时间的变化, 提取物的抑菌活性保持不变, 由此可见, 该提取物对紫外具有极高的稳定性。

表 4 紫外照射对 80% 乙醇提取物抗菌活性的影响
Table 4 Effects of ultraviolet on antimicrobial activity of 80% ethanol extract from *Pinus koraiensis* needle

菌种	照射时间 (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
Se	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11
Sa	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Bs	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Ec	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pa	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pv	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Ca	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
An	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8

表 5 紫外照射对水提取物抗菌活性的影响
Table 5 Effects of ultraviolet on antimicrobial activity of water extract from *Pinus koraiensis* needle

菌种	照射时间 (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
Se	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11	4.11
Sa	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Bs	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
Ec	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pa	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Pv	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
Ca	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8
An	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8	>65.8

3 结 论

通过两种提取物的抗菌活性的对比研究, 结果显示红松两种提取物对 3 种革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)均比对革兰氏阴性菌(大肠杆菌、绿脓杆菌和变形杆菌)及真菌(白色念珠菌和黑曲霉)的抗菌活性强, 在 65.8mg/ml 的浓度范围内对真菌的 MIC、MBC 未检出。同时, 红松针叶 80% 乙醇提取物比水提取物的抗菌活性强, 这是因为抗菌活性高的活性成分更易溶于高浓度的乙醇中。通过本研究可以得

出,红松针叶乙醇提取物具有良好的抗菌活性,尤其对革兰氏阳性菌更敏感,而80%乙醇提取物比相应的水提取物的抗菌活性更强。提取物对100℃以下温度不敏感,经121℃高温处理,仅对个别菌种的抗菌活性产生微弱影响,随紫外处理时间的变化,提取物的抑菌活性基本保持不变,由此可见,该提取物对热及紫外具有很高的稳定性。因此根据红松针叶乙醇提取物的抗菌特性,可以选择高浓度乙醇的红松针叶提取物作为临床感染性疾病的选择性用药,同时本研究也为红松资源的综合开发利用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 262-265.
- [2] The ministry of health and welfare. *korean pharm acopoeia*. (Seventh revised)[M]. Seoul: Medical Press of Korea, 1998.
- [3] Lee T B. Illustrated Flora of Korea[M]. Seoul: Hangmun Publishers, 1976.
- [4] REYNOLDS J E F. Martindale-the extra pharmacopeia[M]. 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1996.
- [5] LIS-BALCHIN M, DEANS S G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1997, 82: 759-762.
- [6] 朴相勇, 刘向前, 陆昌洙, 等. 红松叶挥发油成分的GC-MS分析[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1784-1785.
- [7] 周正任. 医学微生物学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 135-137.
- [8] HERNÁNDEZ T, CANALES M. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf.(Verbenaceae)[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96: 551-554.
- [9] CHANDRASEKARAN M, VENKATESALU V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 91: 105-108.

各门功课都辅导 提高成绩有诀窍

少年文摘报

小学版系列



少年文摘报发行遍及全国各地,深受中小学师生和家长的喜爱。

少年文摘报小学版分为各年级学习版系列、百科知识版系列、课程达标试题版系列和写作与阅读版系列等四个系列。

诚征发行代理 刊发优秀论文

报社地址: 兰州市白银路甘肃新闻大厦13楼 (730030)

咨询电话: 0931-4560670 13919866375

电子邮箱: LLL698698@yahoo.com.cn 联系人: 刘子林

邮发代号	报纸名称	全年价	邮发代号	报纸名称	全年价
53-78	小学一年级学习指导版(铜版彩)	51.00	53-86	小学五年级语数英学习版	57.00
53-79	小学二年级学习指导版(铜版彩)	51.00	53-87	小学五年级百科知识版	30.00
53-80	小学三年级语数英学习版	57.00	53-88	小学五年级语数英达标试题版	36.00
53-81	小学三年级百科知识版	30.00	53-89	小学六年级语数英学习版	57.00
53-82	小学三年级语数英达标试题版	24.00	53-90	小学六年级百科知识版	30.00
53-83	小学四年级语数英学习版	57.00	53-91	小学六年级语数英达标试题版	36.00
53-84	小学四年级百科知识版	30.00	53-92	小学生写作与阅读版	30.00
53-85	小学四年级语数英达标试题版	24.00	53-206	教育教学研究小学版	30.00