

# 红欏木叶中抑菌活性成分的初步研究

周国海<sup>1</sup>, 于华忠<sup>2</sup>, 卢成英<sup>2</sup>, 周哲<sup>1</sup>

(1. 吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南 张家界 427000)

2. 湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000)

**摘 要:** 本研究以红欏木叶为材料, 对其抑菌活性成分进行提取, 将提取液用不同溶剂分步萃取; 以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和痢疾杆菌为供试菌种, 进行抑菌实验; 对抑菌活性较强的萃取液进行薄层层析分离, 摸索最佳展开剂, 并对薄层层析分离所得抑菌活性成分进行抑菌实验和化学检识, 以研究红欏木叶中抑菌活性成分的种类。结果表明: 乙酸乙酯为最佳萃取溶剂; 氯仿: 丙酮: 甲酸: 水 (60: 35: 5: 2) 为最佳展开剂; 红欏木叶中所含抑菌活性成分主要为鞣质类和香豆素类。

**关键词:** 红欏木叶; 抑菌; 活性成分; 薄层层析

## Primary Study on Bacteriostatic Active Compound from Leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh

ZHOU Guo-hai<sup>1</sup>, YU Hua-zhong<sup>2</sup>, LU Cheng-ying<sup>2</sup>, ZHOU Zhe<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Planning Sciences, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China)

2. Key Laboratory of Hunan Forest Products Chemical Engineering, Zhangjiajie 427000, China)

**Abstract:** In this paper, the leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh were used as raw material, and the bacteriostatic active compound with different solvents extracted in turn. The bacteriostatic effects on *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* were studied with bacteriostatic experiment. The bacteriostatic active extract was separated by thin layer chromatography. The best developer is found. Then the active compounds separated by thin layer chromatography were tested by the bacteriostatic experiment and chemical recognition so as to affirm the species of bacteriostasis active compounds. The results showed that ethyl acetate is the best solvent and the best developer solvent is: chloroform: acetone: formic acid: water (60: 35: 5: 27 respectively). The main active compounds in the leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh are tannin and coumarin.

**Key words** leaves of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh; bacteriostasis active compounds; thin layer chromatography

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)06-0074-04

欏木 [*Loropetalum chinense* (R. Br.) Oliv] 又名坚漆、欏柴、刀脂木等, 为金缕梅科 (*Hamamelidaceae*) 欏木

属常绿灌木或小乔木, 红欏木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh) 系欏木的变种。我国主要分布在长江中下游

收稿日期: 2006-07-12

作者简介: 周国海 (1964-), 男, 副教授, 研究方向为植物化学。

据低浓度黄原胶冷水溶和热水溶部分流变性的不同, 在生产实践中可灵活应用。

### 参考文献:

- [1] 詹晓北. 食用胶的生产、性能与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 199-227.
- [2] 胡国华. 功能性食品胶[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 50-59.

- [3] 宁应之, 杨永利, 李春, 等. 皂荚胶与黄原胶复配胶的流变性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 34-36.
- [4] 杨永利, 张继, 姚健, 等. 皂荚豆胶冷水溶部分与热水溶部分的流变性研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 56-59.
- [5] 张继, 黄玉龙, 杨永利, 等. 决明子胶冷水溶部分和热水溶部分的流变性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(12): 43-46.
- [6] 范建萍, 杨永利, 张继, 等. 槐豆胶及黄原胶复配胶的协效性研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(2): 396-400.

以南、北回归线以北地区, 湖南地区藏量十分丰富<sup>[3]</sup>。据有关文献报道, 欖木枝条中含鞣质, 种子中含脂肪油, 花中含异槲皮苷, 叶中含鞣质、还原糖、苷类、黄酮类、酚性物质及有机酸; 欖木根、叶和花均可入药<sup>[4]</sup>, 具有消暑解热、止咳、止血、止泻、消炎、镇痛等功效, 可用于治疗咳嗽, 咯血, 痢疾、暑泻、外伤出血、烧伤、紫斑病、腹痛等症; 湘西民间常用欖木鲜叶煎服治疗腹泻有奇效。目前, 有关欖木叶中抑菌活性成分的深入报道不多, 仅卢成英等以欖木叶为材料, 用60%乙醇在45℃下提取, 选用不同树脂经柱层析和梯度洗脱, 经抑菌实验结果表明, 欖木叶提取液中含有多种抑菌活性成分, 其中主要可能为香豆素类<sup>[6]</sup>。本研究通过对红欖木叶中抑菌活性成分进行提取和初步分离, 对具较强抑菌活性的萃取液进行薄层分离制备, 将各层析点经溶解解析后, 进行抑菌实验和化学鉴定, 确定其中所含抑菌活性成分的种类, 以期对红欖木叶中抑菌活性物质的开发利用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 红欖木叶及菌种

本实验所用的红欖木叶为2006年3月中旬采于吉首大学张家界校区校园内。经吉首大学城乡资源与规划学院廖博儒副教授鉴定为红欖木(*Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh), 阴干处理、粉碎后备用。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escheichia coli*)和痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*) 湖南省疾病预防控制中心。

#### 1.1.2 试剂

实验所用试剂均为国产分析纯, 对照品四环素 湖北省鄂州市生物化学制药厂; 层析用硅胶G(化学纯) 青岛海洋化工集团。

#### 1.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基、沙氏培养基制备无菌试管斜面、平板备用。

#### 1.1.4 仪器

PCH-1303BN超净工作台; PW/10-002恒温培养箱; SM-52高压蒸汽灭菌器; Yamato RE-540旋转蒸发仪 日本; HH-W21. Cr420恒温水浴锅; 医用LD5-2A台式离心机; AEG-220万分之一天平; SJ-1031A紫外线检出器 日本。

## 1.2 方法

### 1.2.1 红欖木叶中抑菌活性成分的提取及初步分离

称取经处理的红欖木叶粗粉50g置于烧瓶中, 加入

60%乙醇200ml于45℃下回流提取2h。趁热过滤, 滤渣加入相同体积的乙醇重复提取一次, 合并两次所得滤液。将滤液经旋转蒸发仪浓缩至50ml后分步萃取, 先用50ml石油醚分三次萃取, 得萃取液I, 接着用50ml氯仿分三次萃取, 得萃取液II, 再用50ml乙酸乙酯分三次萃取, 得萃取液III, 最后用50ml正丁醇分三次萃取, 得萃取液IV, 原液萃取余液为萃余液V, 原提取液(未萃取)为VI。

### 1.2.2 硅胶G薄板的制备

硅胶G薄板按文献[7]中的方法制备, 于烘箱中110℃烘干活化1h, 冷却后贮于干燥箱内备用。

### 1.2.3 抑菌实验

分别取提取及萃取液0.2ml置无菌小瓶中, 放入Φ6mm无菌滤纸片20片, 45℃下干燥备用, 另设有四环素(100μg/ml)和95%乙醇作对照。取0.2ml菌悬液置于平板上, 用L型玻棒涂布均匀, 将上述药敏纸片等距离置于含菌平板上, 然后置于37℃下培养24h后观测记录结果<sup>[8]</sup>。

## 1.3 抑菌活性成分的分离制备

### 1.3.1 最佳展开剂的摸索

对抑菌效果最佳的萃取液分别选用九种展开剂进行薄层层析, 摸索最佳展开剂。

### 1.3.2 抑菌活性成分的分离制备

将抑菌效果最佳的萃取液以直线均匀点于数块硅胶G薄层板上, 用最佳展开剂进行分离, 在紫外灯下确定各点位置后用小刀刮下, 以乙酸乙酯为溶剂将吸附在硅胶中活性成分溶解解吸, 离心、过滤, 将滤液浓缩定容10ml。

### 1.3.3 抑菌检测实验

用各层析点浓缩液进行抑菌实验, 分别测其抑菌圈直径, 以确定各层析点的抑菌活性。

## 1.4 红欖木叶抑菌活性成分的初步化学鉴定

对抑菌实验证明有抑菌作用的层析点提取液进行物理和化学检测, 初步判断其所含物质种类, 为进一步分离鉴定奠定基础。

## 2 结果与分析

### 2.1 红欖木叶提取及初步分离液抑菌活性实验结果

按1.2.1方法对红欖木叶中抑菌活性成分进行提取及初步分离, 并对提取及萃取液进行抑菌实验, 结果见表1。

由表1可知, 对于各供试菌种的抑菌效果基本均以萃取液III的效果最佳。对于大肠杆菌, 其抑菌圈平均直径达16.0mm, 较之阳性对照物四环素的直径

表1 红欏木叶提取及萃取液的抑菌效果

Table 1 Bacteriostatic effects of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Yieh leaves extracts

处理	抑菌圈直径 (mm)		
	<i>E. c</i>	<i>S. a</i>	<i>S. d</i>
萃取液I	—	—	—
萃取液II	—	—	—
萃取液III	16.0±1.3	16.7±0.6	14.0±1.2
萃取液IV	12.2±0.9	12.5±1.3	11.0±0.8
萃取液V	12.0±1.2	13.7±0.3	12.5±1.0
原提取液VI	15.5±0.9	15.6±1.2	14.6±1.3
四环素	10.5±0.4	9.5±0.4	9.5±0.6
95%乙醇	6.0±0.3	6.0±0.4	6.0±0.5

注: *E. c* 为大肠杆菌; *S. a* 为金黄色葡萄球菌; *S. d* 为痢疾杆菌。

大5.5mm, 高出52.4%; 对于金黄色葡萄球菌, 其抑菌圈平均直径达16.7mm, 比阳性对照物四环素的平均抑菌直径大7.2mm, 高出75.8%; 对于痢疾杆菌, 其抑菌圈平均直径14.6mm, 比阳性对照物四环素的平均抑菌直径大4.5mm, 高出47.4%。萃取液III的抑菌效果较原提取液VI还略为明显, 说明红欏木叶中的抑菌活性成分可能主要为易溶于乙酸乙酯的成分。

## 2.2 展开剂的摸索实验结果

对最具抑菌作用的萃取液III进行薄层层析, 摸索最佳展开剂, 结果见表2。

表2 不同展开剂对萃取液III的分离效果

Table 2 Separation effects of different developing agents to extraction liquid III

展开剂比例	展开现象
氯仿:丙酮:甲酸(60:35:5)	4个点, 3个分开明显, 原点有残留
氯仿:丙酮:甲酸(60:35:15)	4个清晰点, 下端分开不明显
氯仿:丙酮:甲酸(60:35:20)	5个点, 拖尾明显
氯仿:丙酮:甲酸:水(60:35:5:1)	5个点, 后3点分开明显
氯仿:丙酮:甲酸:水(60:35:5:2)	5个点, 后3点分开明显
氯仿:丙酮:甲酸:水(60:35:5:3)	5个点, 分开明显, 有拖尾
氯仿:丙酮:甲酸:氨水(60:35:5:1)	7个点, 前4个点分开不明显
氯仿:丙酮:甲酸:氨水(60:35:5:2)	7个点, 各点分开明显, 有拖尾现象
氯仿:丙酮:甲酸:氨水(60:35:5:3)	7个点, 各点分开明显, 无拖尾现象

由表2可知, 氯仿:丙酮:甲酸:氨水(60:35:5:3)的展开剂分离效果最好, 选用此展开剂对萃取液III进行分离制备。

## 2.3 层析点溶解液的抑菌实验

选用最佳展开剂对萃取液III进行薄层制备, 得七个区带, 刮下各点用乙酸乙酯溶解, 离心、过滤、浓缩后, 定容至10ml, 再进行抑菌实验, 结果见表3。

由表3可知各层析点乙酸乙酯溶解液对供试菌种抑菌效果均不明显, 由于萃取液III本身的抑菌效果较好, 而各层析点乙酸乙酯溶解液的抑菌效果不佳, 考虑是否是因为抑菌活性成分没有被乙酸乙酯溶解解析下来, 故对乙酸乙酯溶解吸后的硅胶滤渣再用甲醇溶解, 离心、过滤、浓缩后定容至10ml, 再进行抑菌

表3 层析点乙酸乙酯溶解液对供试菌种的抑菌效果

Table 3 Bacteriostatic effects of different thin-layer spots dissolved in ethyl acetate

层析点提取液	抑菌圈直径 (mm)		
	<i>E. c</i>	<i>S. a</i>	<i>S. d</i>
层析点I	7.4±0.4	7.3±0.7	7.6±0.8
层析点II	6.4±0.4	6.4±0.4	7.4±1.5
层析点III	6.9±0.6	6.5±0.3	6.2±0.3
层析点IV	7.9±1.2	6.6±0.4	6.2±0.3
层析点V	8.0±1.1	6.8±0.5	6.2±0.1
层析点VI	8.6±0.7	8.2±0.8	6.2±0.1
层析点VII	7.6±0.5	7.5±1.1	7.0±1.1
四环素	12.5±0.4	12.2±0.3	11.6±0.4
95%乙醇	7.0±0.3	7.5±0.3	7.2±0.4

表4 层析点甲醇溶解液对供试菌种的抑菌效果

Table 4 Bacteriostatic effects of different thin-layer spots dissolved in methanol

层析点提取液	抑菌圈直径 (mm)		
	<i>E. c</i>	<i>S. a</i>	<i>S. d</i>
层析点I	8.2±1.0	7.3±1.0	7.2±0.4
层析点II	8.0±0.5	9.0±1.0	9.7±0.6
层析点III	8.8±0.3	9.5±1.2	9.5±1.0
层析点IV	7.2±1.1	8.0±1.0	7.3±0.8
层析点V	8.8±1.2	7.1±0.8	7.2±0.6
层析点VI	8.7±0.8	8.3±1.2	8.5±1.1
层析点VII	10.8±0.9	10.2±1.0	10.7±1.3
四环素	12.6±0.4	12.5±0.5	12.2±0.4
95%乙醇	7.0±0.3	7.5±0.4	7.2±0.3

实验, 结果见表4。

由表4可知, 对于大肠杆菌, 以层析点III、V、VI、VII有一定抑菌效果, 平均抑菌圈直径分别为8.8、8.8、8.7、10.8mm, 比95%乙醇对照品平均抑菌圈直径分别大1.8、1.8、1.7、3.8mm, 分别高出25.7%、25.7%、24.3%、54.3%。

对于金黄色葡萄球菌, 以层析点II、III、VI、VII有一定抑菌效果, 平均抑菌圈直径分别为9.0、9.5、8.3、10.2mm, 比95%乙醇对照品平均抑菌圈直径分别大1.5、2.0、0.8、2.7mm, 分别高出20.0%、26.7%、10.7%、36.0%。

对于痢疾杆菌, 以层析点II、III、VI、VII有一定抑菌效果, 平均抑菌圈直径分别为9.7、9.5、8.5、10.7mm, 比95%乙醇对照品平均抑菌圈直径分别大2.5、2.3、1.3、3.5mm, 分别高出34.7%、31.9%、18.1%、48.6%。

由以上分析可以推断层析点II、III、V、VI、VII所含物质可能为红欏木叶中的主要抑菌成分。

从实验结果中还可以看出, 各薄层层析点的抑菌效果仍不及对照品四环素好, 因此对甲醇溶解吸后的各点硅胶滤渣进行抑菌实验, 结果见表5。

从表5可以看出, 各点硅胶滤渣抑菌效果仍较明

表5 层析点甲醇溶解后硅胶滤渣对各供试菌种的抑菌效果  
Table 5 Bacteriostatic effects of filter residue of silica gel

层析点提取液	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Sc</i>
层析点I	良好	良好	良好
层析点II	良好	良好	良好
层析点III	良好	良好	良好
层析点IV	一般	良好	良好
层析点V	一般	一般	一般
层析点VI	显著	显著	显著
层析点VII	显著	显著	显著

注：抑菌圈大于18mm为显著，12~18mm为良好，小于12mm为一般。

显，说明经甲醇溶解解析后的各层析点硅胶上仍含有部分抑菌活性成分。

#### 2.4 各抑菌活性成分的化学检识

将各层析点用甲醇溶解、浓缩，对经抑菌实验有效果者进行物理和化学检测，初步确定各层析点化学成分。

经薄层层析分离，层析点VI在紫外光下有较强的蓝色荧光，溶解液进行异羟肟酸铁反应试验，有红色产生，推测可能为香豆素类物质。

层析点VII溶解液加入1%三氯化铁溶液，呈墨绿色反应；加入新配制的10%氯化钠的0.5%明胶水溶液有白色沉淀产生，由此推测层析点VII溶解液中可能含有鞣质类化合物。

其他层析点甲醇溶解液可能因其中抑菌活性成分含量较少，所以经化学检识未能予以检出其化学成分。

### 3 结论与讨论

3.1 对红欒木叶中抑菌活性成分进行提取、初步分离及薄层制备，经抑菌实验和化学检识，初步确定红欒木叶中具抑菌活性的成分有香豆素类和鞣质类，其究竟为何种单体物质，有待进一步研究。

3.2 萃取液III的抑菌效果较原提取液VI还略为明显，

说明红欒木叶中的抑菌活性成分可能主要为易溶于乙酸乙酯的物质。

3.3 红欒木叶中抑菌活性成分乙酸乙酯萃取液薄层层析最佳展开剂为氯仿:丙酮:甲酸:水(60:35:5:2)。

3.4 薄层层析各点乙酸乙酯溶解液对供试菌种抑菌效果均不明显，这是否表明乙酸乙酯虽然对红欒木叶中的抑菌活性成分溶解性能较好，但对经薄层制备分离后吸附在硅胶上的抑菌活性成分的解析能力较差，该问题今后应尽快予以探明。

3.5 乙酸乙酯溶解后的各薄层层析点硅胶滤渣用甲醇溶解、离心、过滤、浓缩定容后，再进行抑菌实验，虽然对供试菌种有一定抑菌效果，但其抑菌效果均不及对照品四环素好；对甲醇溶解后的滤渣进行抑菌实验，其抑菌效果仍较明显，说明甲醇亦未能将各层析点中抑菌活性成分完全溶解解析下来。所以对于各层析点最佳溶解溶剂的选择还有待进一步探讨完善。

3.6 本实验只对萃取液III进行了薄层层析分离制备及抑菌研究，对仍有抑菌作用的萃取液IV和萃余液V未进行分离制备及抑菌实验，未分析其中抑菌物质的种类成分，该方面工作也有待进一步深入研究。

#### 参考文献：

- [1] 林昌梅, 黄瑞康, 黄程前. 红花欒木栽培[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001.
- [2] 中药大词典: 下册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991: 4092-4098.
- [3] 祁承经. 树木学: 南方本[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 286-287.
- [4] 中草药资源报告集[M]. 湘西土家族苗族自治州民族彩印厂, 1988.
- [5] 卢成英, 唐克华, 黄早成, 等. 红欒木花红色素提取物抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 107-110.
- [6] 卢成英, 徐东翔, 杜勇, 等. 欒木叶抑菌活性成分提取分离及活性检测[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 40-42.
- [7] 徐东翔. 植物资源化学[M]. 云南: 湖南科学技术出版社, 2004.
- [8] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 张红. 竹叶和六月霜提取液的抑菌比较研究[J]. 食品科技, 2002(7): 24-26.
- [10] 王允祥. 葡萄糖素抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(9): 23-25.

百种中国杰出学术期刊

中国期刊方阵双效期刊