

# 黄条金刚竹叶提取物抑菌活性研究

柳慧贞<sup>1</sup>, 高前欣<sup>2</sup>, 阙松宇<sup>1</sup>, 章莉莎<sup>1</sup>, 魏超军<sup>1</sup>, 倪勤学<sup>2\*</sup>

(1. 浙江农林大学天目学院, 浙江临安 311300; 2. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江临安 311300)

**摘要** [目的] 研究黄条金刚竹叶提取物的抑菌活性。[方法] 以黄条金刚竹叶的水提取物、石油醚提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物分别对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*) 6种菌进行抑菌活性研究。[结果] 试验表明, 黄条金刚竹叶的正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物对3种细菌都有一定的抑菌效果, 水提取物和石油醚提取物对细菌的抑菌效果不明显; 正丁醇提取物对3种真菌都有一定的抑菌效果。[结论] 研究可为竹叶提取物抑菌性的应用提供理论依据。

**关键词** 黄条金刚竹; 竹叶; 提取物; 抑菌作用

中图分类号 S795.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)04-01730-02

## Research on the Antibacterial Activity of Bamboo Leaves Extract of *Pleioblastus kongosanensis*

LIU Hui-zhen et al (Tianmu College, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300)

**Abstract** [Objective] To study anti-bacterial characteristics of bamboo leaves extracts from *Pleioblastus kongosanensis*. [Method] The water extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and n-butanol extract of *P. kongosanensis* bamboo leaf were adopted to study the anti-bacterial activity on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, yeast, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*. [Result] The results showed that, the n-butanol extract and ethyl acetate extract have a certain inhibitory effect on 3 kinds of bacteria, the antibacterial effect of water extract and petroleum ether is not obvious; n-butyl alcohol extract have a bacteriostatic effect on 3 species of fungi. [Conclusion] The study can provide theoretical basis for application of bamboo leaf extracts in anti-bacteria.

**Key words** *Pleioblastus kongosanensis* f. *aureo-striatus*; Bamboo leaf; Extract; Bacteriostatic effect

竹类是禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)多年生常绿植物。我国竹类资源丰富<sup>[1]</sup>, 有不少具有较高观赏价值和较高经济价值的稀有竹种: 如黄条金刚竹、金镶玉竹、箬竹和寒竹等<sup>[2]</sup>。竹叶在我国具有悠久的食用和药用历史。近年的研究表明, 竹叶中含有大量的黄酮、酚酸、葱醌类化合物、生物活性多糖、香豆素类内酯、特种氨基酸、芳香成分和锰、锌、硒等微量元素<sup>[3]</sup>。日本也曾从竹叶中提取出了一种高效、无毒、无副作用的天然食品防腐剂<sup>[4]</sup>。但目前相对于竹木和竹笋的利用来说, 竹叶作为剩余产物往往被舍弃, 造成了极大的资源浪费<sup>[5-6]</sup>。

黄条金刚竹(*Pleioblastus kongosanensis* f. *aureo-striatus*) 是竹亚科(Bambusoideae)北美箭竹超族(*Arundinariatae* keng et keng f.)北美箭竹族北美箭竹亚族(*Arundinarieae* Nees)大明竹属(*Pleioblastus*)大明竹亚属(*Subgen. Pleioblastus*)的一种观叶竹种<sup>[4]</sup>, 属地下混生型, 适于庭院、公园、四旁栽培, 有很高的观赏价值<sup>[7]</sup>。其原产于日本, 1986年被引进南京林业大学竹种园<sup>[8]</sup>, 现江浙和陕西等地有引种栽培。近年来在我国城市园林和道路绿化中有所应用, 但黄条金刚竹竹叶的生理活性研究还未见有文献报道, 笔者通过采用不同溶剂分级萃取竹叶的抑菌成分, 获得抑菌提取物, 并研究其抗菌特性, 为竹叶提取物抑菌性的应用提供理论依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂。303A-4型数显电热培养箱, 南京

大冉科技有限公司; EYELA N-1001S型旋转蒸发仪, 日本Eyela; 葡萄糖(AR), 营养琼脂(AR), 琼脂粉(AR)。

1.1.2 菌种及培养基。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*), 菌种均来自浙江农林大学林业与生物技术学院森林保护实验室; 牛肉膏蛋白胨固体培养基。

### 1.2 培养基的制作

1.2.1 细菌培养基。马铃薯培养基(PDA培养基): 称取马铃薯200g, 去皮, 切块煮沸30min(煮沸后开始计时), 然后用纱布过滤, 取滤液加葡萄糖20g和琼脂15~20g, 加热溶解后补足水至1000ml, 装入锥形瓶中(装瓶前必须是1000ml), 调整pH到6, 121℃灭菌30min。

1.2.2 霉菌培养基。分别称取牛肉膏10g、蛋白胨20g、NaCl 10g、琼脂30~40g, 加入到2000ml水中, 再加热至全部溶解, 用NaOH将pH调至7.2~7.4, pH试纸检测终点。装入锥形瓶中(装瓶前补至2000ml), 121℃灭菌20min。

1.3 黄条金刚竹叶及提取液的制备 在9月份采集黄条金刚竹后立即用自来水清洗, 沥干, 再用微波杀青和干燥(640W, 间隙加热2~3次, 每次60s), 最后将叶样置于烘箱(40±1)℃中2~3h, 烘干后称重, 粉碎过10~20目筛, 收集筛下物低温密封保存待用。

称取一定量竹叶粉末置于圆底烧瓶内加70%乙醇在60℃下热回流提取, 得到醇提取液。将提取液用旋转蒸发仪挥干, 称量, 溶于100ml蒸馏水中。水悬浮液再用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇逐级萃取, 得到石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相4个分级相。

基金项目 浙江省大学生科技创新活动(2011R412009)。

作者简介 柳慧贞(1989-), 女, 浙江丽水人, 本科生, 专业: 食品科学与工程, E-mail: 641237855@qq.com。\* 通讯作者。

收稿日期 2012-12-17

## 1.4 抑菌试验方法

1.4.1 抑菌圈试验。抗菌试验采用滤纸片法。

1.4.2 抑菌活性测定。用枪头已经灭菌的移液枪移取菌悬液 1.00  $\mu\text{l}$  均匀涂布平板培养基表面,将制备好的含有提取液的滤纸片放到含菌平皿上,细菌经 37  $^{\circ}\text{C}$ 、24 h,霉菌经 28  $^{\circ}\text{C}$ 、48 h 培养后,量取抑菌圈直径,以抑菌圈直径作为竹叶抑菌活性指标,直径越大说明抗菌活性越强。

另将杀菌过的滤纸片分别浸入水、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯 24 h,放在已涂布好菌液的培养基上,作为各自的空白对照。再将杀菌过的滤纸片浸入 100 mg/ml 的山梨酸钾溶液 24 h,放在已涂布好菌液的培养基上,作为阳性对照。

1.4.3 最低抑制浓度(MIC)的测定。两倍稀释法将提取物稀释至 25.000、12.500、6.250、3.125、1.563、0.781、0.390 mg/ml 的溶液备用。按“1.4.2”的方法对各浓度稀释液进行抑菌试验,以 24 h 没有菌生长的最低提取物浓度为该提取物的最低抑菌浓度(MIC)。

## 2 结果与分析

2.1 黄条金刚竹叶提取物对细菌的抑制效果 由不同溶剂分离得到的各萃取相对细菌的抑制效果如表 1 所示,以各萃取相的空白组抑菌圈直径为标准。表 1 数据表明,正丁醇相和乙酸乙酯相对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌 3 种细菌都有明显的抑制效果,其中正丁醇相抑制作用更强一些,尤其对枯草芽孢杆菌。而水相和石油醚相则对细菌无明显抑制效果。

表 1 黄条金刚竹叶提取物对细菌的抑菌效果

级相	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
水	-	-	-
乙酸乙酯	8.18	8.91	8.39
石油醚	-	-	-
正丁醇	10.21	13.62	11.343
山梨酸钾	-	-	-

2.2 黄条金刚竹叶提取物对霉菌和酵母的抑制效果 表 2 数据表明,正丁醇相对霉菌和酵母都有明显的抑制效果,而乙酸乙酯相只对酵母有抑制作用,对霉菌无效果。而水相和石油醚相则对霉菌和酵母均无明显抑制效果。

表 2 黄条金刚竹叶提取物对霉菌的抑菌效果

级相	抑菌圈直径/mm		
	黄曲霉	青霉	酵母菌
水	-	-	-
乙酸乙酯	-	-	11.48
石油醚	-	-	-
正丁醇	10.406	10.847	10.57
山梨酸钾	14.841	19.925	12.53

从结果可知,正丁醇相抑菌能力较强,具有广谱抑菌效果,对细菌、霉菌和酵母均有效。而水相和石油醚相则无抑制作用,说明抑菌成分属于中等极性。

2.3 最低抑菌浓度 将浓缩物按两倍稀释法稀释,得到表 3

最小抑制浓度数据,除金黄色葡萄球菌乙酸乙酯相的最低抑菌浓度为 7.81 kg/ml,正丁醇和乙酸乙酯相在浓度为 3.9 kg/ml 的时候对所有菌都有抑菌作用,表明黄条金刚竹叶的提取物在比较低的浓度下能抑制一些常见食品腐败菌。

表 3 最小抑菌浓度 kg/ml

菌类	级相	
	正丁醇提取物	乙酸乙酯提取物
黄曲霉	3.9	3.9
青霉	3.9	-
酵母菌	3.9	3.9
大肠杆菌	3.9	3.9
金黄色葡萄球菌	3.9	7.81
枯草芽孢杆菌	3.9	3.9

## 3 结论

试验表明,正丁醇相对细菌、霉菌、酵母各试验菌均具有抑制效果;乙酸乙酯相仅对酵母有抑制作用;水相和石油醚相对各试验菌无抑制作用。竹叶中黄酮类、酚类、多糖类等成分都具有抑菌特性。某些黄酮类和酚类溶于正丁醇,由此推测,正丁醇相中的抑菌成分可能为黄酮化合物或酚类,还需进行更深入的研究才能确定抑制成分的种类。

目前已有多位学者对竹叶抑制效果从不同角度进行了大量研究。张伟等测定了淡竹竹叶提取液对食品致病菌的抑制作用<sup>[9]</sup>。结果表明,竹叶提取液对伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、魏氏梭菌、肉毒梭菌这些食品致病菌,有较强的抑制作用,其中对伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、魏氏梭菌具有更强烈的抑制作用。张慧等对箬竹(*Indocalamus tessellatus*)的水提取物和丙酮提取物研究表明,对水果和豆腐干均有较好的保鲜效果<sup>[10]</sup>。黄金间碧竹、绿竹、青杆竹<sup>[11]</sup>、夹竹桃叶<sup>[12]</sup>、金镶玉竹<sup>[13]</sup>叶都表现出良好的抑菌特性。我国有丰富的竹子资源,竹子加工产生大量的竹叶副产品,可以通过提取竹叶抑菌活性成分来提升竹子加工附加值,因此开发利用前景广阔。

竹叶提取物的安全性也是在开发利用中必须要考虑的问题。张英对竹叶提取物的安全性研究表明,竹叶黄酮粉各剂量组对大鼠 30 d 喂养试验未见明显毒性反应,得出其无作用剂量为 5.0 g/kg 体重<sup>[14]</sup>。卫生部 2002 年公布了 87 种药食两用物品名单<sup>[15]</sup>,淡竹叶列入其中,但其他种类的竹叶未入选。因此,虽然对竹叶的功能性研究数量很多,但缺乏系统性,不能为竹叶功能食品的开发提供有力的证据,今后在这方面还需要加强协作,使得竹叶的功能性和安全性得到认可,才能真正实现开发利用。

## 参考文献

- [1] 吴平. 中国发展竹产业的优势、问题与对策[J]. 世界竹藤通讯, 2010, 8(6): 28-32.
- [2] 刘云. 我国竹类资源开发利用前景和途径[J]. 资源科学, 1988(3): 25-30.
- [3] 张英. 天然功能性添加剂竹叶提取物[J]. 精细与专用化学品, 2002(7): 20-22.

(下转第 1733 页)

匀,放置 30 min 待测。已知量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。汞的浓度在 0~2.0  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内呈线性,线性回归方程为  $I_f = 462.335C - 19.452, r = 0.9999$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 精密度试验** 取处理好的供试样品 1 份,连续进样 7 次,测得样品中砷、汞含量,结果见表 2。

表 2 人参海狗丸样品分析测试结果

元素	重复// $\mu\text{g/L}$							平均值// $\mu\text{g/L}$	SD	RSD//%
	1	2	3	4	5	6	7			
砷	12.206	11.919	12.140	12.310	11.980	11.832	12.315	12.10	0.192	1.59
汞	1.609	1.630	1.608	1.592	1.619	1.573	1.612	1.60	0.019	1.16

**2.2 重复性试验** 分别取同批样品 6 份,每份 0.5 g,精密称量,按照该方法测定,结果 As 为 7.45、7.11、6.84、7.80、7.24、6.92  $\mu\text{g/L}$ ,RSD 值为 4.94%;汞为 0.81、0.76、0.74、0.83、0.77、0.79  $\mu\text{g/L}$ ,RSD 值为 4.25%。

**2.3 检出限试验** 重复进样空白溶液 11 次,记录吸光度值。以吸光度值标准偏差的 3 倍与标准曲线的斜率的比值,计算得到该方法的检出限,砷为 0.043  $\mu\text{g/L}$ ,汞为 0.008  $\mu\text{g/L}$ 。

**2.4 回收率试验** 分别在人参海狗丸样品中加入低、中、高浓度的砷、汞标准使用液,按试验方法进行测定,测定结果及回收率见表 3。

表 3 回收率测试结果

项目	砷				汞			
	本底值 $\mu\text{g/L}$	加标量 $\mu\text{g/L}$	测定值 $\mu\text{g/L}$	回收率//%	本底值 $\mu\text{g/L}$	加标量 $\mu\text{g/L}$	测定值 $\mu\text{g/L}$	回收率//%
1	1.26	4.00	5.430	104.2	0.16	0.80	0.985	103.1
2			5.118	96.5			0.959	99.9
3			5.385	103.1			0.936	97.0
4		8.00	9.634	104.7		1.20	1.469	109.1
5			8.956	96.2			1.387	102.3
6			10.018	109.5			1.326	97.2
7		12.00	13.453	101.6		1.60	1.830	104.4
8			14.106	107.1			1.689	95.6
9			13.588	102.7			1.850	105.6

## 3 结论与讨论

在一定范围内,灯电流越大,荧光强度信号也越强,灵敏度越高,但过大的灯电流会缩短灯的使用寿命;负高压的调节与灯电流没有关系,负高压越大则荧光信号就越强,同时噪声也增大,稳定性就越差,光电倍增管有一定的耐压范围,负高压与灵敏度呈指数关系,所以根据具体的荧光强度进行

选择合适的负高压。试验发现,载气流量也对结果产生影响,载气流量过大会造成气流速度快,冲淡原子浓度,导致原子化效率降低,从而影响灵敏度,流量过小会造成信号不稳定。经试验选择负高压 300 V,灯电流为砷 60 mA,汞 20 mA,炉高为 8 mm,载气为 500 ml/min 时,砷、汞的响应都较高且稳定。

砷、汞是易挥发性元素,常用湿法消解。由于微波消解具有消解速度快,挥发性元素不易损失等特点,但微波消解的样品种类不同,所采取的消解条件也不相同,重复多次试验后,最终选择硝酸和过氧化氢混合液为消解液,采用梯度升温的微波消解方式消解样品。当微波消解条件为表 1 所示,可达到良好的消解效果。

经过精密度和回收率试验发现,该方法的 RSD < 5%,回收率为 95%~110%,说明该方法加标回收率理想。采用微波消解处理人参海狗丸样品,并用双道氢化物发生原子荧光光谱法同时测定样品的砷、汞含量,方法简单、快速、准确、灵敏度高,而且同时测定砷、汞既方便又节省试剂,可广泛用于此类样品的实验室检测。

## 参考文献

(上接第 1731 页)

- [4] 丁明,陈少妃,徐耀华. 黄条金刚竹中总黄酮的提取及含量测定[J]. 浙江农业科学,2011(4):910-913.
- [5] 李洪玉,孙静芸,戴诗文. 竹叶化学成分研究[J]. 中药材,2003,26(8):562-563.
- [6] 倪向梅,曹光群. 竹叶提取物的体外抑菌及抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(4):717-721.
- [7] 周芳纯. 中国观赏竹种简介[J]. 竹类研究,1993,49(2):68-87.
- [8] 王波,汪奎宏,李琴,等. 黄条金刚竹生长规律研究[J]. 浙江林业科技,2008,28(6):16-19.
- [9] 张伟,檀建新,贾英民,等. 竹叶对食品致病菌抑菌作用[J]. 中国食品学报,1998,2(1):29-33.
- [10] 张慧,林海萍,盛恩浩,等. 箬竹提取物抑菌活性研究[J]. 浙江林业科

- [1] 运行,安迎雪. 微波消解-原子荧光光谱法测定宫瘤消片中的砷、镉[J]. 药物分析杂志,2012,32(2):289-291.
- [2] 孙楠,薛建. 中药中重金属测定的研究进展[J]. 中草药,2005,36(12):1907-1909.
- [3] 尹利辉,王瑾. 药品中汞的分析进展[J]. 药物分析杂志,2005,25(4):480-483.
- [4] 杨杰,王竹天,杨大进. 食品中总汞检测方法的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,2008,20(4):346-351.
- [5] 曾晓丹,刘彩云,宋影,等. 氢化物发生-原子荧光光谱法同时测定中药材中砷和汞[J]. 光谱实验室,2010,27(2):673-676.
- [6] 宋青云,肖昭蓉,陈晓红. 氢化物-原子荧光法测定 5 种补益中药中的汞·砷·铋[J]. 安徽农业科学,2009,37(17):7827-7828.
- [7] 技,2010,30(3):38-41.
- [11] 李惠珍,陈朝洋. 天然食品防腐剂-竹叶的研究 I. 抗菌物质的提取、抗菌活性及稳定性[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,1990,6(2):74-82.
- [12] 李萍,谭芸,龚枕,等. 夹竹桃叶提取液的抑菌作用研究[J]. 湖南农业科学,2009(11):94-95.
- [13] 贾桂云,邹润英,郭飞燕. 竹叶提取物抑菌效果研究[J]. 海南师范大学学报:自然科学版,2010,23(4):420-422.
- [14] 张英. 天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮[J]. 中国食品添加剂,2002(3):54-58,66.
- [15] 卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知[EB/OL]. (2002-02-28) <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwshjdt/s3593/200810/38057.htm>.