

# 杭黄菊提取物的体外抗菌活性研究

宋雷<sup>1\*</sup>, 绽春蕊<sup>1</sup>, 杨世英<sup>1</sup>, 马伟林<sup>1</sup>, 马贤<sup>1</sup>, 柳军席<sup>2</sup>

<sup>1</sup>西北民族大学医学院, 兰州 730030; <sup>2</sup>中国科学院兰州化学物理研究所甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000

**摘要:** 本文研究杭黄菊花水提物和醇提物对常见的人体肠道致病菌的抑菌活性。采用超声波提取法获得杭黄菊提取物, 用琼脂扩散法测试该粗提物对受试菌的抑菌作用, 并用倍比稀释法确定最小抑菌浓度。实验结果表明杭黄菊花水提物和醇提物对常见的 7 种肠道致病菌具有较强的抑制作用, 尤其对变形杆菌、痢疾杆菌和伤寒杆菌的抑制作用较强。采用相同提取方法的高浓度提取物比低浓度提取物具有更显著 ( $P < 0.01$ ) 的抑菌作用, 而相同浓度的水提物比醇提物抑菌效果更为明显 ( $P < 0.01$ ), 水提物对相同细菌的最低抑菌浓度 (MIC) 低于醇提物。杭黄菊提取物对肠道致病菌有明显的抑制作用, 可被开发用于抗菌新药研制。

**关键词:** 杭黄菊; 提取物; 肠道菌群; 抑菌作用

中图分类号: R284.2; R285.5; TS201.3 文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.017

## Anti-bacterial Activity of *Chrysanthemum morifolium* Ramat

SONG Lei<sup>1\*</sup>, ZHAN Chun-ru<sup>1</sup>, YANG Shi-ying<sup>1</sup>, MA Wei-lin<sup>1</sup>, MA Xian<sup>1</sup>, LIU Jun-xi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; <sup>2</sup>Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** The anti-bacterial effects of crude extracts of flower of *Chrysanthemum morifolium* Ramat (CMR) on common human intestinal bacteria were investigated in this study. Anti-bacterial activities of ultrasonic extracts of CMR flower were tested by agar diffusion method, and minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined by multi-proportion dilution method. The results showed that both aqueous extract and alcohol extract showed high inhibitory effect on 7 common human intestinal bacteria, especially on *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhi*. The anti-bacterial effects of aqueous and alcohol extracts with higher concentration were significantly obvious ( $P < 0.01$ ) than that of lower concentration, and aqueous extract showed prominent ( $P < 0.01$ ) anti-bacterial effects than alcohol extract at the same concentration. Furthermore, the MIC of aqueous extract lower than that of alcohol extract for the same bacterium.

**Key words:** Yellow chrysanthemum; extracts; intestinal bacteria; bacteriostasis

我国拥有丰富的药用植物资源, 其中很多药用植物都具有突出的抑菌作用<sup>[1]</sup>。药用植物是绿色无毒性的, 在大多数情况下易得、价廉并没有副作用, 可以避免由于抗生素滥用而带来的细菌耐药性问题, 同时减少化学合成药物的免疫抑制和超敏反应等严重不良反应, 所以无论是发展中国家还是发达国家对以天然植物为基础的抗菌治疗的需求都在不断增加<sup>[2]</sup>。

菊花系菊科植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的干燥头状花序, 在我国长期的药用栽培历史中形成了不同栽培变种, 如杭白菊、杭黄菊、黄

菊、毫菊、滁菊、淮菊、贡菊等, 具有散风清热、平肝明目等功效, 用于治疗风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明, 菊花具有抗菌、抗炎、抗氧化、舒血管、调血脂、抗肿瘤、驱铅等多种药理作用<sup>[4]</sup>。由于栽培地区的差异及成品加工方法的不同, 杭白菊和杭黄菊之间在所含成分和含量方面存在较大差异, 导致其药效的差异<sup>[5]</sup>。本文以人体肠道常见致病菌为供试菌种, 进行杭黄菊粗提取物抑菌的试验研究, 为杭黄菊的综合开发利用提供基础理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 药材与菌种

杭黄菊干燥花蕾 (购自兰州市德生堂大药房),

收稿日期: 2013-07-02 接受日期: 2013-11-21

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (31920130036); 西北民族大学教学科研启动费 (xbmuyjrc201120)

\* 通讯作者 Tel: 86-931-2938150; E-mail: yxsonglei@xbmu.edu.cn

用药物粉碎机粉碎后用保鲜袋封装好,置于 4 °C 冰箱保存备用。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) 7 种肠道菌用于本研究,均由西北民族大学医学中心实验室提供。

### 1.1.2 试剂

MH 培养基(杭州微生物试剂厂),体积分数 95% 的乙醇(分析纯),0.9% 生理盐水,自制蒸馏水,超纯水。

### 1.1.3 主要仪器

电子天平(德国 Sartorial 公司);ZHWHY-103D 恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司);Hfsafe-1200 生物安全柜(Heal Force Development Ltd.);HPX-9272 mbe 电显电热培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);KG19V51T 冰箱(西门子电器有限公司);DF-30 中药粉碎机(山东三阳包装设备公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发仪(杭州明远仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 杭黄菊花粗提物制备

称取经药物破碎机粉碎并过 60 目筛的杭黄菊花 10 g,以去离子水及 95% 乙醇为溶剂,料液比 1:10,用超声波辅助提取,每次提取 30 min 后过滤,滤渣再加适量的溶剂进行提取,提取三次,合并滤液,用旋转蒸发仪干燥挥发除去提取剂,得到杭黄菊花的水或醇提物浸膏。杭黄菊花水和醇提物浸膏分别用超纯水溶解为 500 mg/mL 和 200 mg/mL 的溶液并用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后备用。

### 1.2.2 菌液的制备

将各实验菌种接种于营养琼脂平板上培养使其活化,实验前挑取单个菌落接种于 MH 肉汤中 37 °C 培养 12~16 h,作为原菌液。

### 1.2.3 体外抑菌试验

采用琼脂扩散法<sup>[6,7]</sup>,用活菌平板计数法将受试菌液浓度调为  $10^8 \sim 10^9$  cfu (Colony forming unit)/L 的细菌稀释液,取 100 μL 用涂布棒均匀涂于 MH 平板上,利用 6 mm 打孔器打孔后用洗耳球洗出孔中的琼脂,分别滴加 200 mg/mL 和 500 mg/mL 的杭黄菊花粗提取药液,至液面与 MH 平板表面平行即可。

每种菌做 2 个平行,实验重复 3 次,以无菌生理盐水处理做为对照,将平板 37 °C 培养 16~18 h 后,通过测量抑菌圈直径来比较抑菌效果,数据以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 Microsoft Excel 软件进行统计处理,组间比较采用 *t* 检验。

### 1.2.4 最小抑菌浓度的测定

采用琼脂平板连续稀释法<sup>[8]</sup>测定杭黄菊不同提取物的 MIC,取上述 500 mg/mL 的杭黄菊花水或醇提物溶液并倍比稀释共得到 6 个浓度供试液,分别为 500、250、125、62.50 mg/mL、31.25 和 15.62 mg/mL,设生理盐水为对照组。具体操作如下:取已灭菌的培养基冷却到 70 °C 左右,取 9 mL 加入到培养皿中,迅速加入 1 mL 的供试液,混匀,冷却,加 100 μL 菌悬液于培养基上涂布均匀,置 37 °C 培养,24 h 后未长菌的最小浓度即为 MIC。各浓度药液对每种实验菌均做 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 杭黄菊提取物对常见肠道菌的抑菌作用

杭黄菊超声水提法的提取率为 20%;杭黄菊超声醇提法的提取率为 15.3%。各提取液不同浓度下对常见肠道病原菌的抑制作用如表 1 所示,杭黄菊花水提物和醇提物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌等 7 种常见肠道菌的抑菌效果显著,抑菌圈直径均大于 10 mm,具有潜在的广谱抗菌活性,而且高浓度提取物比低浓度提取物的抑菌作用更强,相同提取方法不同浓度之间比较差异极显著。提取方法不同对抑菌活性亦有影响,水提物的抑菌效果比醇提物更为明显,相同浓度下不同提取方法之间差异均极显著(表 1)。水提物抑菌活性强可能与其主要含黄酮类生物碱的溶解性有关,水提物对变形杆菌、伤寒杆菌和痢疾杆菌极敏感,对其他菌种也高度敏感,而醇提物仅在高浓度时对除产气和大肠杆菌以外的菌种高度敏感,在低浓度时对 7 种肠道致病菌仅是中度敏感。

### 2.2 最小抑菌浓度测定结果

杭黄菊花提取物的最低抑菌浓度结果见表 2。杭黄菊花水提物和醇提物的 MIC 有所差异,水提物的抗菌有效性进一步被 MIC 值所证实,杭黄菊花水提物对金葡菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 31.25 mg/mL,对大肠杆菌的最小抑菌浓度大于 62.5 mg/mL。杭黄菊花醇提物对金葡菌的最小抑菌浓度大于 31.25 mg/mL,而对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最

表 1 杭黄菊提取物对常见肠道菌的抑制活性结果 (mm,  $n=3, \bar{x} \pm s$ )Table 1 The inhibitory activities of CMR flower extracts on 7 common intestinal pathogenic bacteria (mm,  $n=3, \bar{x} \pm s$ )

细菌名称 Name of bacteria	水提物 Aqueous extract		醇提物 Alcohol extract		生理盐水 NS 0.9%
	200 mg/mL	500 mg/mL	200 mg/mL	500 mg/mL	
变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	22.17 ± 0.76 <sup>△△</sup>	24.83 ± 0.29 <sup>**△△</sup>	14.50 ± 0.50	17.50 ± 0.50 <sup>**</sup>	-
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	17.83 ± 0.29 <sup>△△</sup>	22.83 ± 0.76 <sup>**△△</sup>	14.17 ± 0.29	16.67 ± 0.58 <sup>**</sup>	-
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	17.83 ± 0.76 <sup>△△</sup>	22.83 ± 0.76 <sup>**△△</sup>	13.17 ± 0.29	16.83 ± 0.29 <sup>**</sup>	-
痢疾杆菌 <i>Sh. dysenteriae</i>	21.17 ± 0.76 <sup>△△</sup>	23.50 ± 0.50 <sup>**△△</sup>	13.83 ± 0.29	15.83 ± 0.29 <sup>**</sup>	-
伤寒杆菌 <i>S. typhi</i>	20.83 ± 0.29 <sup>△△</sup>	24.83 ± 0.29 <sup>**△△</sup>	11.67 ± 0.58	16.00 ± 0.00 <sup>**</sup>	-
产气杆菌 <i>En. aerogenes</i>	14.67 ± 0.58 <sup>△△</sup>	18.50 ± 0.50 <sup>**△△</sup>	11.17 ± 0.76	14.83 ± 0.29 <sup>**</sup>	-
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	16.00 ± 0.50 <sup>△△</sup>	18.67 ± 0.58 <sup>**△△</sup>	10.67 ± 0.58	14.33 ± 0.58 <sup>**</sup>	-

注:抑菌圈直径在 20mm 以上为极敏,15~20 mm 为高敏,10~14mm 为中敏,10mm 以下为低敏。“-”表示无抑菌圈。提取物浓度间差异<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;提取方法之间差异<sup>△△</sup>  $P < 0.01$ 。

Note: The diameter of inhibition zone above 20 mm is extremely sensitive, 15-20mm is highly sensitive, 10-14 mm is medium sensitive, below 10 mm is low sensitive. “-” indicates no antibacterial circle. Difference between different concentration groups<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  and between different extraction methods<sup>△△</sup>  $P < 0.01$ .

小抑菌浓度为大于或等于 62.5 mg/mL。抑制效力 菌,水提物和醇提物基本一致。

依次为金黄色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 大肠杆

表 2 杭黄菊活性提取物的最低抑菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts of CMR flower

提取物 Extract	MIC (mg/mL)		
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>
水提物 Aqueous extract	31.25 ± 0.00	> 62.50	31.25 ± 0.00
醇提物 Alcohol extract	> 31.25	> 62.50	62.50 ± 0.00
生理盐水 NS	ND	ND	ND

ND: 未检测出。

ND: not detected.

### 3 讨论

杭黄菊提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、伤寒杆菌、产气杆菌和痢疾杆菌均有明显的抑制作用,其中杭黄菊水提物对变形杆菌、伤寒杆菌和痢疾杆菌为高度敏感,抑菌圈直径 23.50~24.83 mm。并且杭黄菊的水提物抗菌活性比醇提物更佳,表明抗菌复合物的极性使其更易被水提取,使用水溶液不会对其抗菌生物活性产生负面影响。但是我们仅仅检验了粗提物的活性,结果中并没有指明抗菌物质的成分,但获得的结果显示其具有广谱的抗菌活性,这对杭黄菊的传统用途提供了数据支持,显示了其在抗菌药物研发中的潜力。对革兰氏阳性菌、阴性菌、需氧菌和厌氧菌的广谱性抗菌的机制还有待进一步深入研究。

近年来由于各种抗生素类药物的广泛使用,使

得耐药菌群不断增加<sup>[9]</sup>,导致许多细菌引起的感染性疾病的治疗成为难题,而随着人们对生活质量要求的提高,许多有致癌可能性的食品防腐剂越来越引起人们的警惕。菊花含有丰富的挥发油、嘌呤、氨基酸、黄酮类等成分<sup>[10]</sup>。本实验采用超声辅助提取方法,未使用挥发油提取器,所以粗提物中黄酮类和绿原酸等化合物的作用可能更为突出。黄酮类化合物的抑菌作用被越来越多的研究所证实,它可以作用于微生物的细胞膜,改变细胞膜的流动性,甚至是破坏细胞膜的完整性导致细胞膜内的小分子物质外渗<sup>[11]</sup>。本文通过对杭黄菊提取物抑菌效果的比较发现,天然环境中的杭黄菊具有高活性的明显抑菌效果,为天然抗菌新药及天然高效、低毒食品添加剂的开发和应用提供了基础实验室依据,但体外试验未考虑到一种细菌对一种抗菌药在体内的动力学和复杂的生物学属性,因此,体外试验并非总能预测到

药物在患者体内的成功治疗,还需进一步地进行体内试验和抗菌机制的研究。

#### 参考文献

- 1 Wang X(王雄), Zhao ZG(赵志光), Shao AH(邵爱华), *et al.* *In vitro* bacteriostasis of eight Chinese herbal medicines on common pathogenic bacteria. *J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报)*, 2010, 45: 25-29.
- 2 Ghosh A, Das BK, Roy A, *et al.* Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med*, 2008, 62: 259-262.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: Chinese medical science and Technology Press, 2010. Vol I, 292.
- 4 Zhang QH(张清华), Zhang L(张玲). Research advance in chemical composition and pharmacological action of *Chrysanthemum morifolium*. *Food Drug(食品与药品)*, 2007, 9: 60-63.
- 5 Guan YL(官艳丽), Wang YJ(王燕军), Shi L(石琳), *et al.* GC-MS analysis of the essential oil from Hangbaiju and Hanghuangju. *Chin J Anal Lab(分析实验室)*, 2007, 26: 77-80.
- 6 Ma XR(马绪荣), Su DM(苏德模). *Pharmaceutical Microbial Test Instructions(药品微生物检验手册)*. Beijing: Science Press, 2000. 265.
- 7 Bar W, Bade-Schumann U, Krebs A, *et al.* Rapid method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics. *J Microbiol Meth*, 2009, 77: 85-89.
- 8 Zhou BJ(周邦靖). *Bacteriostatic Action of Traditional Chinese Medicine and Its Determination Method(常用中药的抑菌作用及其测定方法)*. Chongqing: Chongqing Science and Technology Press, 1987. 302-303.
- 9 Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ*, 1998, 317: 647-650.
- 10 Zheng ZH(郑占虎), Dong ZH(董泽宏), She J(余靖). *Modern Research and Application of Traditional Chinese Medicine, Volume 5(中药现代研究与应用, 第五卷)*, Beijing: Academy Press, 1998. 4093.
- 11 Mbaveng AT, Ngameni B, Kuete V, *et al.* Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *J Ethnopharmacol*, 2008, 116: 483-489.
- 4 Aleksander Siger, Jaroslaw Czubinski, Piotr Kachlicki, *et al.* Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *J. Food Composition and Analysis*, 2012, 25: 190-197.
- 5 Lu M, Yuan B, Zeng M, *et al.* Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Res Int*, 2011, 44: 530-536.
- 6 Zhang Q(张强), Wang SH(王松华), Sun YJ(孙玉军), *et al.* Study on antioxidant activity *in vitro* of onion flavonoids. *Transac Chin Soc Agri Mach(农业机械学报)*, 2009, 40: 139-142.
- 7 He G(何改). Studies on the optimum extraction of flavonoids from crataegus leaves. *Food Res Dev(食品研究与开发)*, 2002, 23: 15-17.
- 8 Zhao EL(赵二劳), Liang Z(梁泽), Zhang HR(张海容). Study on the nitrite scavenging ability with seabuckthorn Leaf Extract. *Sci. Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2006, 27(3): 81-82.
- 9 Li L(李琳), Jiang XF(姜新发), Zhang ZB(张志斌), *et al.* Study on antioxidative activities of extraction from loquat peel and mango peel. *J UEST Chin(电子科技大学学报)*, 2003, 32: 755-759.
- 10 Xie LL(解利利), Zhang M(张懋), Sun JC(孙金才). Study on antioxidation activities of freezing blueberry polyphenol. *J Food Sci Biotechnol(食品与生物技术学报)*, 2011, 30: 819-821.
- 11 Zhu PP(朱沛沛), Li J(李嘉乐), Zeng Y(曾懿), *et al.* Study on extraction of polyphenol from rapeseed meal and the activity of eliminating hydroxy radical. *Sci Tel Cereal Oils(粮油食品科技)*, 2013, 21: 23-25.
- 12 Liu CL(刘春兰), Liu HQ(刘海青), Deng YH(邓义红), *et al.* Study on the purification and scavenging free radical activity of water soluble polysaccharide of leave in *Hippocampoides L.* *J Chin Med Mat(中药材)*, 2006, 29: 151-154.

(上接第 441 页)