

南蛇勒提取物抑菌作用研究

余旭亚, 李涛, 汪帅, 金巍伟, 刘殿君
(昆明理工大学 生物与化学工程学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 采用打孔法和滴注法测定了南蛇勒 95% 乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、镰刀菌的抑菌作用. 结果表明: 20% 南蛇勒提取物对革兰氏阴性菌的抑菌作用明显, 绿脓杆菌的抑菌环直径为 17.62 ± 0.52 mm, 大肠杆菌的为 11.62 ± 1.30 mm, 对 4 种供试菌的最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 2.0%, 0.5%, 0.25%, 0.05%.

关键词: 南蛇勒; 抑菌; 植物药材

中图分类号: Q949.95 文献标识码: A 文章编号: 1007-855X(2006)03-0069-03

Study on the Antimicrobial Effect of Extracts from *Caesalpinia Minax* Hance

YU Xu-ya, LI Tao, WANG Shuai, JIN Wei-wei, LIU Dian-jun

(Faculty of Biological and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract Boring incubation and dropping incubation are used to determine the antimicrobial activities of the extracts from *Caesalpinia minax* Hance by 95% ethanol in this paper. Tested microbial species are *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Fusarium sp.*. The results show that the extracts from *Caesalpinia minax* Hance has strong inhibition effects on Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria and diameter of inhibition cycle of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are 17.62 ± 0.52 mm and 11.62 ± 1.30 mm respectively when the concentration of the extract is at 20%. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the extract are shown as following: *Escherichia coli* 2.0%; *Staphylococcus aureus*, 0.5%; *Pseudomonas aeruginosa*, 0.25%; *Fusarium sp.*, 0.05%.

Key words *Caesalpinia minax* Hance; antimicrobial effect; vegetation medicinal materials

0 引言

南蛇勒, 拉丁文: *Caesalpinia minax* Hance, 豆目, 苏木科, 别名喙果云实, 老鸦枕头, 石莲子, 打鬼棒; 生长于山坡林中或灌木中, 主要分布在西双版纳、德宏州一带, 当地居民用其根、嫩叶、籽入药, 具有解热祛风、消肿散结的功效。^[1] 有研究表明, 南蛇勒具有抗 RSV、para-3 (para-influenza virus type 3) 病毒活性及抑制小鼠黑色素瘤细胞 K1735M 2 增殖的活性^[2-3]. 笔者从南蛇勒籽中提取抑菌物质, 用几种常见的微生物接种, 进行抑菌作用研究, 以期在南蛇勒的开发利用找到新的途径.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 南蛇勒, 购于云南芒市.

1.1.2 供试菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由昆明理工大学生物工程实验室提供; 镰刀菌 (*Fusarium sp.*) 由云南大学提供.

收稿日期: 2005-04-30 基金项目: 云南省教育厅青年基金项目资助 (项目编号: 5Y0142B)

第一作者简介: 余旭亚 (1969~), 男, 硕士, 副教授. 主要研究方向: 生化药物. E-mail: yumuxuya@sina.com.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3 培养基

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌为 LB 培养基, 镰刀菌为马铃薯培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 南蛇勒提取物的制备

去除南蛇勒外壳, 取其籽叶, 于 37℃ 烘干, 将其研磨成粉, 称取 15.0 g 南蛇勒粉末放入滤纸包内, 加入 95% 的乙醇 100 mL, 用索式抽提器抽提, 水浴加热, 温度控制在 90℃, 回流抽提 36 h, 将抽提物蒸干, 用乙酸乙酯(打孔法用)和二甲基亚砜(滴注法用)溶解, 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 样品溶液的制备

用乙酸乙酯溶解物分别稀释成 20%, 2%, 0.2%, 0.02%, 0.002% 浓度, 用二甲基亚砜溶解物分别稀释成 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.1%, 0.05%, 0.025% 浓度备用。

1.2.3 供试菌株悬浮液的制备^[4]

在超净工作台上进行无菌操作。增菌培养后, 用生理盐水将菌悬液稀释成含菌量(集落形成单位, cfu): 细菌为 1.0×10^8 , 真菌为 1.0×10^6 。

1.2.4 抑菌环的测定

采用打孔法^[5], 在直径为 9 cm 的平板上倾倒培养基, 厚度约 6 mm, 待冷却后每个平板加菌液 100 μ L, 涂布均匀后用无菌钢管打 3 个孔, 每孔直径为 4 mm, 在每个孔中先加 0.7% 的琼脂溶液 10 μ L 封底, 再加稀释好的药物溶液 40 μ L, 对照孔分别加入含相应浓度的乙酸乙酯蒸馏水溶液, 放入 37℃ 培养箱培养, 真菌培养 48 h, 细菌培养 24 h 测量抑菌环直径, 取平均值。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

采用滴注法^[6], 将不同浓度的二甲基亚砜样品溶解液 4 mL 与 36 mL 培养基的在三角瓶中混匀, 使培养基中药物浓度为原来的 10^{-1} , 倒平板, 待凝固后, 吸取菌液 10 μ L 滴种在培养基上, 每个平板滴 8 滴, 二甲基亚砜作空白。实验重复 3 次。待菌液吸收后, 平皿平放培养箱中, 37℃ 培养, 连续 4 d 观察菌落生长情况。对于细菌, 以培养 24 h 不长菌的浓度为最低抑菌浓度(MIC), 4 d 不长菌的浓度为最低杀菌浓度(MBC); 对于真菌, 以培养 2 d 不长菌的浓度为最低抑菌浓度(MIC), 4 d 不长菌的浓度为最低杀菌浓度(MBC)。

1.3 统计分析

抑菌环结果以 $\bar{x} \pm s$, 用 student-t 检验两组数据之间的显著性差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为存在显著性差异; 当 $P < 0.01$ 时, 认为存在极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 南蛇勒提取物的抑菌效果

将南蛇勒提取物用乙酸乙酯溶解, 用蒸馏水稀释成 20%, 2%, 0.2%, 0.02%, 0.002% 的浓度, 分别加入已涂各菌液平皿的孔中, 每一浓度做 8 个孔, 培养后测定抑菌环直径, 实验结果见表 1。

表 1 不同浓度南蛇勒提取物的抑菌效果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab 1 The inhibition effect of extracts from *Caesalpinia minax* Hance on bacteria

南蛇勒提取物浓度 /%	抑菌环直径 /mm			
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌	镰刀菌
0	4.00 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00	4.12 \pm 0.12	4.00 \pm 0.00
20.0	11.62 \pm 1.30	9.65 \pm 0.58	17.62 \pm 0.52	9.88 \pm 0.64
2.0	8.75 \pm 1.28	5.92 \pm 0.59	10.38 \pm 0.74	5.62 \pm 0.52
0.2	6.50 \pm 0.76	5.06 \pm 0.46*	6.88 \pm 0.64	5.25 \pm 0.46
0.02	5.25 \pm 0.46	4.32 \pm 0.54*	6.50 \pm 0.92*	4.62 \pm 0.74
0.002	4.38 \pm 0.52	4.00 \pm 0.00	5.12 \pm 0.25	4.00 \pm 0.00
P 值	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.01

* 为 $P > 0.05$

从表 1 中可以看出, 随着南蛇勒提取物浓度的增加, 其对 4 种供试菌的抑菌效果越明显, 尤其对绿脓杆菌的抑菌效果较好, 大肠杆菌次之, 对金黄色葡萄球菌和镰刀菌的抑菌效果较差, 在南蛇勒提取物浓度 $\leq 0.2\%$ 时, 其对金黄色葡萄球菌和镰刀菌的抑菌效果差异不显著, 基本不存在抑菌作用。

2.2 MIC 和 MBC 的测定

用滴注法测定了南蛇勒提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、镰刀菌 4 种供试菌的 MIC 和 MBC, 结果见表 2

绿脓杆菌和其他革兰氏阴性杆菌的细胞壁外, 有一层主要由蛋白质组成的外膜。外膜蛋白可分为结构蛋白、转运蛋白和微孔蛋白等, 它们具有不同的功能。有的转运营养成分、无机盐等进入菌体, 有些药物和物质可以通过微孔蛋白形成的孔道进入菌体, 但一些大分子物质则不能通过外膜进入菌体, 某些大分子的药物也不能通过外膜进入菌体, 这是抗绿脓杆菌药物较少的原因之一。因此, 寻找抑制绿脓杆菌和其他革兰氏阴性杆菌外膜合成的药物, 可使一些原来不能透过绿脓杆菌外膜的物质进入菌体, 抑制菌体的生长繁殖, 也可寻找既能抑制外膜合成, 又有抗菌作用的药物^[7]。从表 2 看出, 南蛇勒提取物对供试菌绿脓杆菌的 MIC 为 0.25% , MBC 为 0.5% , 表明其为具有抗菌作用的药物, 是否为抑制外膜合成的药物, 机制尚不清楚。据文献报道, 南蛇勒提取物中含有呋喃二萜内酯, 具有细胞毒活性^[1], 其体外抗 RSV 活性为 $IC_{50} = 24.2 \mu\text{g}/\text{mL}$, $TC_{50} = 138.3 \mu\text{g}/\text{mL}$; 该化合物在组织培养中也显示中度的抗白血病细胞 (L_{1210}) 的细胞毒活性 IC_{50} 为 $50 \sim 60 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[8]。经芦丁标准比色法测定, 南蛇勒提取物中黄酮的含量为 $2.73 \text{mg}/\text{mL}$, 也有可能是黄酮类化合物的存在显示其抑菌活性^[9]。

表 2 南蛇勒提取物对 4 种供试菌的 MIC 及 MBC
Tab 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) and them inimum bactericidal concentration (MBC) of extracts from *Caesalpinia max* on the bacteria

供试菌	MIC /%	MBC /%
大肠杆菌	2.0	4.0
金黄色葡萄球菌	0.5	2.0
绿脓杆菌	0.25	0.5
镰刀菌	0.05	0.1

3 结论

南蛇勒 95% 乙醇提取物对各种供试菌的抑制效力不同, 对绿脓杆菌的抑菌效果较好, 37°C 培养箱培养 24 h 后, 20% 的提取物乙酸乙酯溶解液的抑菌环直径为 $17.62 \pm 0.52 \text{mm}$, 大肠杆菌的为 $11.62 \pm 1.30 \text{mm}$, 其对这两种供试菌的 MIC 和 MBC 值也表明南蛇勒抗革兰氏阴性杆菌的医用前景, 有关提取物中主要活性成分的结构及抑菌机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] JIANG R W, PAUL P H B, MA S C, et al Structure and Antiviral Properties of Macrocaesalpin A Novel Cassane Furanoditerpenoid Lactone from the Seeds of *Caesalpinia max* Hance [J]. Tetrahedron Letters, 2002, 43: 2415-2418
- [2] JIANG R W, PAUL P H B, MA S C, HE Z D, et al Molecular Structures and Antiviral Activities of Naturally Occurring and Modified Cassane Furanoditerpenoids and Friedelane Triterpenoids from *Caesalpinia max* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10: 2161-2170
- [3] YU X Y, XIE L P, ZHANG Y, et al Multiple Suppressive Effects of a Protein from *Caesalpinia max* on Murine Melanoma Cells [J]. Tsinghua Science and Technology, 2002, 7(6): 641-644
- [4] 俞树荣. 微生物学和微生物学检验 (第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 458
- [5] 周南进, 谢勇, 李弼明, 等. 壳聚糖抗幽门螺杆菌的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 72-73
- [6] 刘碧源, 高仕瑛, 李邦良, 等. 壳聚糖抗菌活性的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 74-75
- [7] 吴剑波. 微生物制药 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 31
- [8] 张宁宁. 白花益母草的成分研究 [J]. 国外医学中医中药分册, 2004, 26(4): 240
- [9] 李春美, 杜靖, 谢笔钧. 柚皮提取物的抑菌作用 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(1): 38-41.