

胆木叶抗 MRS 活性研究

苏奎^{1,2}, 龚敏¹, 周静¹, 邓世明² (1. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000; 2. 海南大学海洋学院, 海南海口 570228)

摘要 以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRS)、大肠杆菌、普通金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌为供试菌种, 采用滤纸片琼脂扩散法研究胆木叶提取物的体外抑菌活性。结果表明, 以40%以上体积分数乙醇为提取剂时, 胆木叶提取物对MRS具有抑菌活性, 且乙醇的体积分数越大, 提取物的抑菌活性越强; 胆木叶乙醇提取物中的中高极性溶剂萃取段抑菌活性最强。胆木叶水煮液对大肠杆菌具有抑菌活性, 醇提液对大肠杆菌只有极弱的抑菌活性。胆木叶醇提液和水煮液对普通金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌只有极弱的抑菌活性。

关键词 胆木; MRS; 抑菌活性

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-12014-03

Study on Anti-MRS Activity of *Nauclea officinalis* Leaves

SU Kui et al (Food College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract With methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRS), escherichia coli, staphylococcus aureus, proteus vulgaris, bacillus subtilis as the tested strains, the vitro antibacterial activity of extracts from *Nauclea officinalis* leaves was determined by filter paper agar diffusion method. The results showed that the extract from *N. officinalis* leaves had antibacterial activity on MRS when ethanol which volume fraction was more than 40% was taken as extractant, and the bigger the volume fraction of ethanol was the stronger the antibacterial activity of the extract was. The antibacterial activity of middle and high polar solvent extraction section of ethanol extract from *N. officinalis* leaves was the strongest. The decoction of *N. officinalis* leaves had antibacterial activity on escherichia coli, while the alcohol extract only had exceedingly weak antibacterial activity on escherichia coli. The alcohol extract and decoction of *N. officinalis* leaves only had exceedingly weak antibacterial activities on staphylococcus aureus, proteus vulgaris and bacillus subtilis.

Key words *Nauclea officinalis*; MRS; Antibacterial activity

胆木别名乌檀、熊胆树、树黄柏, 为茜草科乌檀属乔木。高达10 m以上, 木材鲜黄色, 坚硬, 喜生于低海拔至中海拔的山谷疏密林中。在我国主要分布于广东、广西、云南等省区。其药用枝条、树干和根全年可采。性味苦, 寒, 具有清热泻火之功效, 可用于治疗外感发热, 急性扁桃体炎, 咽喉炎, 支气管炎, 肺炎, 肠炎, 痢疾, 急性黄疸, 胃痛等^[1]。胆木的传统药用部位为茎、皮^[2]。目前, 开发应用的胆木产品有“胆木注射液”和“胆木浸膏片”中药制剂, 临床用于治疗急性扁桃腺炎, 急性咽喉炎, 急性结膜炎及上呼吸道感染。符健等^[3]用毛细血管通透性、耳肿胀、跖肿胀、慢性肉芽肿、解搏等方法对胆木浸膏片进行了药理研究, 结果表明, 胆木浸膏片对冰醋酸引起的小鼠腹部毛细血管通透性增加、二甲苯所致的小鼠耳肿胀、大鼠蛋清性足跖肿和棉球肉芽组织增生均具有抑制作用。同时, 该药品对伤寒 vi 多糖菌苗引起的家兔体温升高具有明显的抑制作用。笔者采用生物活性追踪法, 以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRS)、大肠杆菌、普通金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌为供试菌, 对胆木叶提取物的体外抑菌活性及其作用机制进行了研究, 以期胆木新药的开发提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 ①胆木叶、胆木材(包括茎、皮), 于2005年7月采自海南省琼中地区。所采样品于阴凉通风处自然风干后粗粉碎, 置室温下保存备用; 胆木浸膏片、硫酸庆大霉素购自药品超市; 硫酸卡那霉素由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。②抑菌活性供试菌: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant staphylococcus, MRS), 由中国热带

农业科学院热带生物技术研究所提供; 大肠杆菌(*E. coli*)、普通金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、普通变形杆菌(*P. Vulgaris*)、枯草芽孢杆菌(*Bacil subtilis*)由海南大学公共实验中心微生物实验室提供。③培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基^[4]。

1.2 方法

1.2.1 抑菌活性初步评价。分别定量称取胆木叶、胆木材, 按料液比1:2用体积分数95%的乙醇恒温水浴摇床辅助浸提, 50℃, 提取24 h, 连续提取3次(每次提取后用滤纸过滤, 滤渣加入提取溶剂再次提取), 合并3次浸提液, 减压浓缩蒸出溶剂得样品。

分别定量称取胆木叶、胆木材, 按料液比1:5加入蒸馏水, 水蒸汽回流提取3次, 第1次提取2.0 h, 第2、3次均提取1.5 h。每次提取后用滤纸过滤, 滤渣加入提取溶剂再次提取, 合并各次浸提液, 减压浓缩蒸出溶剂得样品。

采用纸片扩散法^[5], 吸取0.1 ml 适宜浓度的菌悬液, 加入备用的平板培养基上, 涂布均匀。无菌条件下将待测样品稀释后滴加在滤纸片(6.0 cm)上, 每片载药量为2.5 mg, 滤纸片自然风干后贴于平板培养基上, 每皿($d=9$ cm)4片, 每皿中央为阳性对照, MRS的阳性对照为硫酸卡那霉素, 其他菌种的阳性对照为硫酸庆大霉素, 37℃培养24 h, 测定抑菌圈大小。

1.2.2 不同体积分数乙醇提取物抑菌活性的比较。分别以体积分数为0、20%、40%、60%、80%、95%的乙醇为浸提溶剂, 按“1.2.1”的方法制备样品并测定其抑菌活性。

1.2.3 乙醇提取物的系统溶剂分离及活性跟踪。称取胆木叶粗干粉, 以前述方法制得胆木叶95%乙醇提取液, 减压浓缩得浸膏。采用系统溶剂法分离得到各有机溶剂段: 石油醚段、二氯甲烷段、乙酸乙酯段、正丁醇段、水段。将各有机溶剂段减压浓缩后制得浸膏, 为进一步明确乙醇提取物中的抑

基金项目 国家科技支撑计划(2007BAI27B05)。

作者简介 苏奎(1983-), 男, 安徽阜南人, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学。

收稿日期 2009-05-04

菌成分,按“1.2.1”的方法进行抑菌活性跟踪试验。

1.2.3.1 石油醚段的柱层析、活性跟踪。以“1.2.3”的方法得石油醚段。经处理后定量取样,上 7.9 cm × 100.0 cm 硅胶柱,用石油醚:乙酸乙酯 = 9:1 的洗脱剂洗脱(掏柱洗脱),薄层检测合并相近成分,3 段减压浓缩得浸膏。为进一步明确石油醚段中的抑菌物质,以“1.2.1”的方法进行抑菌活性跟踪试验。

1.2.3.2 二氯甲烷段的柱层析分离、活性跟踪。以“1.2.3”的方法得二氯甲烷段。经处理后定量取样,上 6 cm × 33 cm 减压硅胶柱,用二氯甲烷:乙酸乙酯 = 20:1 ~ 0:20 6 种不同洗脱剂梯度洗脱,薄层检测相近成分不明显,故得 6 段柱层析分离部分,减压浓缩制浸膏。为进一步明确二氯甲烷段中的抑菌物质,以“1.2.1”的方法进行抑菌活性跟踪试验。

1.2.3.3 水层大孔吸附树脂不同浓度乙醇洗脱的抑菌活性比较。以“1.2.3”的方法得水层,经大孔吸附树脂吸附后分别用体积分数为 0.5%、30%、95% 的乙醇梯度洗脱,得 4 部分洗脱物。为进一步明确水段中的抑菌物质,以“1.2.1”的方法进行抑菌活性跟踪试验。

2 结果与分析

2.1 胆木叶抑菌活性的初步评价 以 95% 乙醇和蒸馏水为提取溶剂,所得浸提液对 MRS 和 E (大肠杆菌) 的抑制效力如图 1 所示。由图 1 可知,水提液对 MRS 只有极弱的抑菌活性,95% 乙醇提取液具有较强的抑菌活性,水煮液具有较弱的抑菌活性;胆木叶醇提物对 E 只有极弱的抑菌活性,胆木叶水煮液对 E 具有较弱的抑菌活性、胆木材水煮液和 95% 乙醇提取液及胆木浸膏片对 E 均具有很强的抑菌活性。各样品对 S (普通金黄色葡萄球菌)、P (普通变形杆菌)、B (枯草芽孢杆菌) 只有极弱的抑菌活性。

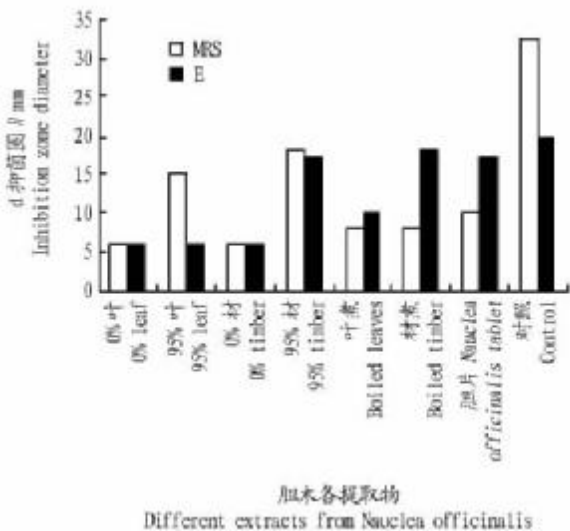


图 1 胆木各溶剂提取物的抑菌效力

Fig. 1 The antibacterial effect of extracts from *Nauclea officinalis* by different solvents

2.2 不同体积分数乙醇浸提物的抑菌效力 由图 2 可知,胆木叶乙醇提取液的抑菌活性与乙醇的体积分数呈正相关。乙醇体积分数 40% 以下的提取液均未表现出明显的抑菌活性,乙醇体积分数 60% 以上的提取液均具有较强的抑菌活性。因此,应采用高体积分数的乙醇提取胆木叶中的抑菌活性物质;不同体积分数乙醇提取液对 E、S、P、B 只有极弱的抑

菌活性,与初步评价结果相符。

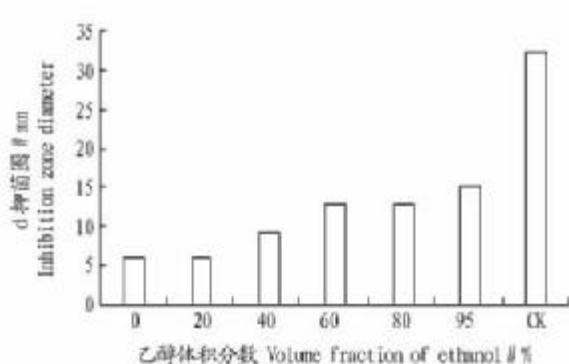
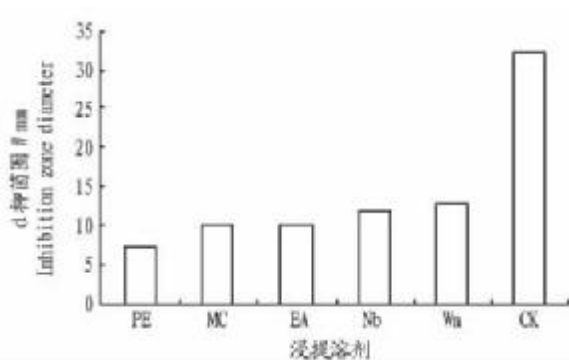


图 2 不同体积分数乙醇浸提物的抑菌效力

Fig. 2 The antibacterial effect of ethanol extracts with different volume fraction

2.3 乙醇提取物的系统溶剂分离及活性跟踪 由图 3 可知,乙醇提取物的有机溶剂萃取部分对 MRS 均具有抑菌活力,其中,中高极性萃取部分的活力最强。除水层对 S、P、B 无明显抑菌活性外,其余各萃取部分对 E、S、P、B 均具有极弱的抑制活力。



注: PE. 石油醚 petroleum; MC. 二氯甲烷 methylene chloride; EA. 乙酸乙酯 ethyl acetate; NB. 正丁醇 n-butyl alcohol; Wa. 蒸馏水 water; CK. 硫酸卡那霉素 resistomycin.

Note: PE, Petroleum; MC, Methylene chloride; EA, Ethyl acetate; NB, n-butyl alcohol; Wa, water; CK, Resistomycin.

图 3 乙醇提取物系统溶剂分离段的抑菌效力

Fig. 3 The antibacterial effect of systematic solvent separation of the ethanol extracts from *Nauclea officinalis*

2.3.1 石油醚段的柱层析分离、活性跟踪。由图 4 可知,各

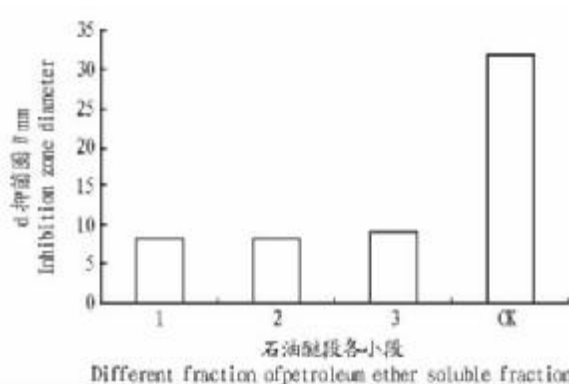


图 4 石油醚段柱层析后各小段抑菌活性的比较

Fig. 4 The antibacterial activity comparison of different parts from petroleum ether soluble fraction after column chromatography

石油醚段对 MRS 均具有较弱的抑制活力,说明作用成分比较分散;石油醚 1、2 段对 E、S、P、B 无明显抑制活力,3 段对 E、S、P、B 均具有极弱的抑制活力。

2.3.2 二氯甲烷可溶部分的柱层析分离、活性跟踪。由图 5 可知,除 5 外,各段对 MRS 均具有抑制活力,6 对 MRS 的作用最强,与中高极性溶剂洗脱物的抑菌活力较强相一致;各段对 E、S、P、B 只有极弱的抑制活力。

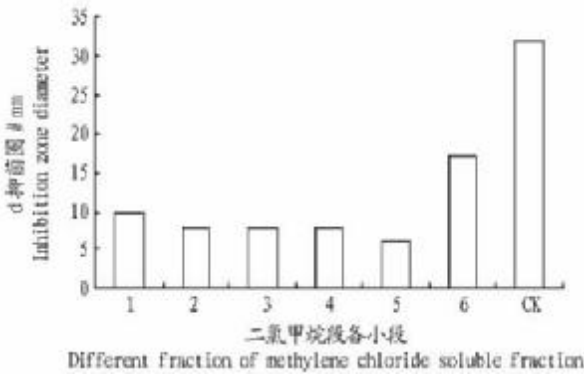


图 5 二氯甲烷段柱层析后各小段抑菌活性的比较

Fig. 5 The antibacterial activity comparison of different parts from methylene chloride soluble fraction

2.3.3 水层大孔吸附树脂不同浓度乙醇洗脱物的抑菌活性比较。由图 6 可知,乙醇浓度越高洗脱物的抑菌活性越明显,说明抑菌活性物质主要存在于高浓度乙醇洗脱物中,但各小段的抑菌活性均无划段前强;各段对 E、S、P、B 只有极弱的抑制活力。

3 讨论

MRS^[6] (Methicillin resistant staphylococcus) 被称为“超级病菌”,所有 β -内酰胺类抗菌药物对 MRS 临床治疗均无效;

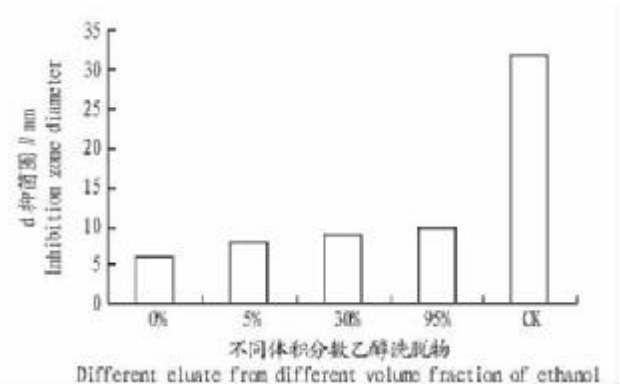


图 6 不同体积分数乙醇洗脱物的抑菌效力

Fig. 6 The antibacterial effect of ethanol eluates with different concentration

同时, MRS 对氟喹诺酮类、氨基糖甙类、大环内酯类等抗菌药物的耐药性也不断升高。胆木叶 95% 乙醇提取物中高极性有机溶剂萃取成分对 MRS 菌株具有很好的抑菌效果,为开发抑制 MRS 菌株的中药提供了理论依据。胆木浸膏片大肠杆菌具有一定的抑菌活性;胆木叶醇提液和水煮液对普通金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌只有极弱的抑菌活性。

参考文献

[1] 邓世明. 海南常用中草药名录 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006: 149.
 [2] 海南制药厂有限公司. 胆木浸膏片标准 (试行) [S]. 2005.
 [3] 符健, 卞少轶, 曾祥周, 等. 胆木浸膏片的抗炎作用研究 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2002, 20 (1): 54 - 55.
 [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214 - 215.
 [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 651.
 [6] 邓光贵, 张文俊, 刘海英. 142 株金黄色葡萄球菌的耐药特点及 MRSA 分离率 [J]. 重庆医学, 1993, 22 (3): 219 - 220.

(上接第 11963 页)

表 3 不同处理对高羊茅经济性状的影响

Table 3 The effects of different treatments on the economic characters of *Festuca arundinacea* Schreb

处理 Treat- ments	株高//mm Plant height	叶片数 片/株 Blade count	鲜草质量 mg/株 Mass of fresh grass	干草质量 mg/株 Hay mass	密度 株/cm ² Density	根系长 mm Root length	根系数量 条/株 Root amount	根系鲜重 mg/株 Fresh weight of root	根系干重 mg/株 Dry weight of root
1	138.42 aA	3.18 aA	27.56 aA	9.65 aA	14.28 aA	26.38 aA	4.76 aA	6.23 aA	2.19 aA
2	117.16 cC	2.88 cBC	23.33 cC	8.16 cC	12.07 cA	22.33 cC	4.29 cA	5.27 cC	1.85 cC
3	127.35 bB	3.03 abA	25.35 bB	8.87 bB	13.13 bA	24.27 bB	4.52 abA	5.73 bB	2.01 bB
4 (CK)	107.78 dD	2.73 cdC	21.46 dD	7.52 dD	11.12 dA	20.54 dD	4.08 dA	4.85 dD	1.69 dD

3 结论

混合基质以糠醛渣:稻壳:粉煤灰:鸡粪:容积为 0.25:0.15:0.50:0.10 的组合效果最佳,与有土栽培相比,容重、pH 值降低,总孔度、通气孔度、水分、有机质、速效 N、速效 P、速效 K、阳离子交换量增大,为无土草毯人工栽培创造了良好的环境条件和营养条件,也为糠醛渣废弃物合理利用找到了一条行之有效的途径。

参考文献

[1] 秦嘉海, 吕彪, 南永慧. 糠醛渣的改土增产效应研究 [J]. 土壤通报, 1994 (5): 52 - 56.
 [2] 刘玉环, 秦嘉海. 全营养混合基质理化性质及其对人参果生长发育的影响 [J]. 土壤通报, 2005, 36 (5): 86 - 89.

[3] 秦嘉海. 蔬菜人工合成土壤栽培技术 [J]. 农村科技开发, 1999 (12): 16 - 17.
 [4] 秦嘉海. 河西走廊荒漠化区域温室辣椒基质栽培技术 [J]. 中国蔬菜, 2004 (2): 52 - 54.
 [5] 曹作中, 高海成, 陈军平, 等. 当前我国生活垃圾处理发展方向探讨 [J]. 环境保护, 2001 (10): 13 - 18.
 [6] 陈世和. 城市垃圾堆肥原理与工艺 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 52 - 68.
 [7] 曹作中, 陈军平, 高海成, 等. 生活垃圾堆肥应注意的若干技术经济问题 [J]. 环境保护, 2000 (8): 39 - 42.
 [8] 李国学. 固体废物堆肥与有机复混肥生产 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 98 - 162.
 [9] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 土壤农业化学常规分析法 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 106 - 208.
 [10] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978: 110 - 218.