

美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物体外抗菌活性研究

李洪文^{1,2}, 耿玲¹, 刘光明¹, 李冬梅¹

(1. 大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2. 楚雄医药高等专科学校, 云南 楚雄 675000)

[摘要] **目的:** 探讨美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物的体外抗菌作用。对比了美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物的抗菌谱和抗菌强弱。**方法:** 美洲大蠊脱脂膏用活性炭脱色后进行冷冻干燥得到固体脱色物, 然后用脱脂膏和脱色物对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、痢疾志贺菌 (*Shigella dysenteriae*)、甲型副伤寒沙门菌 (*S. paratyphi A*)、乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi B*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherichia coli*) 进行体外抗菌活性研究, 测定最小抑菌浓度 (MIC)。**结果:** 在实验的各菌株中, 脱脂膏仅对白色葡萄球菌具有一定抗菌作用, MIC 31.25 g·L⁻¹, 对其他 11 株细菌均无抗菌活性。脱色物对金黄色葡萄球菌 25923、白色念珠菌无抗菌活性, 对其他 10 株细菌均有抗菌活性, MIC 15.63 ~ 250 g·L⁻¹, 其中对白色葡萄球菌和绿脓杆菌抗菌效果较好, MIC 分别为 15.63, 62.5 g·L⁻¹。**结论:** 美洲大蠊中含有抗菌活性成分, 脱色物与脱脂膏相比, 抗菌效果优于脱脂膏。

[关键词] 美洲大蠊; 脱脂膏; 活性炭脱色物; 体外抗菌活性; 最低抑菌浓度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0159-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.009 **[网络出版时间]** 2012-03-27 14:48

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1448.009.html>

Research on Antimicrobial Activity by *Periplaneta americana* Cockroach Skimmed Cream and Active Carbon Material *in vitro*

LI Hong-wen^{1,2}, GENG Ling¹, LIU Guang-ming¹, LI Dong-mei¹

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali Institute, Dali 671000, China;

2. Pharmacy Department of Chuxiong Medical College, Chuxiong 675000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate antibacterial activity by *Periplaneta americana* skimmed cream and active carbon material, and compare the effect of intensity between *P. americana* skimmed cream and active carbon material. **Method:** The *P. americana* skimmed cream was decolorized with active carbon and solid bleaching material was obtained after freeze-drying. The antibacterial activity of them against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus albus* (*S. albus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*), *Salmonella Paratyphi* (*S. paratyphi A*), *S. paratyphi B*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Bacillus bacteria* (*B. subtilis*), *Proteus* (*P. vulgaris*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) *in vitro* was observed, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. **Result:** In all experimental strains, only skimmed cream had some antibacterial effect, *S. albus*. MIC values of 31.25 g·L⁻¹, on the other multiple strains of bacteria had no antibacterial activity. active carbon material and antibacterial against *S. aureus* 25923, *C. albicans*, no antibacterial activity against many other strains of bacteria had antibacterial activity, in which the *S. albus* and *P. aeruginosa* antimicrobial was better, the MIC was 15.63, 62.5

[收稿日期] 20111019(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30560181)

[第一作者] 李洪文, 讲师, 主要从事天然药物化学及药理学研究, Tel:15125769709, E-mail:lhwen31@163.com

$g \cdot L^{-1}$, respectively. **Conclusion:** *P. americana* contains antimicrobial active ingredients, compared with active carbon material and skimmed cream, antibiotic effect of active carbon material is better than that of skimmed cream.

[**Key words**] *Periplaneta americana*; skimmed cream; active carbon material; *in vitro* antibacterial activity; minimum inhibitory concentration

美洲大蠊为昆虫纲翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫,俗称“蟑螂”,在我国分布广泛,入药始载于《神农本草经》^[1]。至今以美洲大蠊为原料研制出的新药有:具有抗炎、消肿、促进伤口愈合、促进血管新生的康复新^[2];具有强心、扩张肺血管、改善微循环、抗心律失常、保护心脏作用的心脉隆注射液^[3];具有抗病毒、提高机体免疫力和修复损伤肝细胞功能作用的肝龙胶囊^[4-5]。此外许多研究资料表明美洲大蠊及制剂在抗肿瘤方面有一定的效果,如原发性肺癌、3 L 肺癌、Lewis 肺癌等^[6-7]。还有研究发现美洲大蠊提取的抗菌肽可直接杀灭细菌^[8]。本实验通过对美洲大蠊脱脂膏及其活性炭脱色物的体外抗菌活性实验研究,为扩大美洲大蠊的药用范围提供一定的理论参考。

1 材料

1.1 受试药物 美洲大蠊 *Periplaneta americana* L., 本实验所用美洲大蠊由云南省弥渡县李向春养殖基地提供,经大理学院药物与化学学院李树楠教授鉴定。成虫体长 29 ~ 35 毫米,红褐色。它们成群地聚集在阴暗、潮湿、多洞缝的场所。取蟑螂粗粉用 70% 乙醇浸泡 3 次,每次 24 h,过滤,滤液合并浓缩至干即得浸膏。

1.2 仪器 EYELA-FDU-2100 真空冷冻干燥机(东京理化器械株式会社),RE-52CS1 旋转蒸发器(上海亚荣),R-210 旋转蒸发器(瑞士步琪),SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司),隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司),YXQ-LS-50S11 型立式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),FD-1C-80 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),HWS-12 电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)等。

1.3 试剂、菌株 粉末状活性炭(工业)、纯化水、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、痢疾志贺菌(*S. dysenteriae*)、甲型副伤寒沙门菌(*S. paratyphi A*)、乙型副伤寒沙门菌(*S. paratyphi B*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)、变形杆菌(*P. vulgaris*)、白色念珠菌

(*C. albicans*)。标准质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*),大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherichia coli*)。以上菌株由大理学院基础医学院病原微生物学实验室提供。

1.4 培养基 Mueller-Hinton 琼脂培养基(简称 M-H 琼脂培养基,杭州天和微生物试剂有限公司,批号 070731);细菌干粉培养基(简称 M-H 肉汤培养基,杭州天和微生物试剂有限公司,批号 070905);沙氏琼脂培养基(北京三药科技开发公司,批号 20091105);液体沙氏培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20090905)。

2 方法

2.1 脱脂膏的制备 取美洲大蠊浸膏适量放入烧杯中,加纯化水让其分散混匀,放在 70 °C 水浴中加热,加热过程中油脂析出漂浮于水面,放冷油脂固化,去除油脂,所剩溶液浓缩后得到棕黑色膏状物即为脱脂膏。放入冰箱 -25 °C 条件下进行保存。本实验共进行 6 次,由浸膏到脱脂膏收得率均数为 75.18%。重复性考查,RSD% 为 1.23%。

2.2 脱色物的制备 称取脱脂膏 20 g 于 500 mL 烧杯中,加纯化水适量在 50 °C 水浴中加热溶解,然后转移至 500 mL 锥形瓶中,加水至 200 mL 充分振摇均匀,加入粉末状活性炭 10 g 充分振摇 5 ~ 10 min,静止放置 4 h,抽滤,碳饼用 200 mL 水洗,抽干,滤液合并,然后浓缩至 80 ~ 100 mL,将其装入 250 mL 烧杯中,每个烧杯约 40 ~ 50 mL,在 -40 °C 乙醇中让其结冰,结冰后放在 -80 °C,4 Pa 条件下进行冷冻干燥,24 h 后取出,脱色物为淡黄色固体,露置于空气中易吸潮,吸潮后黏度增大,室温、光照条件下长时间放置颜色加深。所以取出后应立即密封放入 -25 °C 冰箱中保存。本实验共进行 6 次,由脱脂膏到脱色物收得率均数为 67.25%。重复性考查,RSD% 为 0.78%。

2.3 体外抗菌实验

2.3.1 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定 采用常量试管稀释法^[9-10]测定美洲大蠊脱脂膏及其脱色物的最低抑菌浓度(MIC)。

2.3.2 菌液制备 从孵育 10~12 h 的非选择性培养基上挑取 3~5 个菌落,直接用灭菌生理盐水制成混悬液并将浊度调至 0.5 麦氏比浊标准,相当于 10^8 CFU/mL 的含菌量。使用时用 M-H 肉汤稀释 (1:10),稀释后的菌液在 15 min 内接种。

2.3.3 药物配制 取已处理好的无菌试管 (15 mm × 100 mm) 14 支,排成 1 排,除第 1 管外,其余每管加入 M-H 肉汤 2 mL,在第 1 管中加入脱脂膏样品 ($250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 mL,第 2 管同样加入脱脂膏样品 2 mL,混匀后从第 2 管吸取 2 mL 至第 3 管,如此连续对比稀释至第 11 管,并从第 11 管中吸取 2 mL 弃去,保证每管终体积为 2 mL。第 11,12,13,14 管分别为药物不加菌液对照、M-H 肉汤对照、菌液对照和溶剂对照。此时各管药物浓度依次为 250,125,62.5,31.25,15.625,7.8125,3.906,1.953,0.977,0.488 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同法进行脱色物样品的配制。

2.3.4 抑菌实验 用 M-H 肉汤将调好的菌液作 1:10 稀释,除第 11,12,14 管外每管加入菌液 0.1 mL。然后置于 37 °C 恒温培养箱中培养 18~20 h 后观察结果。因为药液颜色较深,影响最低抑菌浓度 (MIC) 的观察,故培养后用微量加样器取出不确定管中溶液 100 μL 密集划线转种于 M-H 琼脂平板、沙氏琼脂平板上,继续培养 24 h,观察有无细菌生长。以完全无细菌生长的最低药物浓度作为该脱脂膏及其脱色物的最低抑菌浓度 (MIC)。

3 结果

脱脂膏和脱色物 MIC 测定 在实验的各株细菌中,所配制的浓度范围内,脱脂膏只对白色葡萄球菌具有一定的抗菌活性,最小抑菌浓度为 $31.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,对其他菌株在无抗菌活性。脱色物除了对金黄色葡萄球菌 25923 和白色念珠菌无抗菌活性,对其他所测菌株均有一定的抗菌活性。其中对白色葡萄球菌和绿脓杆菌抗菌效果较好,最小抑菌浓度分别为 15.63,62.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

4 讨论

美洲大蠊是研究较为广泛的动物中药之一,但是它的活性研究主要集中在抗肿瘤,治疗肝炎、心血管疾病等方面,在抗菌方面只有蓝江林^[8]等报道了美洲大蠊抗菌肽的杀菌作用。本实验用美洲大蠊的脱脂膏和脱色物做了体外抗菌实验,结果显示脱色物抗菌效果优于脱脂膏,说明可以用活性炭脱色对脱脂膏进行精制。脱色物虽然对多株细菌具有抗菌活性,但抗菌的最低抑菌浓度相对较大,不适宜用单纯的脱色物进行抗菌使用,我们将对脱色物活

表 1 脱脂膏和脱色物最低抑菌浓度 (MIC) 测定

菌种	MIC/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
	脱脂膏	脱色物
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	-	250
金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)	-	-
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)	-	250
大肠杆菌 (ATCC 25922)	-	250
痢疾志贺菌 (<i>S. dysenteriae</i>)	-	250
副伤寒沙门菌 (<i>S. paratyphi A</i>)	-	125
乙型副伤寒沙门菌 (<i>S. paratyphi B</i>)	-	250
绿脓杆菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	-	62.5
白色葡萄球菌 (<i>S. albus</i>)	31.25	15.63
变形杆菌 (<i>P. vulgaris</i>)	-	250
枯草杆菌 (<i>B. subtilis</i>)	-	250
白色念珠菌 (<i>C. albicans</i>)	-	-

注:“-”表示在所测浓度下没有结果。

性成分进一步追踪,再进行抗菌活性测定,最终分离到起具有抗菌活性的单体成分。同时该实验为抗菌药物的筛选,抗菌谱的测定,有效部位的筛选和精制提供了可供参考的数据依据,为美洲大蠊的进一步开发利用提供了一些基础资料。

[参考文献]

- [1] 孙星衍. 神农本草经 [M]. 北京: 商务印书馆, 1955:90.
- [2] 焦春香,刘光明,周萍. 天然药物康复新的研究进展 [J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2623.
- [3] 张利. 心脉龙注射液的药理作用和临床疗效 [J]. 医药导报,2001,20(4):250.
- [4] 杜一民,李树楠,陈鸿珊,等. 新药肝龙胶囊对雏鸭体内鸭乙型肝炎病毒的抑制效果 [J]. 大理学院学报,2006,5(4):6.
- [5] 杨永荣,缪新权,梅光涛. 肝龙胶囊治疗 HBeAg-1 慢性乙型肝炎的疗效观察 [J]. 云南医药,2008,29(2):182.
- [6] 张军. 虫类药的抗肿瘤实验及应用 [J]. 中医药信息,1992,9(3):39.
- [7] Jiang Yongxing, Wang Xicai, Jin Congguo, et al. Inhibitory effect of Periplaneta Ameircnan extract on 3LL lung cancer in mice [J]. Chin J Lung Cancer, 2006, 9 (6):488.
- [8] 蓝江林,周先治,卓侃,等. 美洲大蠊 (*Periplaneta americana* L.) 抗菌肽杀菌作用初步观察 [J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2004,33(2):166.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1993:259.
- [10] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册 [M]. 北京:科学出版社,2001:210.

[责任编辑 聂淑琴]