

# 三丫苦对乙型溶血性链球菌的体外抗菌作用

邓琪<sup>1</sup>, 梁粤<sup>1</sup>, 郭丽冰<sup>1\*</sup>, 周玉珍<sup>2</sup>

(1. 广东药学院中药学院; 2. 广东药学院基础学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 研究三丫苦对乙型溶血性链球菌的作用。方法: 用 95% 乙醇提取三丫苦地上和地下部分, 用系统溶剂法萃取分离得到 10 个提取物。通过测定这些提取物对乙型溶血性链球菌的抑菌圈大小和最小抑菌浓度(MIC) 来确定其抗菌活性。结果: 三丫苦地上部分的石油醚、氯仿和乙酸乙酯提取物和地下部分的石油醚、氯仿提取物对乙型溶血性链球菌都有比较明显的效果。结论: 三丫苦抗乙型溶血性链球菌的活性成分集中在极性小的部位。

[关键词] 三丫苦; 乙型溶血性链球菌; 抑菌作用

[中图分类号] 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0123-02

三丫苦分布在岭南地区及邻近东南亚国家, 具有清热解毒、祛风除湿<sup>[1]</sup> 的功效。它既是广东凉茶的常用配方组分, 也是一些感冒药中的主要成分之一<sup>[2]</sup>。以前三丫苦的药用部位是根和茎, 目前出于对资源的保护, 药用部位是地上部分。有报道三丫苦的茎及带叶嫩枝对福氏痢疾杆菌有抑制作用<sup>[3]</sup>, 三丫苦对志贺痢疾杆菌、八迭球菌和白喉杆菌有抑制作用, 但对绿脓杆菌无抑制作用<sup>[4]</sup>。乙型溶血性链球菌在自然界中分布较广, 常可引起皮肤、皮下组织的化脓性炎症、呼吸道感染、流行性咽炎的爆发等。为了研究三丫苦治疗咽喉肿痛和感冒的物质基础, 比较三丫苦药用部位抗菌活性的差别, 作者选用乙型溶血性链球菌进行体外抗菌实验, 研究三丫苦地上部分及地下部分不同极性段提取物的抑菌效果, 并采用二倍稀释法确定其最小抑菌浓度(MIC)。

## 1 材料

**1.1 药材** 三丫苦地上部分(茎叶各半), 三丫苦地下部分(根); 由广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定为 *Evodiae Pta*(Spreng.) Merr. 为芸香科吴茱萸属植物。

**1.2 菌种** 乙型溶血性链球菌, 由广东药学院基础学院微生物与免疫实验室保存。

**1.3 试剂** 营养琼脂细菌干粉培养基, 营养肉汤细

菌干粉培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 小牛血清(广州东征化玻仪器有限公司); 吐温 80(广州泰峰贸易有限公司); 乙醇, 石油醚, 氯仿, 乙酸乙酯, 正丁醇(天津博迪化学试剂分析纯)。

**1.4 仪器** SHZ-D( ) 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 生化培养箱(广东省医疗器械厂); 自封手提式压力灭菌器(广州医疗设备厂); SW-CJ-2FD 净化工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 三丫苦醇提取物不同部位供试液制备** 分别称取三丫苦地上部分(茎叶各半)及地下部分(根) 25 g, 粉碎, 加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 减压浓缩, 加蒸馏水适量, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇分别反复萃取。各萃取液及水溶液减压浓缩, 浸膏分别加 0.5% 吐温水溶液定溶至 25 mL, 制成含生药 1 g·mL<sup>-1</sup> 供试液, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 冰箱保存备用。得各个萃取部位供试液, 分别为石油醚部位(APP)、氯仿部位(APC)、乙酸乙酯部位(APE)、正丁醇部位(APB)、水部位(APW)。

**2.2 菌液的制备** 将保存的菌种先接种营养琼脂平板, 于 37 °C 培养 24 h。再将细菌接种于与 0.1 mL (0.5%) 小牛血清混匀的 2 mL 牛肉汤中, 于 37 °C 培养 12 h 后, 将细菌稀释为 3 × 10<sup>7</sup> 个/mL 的备用菌液。

**2.3 营养琼脂平皿的制备** 紫外线灯下照射 30 min 后, 在无菌操作台上将营养琼脂熔融并恒温到

[收稿日期] 20100107(012)

[基金项目] 广东省科学技术厅社会发展项目(93039)

[作者简介] 邓琪, E-mail: dengkiki@gmail.com.

[通讯作者] \* 郭丽冰, Tel: (020) 39352179, E-mail: xiabing\_12@yahoo.com.cn

58 左右, 倒入无菌平皿, 每平皿倾入 10 mL。充分冷却后待用。

**2.4 体外抑菌效果的测定** 采用打孔法<sup>[5]</sup>并加以改进。取无菌试管分别加入 2 mL 熔融并恒温到 58 左右的营养琼脂, 0.1 mL 小牛血清和 **2.2** 制备好的菌液 0.1 mL, 快速搓动, 充分混匀, 趁热倒入 **2.3** 制备的平皿中, 使其均匀铺开。待冷却凝结后, 用 6 mm 玻璃灭菌打孔器于平皿中均匀且垂直打 6 个孔, 挑出琼脂, 排列成六边形, 分别用定量移液器移取供试液 50  $\mu\text{L}$ , 及 0.5% 吐温水溶液做阴性对照, 加 3 孔为平行样。于 36 生化培养箱中培养 24 h 后, 以游标卡尺分别测量每一个抑菌圈两个垂直方向的直径, 抑菌环的边缘以肉眼看不到细菌明显生长为限。量完后取其平均值进行统计分析, 计算 3 个孔抑菌圈直径的平均值及标准差。体外抑菌定性结果的判定标准: 抑菌圈直径小于 7 mm 为不敏感(-), 7~12 mm 为低度敏感(+), 12~18 mm 为中度敏感(++), 18 mm 以上为高度敏感(+++)。

**2.5 最小抑菌浓度(MIC)的测定** 采用试管二倍稀释法<sup>[6]</sup>。取 13 mm  $\times$  100 mm 试管 13 支, 编号排列, 除第 1 支加 3 mL 无菌营养肉汤外, 其余每支加 2 mL 无菌营养肉汤。在第 1 支试管中加入 1 mL 供试液, 混匀后取出 2.0 mL 放入第 2 管中。以此类推, 直到第 10 管取出 2.0 mL 弃去, 配成含药提取物分别为 0.25, 0.125, 0.006 25, 0.031 25, 0.015 625, 0.007 813, 0.003 774, 0.001 953  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  各种浓度的液体。除去最后一管分别往每个试管中加入 0.1 mL 小牛血清和 **2.2** 中配好的菌液 0.1 mL。余下 3 管分别为正常检测菌对照、0.125% 吐温水溶液检测菌对照和肉汤无菌对照。混匀后于 36 放入生化培养箱中培养 24 h, 因乙型溶血性链球菌沉底生长, 观察结果要适当混匀, 待测菌肉眼未见生长的最低浓度为该药对待测菌的 MIC。

### 3 结果与分析

**3.1 体外抑菌效果的测定** 本试验测定了三丫苦地上部分与地下部分醇提物和各个部位对乙型溶血性链球菌的体外抑菌效果, 结果三丫苦地上部分的石油醚、氯仿和乙酸乙酯部位对乙型溶血性链球菌的抑菌圈分别是 (9.54  $\pm$  0.20), (8.17  $\pm$  0.15), (9.25  $\pm$  0.41) mm, 抑菌效果较好, 属于低度敏感。

正丁醇与水部位对乙型溶血性链球菌均无抑制作用。三丫苦地下部分的石油醚部位的抑菌圈是 (15.48  $\pm$  0.41) mm、氯仿部位抑菌圈是 (8.64  $\pm$  0.12) mm。乙型溶血性链球菌对石油醚萃取物属于中度敏感, 对氯仿部分为低度敏感, 乙酸乙酯、正丁醇与水部位均不敏感。

**3.2 最小抑菌浓度的测定** 本试验测定了三丫苦地上部分与地下部分醇提物和各个部位对乙型溶血性链球菌的最小抑菌浓度(MIC), 结果三丫苦地上部分石油醚、氯仿、乙酸乙酯部位的 MIC 按生药量计分别是 0.031 25, 0.25, 0.125  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 三丫苦地下部分石油醚、氯仿部位的 MIC 按生药量计为 0.015625, 0.125  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 都显示出乙型溶血性链球菌对其有较好的敏感度, 但是不论是地上部分还是地下部分大极性的萃取物对乙型溶血性链球菌无明显抑菌作用, 与打孔法获得的结果一致。

### 4 讨论

实验结果表明三丫苦茎叶与根一样, 对乙型溶血性链球菌有一定的抑制作用, 根的抑菌作用更强, 说明药用部位只用地地上部分有其合理性。同时为三丫苦治疗咽喉肿痛、湿疹、皮炎等提供了实验依据。石油醚部位抑菌效果最好, 说明三丫苦对乙型溶血性链球菌有抑制作用的成分是极性小的成分, 有必要对三丫苦的石油醚、氯仿、乙酸乙酯部位的活性成分进一步追踪, 找到活性成分。

### [参考文献]

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1976: 27.
- [2] 梁粤, 郭丽冰. 三丫苦化学成分及药理活性研究进展[J], 中国现代中药, 2009, 11(2): 15.
- [3] 广东省食品药品监督管理局. 广东中药材标准(第一册)[S], 广州: 广东科技出版社, 2004: 7.
- [4] 徐坚. 中药三丫虎研究概况[J]. 福建中医药, 1985, (4): 43.
- [5] 李仪奎, 金若敏. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 755.
- [6] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1657.

[责任编辑 聂淑琴]