

# 野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物抑菌活性的研究

邓 佳<sup>1</sup>, 王 芳<sup>2</sup>, 史正军<sup>1</sup>, 刘惠民<sup>1</sup>

(1. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘 要:**以野生牛角瓜为试材, 采用索氏提取法提取野生牛角瓜花、果、叶中脂溶性物质, 选择大肠杆菌、普通变形杆菌和枯草芽孢杆菌为供试菌, 采用抑菌圈法和最低抑菌浓度法测定其抑菌活性, 研究野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物的抑菌活性。结果表明: 野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物对大肠杆菌抑菌效果最明显, 其中叶脂溶性提取物的抑菌活性最强。叶脂溶性提取物对大肠杆菌和普通变形杆菌的最小抑菌浓度分别为 30、60 mg/mL。野生牛角瓜脂溶性提取物具有抗菌能力, 可为牛角瓜资源的进一步开发利用提供一定的参考依据。

**关键词:**牛角瓜; 脂溶性提取物; 抑菌活性

**中图分类号:**S 567. 23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2014)24—0144—03

牛角瓜(*Calotropis gigantea* L.) 属萝藦科牛角瓜属植物, 又称羊浸树、断肠草, 广泛分布于亚洲和非洲的热带亚热带地区, 在我国主要分布于海南、广东、四川和云南<sup>[1-2]</sup>。牛角瓜属植物在民间具有广泛的药用价值, 其根、茎、叶、果及各部位的白色汁液均可药用, 具有抗菌、消炎、驱虫、解毒等作用, 可用于哮喘、咳嗽、麻疯病、溃疡、肿瘤等疾病的治疗<sup>[3-4]</sup>。目前, 国内外对牛角瓜的化学成分和药理作用做了多方面的研究, 结果表明, 牛角瓜含有生物碱、黄酮、酚类、强心苷类、三萜类和甾体类等多种类型的化合物<sup>[3]</sup>, 具有抗菌、抗肿瘤等活性。

有研究报道了牛角瓜属植物脂溶性成分的抑菌性, 并从中发现和提取低毒广谱抗菌物质<sup>[5]</sup>。王茂媛等<sup>[6]</sup>研究证明, 牛角瓜花脂溶性成分对金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)均表现出一定的抑制作用。Alam 等<sup>[7]</sup>报道了牛角瓜根脂溶性成分对藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)具有明显的抑菌效果, 但关于牛角瓜不同部位脂溶性提取物抑菌效果的比较研究尚鲜见详细报道。

该试验采用氯仿萃取野生牛角瓜乙醇提取物, 研究牛角瓜不同部位(花、果、叶)脂溶性提取物对 3 种常见细菌的抑菌效果, 以期为牛角瓜的研究与开发提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料野生牛角瓜(*Calotropis gigantea*)花、果、叶于 2013 年 11 月采自云南省玉溪市元江县, 分别干燥粉碎后备用。供试菌种为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 由西南林业大学植物病理实验室提供。试剂为无水乙醇、氯仿、正己烷、氢氧化钠、牛肉膏、蛋白胨、琼脂等试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 提取液的制备** 将野外采集的野生牛角瓜花、果、叶带回实验室, 在烘箱中 60℃ 烘干粉碎, 过 40 目筛, 称取牛角瓜花、果、叶样品各 30 g, 置于索氏提取器中, 加入 300 mL 75% 乙醇溶液(物料比 1:10), 85℃ 回流提取 4 h, 减压回收乙醇至无醇味, 粗提物分散于水中形成悬浊液, 经氯仿萃取 3 次, 合并减压浓缩得黄色油状提取物备用。

**1.2.2 抑菌活性试验** 该试验所用培养基为牛肉膏蛋白胨固体培养基: 蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、氯化钠 5 g 和琼脂 18~20 g, 去离子水定容至 1 000 mL, pH 值调至 7.0~7.2, 121℃, 0.15 MPa 下湿热灭菌 30 min。牛肉膏蛋白胨液体培养基: 除不加琼脂外, 与牛肉膏蛋白胨固体培养基配制方法相同。菌种活化: 将供试的菌株接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基斜面, 37℃ 培养 24 h。菌悬液制备: 在 3 个装有 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的

**第一作者简介:**邓佳(1983-), 女, 云南昆明人, 博士, 讲师, 现主要从事经济林栽培与开发利用等研究工作。E-mail: dengjia1983@163.com.

**责任作者:**刘惠民(1957-), 男, 湖南武冈人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事经济林栽培与开发利用等研究工作。

**基金项目:**国家林业局林业公益行业资助项目(201304810); 教育部重点实验室科研基金资助项目(KLESWFU-1405); 西南林业大学科研启动资助项目(111406)。

**收稿日期:**2014-09-09

三角瓶中各接种一环活化供试菌株,于 37℃ 培养 18 h,制得初始菌悬液。用无菌生理盐水采用梯度稀释法制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  等 6 个浓度梯度的菌悬液;选取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  2 个梯度各取 200  $\mu\text{L}$  分别涂布平板,于 37℃ 倒置培养 18 h 后计数。根据培养结果,挑选合适浓度的菌悬液作为供试菌悬液。抑菌圈法:用打孔器将滤纸打成孔径为 6 mm 的圆纸片,高压蒸汽灭菌。将灭菌后的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基倒入无菌培养皿制成平板,每皿约 20 mL,待培养基凝固以后,分别加入 3 种菌悬液(大肠杆菌:  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL,枯草芽孢杆菌:  $3.8 \times 10^7$  CFU/mL,普通变形杆菌:  $6.6 \times 10^7$  CFU/mL) 各 200  $\mu\text{L}$ ,用无菌玻璃刮涂布均匀。将野生牛角瓜花、果、叶氯仿萃取物配成质量浓度分别为 60 mg/mL 的正己烷溶液,取直径 6 mm 的无菌滤纸片,分别放入牛角瓜花、果、叶的正己烷溶液中充分浸泡,并以正己烷作空白对照,取出后放在含菌平板上,每皿 1 片对照,每个浓度平行作 2 皿,37℃ 倒置培养 18~24 h 后,分别测量各样品的抑菌圈直径(mm),取平均值。最低抑菌浓度(MIC)法:根据上述试验结果,对具有明显抑菌圈的样品进行 MIC 值的测定。将具有最佳抑菌效果的提取原液进行连续梯度稀释,配成含提取原液为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 的 5 种浓度的液体,加之原液一共有 6 个浓度梯度的提取液,加入 1.0 mL 离心管并用去离子水补齐、摇匀,再分别加入到灭菌的 19 mL 培养基中,混匀,制成平板。待培养基凝固以后,分别加入上述 3 种菌悬液各 200  $\mu\text{L}$ ,菌悬液的浓度为  $10^6$  CFU/mL,涂布于平板,于 37℃ 倒置培养 24 h,观察细菌生长情况。以完全无菌生长的浓度作为供试样品溶液的 MIC 值,同时以 1.0 mL 正己烷溶液代替牛角瓜提取物溶液与培养基混合作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生牛角瓜脂溶性提取物样品得率

野生牛角瓜花、果、叶乙醇提取物,经氯仿萃取合并浓缩,分别得花、果、叶脂溶性提取物 1.60、1.35、2.10 g,得率分别为 5.3%、4.5%、7.0%。

### 2.2 野生牛角瓜脂溶性提取物的抑菌效果比较

从表 1 可以看出,野生牛角瓜叶脂溶性提取物对大肠杆菌的抑菌效果最佳,对普通变形杆菌的效果次之,对枯草芽孢杆菌作用不理想。野生牛角瓜花脂溶性提取物对大肠杆菌和普通变形杆菌抑菌效果较好,对枯草芽孢杆菌的抑菌作用最弱。野生牛角瓜果脂溶性提取物除对普通变形杆菌外无明显抑菌效果。

上述结果表明,野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物总体上对大肠杆菌和普通变形杆菌的抑菌效果比枯草芽孢杆菌的效果好,特别是对大肠杆菌的抑菌效果较明显。野生牛角瓜 3 个部位脂溶性提取物中,叶提取物抑

菌作用最强,其次是花提取物,果提取物的抑菌作用最弱。

表 1 野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物对 3 种菌的抑菌直径

Table 1 Diameter zone of inhibition for 3 bacterial with liposoluble extraction in different parts of wild *Calotropis gigantean*

菌株 Bacterial strain	抑菌圈大小 Diameter zone of inhibition/mm			
	花 Flower	果 Fruit	叶 Leave	对照 Control
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	7.21	6.46	15.00	6
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	7.08	6.73	8.13	6
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	6.21	6.15	6.32	6

### 2.3 野生牛角瓜叶脂溶性提取物的最低抑菌浓度(MIC)值

由表 2 可知,野生牛角瓜叶脂溶性提取物对大肠杆菌和普通变形杆菌的最低抑菌浓度分别为 30、60 mg/mL。野生牛角瓜叶脂溶性提取物对枯草芽孢杆菌抑菌效果不明显,在叶脂溶性提取物较高浓度下,细菌仍生长良好。

表 2 野生牛角瓜叶脂溶性提取物对试验菌的最低抑制浓度

Table 2 The minimal inhibitory concentration (MIC) of leave liposoluble extraction against for test organisms

菌株 Bacterial strain	叶脂溶性提取物最低抑菌浓度 MIC Minimal inhibitory concentration of leave liposoluble extraction MIC/(mg · mL <sup>-1</sup> )				
	60	30	15	7.5	3.75
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	+	++	+++
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	—	+	+++	++++	+++++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	+	++	+++	++++	+++++

注:“—”表示无菌生长;“+”表示有少量菌体生长;“++”表示有不超过 1/3 平皿面积的菌体生长;“+++”表示有不超过 1/2 平皿面积的菌体生长;“++++”表示有超过 1/2 平皿面积的菌体生长[8]。

Note:“—” shows no bacterial;“+” shows little bacterial;“++” shows less than 1/3 plate area of bacteria;“+++” shows less than 1/2 plate area of bacteria;“++++” shows more than 1/2 plate area of bacteria.

## 3 讨论与结论

该试验采用 75% 的乙醇 85℃ 回流提取经氯仿萃取得浸膏分别为:花 1.60 g、果 1.35 g、叶 2.10 g,得率分别为 5.3%、4.5%、7.0%。抑菌试验结果表明,野生牛角瓜脂溶性提取物对大肠杆菌、普通变形杆菌和枯草芽孢杆菌都有一定抑菌作用,抑菌效果大小依次为:大肠杆菌>普通变形杆菌>枯草芽孢杆菌。野生牛角瓜不同部位脂溶性提取物抑菌效果大小依次为:叶>花>果。叶脂溶性提取物对大肠杆菌和普通变形杆菌的最小抑菌浓度分别为 30、60 mg/mL。野生牛角瓜脂溶性提取物对 3 种细菌的抑菌活性具有明显差异,这可能与革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌细胞壁结构组分不同有关。大肠杆菌和普通变形杆菌属革兰氏阴性菌,其细胞壁较薄,物质的转运通道多,相对而言,野生牛角瓜抑菌物质更容易穿过细胞壁,表现为较强的抑菌作用。枯草芽孢杆菌属革兰氏阳性菌,其细胞壁较厚,肽聚糖含量丰富,

形成坚固致密的三维立体网状结构,膜转运通道少,抑菌化合物较难进入细胞质膜,抑菌效果相对较弱<sup>[9]</sup>。

该试验仅研究了体外抑菌效果,未进行有机体内抑菌活性试验,且该试验所选提取溶剂、时间、温度较为单一,对脂溶性成分种类、含量也不尽相同,从而对抑菌活性有很大影响,需要进一步对不同提取溶剂、提取条件进行系统研究。结果表明,野生牛角瓜脂溶性提取物对供试菌有良好的抑菌作用,与王茂媛等<sup>[6]</sup>的研究结果相似。野生牛角瓜脂溶性成分含有多种化合物,如脂肪酸类、烷烃类、醇类等,已有试验表明牛角瓜脂溶性成分含有羽扇豆醇、 $\alpha$ -香树脂醇和 $\beta$ -香树脂醇等三萜类化合物,其具有抗肿瘤、抗炎和镇痛的作用并对多种细菌也有广泛的抗菌作用<sup>[6,10]</sup>,但值得注意的是,该试验中野生牛角瓜不同部位脂溶性成分的抑菌活性有所差异,推测与其不同部位萜类成分含量不同有关。该研究只是对野生牛角瓜脂溶性提取物进行了抑菌活性的初步研究,具体哪一种或几种活性成分起主要抑菌作用,以及各活性成分之间的相互作用目前尚不明确,因此对野生牛角瓜脂溶性提取物中抑菌活性成分的进一步分离纯化及其抑菌机理有待进一步深入研究和探讨。

牛角瓜提取液作为天然植物的抗菌物质,具有多种药用价值,国内外学者对它的化学成分和药理活性进行了广泛的研究<sup>[2,11-12]</sup>。近年来,各种抗菌素的大量广泛应用,使细菌的抗药性问题变得越来越突出。采用牛角瓜提取液配合一些抗生素来使用,可以减少抗生素的使用量,降低抗药性。随着国内外学者对牛角瓜化学成分、药理活性展开的深入研究,将有利于人们对牛角瓜属植物的开发利用。

## Study on Bacteriostatic Activity of Different Parts of *Calotropis gigantean* Liposoluble Extraction

DENG Jia<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, SHI Zheng-jun<sup>1</sup>, LIU Hui-min<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Key Laboratory of Diversity Conservation in the Southwest of China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** Taking *Calotropis gigantean* as material, liposoluble constituents of *Calotropis gigantean*'s flower, fruit and leave were extracted by soxhlet extraction. The antibacterial activities on *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and *Bacillus subtilis* of three fractions were studied by inhibition zone method and minimal inhibitory concentration (MIC) method to study the bacteriostatic activity of different parts of *Calotropis gigantean* liposoluble extraction. The results showed that the antibacterial activity of liposoluble extraction in different parts of *Calotropis gigantean* were the highest for *Escherichia coli*, while leave extraction exhibited the strongest bacteriostatic activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) of leaves liposoluble extraction against for *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris* were 30 mg/mL, 60 mg/mL respectively. The wild *Calotropis gigantean* liposoluble extractions had a good bacteriostatic activity. The study could provide theoretical foundation for further studying and developing of the *Calotropis gigantean*.

**Keywords:** *Calotropis gigantean* L.; liposoluble extraction; antibacterial activities

## 参考文献

- [1] 中国科学院华南植物研究所编辑委员会. 海南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1974: 260-261.
- [2] 戴好富, 王茂媛, 梅文莉, 等. 牛角瓜属植物化学成分与药理活性研究进展[J]. 河南大学学报(医学版), 2009, 28(1): 1-7.
- [3] Singh S, Singh S, Singh A P. Phytochemical investigation of different plant parts of *Calotropis Gigantea*[J]. International Journal of Scientific and Research Publication, 2013, 9(3): 1-3.
- [4] Wang M Y, Mei W L, Deng Y Y, et al. Cytotoxic constituents from the roots of *Calotropis gigantean*[J]. Modern Pharmaceutical Research, 2008, 1(2): 4-9.
- [5] Chitme H R, Chandra R, Kaushik S. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals[J]. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2004, 7(1): 70-75.
- [6] 王茂媛, 王建荣, 张新蕊, 等. 牛角瓜花脂溶性成分及其抗菌活性研究[J]. 中药材, 2013, 36(3): 404-407.
- [7] Alam A M, Habib R M, Nikkon F, et al. Antimicrobial activity of akan-da (*Calotropis gigantean* L.) on some pathogenic bacteria[J]. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 2008, 43(3): 397-404.
- [8] 张虹, 白红丽, 张江梅, 等. 青叶胆不同部位总黄酮提取及其抑菌作用[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 224-226.
- [9] 冯聪, 林莉莉, 陆军, 等. 红薯茎叶黄酮提取物抑菌研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(8): 14-17.
- [10] 王茂媛, 戴好富, 王祝年. 牛角瓜根脂溶性成分的 GC-MS 分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 2039-2042.
- [11] Seeka C, Suttthivaiyakit S. Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 58(5): 725-728.
- [12] Dhivya D, Manimegalai K. Preliminary phytochemical screening and GC-MS profiling of ethanolic flower extract of *Calotropis gigantean* Linn. (Apocynaceae)[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2013, 2(3): 28-32.