

• 基础实验研究 •

楠竹叶乙醇提取液与水煮液的抑菌效果比较

梁 莹

(咸宁学院基础医学院病原系实验室 437100)

摘 要:目的 比较楠竹叶无水乙醇提取液与楠竹叶水煮液的抑菌效果。方法 采取琼脂平板扩散法测定楠竹叶无水乙醇提取液与楠竹叶水煮液的抑菌效果及其最小抑菌浓度(MIC)。结果 无水乙醇提取液与水煮液对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑菌效果,当提取液的浓度在 100%和 50%时的最小抑菌浓度分别为 6.25%、12.5%、3.13%、6.25%、12.5%、25%和 12.5%、12.5%、25%、12.5%、6.25%、50%。结论 无水乙醇提取液的抑菌效果与浓度有密切关系,而水煮液两种浓度的抑菌效果与浓度影响不大。且提取液浓度在 50%时与水煮液浓度在 100%时的抑菌效果差距不大。因此,楠竹叶的水煮液对 G⁺ 和 G⁻ 菌的感染均有辅助疗效的作用。

关键词:乙醇; 楠竹叶; 提取液; 水煮液; 抑菌效果

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)01-0045-02

The compare on the antibacterial effect of bamboo leaves ethanol extracts and bamboo leaves decoction

Liang Ying

(Department of Medical microbiology of Basic Medical, Xianning University, Hubei 437100, China)

Abstract: Objective To compare on the antibacterial effect of bamboo leaves ethanol extracts and bamboo leaves decoction. **Methods** Agar plate diffusion method was used to determine ethanol extract of bamboo leaves and bamboo leaves and decoction antibacterial effect of the minimum inhibitory concentration. **Results** It showed that ethanol and decoction extract were significant antibacterial effect against Staphylococcus aureus, Staph. epidermidis, Escherichia coli, Salmonella typhi, proteus vulgaris, Bacillus subtilis, the minimal inhibitory concentration of the extract for them were 6.25%, 12.5%, 3.13%, 6.25%, 12.5%, 25% and 12.5%, 12.5%, 25%, 12.5%, 6.25%, 50% when the concentration of extract at 100% and 50%. **Conclusion** The experiment indicates that the antibacterial effect of bamboo leaves ethanol extracts is closely related to the concentration, and the antibacterial effect of bamboo leaves decoction is little related to the concentration, and the antibacterial effect of extract concentration in 50% and decoction concentration in 100% are not differ much. Therefore, the decoction of bamboo leaves have secondary treatment effects for gram positive and negative bacteria.

Key words: ethanol; bamboo leaves; extracts; decoction; antibacterial effect

楠竹又名毛竹、猫头竹、孟宗竹,属禾本科竹亚科刚竹属,多年生绿植物,主要分布在湖南、湖北、江西、福建等地。楠竹叶在食用、药用方面都有着悠久的历史。竹叶含有大量的黄酮、内酯、多糖、叶绿素、氨基酸、维生素、微量元素等营养素。其中黄酮具有抗衰老、抗应激、抗疲劳、调节血脂、阻断亚硝化反应、增加免疫能力、抗菌和抑菌等作用^[1-2]。据《中药大辞典》记载,淡竹叶功用:主治清热除烦,生津利尿;治热病烦渴,小儿惊痫,咳逆吐血,面赤,小便短赤,口糜舌疮等。近几年来,有关人员楠竹叶乙醇提取液的抑菌效果作了大量的研究^[3],得到了广泛的认识。但是,提炼提取液的操作过程繁琐,而楠竹叶水煮液既方便又省时更省力省费用。现以楠竹叶无水乙醇提取液的抑菌效果与楠竹叶水煮液的抑菌效果进行比较,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 设备 DHP-9082D 电热恒温培养箱(上海申贤恒温设备厂);全自动不锈钢双层立式电热蒸汽压力消毒器(上海三申医疗器械有限公司);垂直流超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);RE201C(2L)旋转蒸发器(南京旺厚仪器设备有限公司);DK-600 电热恒温水浴槽(上海申贤恒温设备厂);TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);电热鼓风干燥箱(上海申贤恒温设备厂)。

1.1.2 楠竹叶 采摘于咸宁学院校园小竹林的当年竹叶。

1.1.3 培养基 营养琼脂(BR 生化试剂。北京奥博星生物技

术有限责任公司)普通肉汤培养基(由本室提供)。

1.1.4 供试菌 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、表皮葡萄球菌(ATCC 12228)、大肠杆菌(ATCC 25922)、伤寒杆菌(ATCC 14028)、普通变形杆菌(ATCC 49132)、枯草芽孢杆菌(ATCC 9372),来源于华中科技大学同济医学院医学微生物学教研室。

1.1.5 试剂 石油醚(上海宝曼生物科技有限公司),无水乙醇(安徽特酒总厂),0.9%的无菌生理盐水(湖北拓朋药业有限公司)。

1.1.6 阳性药物纸片 青霉素(peillin G, PG)、链霉素(streptomycin, Sm)、庆大霉素(gentamicin, Gm)、氯霉素(chloroamphenicol, CM)均来自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 供试菌悬液的制备^[4] 营养琼脂斜面培养基 24 h 新鲜培养物,用无菌生理盐水洗下,并稀释至含菌量为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL(麦氏比浊法)的悬液,备用^[5]。

1.2.2 楠竹叶提取液的制备^[6] 将楠竹叶烘干,粉碎,称取 10 g 竹叶于三角烧瓶中,加入 100 mL 石油醚,常温脱脂脱色 2 h,过滤回收石油醚,并将三角烧瓶中剩余的石油醚通过水浴加热回收除尽。然后加 100 mL 无水乙醇,放在 60 °C 恒温水浴箱中提取 16 h,过滤,滤液 4 000 r/min 离心沉降 10 min,去除沉淀杂质得到棕色的提取液。提取液用旋转蒸发器进行真空浓缩,浓缩至 10 mL 内,再加适量蒸馏水继续浓缩除去溶剂至 10 mL,经高压蒸汽灭菌,备用。

1.2.3 楠竹叶水煮液的制备^[7] 将新鲜楠竹叶 50 g 洗净凉干,剪碎,加适量蒸馏水煎煮 30 min 后倒出,再加适量的蒸馏水继续煎煮 20 min 倒出,将两次提取液合并,过滤,浓缩至 50 mL(100%)。经高压蒸汽灭菌,备用。

1.2.4 实验纸片制备 将备用的楠竹叶提取液和楠竹叶水煮液作为原液,分别用 2 倍稀释法稀释成两种不同的浓度 100%、50%^[8],用新华定性滤纸制作成直径 5 mm 的滤纸片,经高压蒸汽灭菌处理后,置 120 ℃,2 h 烤干,用无菌镊子夹取,浸在不同浓度的楠竹叶提取液和楠竹叶水煮液中 12 h,备用。

1.2.5 阴性对照液纸片的制备 将直径 5 mm 的无菌滤纸片放入 0.9% 的无菌生理盐水中浸泡 12 h,备用。

1.2.6 琼脂平板扩散法测定^[9] 用涂抹法将各供试菌液(100 μL)接种在培养基上,再用无菌镊子夹取浸有不同浓度提取液和水煮液的滤纸片及阳性和阴性对照纸片,分别贴于涂布供试菌的琼脂平板上。其中每个琼脂平板贴 3 片,每种细菌对应每种液片重复 3 次。完成后,置于 37 ℃ 的恒温箱中培养 24 h,观察测定各琼脂平板上滤纸片周围抑菌圈直径的大小,比较抑菌效果。

1.2.7 最小抑菌浓度(MIC)的测定^[10] 用 2 倍稀释法,将楠竹叶提取液与楠竹叶水煮液的原液(100%),用无菌蒸馏水稀释为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.56% 6 种不同浓度,分别取 2 mL 放入无菌平板内,然后倒入高压灭菌后的营养琼脂培养基 2 mL,充分混匀,冷却凝固后,每个平板加入 0.2 mL 供试菌液涂匀。每个浓度重复 3 个,以不放提取液和水煮液的平板作为对照,完成后 37 ℃ 培养 24 h 观察结果,以含提取液与水煮液浓度低,而无肉眼可见菌生长的平板浓度为该菌的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.8 药敏实验纸片判断标准 见表 1。

表 1 药敏实验纸片判断标准			
抗菌药物	抑菌圈直径(mm)		
	高度敏感	中度敏感	耐药
PG	≥29	21~28	≤20
Sm	≥15	12~14	≤11
Gm	≥15	13~14	≤12
CM	≥17	10~17	≤10

2 结 果

2.1 楠竹叶无水乙醇提取液与楠竹叶水煮液和阳性、阴性对照组的抑菌效果 新鲜竹叶乙醇提取液及水煮液的浓度在 100% 和 50% 时对供试菌都有明显的抑制作用。其中对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等化脓性球菌的抑制能力最强,大肠杆菌、伤寒杆菌、普通变形杆菌等肠道杆菌的抑菌效果次之,枯草芽孢杆菌的抑菌效果最弱。见表 2~4。

表 2 楠竹叶提取液的抑菌效果		
供试菌	抑菌圈直径(mm)	
	100%	50%
金黄色葡萄球菌	18.5	10.5
表皮葡萄球菌	21.5	12.0
大肠杆菌	11.5	10.5
伤寒杆菌	9.0	8.0
普通变形杆菌	11.5	6.0
枯草芽孢杆菌	9.5	6.5

表 3 楠竹叶水煮液的抑菌效果		
供试菌	抑菌圈直径(mm)	
	100%	50%
金黄色葡萄球菌	9.0	7.0
表皮葡萄球菌	11.0	7.5
大肠杆菌	10.0	8.0
伤寒杆菌	7.0	6.5
普通变形杆菌	10.0	8.0
枯草芽孢杆菌	5.5	5.5

表 4 阳性、阴性对照组的抑菌效果					
供试菌	抑菌圈直径(mm)				
	PG	Sm	Gm	CM	盐水
金黄色葡萄球菌	19	28	35	23	—
表皮葡萄球菌	18	37	36	40	—
大肠杆菌	0	25	24	27	—
伤寒杆菌	0	13	11	18	—
普通变形杆菌	0	35	40	37	—
枯草芽孢杆菌	0	28	25	23	—

—:无抑菌效果。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)测定结果 见表 5。

表 5 提取液与水煮液最小抑菌浓度(MIC)		
供试菌	最小抑菌浓度(MIC)	
	提取液(%)	水煮液(%)
金黄色葡萄球菌	6.25	12.50
表皮葡萄球菌	12.50	12.50
大肠杆菌	3.13	25.00
伤寒杆菌	6.25	12.50
普通变形杆菌	12.50	6.25
枯草芽孢杆菌	25.00	50.00

3 讨 论

本研究显示,100% 的提取液对供试菌的抑菌效果均比较强。而提取液浓度在 50% 时,供试菌的抑菌圈直径落差较大,特别是金黄色葡萄球菌由 18.5 mm 下降到 10.5 mm,表皮葡萄球菌的抑菌圈直径也由 21.5 mm 降至 12.0 mm。说明提取液的抑菌效果与浓度有密切的关系。但对大肠杆菌、伤寒杆菌影响不大。本研究显示,楠竹叶的水煮液浓度在 100% 和浓度在 50% 时,供试菌的抑菌圈直径相近,说明抑菌效果与浓度无明显差异,具体原因有待于进一步研究。

贾桂云等^[10]报道,竹叶的提取液适合添加到由细菌引起变质的食物中。说明竹叶的提取液在饮食过程中无毒无害。而姚志蕊等^[11]的研究表明,楠竹叶提取物可应用于化妆品作为防腐剂,说明对人体皮肤基本不会产生过敏反应。上述研究均表明,楠竹叶已经广泛用于工业、农业各个生产领域。根据药物敏感实验判定标准^[12],抑菌效果表明竹叶提取液及水煮液对 G⁺ 和 G⁻ 菌均有一定的抑制作用,特别对化脓性球菌作用更加明显。因此,有待成为纯天然的广谱抗(下转第 48 页)

(可能还有吸入)卵囊污染的水或食物而被感染。进入人体后,卵囊内的子孢子逸出并寄生于胃肠道或其他组织(如呼吸道)上皮细胞,经裂体增殖及配子增殖发育为卵囊。卵囊在宿主体内形成孢子排出。卵囊有两种,一种是通常从宿主排泄的厚壁卵囊,一种是与自体感染有关的薄壁卵囊^[6]。隐孢子虫的生活史仅需 5~11 d 即可完成。由于卵囊排出体外时已具有感染性,使直接和即刻的粪-口传播成为可能^[7]。

隐孢子虫感染是引起艾滋病患者腹泻的最常见原因。严重的腹泻多发生于 CD⁺4 细胞显著减少(<200/ μ L)的艾滋病患者^[8],感染起始于空、回肠,可播散至大部分的胃肠道黏膜。临床特征为频繁水泻,一天有数次至数十次,患者可出现严重脱水和电解质紊乱,一些患者可进展为慢性腹泻。人对隐孢子虫的易感性与年龄显著相关,5 岁以下婴幼儿易感染,先天及后天免疫功能低下者及接受免疫抑制剂治疗的患者感染率高,也可发生严重的隐孢子虫感染^[9-12]。由药物造成免疫功能低下的患者,停药后隐孢子虫病即可痊愈。

目前,诊断隐孢子虫病的方法有多种,如病原学检查法、免疫学方法和核酸分子生物学方法^[13]。免疫荧光法及 PCR 方法在国内外都已有所应用,但由于其成本较高及标准化等原因,不易于普及^[14]。病原学检查目前仍是隐孢子虫病确诊的金标准。病原学诊断方法包括碘染色、沙黄-美蓝染色、金胺-酚染色、改良抗酸染色等,从粪便中检查隐孢子虫卵囊^[15]。其中,改良抗酸染色是临床实验室最常使用的可靠方法,抗酸染色镜下卵囊呈亮红色,圆形或椭圆形,直径 4~5 μ m,内部子孢子清晰可见。为提高卵囊的检出率,涂片染色前应先浓集卵囊,甲醛-乙酸乙酯沉淀法是推荐使用的临床实验室粪便浓集方法。

参考文献

- [1] Certad G, Arenas-Pinte A, Pocater L, et al. Cryptosporidiosis in HIV-infected venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(1): 54-57.
- [2] 杜学利. 免疫缺陷病人隐孢子虫感染流行病学特征研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(9): 699-702.

(上接第 46 页)

菌药物的可靠来源。

本研究显示,楠竹叶提取液浓度在 50% 时与水煮液浓度在 100% 时的抑菌效果差距不大,而水煮液浓度在 100% 和 50% 时的抑菌效果均比较稳定。因此,提取液的抑菌效果还是比相同稀释度水煮液的抑菌效果要好。但是考虑到中国人口众多,特别是偏僻山区,医源条件不齐,同时,水煮液比提取液制作更加方便、经济,需要的仪器条件更为简单,因此对于一些常见的皮肤化脓性感染的日常家庭治疗,水煮液更为方便实用。辅以饮用、外用、预防、保健都具有良好的抑制细菌生长的作用^[13-14]。

参考文献

- [1] 陶文亮,吴玉娟. 竹叶黄酮提取分析方法的研究及其新进展[J]. 贵州化工, 2009, 34(3): 15-17.
- [2] 张英. 竹叶黄酮的生理和药理活性[J]. 世界竹藤通讯, 2004, 2(2): 1-11.
- [3] 荆文静. 竹叶黄酮类化合物研究进展[J]. 科技情报开发与经济, 2009, 19(20): 139.
- [4] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 2002-11-15.

- [3] Xiao L, Fayer R, Ryan U, et al. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(1): 72-97.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 308.
- [5] Pantenburg B, Dann SM, Wang HC. Intestinal immune response to human Cryptosporidium sp. Infection[J]. Infect Immun, 2008, 76(1): 23-29.
- [6] 赵杰,张龙现,李逐波. 隐孢子虫病研究进展[J]. 河南畜牧兽医, 2008, 29(5): 8-9.
- [7] 吴亮,陈盛霞,曹建平,等. 隐孢子虫病的流行与诊断研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(5): 277-281.
- [8] 张艳梅,潘自铁,高永刚. 人类免疫缺陷病毒感染及艾滋病患者免疫功能与病毒载量之间的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(6): 563-564.
- [9] 王珺,刘泉波,许红梅. 儿童迁延性慢性腹泻的病因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 236-238.
- [10] Ford A, Duke T, Campbell H. Evidence behind the WHO guide lines: hospital care for children: what is the aetiology and treatment of chronic diarrhoea in children with HIV[J]. J Trop Pediatr, 2009, 55(6): 349-355.
- [11] Sandhu SK, Priest JW, Lammie PJ, et al. The natural history of antibody response to Cryptosporidium parasites in men at high risk of HIV infection[J]. Infect Dis, 2006, 194(10): 1428-1437.
- [12] Ud giri N, Minz M, Kashyap R, et al. Intestinal cryptosporidiosis in living related renal transplant recipients[J]. Transplant Proc, 2004, 36(7): 2128-2129.
- [13] 田利光,周晓农. 艾滋病患者几种易被忽视的肠道寄生虫感染[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(5): 376-381.
- [14] 陈盛霞,吴亮,沈玉娟,等. 采用实时 PCR 技术比较不同方法提纯隐孢子虫卵囊 DNA 效果[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(2): 130-134.
- [15] 卢良安,张文生,李碧波. 隐孢子虫病的病原学诊断及病例对照研究[J]. 当代医学, 2009, 15(13): 150-151.

(收稿日期: 2011-09-20)

- [5] 谭瑶,赵清. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290-2291.
- [6] 黄占旺,邹双双,熊水波,等. 毛竹叶提取物抑菌作用的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 961.
- [7] 陈奇. 中药药理实验[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1998: 8-10.
- [8] 萧力争,郭维,刘素纯,等. 茶叶提取物与二氢杨梅素抑菌活性比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(2): 239-242.
- [9] 李桂兰,芮成. 3 种香兔耳提取物抑菌活性的研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(7): 45-47.
- [10] 贾桂云,邹润英,郭飞燕,等. 竹叶提取物抑菌效果研究[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 23(4): 420-422.
- [11] 姚志蕊,曹光群,杨成,等. 毛竹叶抑菌活性成分提取工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(5): 51-54.
- [12] 姚旌旗,覃金红,孙剑刚,等. 病原学与免疫学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 67-68.
- [13] 阳东青,赵美丽,余德润,等. 从竹叶中提取叶绿素[J]. 江西化工, 2008(1): 33-35.
- [14] 孙长花,张素华,张凌云,等. 竹叶黄酮的生理活性与应用研究[J]. 四川食品与发酵, 2006(1): 13-16.

(收稿日期: 2011-07-09)