

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.03.025

王硕,龚小妹,戴航,等. 西瓜藤提取物的抑菌作用研究[J]. 广西植物,2013,33(3):428—431

Wang S,Gong XM,Dai H,et al. Antimicrobial activity of the extracts from *Citrullus vulgaris* Schrad vine[J]. Guihaia,2013,33(3):428—431

西瓜藤提取物的抑菌作用研究

王 硕¹, 龚小妹^{2,3}, 戴 航², 周丹丹², 邓家刚^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001; 3. 广西药用植物研究所 西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 南宁 530023)

摘 要: 采用琼脂稀释法研究西瓜藤提取物的体外抑菌作用,用小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌法研究 80% 醇提取物的体内抑菌作用。结果表明:西瓜藤提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏菌均有不同程度的抑制作用,但对链球菌作用不明显。其中 80% 醇提取物和乙酸乙酯萃取物抑制金黄色葡萄球菌活性最好,其最低抑菌浓度(MIC)分别为 4.2、8.4 mg · mL⁻¹。体内实验也表明,80% 乙醇提取物具有较好的抑菌作用。西瓜藤提取物具有抑菌活性,在抑菌方面有一定开发前景。

关键词: 西瓜藤; 提取物; 抑菌作用

中图分类号: R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)03-0428-04

Antimicrobial activity of the extracts from *Citrullus vulgaris* Schrad vine

WANG Shuo¹, GONG Xiao-Mei^{2,3}, DAI Hang²,
ZHOU Dan-Dan², DENG Jia-Gang^{1*}

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 3. National Engineering Laboratory of Southwest Endangered Medicinal Resources Development, Institute of Guangxi Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

Abstract: Agar dilution method was applied to detect the antimicrobial effects of *Citrullus vulgaris* Schrad vine extract *in vitro*, and the mice celiac injection of staphylococcus aureus method was applied to detect the antimicrobial effect of *C. vulgaris* Schrad of 80% alcohol extract *in vitro*, in order to study antimicrobial activity *in vitro* of *C. vulgaris* Schrad vine extract. *C. vulgaris* Schrad vine extract had different inhibition effects on staphylococcus aureus, escherichia coli, bacillus aeruginosus, salmonella typh, bacillus subtilis and klebsiella pneumoniae, but it showed weak inhibition effect on chain coccus. Effects of 80% alcohol extract and ethyl acetate extract were better than others on staphylococcus aureus. The minimum inhibition concentration(MIC), was 4.2 mg · mL⁻¹, 8.4 mg · mL⁻¹ respectively. *C. vulgaris* Schrad vine extract had antibacterial action, and would provide a basis to exploit new antimicrobic drug.

Key words: *Citrullus vulgaris* Schrad vine; extraction; antibacterial action

西瓜藤为葫芦科(Cucurbitaceae)植物西瓜(*Citrullus lanatus*)的藤。西瓜的瓢、皮、籽皆可入药,已有两千年药用历史,为我国历代本草收载的品

种,而目前对西瓜藤的研究比较少(李培,2008),其作为一种农作物废弃物,资源非常丰富,开展其药用价值研究,对开发新的药用资源,实现中药资源的可

收稿日期: 2013-01-24 修回日期: 2013-04-19

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 10124008-12)

作者简介: 王硕(1973-),男,博士研究生,研究方向为中药药理与新药研发,(E-mail)ws428@163.com。

*通讯作者: 邓家刚,教授,博士生导师,研究方向为中药药效与物质基础,(E-mail)dengjg@tom.com。

持续发展具有重要的意义(邓家刚,2010)。笔者前期研究发现,西瓜藤总提取物具有较好的抗炎镇痛作用,其主要化学成分苯甲酸、对羟基苯甲酸、琥珀酸等均具有较好的抑菌作用(王硕等,2012;王硕等,2013;Jia-gang DENG,2010)。本文在前期研究基础上,开展了西瓜藤不同提取物的体内外抑菌活性研究,为开发新的药用资源提供了一点信息。

1 材料与仪器

1.1 动物

昆明种小鼠 60 只,体重 18~20 g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(桂)2011-0003。

1.2 药品与试剂

西瓜藤采自广西崇左,由广西药用植物研究所马小军研究员鉴定。M-H 琼脂(北京陆桥技术有限责任公司);氧氟沙星(上海迪赛诺生物医药有限公司,批号:国药准字 H20012224);无菌绵羊全血(广西医科大学实验动物中心);其余试剂为分析纯。菌株:金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、枯草芽孢氏菌(CMCC10211)、伤寒沙门氏菌(CMCC50035)、肺炎克雷伯氏菌(CMCC46117)、甲型溶血性链球菌(CMCC32205)、乙型溶血性链球菌(CMCC32204),均由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 仪器

SPX 型智能生化培养箱(宁波江南仪器厂);ATB 细菌药敏比浊仪(法国梅里埃公司)。

2 方法与结果

2.1 西瓜藤的提取物和药液的制备

取西瓜藤 50 g 晒干粉碎,分别用 10 倍、8 倍量水煮沸提取 2、1.5 h,合并提取液,浓缩干燥,即得水提取浸膏(12 g)(每克浸膏相当于 4.2 g 生药)。取西瓜藤干品 2 kg,用 5 倍量 80%乙醇分别常温超声提取 2、1 h 两次,过滤,合并滤液,减压浓缩至无醇味,冷冻干燥得 240 g 醇提取浸膏(每 1 g 浸膏相当于 8.3 g 生药)。将此浸膏分散于 500 mL 去离子水中,静置过夜。离心(3 000 r/min)分出不溶于水的黏稠固体悬浮物和水溶液。取水溶液依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 倍量萃取样品,萃取液分别

减压浓缩,回收溶剂,蒸干,得到石油醚浸膏(12 g)、乙酸乙酯浸膏(13.2 g)、正丁醇浸膏(40 g)(每 1 g 浸膏相当于 166.7、151.5、50 g 生药)。

称取 80% 醇提浸膏及水提浸膏各 2 g,分别加入 2 mL 二甲亚砜(DMSO)溶解后用无菌生理盐水稀释到 10 mL,配成 20% 的浓度;称取石油醚、乙酸乙酯、正丁醇浸膏各 2 g,分别用 4 mL DMSO 溶解后加无菌生理盐水定容至 20 mL,配成 10% 的浓度。

2.2 菌悬液和含药平皿的制备

采用直接菌落法制备菌悬液(张超等,2011;张继红等,2010;周立刚等,2004)。取各菌于 37 ℃、18~24 h 的纯培养物,用无菌生理盐水校正到浓度相当于 0.5 麦氏标准比浊标准,无菌生理盐水 1:10 稀释备用。每药取 10 个 75 mm 培养皿,编号后按顺序分别加入配好的药液 1.00、0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05、0.025、0.0125、0.01 mL;另取两个平皿,各加 1 mL 的无菌生理盐水和 1 mL 含 20% DMSO 的无菌生理盐水。M-H 琼脂经 120 ℃ 高压灭菌 20 min 后,在水浴中平衡到 60 ℃ 备用。加好药液的各组平皿,一份加 M-H 琼脂至 10 mL,另一份加含 5% 无菌绵羊全血的 M-H 琼脂至 10 mL,轻轻地振摇使药液和琼脂充分混匀,放置,冷却,琼脂厚度为 4~5 mm。

2.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

参照 NCCLS 推荐的液体稀释法(Microdilution method)进行,通过琼脂平板抑菌法观察上述西瓜藤不同萃取物的 MIC 结果。具体应用 2 倍稀释法对药物进行稀释,稀释液为 MH 液体培养基,每种中草药的剂量分别为 0.100、0.050、0.025、0.0125、0.00625 mg/L,在每个试管中加入 1.5×10^8 CFU/L 的细菌 10 μ L,35 ℃ 培养 24 h,分别转种普通平板培养基,24 h 后无细菌生长的试管则为 MIC。

2.4 体外抑菌试验

精确吸取 2 μ L 菌液,接种于琼脂平皿表面,形成直径为 5~8 mm 的菌斑,每个菌斑含菌数约为 10^4 CFU,链球菌接种在含绵羊血的平皿上,其它菌接种在不含血的平皿上。每药第 10 个平皿不接菌种作为药物对照,生理盐水组和 DMSO 组作生长对照,均有菌斑生成。将接种好菌液的平皿置室温下放置,待菌液被琼脂吸收后(一般不超过 30 min),把琼脂平皿倒置放入(35 $\pm$ 2)℃培养箱中孵育 16~20 h(李宏等,2007;黄宁珍等,2010;牛立新等,2008),链球菌 20~24 h。结果表明:试验方法重复

性良好。表中药物浓度为最后作用的药物浓度,即每毫升培养基中所含提取物的相当生药量。西瓜藤提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏

菌均有不同程度的抑制作用。其中,80%醇提取物和乙酸乙酯萃取物抑制金黄色葡萄球菌活性最好,其最低浓度(MIC)分别为 4.2、8.4 mg · mL⁻¹。各部分提取物对敏感菌的 MIC 结果见表 1。

表 1 西瓜藤提取物体外抑菌作用
Table 1 Inhibition effects of extracts from *Citrullus vulgaris* schrad vines *in vitro*

提取物 Extract	细菌 Bacteria	浓度 C (mg · mL ⁻¹)									对照组 Control group	最低抑菌浓度 MIC (mg · mL ⁻¹)
		84	67.2	50.4	33.6	16.8	8.4	4.2	2.1	1.05		
水提取物 Water extract	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	33.6
	大肠埃希氏菌	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	84
	铜绿假单胞菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	33.6
	枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	伤寒沙门氏菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	50.4
	肺炎克雷伯氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	甲型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	乙型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
80%醇提物 80% ethanol extract	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	4.2
	大肠埃希氏菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	33.6
	铜绿假单胞菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	枯草芽孢杆菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	50.4
	伤寒沙门氏菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	肺炎克雷伯氏菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	甲型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	乙型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate fraction	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	8.4
	大肠埃希氏菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	33.6
	铜绿假单胞菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	枯草芽孢杆菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	50.4
	伤寒沙门氏菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	肺炎克雷伯氏菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	甲型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	乙型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
石油醚萃取物 Patroleum ether fraction	金黄色葡萄球菌	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	84
	大肠埃希氏菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	铜绿假单胞菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	50.4
	枯草芽孢杆菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	伤寒沙门氏菌	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	84
	肺炎克雷伯氏菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	甲型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	乙型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
正丁醇萃取物 N-butyl alcohol fraction	金黄色葡萄球菌	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	50.4
	大肠埃希氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	铜绿假单胞菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	67.2
	枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	伤寒沙门氏菌	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	84
	肺炎克雷伯氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	甲型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	乙型溶血性链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—

注：+ 表示有细菌生长；— 表示无细菌生长。 Note: + bacteria growth;— No bacteria growth.

2.5 体内抗菌实验

选体重 18~20 g 小鼠,随机分组,设西瓜藤 80%醇提物高、中、低剂量组;氧氟沙星 0.06 g/kg 组和模型对照组,每组 10 只,每天灌胃 1 次,连续 5 d,末次给药 1 h 后腹腔注射浓度为 6×10^8 个/mL 金黄色葡萄球菌悬液 0.5 mL。然后继续每天给药 1

次,观察记录 7 d 内各组动物的存活时间及死亡动物数,与模型组比较, χ^2 法检验死亡率差异性,用 t 检验存活时间差异的显著性(张宏等,2012)。结果表明,西瓜藤 80%醇提物高、中剂量组有明显降低金黄色葡萄球菌感染小鼠死亡率的作用($P<0.05$, $P<0.01$),结果见表 2。

表 2 西瓜藤 80% 醇提物体内抗菌作用
Table 2 Inhibition effects of ethyl acetate extracts from *Citrullus vulgaris* schrad vines *in vivo*

组别 Group	剂量 Dose (g/kg ⁻¹ · d ⁻¹)	动物数(只) No.of animals	死亡数/总数 Mortality/Total	死亡率 Mortality rate	存活时间 Survival time (h)
模型组 Model group	—	10	9/10	90%	62.70±29.46
阳性组 Positive group	0.06	10	1/10 * *	10%	167.50±34.36 * *
高剂量 High-dose group	20	10	5/10 *	50%	104.94±60.69 *
中剂量 Modial-dose group	10	10	5/10 *	50%	99.56±39.18 *
低剂量 Low-dose group	5	10	8/10	80%	71.50±54.63

注：与模型组比较 * $P<0.05$, * * $P<0.01$ 。 Note: * $P<0.05$, * * $P<0.01$,as compared to the model control.

3 结论与讨论

本实验中西瓜藤 5 种不同提取物对临床常见 8 种细菌的抑制作用进行了研究,结果发现其对除链球菌外的 7 种临床常见致病菌金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯氏菌均有不同程度的抑制作用。其中,80% 醇提取物抑制金黄色葡萄球菌活性最好,其次为乙酸乙酯萃取物,最低浓度(MIC)分别为 4.2、8.4 mg · mL⁻¹,说明西瓜藤抑菌活性成分主要为脂溶性成分,存在于乙酸乙酯部位,但 80% 醇提取物的作用效果优于乙酸乙酯萃取物,可能是在萃取过程中一些不溶于水的黏稠固体悬浮物被萃取掉了,而这部分也具有抑菌的活性成分。体内实验表明,西瓜藤 80% 醇提物对金黄色葡萄球菌感染小鼠具有一定的降低死亡率的作用,但其作用机理有待进一步研究。

西瓜藤作为一种农作物废弃物,资源非常丰富,且毒副作用相对较小(邓家刚等,2010),因此在抗菌药物研究方面,具有较好的开发潜力以及广阔的临床应用前景,值得进一步研究。

参考文献:

王硕,龚小妹,周小雷,等. 2012. 四种不同品种西瓜藤化学成分预实验[J]. 时珍国医国药, **23**(2):390—391
邓家刚. 2010. 农作物废弃物药用研究的战略意义与基本思路[J]. 广西中医药, **33**(1):1—3
Deng JG(邓家刚), Wang S(王硕), Guo LC(郭力城), *et al.* 2010. Extracts from watermelon roots and leaves have protective roles in anti-inflammation and analgesia(西瓜根叶提取物抗炎镇痛作用实验研究)[J]. *Chin Herb Med*(中草药), **2**(3):231—235

Huang NZ(黄宁珍), Qu C(区婵), He JX(何金祥), *et al.* 2010. Isolation and identification of antagonistic bacteria and their mechanisms against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in karst area of Guangxi(广西岩溶区烟草黑胫病拮抗细菌的筛选鉴定及其抗病机理)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(6):869—875
Li H(李宏), Jing HC(姜怀春). 2007. Antibacterial effects of the total extract of *Hypericum perforatum* on clinically isolated bacteria (贯叶连翘总提取物对致病细菌的抗菌作用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(3):466—468
Li P(李培). 2008. Optimization of extraction process of total flavones from watermelon stalk(西瓜藤中黄酮类化合物提取工艺的优化)[J]. *Exp Rep & Theor Res*(实验报告与理论研究), **11**(2):29—31
Niu LX(牛立新), Jin L(靳磊), Zhang YL(张延龙), *et al.* 2008. An evaluation on the antibacterial effects of the bulb extract from three *Lilium* species(三种百合鳞茎提取物的抑菌作用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(6):842—846
Wang S(王硕), Gong XM(龚小妹), Zhou DD(周丹丹), *et al.* 2013. Study on chemical constituents of *Citrullus lanatus* vine(I)(西瓜藤的化学成分研究)(I)[J]. *Chin J Exp Trad Med Form*(中国实验方剂学杂志), **19**(6):131—134
Zhang C(张超), Wei Q(魏琴), Du YH(杜永华), *et al.* 2011. The antibacterial study on extracts from de-oiled leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* against three of the pathogenic bacteria(脱油樟叶提取物的体外抑菌活性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **31**(5):690—694
Zhang H(张宏), Gan Y(甘雨), Qiao M(乔敏). 2012. Bacteriostatic test of the extractive from *Blackberrylily rhizome*(射干提取物抑菌实验研究)[J]. *Lab Anim Sci*(实验动物科学), **29**(2):5—7
Zhang JH(张继红), Tao NG(陶能国), Li JL(李俊丽), *et al.* 2010. Extraction of capsaicin and its anti-microbial activity(辣椒素的提取及抑菌活性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(1):137—140
Zhou LG(周立刚), Song WT(宋卫堂), Xie GH(谢光辉), *et al.* 2004. Antimicrobial treatment of nutrient solution in hydroponic cultivation of *populus nigra*(黑杨水培中营养液抑菌处理研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(3):259—262