

不同发酵时间对西瓜霜抗菌活性的影响及其有效部位筛选

王秋红, 曹琦, 李斌, 辛萍, 王知斌, 杨欣, 匡海学*

黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 考察不同发酵时间对西瓜霜抗菌活性的影响, 并对最佳发酵时间制得的西瓜霜进行有效部位筛选。**方法** 选择常见致病菌(多为口腔、上呼吸道致病菌), 采用体外试管法抑菌实验和平板法杀菌实验, 对发酵 7、15、22、30、50 d 的西瓜霜进行抗菌活性比较; 以甲醇提取发酵 15 d 的西瓜霜制得西瓜霜甲醇提取物, 进一步以 AB-8 大孔吸附树脂对西瓜霜甲醇提取物进行分离, 得到甲醇提取物的水洗脱部位和 95%乙醇洗脱部位, 比较西瓜霜甲醇提取物与其水洗脱部位和 95%乙醇洗脱部位的抗菌活性, 筛选有效部位。**结果** 发酵 15 d 制备的西瓜霜抗菌活性最强; 西瓜霜甲醇提取物的大孔吸附树脂 95%乙醇洗脱部位对福氏痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、白葡萄球菌、柠檬葡萄球菌、绿脓杆菌、乙型溶血性链球菌、乙型副伤寒杆菌和大肠杆菌具有明显抗菌作用。**结论** 发酵时间对西瓜霜的抗菌活性具有显著影响, 西瓜霜抗菌作用的有效部位为其甲醇提取物的大孔吸附树脂 95%乙醇洗脱部位。

关键词: 西瓜霜; 发酵时间; 有效部位; 抑菌作用; 杀菌作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)13-1950-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.016

Effect of fermentation time on antibacterial activity of *Mirabilitum Praeparatum* and screening of its antibacterial active parts

WANG Qiu-hong, CAO Qi, LI Bin, XIN Pin, WANG Zhi-bin, YANG Xin, KUANG Hai-xue

Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the effect of fermentation time on antibacterial activity of *Mirabilitum Praeparatum* (MP) and screen the antibacterial active parts from MP with the optimal fermentation time. **Methods** Using test tube *in vitro* antibacterial test and flat germicidal test, the pathogenic bacteria activities of MP with different fermentation time (7, 15, 22, 30, 50 d) were studied, and the optimal fermentation time was screened. The methanol extracts from MP with fermentation time of 15 d and its aqueous and 95% ethanol elution parts were prepared. The antibacterial and bactericidal effects of methanol extracts from MP and its aqueous and 95% ethanol elution parts were compared. **Results** The 15 d fermentation MP had the strongest antibacterial activity. The 95% ethanol elution parts from MP had the strongest antibacterial activity on nine kinds of common pathogens, especially for the oral and upper respiratory tract pathogens. **Conclusion** Fermentation time has obvious effect on antibacterial activity of MP, and 95% ethanol elution parts of macroporous adsorption resin from MP may be active parts.

Key words: *Mirabilitum Praeparatum*; fermentation time; active parts; antibacterial effect; bactericidal effect

西瓜霜具有清热泻火、消肿止痛的功效^[1], 用于治疗咽喉肿痛、喉痹、口疮, 被历代医家视为治疗咽喉、口腔疾病的良药, 为“喉科圣药”^[2]。而

传统中医认为, 西瓜霜有清热泻火、消肿止痛的功能, 主要是因为西瓜能清热解暑, 芒硝能清热泻火, 两药合制, 起到协同作用, 性味增强, 并使芒硝更

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073049); 黑龙江省留学回国科学基金项目(LC2012C15); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”科研项目(2012RCD05); 中国博士后科学基金会项目(20110491126);

作者简介: 王秋红(1969—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药及天然药物药效物质基础及中药炮制研究。

Tel: (0451)87266856 E-mail: qhwang668@sina.com

*通信作者 匡海学(1955—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药性味理论研究、中药及复方药效物质基础及其作用机制研究。Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang56@163.com

纯净, 增强清热泻火之功^[3]。一直以来, 西瓜霜的制备被认为属于中药炮制的制霜法, 为西瓜中渗析出的芒硝的细小结晶。而本课题组通过研究发现, 西瓜霜制备过程实质可能是以西瓜为培养基的发酵过程, 在高盐情况下(含一定量 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 进行的发酵可能为其炮制的真正作用。发酵微生物产生的代谢产物及生物转化产物往往具有抗菌活性, 抗菌作用应当是西瓜霜发挥药效作用的重要机制, 即发酵微生物的代谢物或生物转化产物发挥抗菌作用应为西瓜霜治疗口腔炎症的机制。据此, 本实验对不同发酵时间的西瓜霜进行抗菌活性比较, 确定最佳发酵炮制时间; 进而对最佳发酵时间得到的西瓜霜进行抗菌活性部位筛选, 以确定其抗菌活性有效部位。

1 实验材料

1.1 菌种

福氏痢疾杆菌 *Shigella flexneri*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白葡萄球菌 *Staphylococcus albus*、柠檬葡萄球菌 *Staphylococcus citreus*、乙型溶血性链球菌 β -*emolytic streptococcus*、乙型副伤寒杆菌 *Bacillus paratyphosus* B、大肠杆菌 *Escherichia coli*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 由黑龙江中医药大学微生物免疫教研室提供。

1.2 仪器

R-3 旋转蒸发仪, 瑞士 BUCHI; PH-71 冻干机, 德国 Christ; 电热恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; II 级 B2 型生物安全柜, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 药品与试剂

牛肉膏、蛋白胨、琼脂, 北京奥博星生物技术有限责任公司; NaCl、NaOH、芒硝, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; pH 精密试纸, 杭州富阳特种纸业公司; AB-8 大孔树脂, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 双黄连片, 哈尔滨圣泰制药股份有限公司(批号 20120209); 盐酸小檗碱片, 东北制药集团沈阳第一制药有限公司(批号 20121217)。

1.4 药材

新鲜西瓜(产地为黑龙江省双城市乐群乡, 品种为帝王花冠), 经黑龙江中医药大学药用植物学教研室苏连杰教授鉴定为葫芦科植物西瓜 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumu. et Nakai 的成熟新鲜果实。

2 方法

2.1 不同发酵时间西瓜霜的制备

按照文献方法^[3]自制西瓜霜: 取新鲜西瓜 36.13 kg 切碎后放入发酵罐或容器中, 加入芒硝 5.42 kg (每 100 千克西瓜加入 15 kg 芒硝), 置于阴凉通风处放置, 分别发酵 7、15、22、30、50 d, 期间定期搅拌, 注意通风、溶氧, 发酵结束后, 离心, 取上清液, 将上清液冷冻干燥, 制得白色结晶粉末。按照《中国药典》2010 年版一部中西西瓜霜的标准测得 Na_2SO_4 质量分数为 90%, 符合药典标准, 即得到的白色结晶粉末为西瓜霜。

2.2 西瓜霜有效部位的制备

取发酵 15 d 的自制西瓜霜, 用 2 倍量的甲醇超声提取, 每次 30 min, 重复提取 3 次, 减压回收甲醇, 得西瓜霜甲醇提取物(由于西瓜霜中含有大量的无机盐 Na_2SO_4 , 而其不溶于甲醇溶液中, 故用甲醇提取得到的甲醇提取物含有西瓜霜中除 Na_2SO_4 以外的成分), 再将西瓜霜甲醇提取物进行大孔吸附树脂柱色谱, 依次分别用水和 95%乙醇洗脱, 分别得到各自的洗脱物后减压回收溶剂, 即得 AB-8 大孔树脂水洗脱组分和 95%乙醇洗脱组分。

2.3 培养基的制备

牛肉膏蛋白胨液体培养基^[4]: 牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5 g, 加 100 mL 蒸馏水, 在沸水中加热使之完全溶解; 冷至 40~45 °C 时, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.6, 再煮沸 10 min, 使培养基再次充分溶解, 用滤纸滤过, 补足失水; 重新校正 1 次 pH 值。根据需要分装于试管或烧瓶内。放高压灭菌器内 103.4 kPa, 121 °C, 灭菌 15~20 min。培养基的无菌检测: 将已灭菌的培养基, 置于孵箱中 37 °C 培养 24 h, 如无细菌生长, 即可使用。

牛肉膏蛋白胨固体培养基^[5]: 按液体培养基配制方法, 校正 pH 值后, 加入 1.5% 的营养琼脂, 加热溶解, 滤过, 装入锥形瓶中, 按上法灭菌, 并在无菌条件下, 分装于无菌表面皿中, 放凉, 在孵箱中 37 °C 培养 24 h, 如无细菌生长, 即可使用。

2.4 体外抑菌实验

2.4.1 最低抑菌浓度(MIC)的测定 采用连续稀释法^[6]: 将牛肉膏蛋白胨液体培养基溶液分装于 10 只无菌试管内, 第 1 管 1.5 mL, 其余各管 1 mL; 另吸取配制的供试药液(西瓜霜粉末、甲醇提取物和洗脱物干膏加适量蒸馏水溶解, 再用培养液稀释) 0.5 mL 加入第 1 管内, 吹吸 3 次, 混匀后吸出 1 mL

至第 2 管中,混匀后再吸 1 mL 至第 3 管中,依此类推至第 9 管时,混匀后吸出 1 mL 弃去,即 1~9 管含药液稀释比率分别为 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1 024,第 10 管不加药物(空白组);除每组的第 9 管外,向各管中加试验菌液 0.05 mL,轻轻摇匀;将以上各管于 37 °C,培养 24 h 并观察结果。肉眼观察判定结果,与空白组对照无细菌生长的最低药物质量浓度即为 MIC。考察发酵时间的影响时设芒硝对照组,考察活性部位时设双黄连和盐酸小檗碱为阳性对照。

2.4.2 最低杀菌浓度(MBC)的测定 采用平板划线法^[7]:将上述无细菌生长的各菌药混合液接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,置培养箱内 37 °C 继续培养 24 h,观察生长情况,没有细菌生长的最低质量浓度为 MBC。考察发酵时间的影响时设芒硝对照组,考察活性部位时设双黄连和盐酸小檗碱为阳性对照。

3 结果

3.1 不同发酵时间对西瓜霜抗菌活性的影响

在不同发酵时间对西瓜霜抗菌活性的影响实验中,表 1 和 2 结果表明,发酵 15 和 22 d 的西瓜

霜粉末对各种菌株的 MIC 和 MBC 均最低,发酵 7、30 d 西瓜霜的 MIC 和 MBC 略高,发酵 50 d 西瓜霜的 MIC 和 MBC 最大。说明不同发酵时间对西瓜霜的抗菌活性具有显著影响,发酵时间以 15 d 为最佳时间。结果还发现,西瓜霜的抑菌及杀菌效果明显优于芒硝,说明西瓜霜中除了含有来自芒硝的 Na₂SO₄ 主要成分外,尚有其他未知成分具有很强的抑菌和杀菌作用,特别是对乙型溶血性链球菌的抑菌和杀菌作用最强,因此对西瓜霜除 Na₂SO₄ 以外的其他成分进行有效部位筛选。

3.2 西瓜霜抗菌活性部位的筛选

经过 15 d 发酵制得的西瓜霜的不同提取部位对受试菌种的 MIC 和 MBC 值见表 3 和 4。可以看出西瓜霜甲醇提取物的 MIC 和 MBC 较西瓜霜粉末小很多,表明经甲醇超声提取除盐后,抗菌活性物质主要存在于甲醇提取物中。经大孔树脂分离后,发现 95%乙醇洗脱组分的抑菌作用最强,说明西瓜霜抗菌活性物质主要存在于 95%乙醇洗脱组分中,因此初步确定西瓜霜抗菌有效部位为甲醇提取物的 95%乙醇洗脱组分。

表 1 发酵不同时间制得的西瓜霜的抑菌活性

Table 1 MIC of MP with different fermentation time

药物	MIC/(mg·mL ⁻¹)							
	金黄色葡萄球菌	柠檬葡萄球菌	白葡萄球菌	绿脓杆菌	乙型副伤寒杆菌	乙型溶血性链球菌	福氏痢疾杆菌	大肠杆菌
西瓜霜粉末 发酵 7 d	31.3	31.3	31.3	62.5	31.3	15.6	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 15 d	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	7.8	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 22 d	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 30 d	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 50 d	62.5	62.5	31.3	62.5	62.5	31.3	62.5	62.5
芒硝	250.0	250.0	125.0	250.0	250.0	125.0	250.0	125.0

表 2 发酵不同时间制得的西瓜霜的杀菌活性

Table 2 MBC of MP with different fermentation time

药物	MBC/(mg·mL ⁻¹)							
	金黄色葡萄球菌	柠檬葡萄球菌	白葡萄球菌	绿脓杆菌	乙型副伤寒杆菌	乙型溶血性链球菌	福氏痢疾杆菌	大肠杆菌
西瓜霜粉末 发酵 7 d	62.5	31.3	31.3	62.5	31.3	15.6	31.3	—
西瓜霜粉末 发酵 15 d	31.3	31.3	31.3	62.5	31.3	15.6	31.3	—
西瓜霜粉末 发酵 22 d	31.3	31.3	31.3	62.5	31.3	31.3	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 30 d	62.5	31.3	31.3	125.0	31.3	31.3	31.3	31.3
西瓜霜粉末 发酵 50 d	125.0	62.5	62.5	125.0	62.5	31.3	125.0	—
芒硝	250.0	250.0	—	250.0	—	—	—	—

表3 发酵15 d制得的西瓜霜不同提取部位的抑菌活性

Table 3 MIC of different parts from MeOH extract of MP with 15 d fermentation

药物	MIC/(mg·mL ⁻¹)							
	金黄色葡萄球菌	柠檬葡萄球菌	白葡萄球菌	绿脓杆菌	乙型副伤寒杆菌	乙型溶血性链球菌	福氏痢疾杆菌	大肠杆菌
西瓜霜粉末	31.3	31.3	31.3	31.3	31.3	7.8	31.3	31.3
甲醇提取物	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	2.1	12.5	12.5
水洗脱组分	72.5	72.5	72.5	72.5	72.5	18.1	72.5	72.5
95%乙醇洗脱组分	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
双黄连片	5.2	10.4	20.8	5.2	10.4	10.4	10.4	5.2
盐酸小檗碱片	0.063	0.063	0.126	0.063	0.252	0.063	0.063	0.063

表4 发酵15 d制得的西瓜霜不同提取部位的杀菌活性

Table 4 MBC of different parts from MeOH extract of MP with 15 d fermentation

药物	MBC/(mg·mL ⁻¹)							
	金黄色葡萄球菌	柠檬葡萄球菌	白葡萄球菌	绿脓杆菌	乙型副伤寒杆菌	乙型溶血性链球菌	福氏痢疾杆菌	大肠杆菌
西瓜霜粉末	31.3	31.3	31.3	62.5	31.3	15.6	31.3	—
甲醇提取物	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	2.1	12.5	12.5
水洗脱组分	72.5	72.5	72.5	72.5	72.5	18.1	72.5	72.5
95%乙醇洗脱组分	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
双黄连片	10.4	10.4	20.8	10.4	10.4	20.8	10.4	10.4
盐酸小檗碱片	0.126	0.126	0.126	0.252	0.504	0.126	0.126	0.126

4 讨论

微生物的特性是分泌抗菌物质，抑制其他微生物的生长，而人们正是利用微生物这样的特性发现很多具有药用价值的抗菌成分，对西瓜霜的抗菌活性有效部位的筛选实验初步表明以西瓜为培养基发酵产生的代谢物具有抗菌作用，可能是西瓜霜发挥清热泻火、消肿止痛作用的重要物质基础。

微生物在生命活动中，可从初级代谢产物出发，合成一些生理功能不够明确、化学结构特殊、与维持生命活动无关并且不影响生命活动的代谢产物，即次级代谢产物(secondary metabolism)。次级代谢产物的种类比较多，结构复杂，合成所需的前体物质较多，代谢调节环节也相对比较复杂，中药发酵是在一种特定的条件下进行的，中药作为培养基，其中往往含有多种化学成分，这些成分通常也具有抑菌活性。在此条件下可能实现菌种的自然选育，本实验首次基于微生物次生代谢产物生成及生物转化理论研究发酵中药^[8]，即将微生物免疫学和生物技术等与现代中药化学结合，西瓜霜发酵中可能由微生物产生新的次生代谢产物或生物转化产物，对于常见致病菌，尤其是口腔、上呼吸道

致病菌产生抑制作用，从而治疗咽喉肿痛、喉痹、口疮等疾病。

本研究初步探讨了西瓜霜发酵的最佳时间，以及以最佳时间发酵得到的西瓜霜的有效部位，为阐释西瓜霜的作用机制奠定了基础，同时对寻找治疗上呼吸道疾病的新抗菌物质提供了新的思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 凌云鹏. 疡医大全 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 丁安伟. 中药炮制学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [4] 王慧琴. 细菌培养基制备中的几个技巧 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2010, 30(2): 26.
- [5] 龚莉莉, 杨小生, 戎聚全. 中药培养基的制备及敏感菌株培养效果初步观察 [J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(5): 62-63.
- [6] 蔡宏亚, 王泽平, 何宁先. 连续稀释法研究淡红忍冬体外抑菌作用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 9(6): 154-155.
- [7] 张昊, 张争, 许景升. 一种简单快速的赤霉病菌单孢分离方法-平板稀释划线分离法 [J]. 植物保护, 2008, 34(6): 134-135.
- [8] 匡海学, 李斌, 曹琦, 等. 西瓜霜发酵菌种的分离及鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2834-2838.