蝉蜕活性成分的提取及其抑菌活性的研究*

王 珏 田强强 陶 刚 高秋荣 吕婷婷 王 敦**

(植保资源与病虫害治理教育部重点实验室 西北农林科技大学 杨凌 712100)

Analyses on ingredients and antibacterial activity of periostracum cicadae. WANG Jue, TIAN Qiang-Qiang, TAO Gang, GAO Qiu-Rong, LV Ting-Ting, WANG Dun**(*Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management*(*Northwest A&F University*), *Ministry of Education*, *Northwest A&F University*, Yangling 712100, China)

Abstract The antimicrobial components of the traditional Chinese herbal medicine, periostrcum cicadae were extracted and their antibacterial activity examined. Four extraction methods and seven extraction solvents were used. The results show that the highest yield was produced by ultrasonic extraction with 95% ethanol. The antibacterial activity of the obtained extracts against *Escherichia coli* was determined using different bioassays. The bioassay results indicate that all extracts had an obvious inhibitory effect on *E. coli* compared to the control ($P \leqslant 0.05$). There was no significant difference in antimicrobial activity between different extracts. The highest antimicrobial activity was from extracts obtained by ultrasonic extraction with 95% ethanol, the minimum inhibitory concentration (MIC) of this extract on *E. coli* was 0.078 mg/mL.

Key words periostrcum cicadae, bioactive component, antibacterial activity, extraction

摘 要 本文报道了对传统中药蝉蜕抑菌活性成分提取与抑菌活性研究结果。对4种提取方法和7种提取溶剂的提取效果进行了平行比较研究,研究结果显示,以体积分数95%乙醇作为提取溶剂,4种提取方法中,以超声波法提取时的浸膏得率最高。采用超声波提取法时,在7种提取溶剂中,以95%乙醇提取浸膏的得率最高。抑菌试验结果表明,不同方法获得提取物与对照组相比对 *Escheridia coli* 均有明显的抑菌作用($P \leqslant 0.05$),但不同提取方法得到的提取物之间,并无显著的抑菌活性差异。其中采用超声波提取法,以95%乙醇为提取溶剂时,所得提取物的抑菌活性最高,对 *E. coli* 的最小抑菌浓度为0.078 mg/mL。该研究结果是蝉蜕抑菌成分的首次报道。

关键词 蝉蜕,活性成分,抑菌活性,提取

蝉蜕(Periostracum cicadae, PC)为蝉科昆虫黑蚱 *Cryptotympana pustulata* Fabricius 的若虫羽化时脱落的体壁[1],别名蝉衣、蝉退、蝉壳、知了壳[2]。首载于《名医别录》,蝉蜕性甘、寒,味咸,是一种常用中药,具有散风解热、清肺利咽、解表透疹、解毒消炎、清肝明目,安神定志、止咳平喘、息风止痉、明目退翳之功效[3,4],临床上常用于治疗风热感冒,咳嗽音哑,咽喉肿痛,小儿惊痫,惊风抽搐,风疹瘙痒,痘疹疔疮,破伤风等病症[2,5]。

随着科学技术的发展,其功效不断地被发现,且效果明显,现代药效学证实,蝉蜕具有如抗癌、镇痛、抗过敏等作用[6],但对其是否有抑菌作用,截止目前还没有研究报道,因此,本研究以蝉蜕为材料,采用不同提取方法对蝉蜕的活性成分进行初步分离,并对各种提取方法所得蝉蜕提取物进行了体外抑菌活性研究,为深入了解蝉蜕的化学组成和抑菌作用提供基础数据。

* 资助项目:国家自然科学基金(30872033)、教育部新世纪优秀人才项目(NECT-06-0867)。

**通讯作者:E-mail:wanghandecn@yahoo.com.com

收稿日期:2010-03-22,修回日期:2010-04-28

1 材料与方法

1.1 材料

蝉蜕购自西安药材公司，大肠杆菌 *Escherichia coli* 由西北农林科技大学植保学院分子病毒学实验室提供，蛋白胨、酵母提取物购自 OXOXID，牛肉膏购自北京奥特星生物技术有限责任公司，琼脂粉购自润德生物，其余化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器

电热鼓风干燥箱（101-1 北京科伟永兴仪器有限公司）、循环水式多用真空泵（SHB - III 郑州长城科工贸有限公司）、旋转蒸发仪（R205 上海申生科技有限公司）、三用紫外仪（ZF-2 上海市安亭电子仪器厂）、台式三频数控超声波清洗器（KQ3200 昆山市超声仪器有限公司）、UV-2550 型紫外可见分光光度计（SHIMAPZU CORPORATION）、SW-CT-1F 超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）、千分之一电子天平（岛津）、P 型移液器（吉尔森）。

1.3 样品预处理

蝉蜕拣选清洗除杂 3 ~ 4 次，反复漂洗，直至水澄清，然后将样品放在报纸上摊开，置于 60℃ 鼓风干燥箱中恒温鼓风加热干燥 8 h，称重后高速粉碎机粉碎，粉碎后样品过 60 目筛备用。

1.4 样品提取方法比较

分别采用冷浸法[7,8]、煎煮法[9]、超声波提取法[10~13]、微波提取法[14~16]进行提取。不同方法提取，均合并 3 次的提取液。将每种方法收集到的提取液上旋转蒸发仪蒸发至浸膏。称其质量，计算得率。每组试验平行进行 3 次，结果取平均值。

1.5 提取溶剂的选择

分别采用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、95% 乙醇、甲醇作为提取溶剂，按照 1.4 中超声波方法提取，分析比较各种溶剂的提取效果。每组试验平行进行 3 次，结果取平均值。

1.6 蝉蜕提取物生物活性测定

1.6.1 样品稀释 取 1 g 不同提取方法和不同提取溶剂所获得的浸膏干样溶于丙酮中并定容为 1 g/mL，按不同浓度稀释后制成供试液，过滤灭菌后装入灭菌离心管中备用。

1.6.2 抑菌活性分析比色法[17] 挑取大肠杆菌单菌落接种于肉汤培养基，置 37℃ 培养 4 ~ 6 h 后用生理盐水校正浓度为 0.5 麦氏比浊标准，约含大肠杆菌 1×10^8 CFU/mL，然后再用肉汤培养基稀释 10 倍后使用，约含大肠杆菌 1×10^7 CFU/mL，作为测定用 *E. coli* 培养液。

分别无菌操作配制以下供试比色溶液：(1) CK：LB 培养基（5 mL）+ *E. coli* 培养液（50 μL）+ 无菌水（100 μL）；(2) 丙酮（浸膏溶剂）对照：LB 培养基（5 mL）+ *E. coli* 培养液（50 μL）+ 溶剂（50 μL）；(3) 试样：5 mL 液体 LB 培养基 + *E. coli* 培养液（50 μL）+ 分别加 4 种不同提取方法的供试液（50 μL）。所有测试均重复 3 次，6 个处理，共计 18 个样本。

将以上 6 个处理的 18 支试管于 37℃ 恒温摇床培养，每隔 30 min 分别取其中培养液 5 μL，稀释 100 倍用 UV-2550 型紫外可见光分光光度计在 375 nm 波长下检测试样吸光度，测得数据进行比较分析。若供试管的吸光度小于对照管，表明供试液有抑菌活性，若吸光度大于或等于对照管，则表示该供试液无抑菌活性，吸光度越大，表明其抑菌活性越小。

1.6.3 抑菌活性分析纸片扩散法[18,19] 以不同提取方法和不同提取溶剂提取所获得的浸膏用丙酮配制 0.1 g/mL 的供试液，以丙酮作为溶剂对照样品，将每种供试样品和对照样品无菌制备 6 个药敏片，分别帖于含 1×10^6 CFU/mL *E. coli* 的牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上，培养皿倒置，于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。培养结束后，用刻度尺测量培养基中抑菌圈的直径。重复试验 6 次，取平均值作为抑菌圈的最终结果。

1.6.4 最小抑菌浓度（MIC）测定[19,20] 取 95% 乙醇超声波提取物 25 mg 浸膏置于试管中，先加入 0.5 mL 丙酮溶解样品，再加入 4.5 mL 肉汤培养液配成 5 mg/mL 的供试液；另取 0.5 mL 丙酮、4.5 mL 肉汤培养液混匀配成丙酮肉汤培养液，每支测试试管中接菌浓度为 1

$\times 10^6$ CFU/mL的 *E. coli* 菌液 0.05 mL。供试液浓度依次为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039、0.020、0.010 和 0.005 mg/mL,丙酮肉汤培养液作为溶剂对照,不加药液处理作为阴性对照,以加入 100 mg/mL 的氨苄青霉素 10 μL 代替药液作为药物阳性对照。恒温箱 37℃中培养 18 ~ 24 h,然后对各管进行比浊,以确定最低抑菌浓度(MIC)。重复试验 3 次,取平均值。

1.6.5　数据分析　方差分析采用 ANOVA (SAS Institute Inc., 1990),显著性差异分析应用 Duncan 多重比较($P = 0.05$)。

2　结果与分析

2.1　不同提取方法提取率分析

由表 1 可以看出,4 种提取方法提取效率由高到低排列依次为:超声波 > 煎煮 > 微波 > 冷浸,提取效率最高的提取方法是超声波提取法,而提取效率最低的提取方法是冷浸法。

表 1　不同提取方法提取效率

提取方法	超声波	煎煮	微波	冷浸
得率(%)	16.48 ± 0.2	15.04 ± 0.1	14.32 ± 0.3	8.56 ± 0.1

2.2　不同提取溶剂提取率分析

由表 2 可以看出,6 种提取溶剂提取效率由高到低排列依次为:95 % 乙醇 > 甲醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 二氯甲烷 > 石油醚,可以看出提取效率最高的溶剂是 95% 乙醇,而提取效率最低的溶剂是石油醚。

2.3　抑菌活性分析

2.3.1　比色法分析　从图 1 可以看出,4 种不同的提取方法得到的蝉蜕提取物,在抑菌活性上与对照组相比差异显著($P \leqslant 0.05$),而不同提取方法获得的活性物质并没有产生抑菌活性的显著差异。其中以煎煮提取物的抑菌活性最强,冷浸提取物抑菌活性最弱,由图 1 还可以看出,CK 对照和 CK 丙酮对照曲线相近,可以知道,此浓度丙酮加入量对细菌生长没有影响。

表 2　不同提取溶剂提取效率

提取溶剂	石油醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	丙酮	95% 乙醇	甲醇
得率(%)	9.52 ± 0.1	9.96 ± 0.2	12.04 ± 0.2	14.08 ± 0.1	16.32 ± 0.1	15.56 ± 0.2

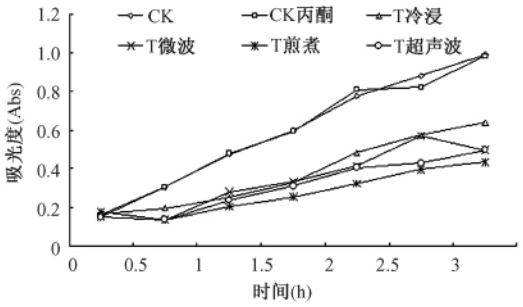

图 1　不同的提取方法得到的蝉蜕提取物活性分析

注:采用 ANOVA 方差分析,显著性差异分析应用 Duncan 多重比较,不同提取方法与对照相比差异显著($P \leqslant 0.05$),不同方法之间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3.2　纸片扩散方法分析　由表 3 可以看出不同的提取方法提取物都表现出较好的抑菌活性,尤其是煎煮法提取的效果最好,但不同方法获得提取物活性差异并不显著。丙酮溶剂对照未产生抑菌圈。提取物活性大小:煎煮 > 超声波 > 微波 > 冷浸。

表 3　不同提取方法所得活性物质的抑菌活性

提取方法	抑菌圈直径(mm)			
	煎煮	超声波	微波	冷浸
	10.0 ± 0.2a	9.4 ± 0.1a	8.8 ± 0.1a	8.4 ± 0.1a

注:采用 ANOVA 方差分析,不同小写字母表示差异显著($P \leqslant 0.05$)。(下表同)

由表 4 可以看出不同提取溶剂提取物活性大小:95% 乙醇 > 甲醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 石油醚 > 二氯甲烷,丙酮溶剂对照未产生抑菌圈。95% 乙醇超声波提取的活性成分抑菌效果最好,二氯甲烷提取物效果最差,但不同提取溶剂获得提取物活性差异并不显著。

表 4 不同提取溶剂所得活性物质的抑菌活性

提取方法	抑菌圈直径(mm)					
	石油醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	丙酮	95% 乙醇	甲醇
	7.4 ±0.1a	6.8 ±0.1a	8.1 ±0.1a	8.2 ±0.1a	9.7 ±0.1a	9.4 ±0.1a

2.3.3 蝉蜕提取物的最小抑菌浓度(MIC)

用超声波提取物通过肉汤倍比稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)结果显示,蝉蜕提取物对 *E. coli* 的 MIC 为 0.078 mg/mL。说明蝉蜕提取物对 *E. coli* 的抑菌活性很强。

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究以蝉蜕作为材料,对不同提取方法和不同提取溶剂的提取率进行了比较,发现以 95% 乙醇作为提取溶剂,用超声波法提取蝉蜕时的浸膏得率最高,对 10 种提取物的抑菌活性测定结果发现,不同方法获得提取物与对照组相比对 *E. coli* 均有明显的抑菌作用($P \leqslant 0.05$),但不同提取方法得到的提取物之间,并无显著的抑菌活性差异。其中采用超声波提取法,以 95% 乙醇为提取溶剂时,所得提取物的抑菌活性最高,对 *E. coli* 的最小抑菌浓度为 0.078 mg/mL。该研究结果是蝉蜕抑菌成分提取与活性分析的首次报道。

3.2 讨论

蝉蜕作为传统的中药材疗效确切,近年来随着传统应用研究的深入,蝉蜕的应用范围不断扩大,现代药理实验证明,蝉蜕多种活性成分发挥着抗氧化、抗炎等作用,而对其抗炎作用的机理尚无研究报道。本研究首次对蝉蜕的抑菌活性成分进行了初步的提取分离,探讨了不同提取方法及不同提取溶剂所获得活性物质的产率,并进行了相关的抑菌活性实验。综合分析认为,蝉蜕的活性成分具有较强的抑菌活性,推断其消炎功效与抑菌活性有关。虽然本研究取得了一些数据,得出了初步的结论,但在提取工艺和单组分分离方面还需要进行大量的工作去摸索和探讨,以便今后能更加深入了解蝉蜕的有效成分和药物作用机理。

参 考 文 献

1 安磊. 蝉蜕的抗惊厥作用. 中国医药导报, 2008, **4**(15): 35 ~36.

2 牛跃华, 陈锡林. 中药蝉蜕传统应用和现代研究概况. 浙江临床医学, 2000, **2**(4): 281 ~282.

3 冷丁. 蝉蜕的药用. 医药与保健, 2001, **12**: 16.

4 肖凤双, 苏素文, 王永梅. 蝉蜕治疗咳喘临床应用举隅. 河北中医药学报, 2007, **22**(4): 17.

5 徐树楠, 张美玉, 王永梅, 等. 蝉蜕镇咳、祛痰、平喘作用的药理研究, 2007, **23**(12): 1 678 ~1 679.

6 何敏. 蝉蜕的研究与临床新用进展. 内蒙古中医药, 1999, **18**(1): 42 ~44.

7 林忠泽, 刘东辉, 关世侠. 冷浸法提取丹参脂溶性部位工艺研究. 广州中医药大学学报, 2009, **26**(4): 388 ~390.

8 姚英娟, 薛东, 杨长举, 等. 蛇床子提取物对几种储粮害虫的趋避和触杀效应. 昆虫知识, 2006, **43**(5): 653 ~656.

9 唐爱莲, 刘笑甫, 冯冬梅. 用煎煮法和冷浸法对黄藤中巴马丁成分提取的比较研究. 华夏医学, 2003, **16**(1): 75 ~76.

10 秦小萍, 赵红艳, 杨美林. 坡柳种子提取物对小菜蛾的拒食活性. 昆虫知识, 2008, **45**(4): 577 ~579.

11 李健, 张令文, 刘宁. 超声波提取苦瓜总皂苷的研究. 化学世界, 2007, **2**: 104 ~106.

12 李洪娟, 孙居锋, 代现平, 等. 桑白皮总黄酮超声波提取法研究. 安徽农业科学, 2009, **37**(3): 1 188 ~1 189.

13 李婷, 侯晓东, 陈文学, 等. 超声波萃取技术的研究现状及展望. 安徽农业科学, 2006, **34**(13): 3 188 ~3 190.

14 李水清, 张钟宁. 艾蒿提取物对菜青虫的生物活性. 昆虫知识, 2004, **41**(5): 439 ~442.

15 鲁敬荣, 郑泽宝, 楚洁. 泰山白首乌多糖的微波提取技术研究. 食品科技 - 工艺技术, 2006, **11**: 112 ~115.

16 刘春娟. 微波萃取技术应用及其研究进展. 广东化工, 2008, **35**(3): 53 ~58.

17 张淑芳, 野丽丽, 白淑晶, 等. 噻唑蓝比色法测定药物最低抑菌浓度的初步研究. 中国热带医学, 2001, **1**(4): 35.

18 唐裕芳, 张妙玲, 黄白飞. 肉桂油的提取及其抑菌活性研究. 天然产物研究与开发, 2006, **18**(3): 432 ~434.

19 肖新生, 林倩英. 枇杷叶提取物抑菌作用研究. 现代食品科技, 2010, **26**(1): 59 ~62.

20 应惠芳. 鱼腥草等 5 种中草药对 10 种常见细菌体外抑菌实验研究. 时珍国医国药, 2006, **17**(11): 2 202 ~2203.