



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398496 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810133217.8

(22)申请日 2018.02.09

(71)申请人 中国科学院武汉植物园

地址 430000 湖北省武汉市武昌磨山

(72)发明人 张春云 郭明全 李梦辉 柴欣生

(74)专利代理机构 武汉知产时代知识产权代理有限公司 42238

代理人 曹雄 金慧君

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

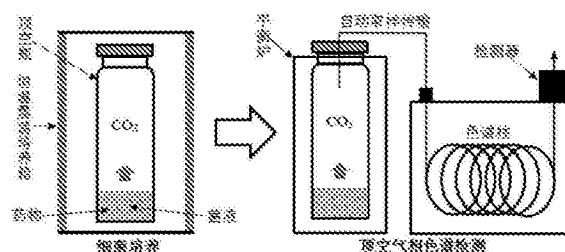
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种天然产物抗菌活性测定方法

(57)摘要

本发明公开了一种天然产物抗菌活性测定方法,将一定浓度的适量细菌菌液与一定浓度的天然药物在顶空样品瓶中共存培养作为实验组,将相同浓度的等量细菌菌液在顶空样品瓶单独培养作为对照组,培养一定时间后,利用顶空气相色谱仪将实验组和对照组样品瓶顶部空间产生的CO₂的含量进行原位测量,通过CO₂色谱峰面积计算药物对细菌生长的抑制率以及半数抑制浓度;实现天然产物抗菌活性安全、简便、准确测定;且可测定不溶物或固体粉末的抗菌活性。



1. 一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,通过顶空气相色谱法测定天然产物与细菌菌液共存培养过程中产生的CO₂含量,根据得到的CO₂含量计算天然产物对细菌生长的抑制率和半数抑制浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,具体包括以下步骤:

(1) 确定细菌培养时间、温度及浓度;

(2) 取适量已知浓度的细菌菌液与适量的天然产物在灭菌后的顶空样品瓶中,在上述温度和时间下作为实验组培养;

(3) 取与步骤(2)等量的已知浓度的细菌菌液于灭菌后顶空样品瓶中,在上述温度和时间下作为对照组培养;

(4) 设置顶空进样器操作条件及气相色谱仪操作条件,将培养后的所述实验组和对照组的顶空样品瓶立即置于顶空进样器中,进行顶空气相色谱分析,采集CO₂色谱峰信息;

(5) 根据采集的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算得到天然产物对细菌生长的抑制率;

(6) 采用不同浓度梯度的天然产物重复步骤(1)、(2)、(3)、(4),采集不同浓度的天然产物与细菌作用产生的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算不同浓度天然产物的抑制率,并计算得到天然产物对细菌生长的半数抑制浓度。

3. 根据权利要求2所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,步骤(1)中,取适量的细菌菌液在灭菌后的顶空样品瓶中,一定温度下培养不同时间后置于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定培养时间。

4. 根据权利要求3所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,步骤(1)中,取适量不同浓度的细菌菌液分别与适量的天然产物于灭菌后的顶空样品瓶中,在所述温度下振荡培养上述确定的时间,于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定细菌菌液浓度。

5. 根据权利要求2所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,步骤(2)中,所述细菌菌液为正常培养代谢可产生CO₂的菌种菌液。

6. 根据权利要求2所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,步骤(2)中,所述天然产物为动植物、海洋生物、微生物的提取天然产物及以提取的所述天然产物为基础的药物制品。

7. 根据权利要求2~5任一项所述的一种天然产物抗菌活性测定方法,其特征是,所述天然产物抗菌活性测定方法可应用于合成药物的抗菌活性测定。

一种天然产物抗菌活性测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学及药理学技术领域,具体涉及一种天然产物抗菌活性测定方法。

背景技术

[0002] 抗菌药物是治疗细菌性感染的特殊药物,抗菌药物可以治疗细菌性感染,同时在一些特定条件下也用于预防某些细菌性感染。自1935年第一个磺胺药应用于临床和1941年青霉素问世以来,抗菌药物因其独特的临床应用价值而得到了迅速的发展和广泛的应用。从我国临床调查结果显示,医疗机构住院患者抗菌药物应用的比例在70%左右,门诊患者抗菌药物应用比例也高达20%。因此,随着我国经济社会发展,以及现有抗菌药物耐药性问题越来越严重,从天然产物中获取抗菌活性强、细菌耐药性弱的新型抗菌药物一直是天然产物化学研究的重要方向。然而,天然产物种类繁多,化学成分复杂,对天然产物提取物及分离得到的化合物进行抗菌活性测定及活性筛选无疑是天然抗菌药物发现的重要环节。

[0003] 相关技术中,利用液体培养基测定天然产物抗菌活性的测定方法为浊度法,所述浊度法是将天然产物和细菌在液体培养基上共存培养后,利用分光光度计测定细菌生长菌落产生的浊度来反应抗菌活性。

[0004] 但发明人发现浊度法测定过程中被测天然产物本身的浊度对测试结果干扰较大,且无法对中药材不溶物甚至固体粉末进行抗菌活性测试,且当天然产物活性较大,测试液浊度较低时,浊度法响应不线性、不灵敏。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的实施例提供了一种不需要测定浊度、天然产物本身对测试结果无影响,测试精度高,响应范围广,且可测定不溶物或固体粉末的抗菌活性的测定方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明实施例采用的技术方案是,一种天然产物抗菌活性测定方法,通过顶空气相色谱法(HS-GC)测定天然产物与细菌菌液共存培养过程中产生的CO₂含量,根据得到的CO₂含量计算天然产物对细菌生长的抑制率和半数抑制浓度。

[0007] 优选地,所述一种天然产物抗菌活性测定方法,具体包括以下步骤:

[0008] (1) 确定细菌的培养时间、温度及浓度;

[0009] (2) 取适量已知浓度的细菌菌液与适量的天然产物在灭菌后的顶空样品瓶中共存,在上述时间、温度下作为实验组培养;

[0010] (3) 取与步骤(2)等量的已知浓度的细菌菌液于灭菌后顶空样品瓶中,在上述时间、温度下作为对照组培养;

[0011] (4) 设置顶空进样器操作条件及气相色谱仪操作条件,将培养后的所述实验组和对照组的顶空样品瓶置于顶空进样器中,进行顶空气相色谱分析,采集CO₂色谱峰信息;

[0012] (5) 根据采集的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算得到天然产物对细菌生长的抑制率;

[0013] (6) 采用不同浓度梯度的天然产物重复步骤(1)、(2)、(3)、(4),采集不同浓度的天然产物与细菌作用产生的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算不同浓度天然产物对细菌生长的抑制率,并计算得到天然产物对细菌生长的半数抑制浓度。

[0014] 优选地,取适量的细菌在灭菌后的顶空样品瓶中,一定温度下培养不同时间后置于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定培养时间。

[0015] 优选地,取适量不同浓度的细菌菌液分别与适量的天然产物于灭菌后的顶空样品瓶中,在所述温度下振荡培养上述确定的时间,于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定细菌菌液浓度。

[0016] 优选地,所述天然产物包括动植物、海洋生物、微生物的提取物及以提取物为基础的药物制品。

[0017] 优选地,所述细菌菌液为正常培养代谢可产生CO₂的菌种菌液。

[0018] 优选地,所述的天然产物抗菌活性测定方法可应用于合成药物的抗菌活性测定。

[0019] 与相关技术比较,本发明实施例提供的技术方案的有益效果是,本发明的天然产物抗菌活性测定方法,通过顶空气相色谱法测定天然产物与相关菌种菌液共存培养过程中产生的CO₂含量计算天然产物对细菌生长的抑制率和半数抑制浓度。方法操作简单,方法相对标准偏差在5%以内,重复性好,精度高;天然产物本身的浊度对测试结果无影响,可对中药材不溶物甚至固体粉末进行抗菌活性的测试;可适用的测定抗菌活性响应范围广。

附图说明

[0020] 图1是本发明实施例的测定方法过程示意图;

[0021] 图2是本发明实施例的测定方法流程示意图;

[0022] 图3是本发明实施例的测定方法得到的抑制率与传统方法(浊度法)得到的抑制率对比示意图;

[0023] 图4是本发明实施例的测定方法得到的半数抑制浓度与传统方法(浊度法)得到的半数抑制浓度(IC₅₀)对比示意图;

[0024] 图5是本发明实施例确定金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)和沙门氏菌(革兰氏阴性菌)培养时间示意图;

[0025] 图6是本发明实施例确定金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)和沙门氏菌(革兰氏阴性菌)的菌液浓度示意图;

[0026] 图7是本发明实施例测定方法测定的氯霉素对金黄色葡萄球菌的抗菌抑制率示意图;

[0027] 图8是本发明实施例测定方法测定的十树樟提取物对沙门氏菌的抗菌抑制率示意图。

具体实施方式

[0028] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明实施方式作进一步地描述。

[0029] 实施例一

[0030] 参照附图1,本发明的实施例提供了一种天然产物抗菌活性测定方法,通过顶空气相色谱法测定天然产物与细菌菌液共存培养过程中产生的CO₂含量,根据得到的CO₂含量计算天然产物对细菌生长的抑制率和半数抑制浓度。不需要测定细菌生长的菌落产生的浊度,天然产物本身的浊度对测定的抑制率和半数抑制浓度不影响,测定方法简单,精度和活性响应范围广。

[0031] 参照附图2,进一步地,所述一种天然产物抗菌活性测定方法,具体包括以下步骤:

[0032] (1) 确定细菌菌液的培养时间、温度及浓度;

[0033] 具体地,取适量的细菌在灭菌后的顶空样品瓶中,一定温度下培养不同时间后置于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定培养时间;得到足够的CO₂检测灵敏度和充分的药物和细菌作用时间;

[0034] 另取适量不同浓度的细菌菌液分别与适量的天然产物于灭菌后的顶空样品瓶中,在所述温度下振荡培养确定的时间,于顶空气相色谱仪中测定CO₂的含量,根据得到的CO₂含量确定细菌菌液浓度;

[0035] (2) 取适量已知浓度的细菌菌液与适量的天然产物在灭菌后的顶空样品瓶中共存,在上述温度和时间下作为实验组培养;在上述确定的温度条件下振荡培养,确保细菌菌液与天然产物之间可充分接触反应以及得到足够的CO₂检测灵敏度;所述细菌菌液为正常培养代谢可产生CO₂的菌种菌液;所述天然产物为动植物、海洋生物、微生物的提取天然产物及以提取的所述天然产物为基础的药物制品;

[0036] (3) 取与实验组等量的已知浓度的细菌菌液于灭菌后顶空样品瓶中,在上述温度和时间下作为对照组培养;与实验组在相同条件下培养作为对照组便于得到无药物作用时细菌正常代谢的CO₂含量;

[0037] (4) 设置顶空进样器操作条件及气相色谱仪操作条件,将培养后的所述实验组和对照组的顶空样品瓶置于顶空进样器中,进行顶空气相色谱分析,采集CO₂色谱峰信息;

[0038] (5) 根据采集的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算得到天然产物对细菌生长的抑制率;

[0039] (6) 采用不同浓度梯度的天然产物重复步骤(1)、(2)、(3)、(4),采集不同浓度的天然产物与细菌作用产生的CO₂色谱峰信息计算CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积计算不同浓度天然产物对细菌生长的抑制率,从而计算得到天然产物对细菌生长的半数抑制浓度。测定方法流程简单,天然产物本身状态及在培养基中的浊度对CO₂的信号无影响,测定结果精确,可有效进行天然产物抗菌活性筛选,对天然产物资源活性评价具有重大意义。

[0040] 进一步地,本发明实施例的天然产物抗菌活性测定方法还可应用于合成药物的抗菌活性测定。

[0041] 参照附图3、4,本发明实施例的方法测定的抗菌活性抑制率、半数抑制浓度与传统方法(浊度)得到的抑制率和半数抑制浓度结果相一致。

[0042] 实施例二

[0043] 参照附图5、6、7、8,采用本发明实施例一的天产物抗菌活性测定方法分别进行氯霉素对金黄色葡萄球菌、十树樟提取物对沙门氏菌的抗菌活性进行测定;具体包括以下步骤:

[0044] (1) 分别取2mL浓度为10⁸cfu/mL的金黄色葡萄球菌菌液、沙门氏菌在灭菌的顶空

样品瓶中,37℃振荡(80rpm)培养不同时间后,于顶空气相色谱仪中检测,测定CO₂的信号确定培养时间为24h;

[0045] (2)取金黄色葡萄球菌菌液、沙门氏菌菌液于含有100μg/mL四环素的LB培养基中,确保菌液浓度范围为10⁶~10⁹cfu/mL,且顶空样品瓶中液体总体积为2mL,在37℃振荡培养24h,然后于顶空气相色谱仪中检测,测定CO₂的信号确定金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的最优浓度为10⁸cfu/mL;

[0046] (3)取10⁸cfu/mL的金黄色葡萄球菌菌液于一系列含有不同浓度氯霉素的LB培养基的顶空样品瓶中,氯霉素最终浓度分别为0,2,5,10,15,20,50,100μg/mL,顶空样品瓶培养液体体积2mL;取10⁸cfu/mL的沙门氏菌菌液于一系列含有不同浓度十树樟提取物的LB培养基的顶空样品瓶中,确保提取物最终浓度分别为0,5,10,50,100,200,500,1000μg/mL,顶空样品瓶培养液体体积2mL;上述样品瓶菌在37℃培养箱中震荡培养24h;

[0047] (4)取2mL的10⁸cfu/mL的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌菌液于灭菌后顶空样品瓶中作为对照组培养;与实验组在相同条件下培养;

[0048] (5)设置顶空进样器操作条件及气相色谱仪操作条件,使CO₂的色谱峰与其它峰基线分离,将所述实验组和对照组的顶空样品瓶置于顶空进样器中,进行顶空气相色谱分析,采集CO₂色谱峰信息;

[0049] (6)根据采集的CO₂色谱峰信息积分CO₂色谱峰面积,根据所述CO₂色谱峰面积分别计算得到不同浓度的氯霉素对金黄色葡萄球菌、不同浓度的十树樟提取物对沙门氏菌生长的抑制率,从而通过SPSS软件分别计算氯霉素对金黄色葡萄球菌以及十树樟对沙门氏菌的半数抑制浓度。其余同实施例一。

[0050] 本发明实施例天然产物抗菌活性测定结果的相对标准偏差见表1,对两种菌(革兰氏阳性和阴性)的五次重复测量相对标准偏差均在5%以内,测定结果准确,精度高。

[0051] 表1 抑制率的测定结果的相对标准偏差

菌种	抑制率, %	RSD, %
金黄色葡萄球菌	60.1	2.67
	56.8	
	59.7	
	60.5	
	60.8	
沙门氏菌	37.4	4.46
	33.2	
	34.3	
	35.5	
	34.8	

[0053] 注:表中数据为10μg/mL四环素对2mL的10⁸cfu/mL的细菌菌液抑制率结果

[0054] 在本文中,所涉及的前、后、上、下等方位词是以附图中零部件位于图中以及零部件相互之间的位置来定义的,只是为了表达技术方案的清楚及方便。应当理解,所述方位词的使用不应限制本申请请求保护的范围。

[0055] 在不冲突的情况下,本文中上述实施例及实施例中的特征可以相互结合。

[0056] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

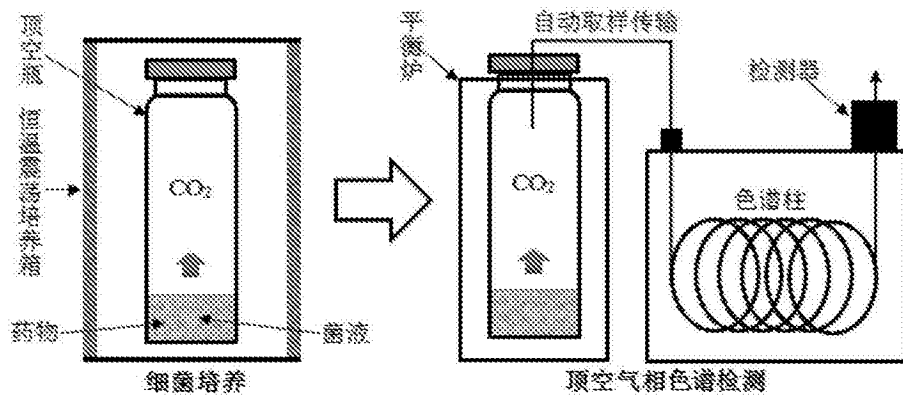


图1

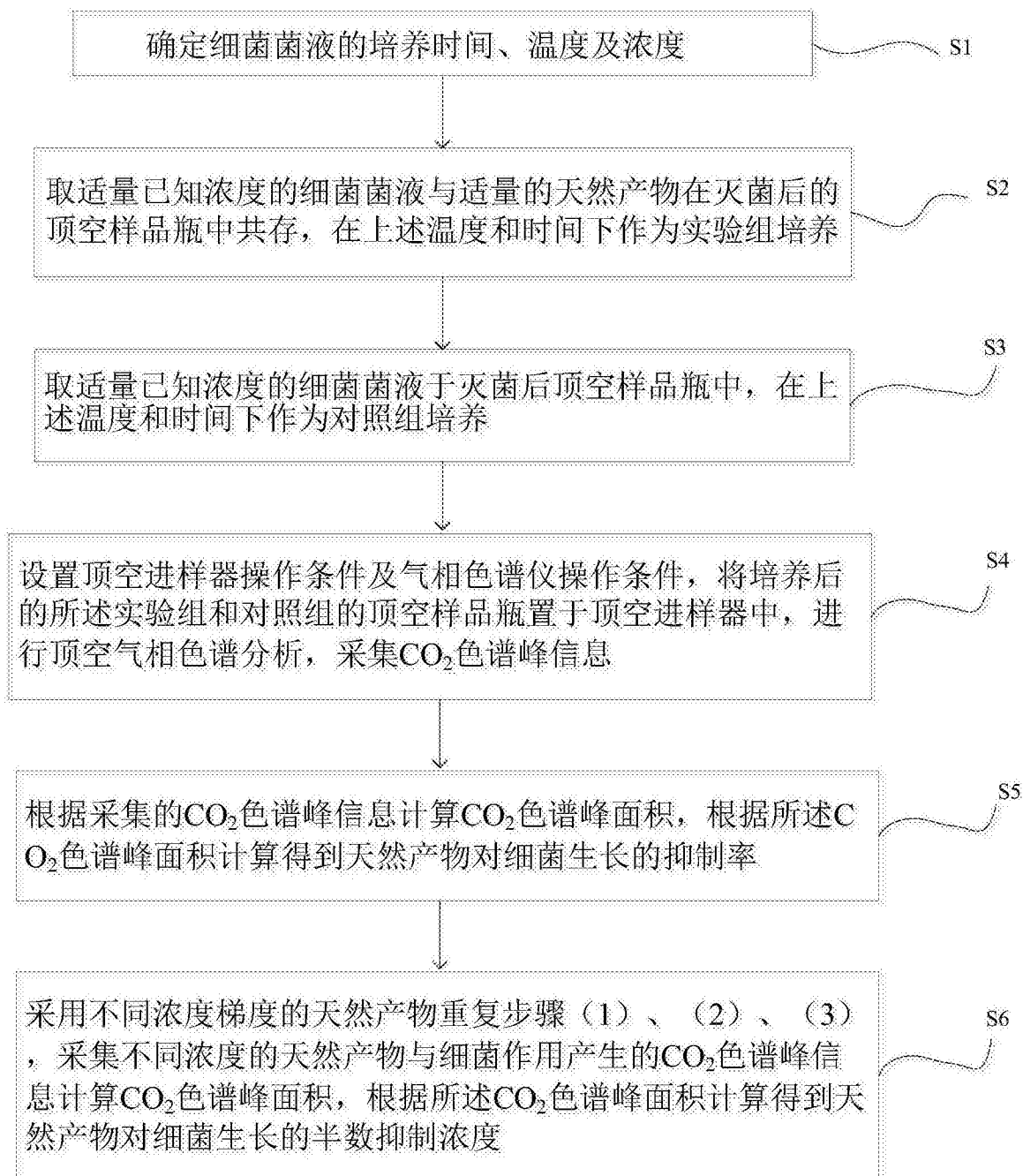


图2

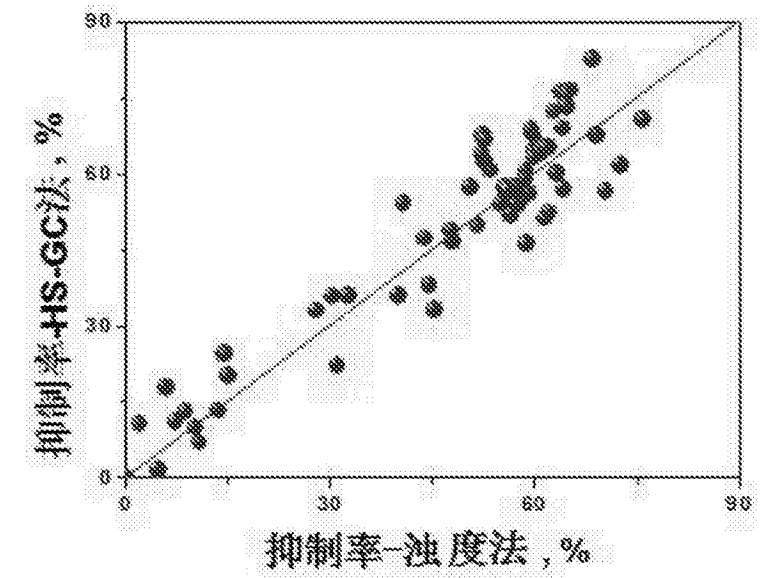


图3

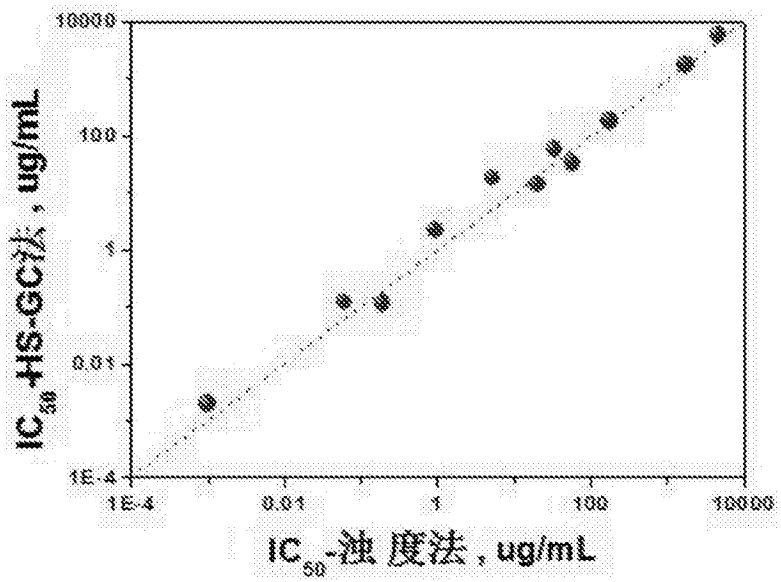


图4

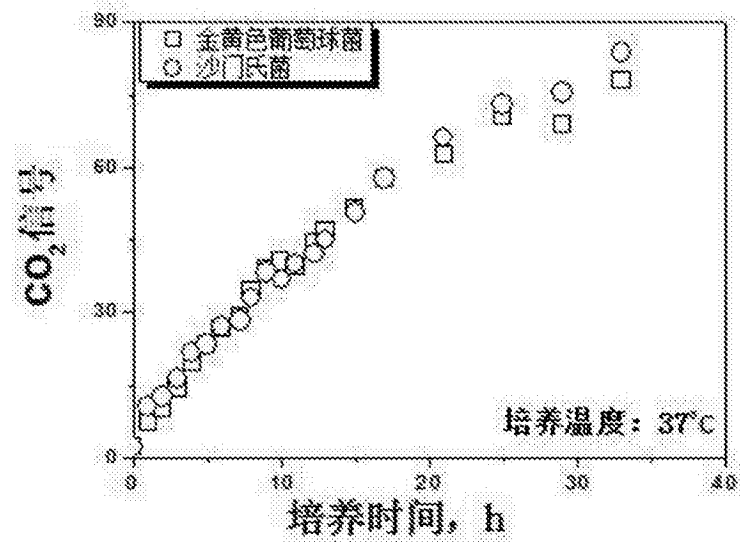


图5

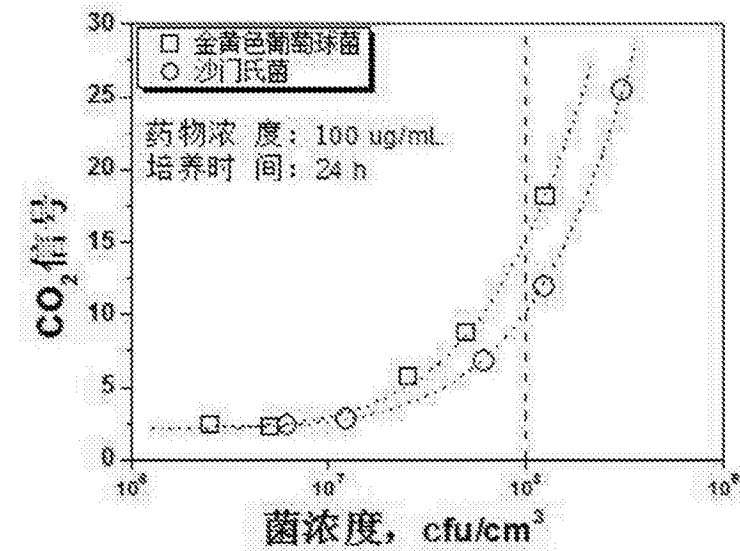


图6

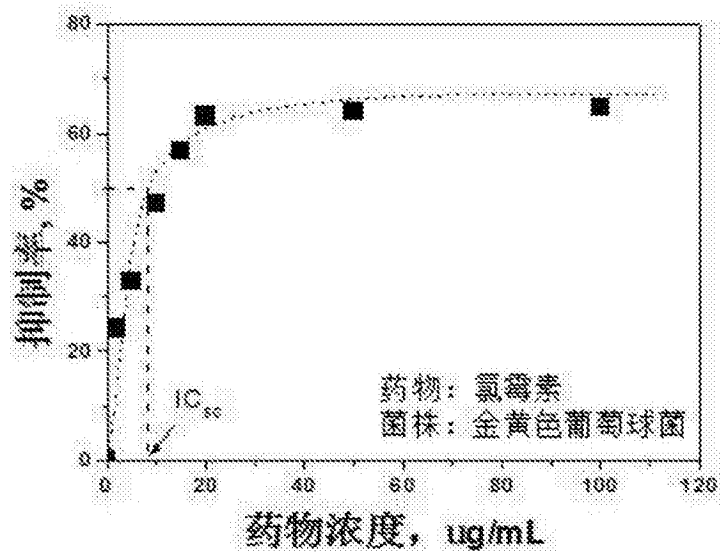


图7

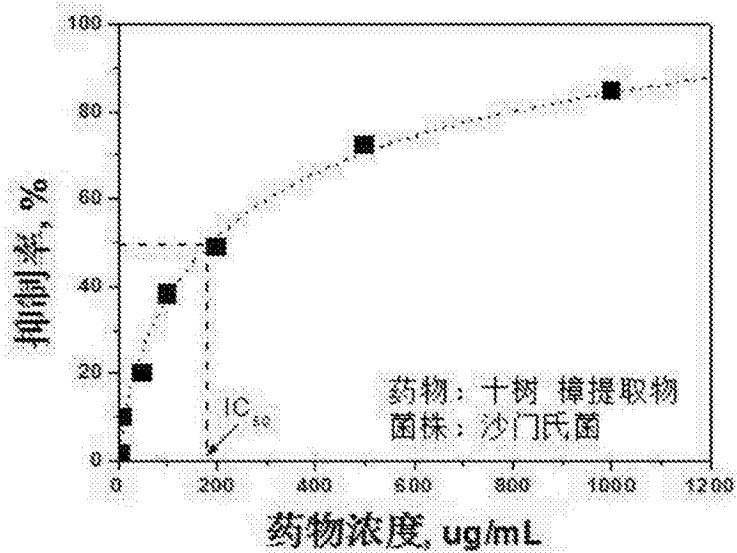


图8