

藏药熏倒牛提取物的抑菌杀虫活性研究

张艳霞^{1,2}, 景明^{1,2*}, 王晶晶¹, 李炆¹, 张银川³¹甘肃中医学院; ²甘肃省中药药理学与毒理学重点实验室, 兰州 730000; ³定西市妇幼保健院, 定西 742000

摘要: 为了探讨藏药熏倒牛乙醇提取物不同极性溶剂萃取部位的抑菌杀虫活性, 将熏倒牛乙醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 所得各萃取部位及水余液部位通过抑菌圈法测定抑菌活性部位, 对活性部位采用二倍稀释法测定最低抑菌浓度, 采用改良任氏法测定杀灭滴虫活性部位及最低有效杀虫浓度。结果表明熏倒牛乙醇提取物的乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌有强抑制作用, 最低抑菌浓度为 0.125 mg/mL, 对变形杆菌、粪肠球菌和白色念珠菌的抑制作用也比较强, 最低抑菌浓度为 0.25 mg/mL。石油醚部位和乙酸乙酯部位对阴道滴虫有明显抑制作用, 最低有效杀虫浓度分别为 0.5、0.25 mg/mL。说明熏倒牛乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位有较强的抑菌杀虫作用, 是熏倒牛的抑菌杀虫活性部位。

关键词: 熏倒牛; 活性部位; 抑菌杀虫

中图分类号: R962

文献标识码: A

Study on the Anti-bacterial and Anthelmintic effects of *Biebersteinia heterostemon* Maxim

ZHANG Yan-xia^{1,2}, JING Ming^{1,2*}, WANG Jing-jing¹, LI Yang¹, ZHANG Yin-chuan³¹Gansu College of Traditional Chinese Medicine; ²The Key Laboratory of Traditional ChineseMedicine Pharmacology and Toxicology, Lanzhou 730000, China; ³Dingxi Hospital of Maternal and Child Health, Dingxi 742000, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the anti-bacterial and anthelmintic effects of different fractions of ethanol extract of *Biebersteinia heterostemon* Maxim. The *B. heterostemon* sample was firstly extracted by ethanol. The ethanol extract was then fractionated using petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol sequentially. The anti-bacterial effects of different extracts of *B. heterostemon* were tested using the bacteriostatic cycle method. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by double dilution method. The modified Ren's method was used to determine the active fraction with anthelmintic effect and its respective minimal effective concentration (MEC). The results showed that the ethyl acetate fraction of *B. heterostemon* ethanol extract had strong inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*, with MIC of 0.125 mg/mL. Its inhibitory effect on *Bacillus proteus*, *Enterococcus faecalis* and *Blastomyces albicans* were also strong with MIC of 0.25 mg/mL. Both petroleum ether fraction and ethyl acetate fraction had obviously inhibitory effect on *Trichomonas vaginalis* with MICs of 0.5 mg/mL and 0.25 mg/mL, respectively. Based on these experimental results, it was concluded that the ethyl acetate fraction of *B. heterostemon* ethanol extract had strong anti-bacterial and anthelmintic effects.

Key words: *Biebersteinia heterostemon* Maxim; active fraction; anti-bacterial and anthelmintic

藏药熏倒牛 (*Biebersteinia heterostemon* Maxim) 是一种常用的藏药, 为蔷薇纲牻牛儿苗亚纲熏倒牛科熏倒牛属植物, 主要分布于甘肃、宁夏及四川, 生于海拔 1000 ~ 3200 m 的山坡、河滩地和杂草坡地^[1,2]。本品味辛、苦, 性寒。具有清热解毒, 散肿

止痛, 清血热, 祛风毒之功效。用于治疗各种炎症、结核症、丹毒、疟疾、咽喉肿痛等。有报道采用平板法对熏倒牛水提浸膏进行了体外抑菌试验, 但对熏倒牛不同极性溶剂提取部位抑菌杀虫活性的研究尚未见报道。笔者采用极性萃取法将熏倒牛乙醇提取物分离成不同极性部位, 采用抑菌环法及二倍稀释法测定抑菌杀虫活性部位, 并对活性部位的最低抑菌浓度和最低有效杀虫浓度进行了测试, 为藏药熏倒牛抑菌、抗炎、杀虫作用在临床应用和深入研究提

供参考。

1 材料与仪器

1.1 试剂

藏药熏倒牛药材于2009年8月采自甘肃省天祝藏族自治县华藏寺镇,经甘肃农业大学农学院陈垣教授鉴定为熏倒牛科植物 *B. heterostemon* 的干燥地上部分;营养琼脂(HM,杭州微生物试剂厂);肉汤培养基(杭州微生物试剂厂);平板菌落计数琼脂(水解酪蛋白琼脂,杭州微生物试剂厂);改良任氏液(杭州微生物试剂厂);庆大霉素片(哈药集团制药总厂);其余试剂均为分析纯。

1.2 菌种与滴虫

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌(*Bacillus proteus*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、产气夹膜杆菌(*Clostridium perfringens*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和白色念珠菌(*Blastomyces albicans*)均由卫生部药品生物制品检定所和卫生部临床检验中心提供;滴虫采自定西市妇幼保健院妇科门诊阴道滴虫急性未治患者。

1.3 仪器

CJ-2S型洁净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司);DHP-9272电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);HR/T16M台式高速冷冻离心机

(湖南赫西仪器装备有限公司);ASV-3023高压灭菌器(日本SAKURA公司);纸片(杭州微生物试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 熏倒牛不同提取部位的制备

取熏倒牛药材粉末,用95%乙醇回流提取3次,每次1h,合并提取液,滤过,滤液减压回收溶剂至无醇味,用蒸馏水稀释(1:1,生药mg/mL),将稀释液依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取(每份溶剂与稀释液等体积连续萃取4次),分别得到石油醚部位(A)、乙酸乙酯部位(B)、正丁醇部位(C)、水余液部位(D),分别回收溶剂,备用。临用前配成所需浓度。

2.2 熏倒牛不同提取部位的抑菌作用

取各菌分别接种于MH琼脂平板培养基中,30℃培养14h,用MH液体培养基制备菌悬液,菌液浓度约为 1×10^6 cfu/mL,4℃冰箱保存(不超过12h)。将熏倒牛各萃取部位的溶液分别灭菌,备用。每张纸片(直径6mm)分别加熏倒牛各萃取部位(50mg/mL)溶液各10μL,每个样品设3个平行组,空白对照(E)为无菌蒸馏水,阳性对照(F)为庆大霉素溶液。K-B法取浓度为 1×10^6 cfu/mL的菌液0.2mL,均匀涂布整块MH琼脂培养基表面,置室温3~5min后贴含药纸片,细菌30℃培养24h,真菌27℃培养72h后观察结果,记录抑菌圈大小来表示抑菌活性。熏倒牛不同萃取部位的抑菌作用见表1。

表1 熏倒牛不同提取部位的抑菌活性($n=3$)

Table 1 The anti-bacterial effects of different fractions of ethanol extract of *B. heterostemon*($n=3$)

组别 Group	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic circle (mm)													
	F				A			B			C		D	
浓度 Concentration(mg/mL)	9	6	3	9	6	3	9	6	3	9	6	3	-	0.02
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	12.3	9.4	3.8	23.1	9.4	3.8	5.3	2.7	0.5	0	0	0	0	25.8
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.7	6.1	2.4	21.2	7.4	2.4	3.8	1.5	0	7.1	3.4	1.2	0	26.4
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	3.6	2	1.3	138	4.2	1.3	3.2	1.2	0	0	0	0	0	20.9
变形杆菌 <i>Bacillus proteus</i>	5.3	3.1	1.7	19.2	9.1	1.7	1	0.5	0	0	0	0	0	22.1
腐生葡萄球菌 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7.1	4.2	2	11.3	4.2	2	2.3	1	0.5	4.8	2.5	1.3	0	21.8
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	6.4	2.7	0.8	22.7	11.7	4.3	0.5	0	0	0	0	0	0	18.3
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	10.3	7.1	3.4	18.6	7.1	3.4	5.1	3.2	1.2	5.2	2.7	1.5	0	22.6
产气夹膜杆菌 <i>Clostridium perfringens</i>	5.5	3.1	1.7	9.7	4	1.5	11.7	4.9	2.1	0	0	0	0	19.7
淋病奈瑟氏菌 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7.2	4.9	2.1	8.3	3.4	1.2	9.7	3.8	2.3	0	0	0	0	15.6
白色念珠菌 <i>Blastomyces albicans</i>	8.2	6.4	3.2	18.3	6.4	3.2	4.4	2.5	0.5	0	0	0	0	21.4

由表 1 可知,熏倒牛乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、变形杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠球菌和白色念珠菌有强抑制作用,且随着浓度降低抑制作用明显降低;熏倒牛石油醚部位和正丁醇部位对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、变形杆菌、阴沟肠杆菌、粪肠球菌和白色念珠菌抑制作用较弱;熏倒牛水余液部位对金黄色葡萄球菌、变形杆菌、阴沟肠杆菌和白色念珠菌没有抑制作用,对铜绿假单胞菌和粪肠球菌的抑制作用很弱。

表 2 熏倒牛乙酸乙酯提取部位的最低抑菌浓度 ($n=3$)

Table 2 The MICs of the ethyl acetate fraction of ethanol extract of *B. heterostemon* ($n=3$)

菌种 Tested bacteria	熏倒牛乙酸乙酯提取部位浓度 (mg/mL) Concentration (mg/mL)								
	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
变形杆菌 <i>Bacillus proteus</i>	-	-	-	-	-	-	±	+	+
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	±	+	+
白色念珠菌 <i>Blastomyces albicans</i>	-	-	-	-	-	-	±	+	+

注:“-”表示无菌生长;“+”表示有菌生长;“±”表示有少量菌生长。

Note:“-” indicates no bacteria growth;“+” indicates bacteria growth;“±” indicates a small amount of bacteria growth.

表 2 的结果进一步证实了熏倒牛乙酸乙酯提取部位对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌有强抑制作用,最低抑菌浓度为 0.125 mg/mL,对变形杆菌、粪肠球菌和白色念珠菌的抑制作用也比较强,最低抑菌浓度为 0.25 mg/mL。

2.4 抑制滴虫试验

虫种在改良任氏液中以无菌培养传代 1 个多月,试验时,建立虫株两株,定为 a 株和 b 株,将 a、b 株在试管内培养 48 h,滴虫生长良好,生命力旺盛,

2.3 熏倒牛乙酸乙酯部位 MIC 的测定

取乙酸乙酯活性部位适量,采用二倍稀释法^[3]用培养基将药物稀释成不同浓度的供试溶液,分别加入 0.1 mL 菌液(0.5 麦氏比浊度,100 倍稀释),将其置于培养箱中,37 °C 培养 18 h 后接种于 MH 平板培养过夜,观察结果。未见细菌生长的为 MIC,每个样品设 3 个平行组,结果以平均值计。熏倒牛乙酸乙酯提取部位的 MIC 见表 2。

管内培养液中虫密度达到一定数量($2.3 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^5/\text{mm}^3$)后,进行试验。经预试后设定药物浓度为 10 mg/mL,用所需培养基将各提取部位稀释成浓度为 0.5、0.25 mg/mL,各提取部位的每一浓度设两支平行管,将各管放入 37 °C 孵箱中继续培养,分别用药 2、4、8、12、24 h 后取出,滴片,镜检,光镜计数,计算抑虫率。并将滴虫死亡率为 100% 及作用 24 h 后达此标准的虫液再转种培养 7 h,观察有无滴虫生长,一次判断药物对滴虫的作用效果。结果见表 3。

表 3 熏倒牛提取物对阴道滴虫的体外抑制试验结果

Table 3 Anthelmintic effects of different fractions of ethanol extract of *B. heterostemon* on *Trichomonas vaginalis*

药物 Sample	虫株 Strain	用药后滴虫死亡率 Mortality rates of <i>Trichomonas vaginalis</i> after medication (%)					
		2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h
石油醚部位 Petroleum ether fraction	a	51	67	84	100	100	+
	b	48	65	81	100	100	+
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	a	100	100	100	100	100	+

	b	100	100	100	100	100	+
正丁醇部位 n-butanol fraction	a	0	3	10	18	40	+
	b	0	2	7	13	27	+
水余液部位 Water residue	a	0	5	12	15	34	+
	b	0	4	11	16	39	+

表3结果显示,熏倒牛石油醚部位和乙酸乙酯部位对滴虫有明显抑制作用,其杀灭滴虫的最低有效浓度分别为0.5、0.25 mg/mL。虽然正丁醇部位、水余液部位对滴虫的抑制作用较弱,但随药物作用时间的延长滴虫死亡率逐渐升高。

3 讨论

由于抗生素的不合理使用导致了耐药菌株的增加,降低了现有抗生素的效率。中藏药在预防和控制细菌性感染疾病方面发挥着积极作用。而且由于中藏药的特殊性,细菌较少对中药产生耐药,研究和开发抗菌中藏药对解决耐药菌株的产生和减少抗生素副作用具有重要意义。

熏倒牛水提浸膏具有解热、镇痛、镇静和解痉作用,体外抑菌试验表明熏倒牛浸膏对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、乙型溶血性链球菌、肺炎双球菌有明显的抑制作用(药物浓度0.5 g/mL),且随浓度增加抑菌作用加强。对大肠杆菌、伤寒杆菌、富氏痢疾杆菌、宋内氏痢疾杆菌无抑菌作用^[4],这与熏倒牛醇提物不同极性溶剂萃取后的水余液部位对金黄色葡萄

球菌、大肠杆菌和白色念珠菌没有抑制作用相吻合。虽然熏倒牛在民间的药用价值较大,但有关熏倒牛的抑菌、抗炎研究报道并不多。本研究发现,熏倒牛乙醇提物的乙酸乙酯部位抑菌杀虫活性最强,是熏倒牛的抑菌杀虫活性部位,从中寻找熏倒牛抑菌杀虫活性成分是今后研究的方向。

参考文献

- 1 Editorial Committee of Flora Republicae Popularis Sinicae (中国植物志编委会). Flora Republicae Popularis Sinicae (中国植物志), Beijing: Science Press, 2004. 415.
- 2 Yang YC (杨永昌). Tibetan Medicines (藏药志). Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991. 263.
- 3 Miao CG (苗春光), Ju YL (鞠玉林), Gao W (高威), et al. Effect of Chinese traditional medicine "LN" to the drug tolerance of Pasteurella. *J Agric Sci Yanbian Univ* (延边大学农学报), 2009, 31: 172-175.
- 4 Tang RJ (唐荣江), Min ZH (闵照华), Dang HQ (党合群), et al. Pharmacological study of *Biebersteinia heterostemon* Maxim. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1988, 3(3): 8-9.

(上接第2026页)

- 5 Kong JH (孔俊豪), Sun QL (孙庆磊), Tu YF (涂云飞), et al. Research progress on enzymatic characteristic and application of polyphenol oxidase. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2011, 30(4): 13-17.
- 6 Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments. *Tetrahedron*, 2006, 62: 4774-4783.
- 7 Kong JH (孔俊豪), Yang XF (杨秀芳), Tu YF (涂云飞), et al. Fast optimization of dynamic preparation of theaflavins

through blank column-orthogonal design by SPSS. *China Tea Proc* (中国茶叶加工), 2011, 3: 10-14.

- 8 Sharma K, Bari SS, Singh HP. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. *J Mol Catal B Enzym*, 2009, 56: 253-258.
- 9 Ngure FM, Wanyoko JK, Mahungu SM, et al. Catechins depletion patterns in relation to theaflavin and thearubigins formation. *Food Chem*, 2009, 115: 8-14.
- 10 Zhong L (钟蓓). 茶叶品质理化分析. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1989. 469-470.