

地肤子甲醇萃取物杀菌抑菌活性成分的初步研究

吴静, 苏学友, 师光禄, 王有年

(北京农学院, 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:为探索藜科地肤属植物地肤种子的杀菌抑菌活性,采用生物活性跟踪法对该植物的杀菌抑菌活性成分进行了初步的研究,并采用柱层析法对其成分进行分离。甲醇萃取物对小麦赤霉病菌、茄子枯萎病菌、桃褐腐病菌和苹果斑点落叶病菌的抑菌率分别为34.74%、39.83%、66.65%和44.36%,效果都好于石油醚和氯仿萃取物;流分10和流分13的抑制效果较好,抑菌率分别为54.81%和76.98%。甲醇萃取物的生物活性显著高于石油醚和氯仿萃取物($P < 5\%$);分离的流分13经活性测定后对桃褐腐病菌有较好的抑菌效果。

关键词:地肤子;活性跟踪法;柱层析;流分

中图分类号:S636.9 **文献标识码:**A

A Preliminary Study on Fungistasis Activity Components of Methanol Extractions from *Kochia scoparia*

Wu Jing, Su Xueyou, Shi Guanglu, Wang Younian

(Beijing University of Agriculture, Key Laboratory of New Technology of Agricultural Application, Beijing 102206)

Abstract: For researching the fungistasis activity of broom cypress (*Kochia scoparia*) seed, this experiment used the tracing method of bioactivity to investigate fungistasis active components. Its ingredient were separated by column chromatography. The results showed that inhibitory rate of methanol extracts separately was 34.74%, 39.83%, 66.65% and 44.36% to *Fusarium gramine*, *Fusarium oxysporum*, *Monilia cinerea* and *Alternaria artemata*. The effections of which was better than others. Ingredient 10 and 13 had better antifungal activities, inhibitory rate was 54.81% and 76.98%. The bioactivity of methanol extracts were markedly higher than petroleum ether and chloroform extracts ($P < 5\%$)., Ingredient 13 had better fungistasis effect on *Monilia cinerea* in all the separating ingredient.

Key words: *Kochia scoparia*, tracing method of bioactivity, analyse, ingredient

生物活性化合物是植物中大量存在的物质,植物作为其天然宝库,其产生的次生代谢产物已超过40万种^[1]。据统计,全球植物种有35万种之多,但目前只有约10%的植物经过化学成分的研究,植物中的大多数化学物质如菇烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特的氨基酸和多糖等均具有杀虫或抗菌活性,从已研究的植物中发现约有2400种植物具有控制有害生物活性。植物源农药作为生物农药的一种,其开发利用于

有害生物防治的前景十分广阔,从植物中探寻新的活性先导物或新的作用靶标,通过类推合成或生物合理设计进行新农药的开发已成为当前农药化学和农药毒理学研究的热点^[2]。地肤子为藜科(*Chenopodiaceae*)植物—地肤(*Kochia scoparia*)的干燥成熟果,载于《神农本草经》,在药用方面,其性状:味苦、寒、无毒,对许兰氏黄癣菌(*Pseudolarix amabilis*),数种小芽胞癣菌和星形奴卡氏菌(*Semen raphani*)等皮肤真菌有不同程度的抑

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872029);北京市自然科学基金重点项目(6071001);北京市科委区县专项资金项目;北京市教委平台建设项目;北京市都市农业学科群项目(XK100190553);北京市属市管高校人才强教计划资助项目。

第一作者简介:吴静,女,1982年出生,内蒙古赤峰人,硕士,从事植物源农药研究。通信地址:102206北京市昌平区北农路7号北京农学院, E-mail: wujing0602005@sohu.com。

通讯作者:王有年,男,1951年生,北京人,教授,从事植物源农药研究。Tel: 80799006, E-mail: wyn1951@126.com。

收稿日期:2008-06-16, **修回日期:**2008-06-23。

制作用,而且有溶解尿酸的作用,适用于尿酸过多的疾病。药理研究表明地肤子中所含的三萜皂甙类成分为其主要活性成分,具有抗炎、抗过敏和抗搔痒等作用^[3]。据报道:用3种有机溶剂对地肤子进行提取,发现地肤子提取物对螨类有很强的抑制效果^[4]。笔者研究发现地肤子甲醇提取物对几种植物病原菌都有较好的抑制效果,所以采用活性跟踪法对地肤子的抑菌成分进行研究,旨在为研制开发新型的植物源杀菌剂提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验时间、地点

试验于2007年在北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室完成。

1.2 材 料

地肤子(采购于北京王府井同仁堂大药房,未炮制)。经粉碎机(6202型)粉碎后,过60目标准筛,干燥低温保存,备用;石油醚(60~90℃沸程)、三氯甲烷、甲醇均为分析纯(北京化工厂生产)、自来水;培养基(PDA培养基):土豆400g,琼脂(Japan)25g,蔗糖40g,用自来水配制成2000ml;供试菌种包括:小麦赤霉病菌(*Fusarium gramine*)、茄子枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、桃褐腐病菌(*Monilia cinerea*)、苹果斑点落叶病菌(*Alternaria artemata*),均由北京农学院植物科学技术系植保植物病理组提供。

1.3 方 法

1.3.1 活性成分提取方法 将一定量的地肤子干粉装入广口瓶中,加入干粉5倍量的甲醇溶剂,浸提3~5d,减压浓缩后,再加入5倍量的溶剂浸提3~5d,减压浓缩,如此3次,合并3次的提取物。然后将提取物采用液-液分配法进行分离(见图1),通过生物活性跟踪,发现萃取物甲醇部分生物活性最强。将甲醇部分采用中压柱层析方法进行柱层析分离,洗脱液为石油醚、氯仿、乙酸乙酯和甲醇配成的一系列极性由低到高的溶剂。洗脱液的流速为10ml/min,每流分收集50ml,共得流分611个,经薄层层析(TLC)检验后,相同成分者合并,最终得13个流分。

薄层层析所用的薄板为GF₂₅₄(天津市天河医疗仪器有限公司),样品在板上展开后,置于碘粒杯里检测,并做好标记。将合并后所得11个流分减压浓缩后,进行生物活性测定,确定活性成分所在部位。

1.3.2 生物活性的测定方法 植物提取物对病原菌菌丝生长抑制作用采用生长速率法^[5]。在无菌条件下,取制备的地肤子提取浓缩液1ml(20W紫外灯灭菌30min下同)加入至约45℃14mlPDA培养基中,充分摇匀后制成平板,将培养4d的4种供试菌株在菌落的边

缘打取菌饼(直径为5mm)接种于培养基的中央,每皿一个菌饼,每个处理设3个重复。以相应量的提取溶剂加入到培养基中作为对照(CK)。28℃恒温培养箱中培养48h后,定期观察菌落形态并用十字交叉法测量菌落直径,直到CK菌落即将长满平皿为止,计算抑制生长率^[6-8]。

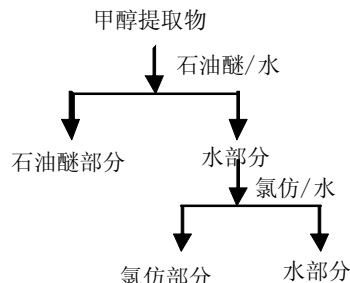


图1 粗提物液-液分配法流程图

抑菌率的计算公式: 纯生长量 = 菌落平均直径 - 菌饼直径;

抑菌率 = [(对照纯生长量 - 处理纯生长量) / 对照纯生长量] × 100%。

F₁₃(流分13,下同)生物活性的测定采用抑菌圈法。流份生物活性测定采用牛津杯抑菌圈法。将供试菌种进行活化培养,PDA培养基,pH自然,28℃恒温培养箱中培养,活化3代后,用含有0.05% Tween80的无菌水洗下孢子制成含量为10⁶~10⁷个/ml的孢子悬浮液,备用。在菌种传代与培养过程中,均严格遵循无菌操作规则。将制备好的菌悬液均匀涂在已经做好的平板培养基上,将灭菌后的4个牛津杯均匀放置其中,轻加压力使之与培养基接触面无缝隙。用枪吸取待测的流份200μl注入牛津杯内至满,平放培养箱中培养24h,取出后准确测出各个牛津杯周围的抑菌圈的直径。

1.3.3 数据处理方法 试验结果采用DPS软件进行分析。方差分析依据Duncan's法。所有处理均用Excel进行。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂萃取物的抑菌作用

液-液分配法对地肤子甲醇提取物进行不同溶剂萃取后的效果(见表1):从表中可以看出,3种有机溶剂萃取物对4种植物病原菌都有一定的抑菌活性,其中甲醇萃取物的抑菌活性最强,石油醚次之,氯仿较差。甲醇萃取物对小麦赤霉病菌、茄子枯萎病菌、桃褐腐病菌和苹果斑点落叶病菌的抑菌率分别为34.74%、39.83%、66.65%和44.36%,效果都好于石油醚和氯仿萃取物。在对于小麦赤霉病菌、茄子枯萎病菌和苹果斑点落叶病菌的抑制效果上,甲醇萃取物和石油醚萃取

物与氯仿萃取物之间呈现差异显著性($P<5\%$),前两者之间不存在差异显著性 ($P<5\%$);3种不同溶剂的萃取物对桃褐腐病菌的抑制效果都呈现差异显著性($P<5\%$)。从整体上看对4种病原菌抑制效果最好的是桃褐腐病菌。

表1 地肤子不同溶剂萃取物的抑菌作用

处理		A	B	C
I	对照	5.60	5.75	5.78
	M 处理	3.65	3.98	5.22
	N	34.74a	30.72a	9.67b
II	对照	5.08	4.85	5.23
	M 处理	3.05	3.08	4.38
	N	39.83a	36.42a	15.08b
III	对照	4.65	4.85	4.88
	M 处理	1.55	2.13	3.87
	N	66.65a	56.01b	20.68c
IV	对照	4.23	4.68	5.00
	M 处理	2.35	2.73	4.38
	N	44.36a	41.40a	12.33b

注:表中菌落直径为3次重复的平均值;表中同行数据后字母相同者表示经新复极差法检测差异不显著($P<5\%$ 水平); I:小麦赤霉病菌 *Fusarium gramine arum*, II:茄子枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*, III:桃褐腐病菌 *Monilia cinerea*, IV:苹果斑点落叶病菌 *Alternaria artemata*, M:菌落直径; N 抑菌率 %; A:甲醇; B:石油醚; C:氯仿。

2.2 柱层析各流分的生物活性

在预试的基础上,设计了以下洗脱液配比:石油醚:氯仿=8:2;石油醚:氯仿=6:4;石油醚:氯仿=3:7;氯仿:氯仿:甲醇=95:5;氯仿:甲醇=7:3;氯仿:甲醇=5:5;氯仿:甲醇=3:7;甲醇。经柱层析分离得到611个流分。TCL检测后合并为13个(见表2)。将这13个流分对

萃取物抑制效果最好的桃褐腐菌进行生物活性测定。结果表明: F_{10} (流分10,下同)和 F_{13} 的抑制效果较好,抑菌率分别为54.81%和76.98%,且两者呈现差异显著性($P<5\%$)。

表2 柱层析各流分对桃褐腐病菌的抑制作用

流分	颜色及状态	抑菌率/%
1(1-110)	无色液体	2.42d
2(111-205)	微黄色液体	8.18d
3(206-245)	青绿色液体	1.18d
4(246-265)	无色液体	0.00d
5(266-317)	青色液体有细微沉淀	0.00d
6(318-367)	黄色液体	6.78d
7(368-390)	深黄绿色液体	11.21d
8(391-401)	黄中泛有青色液?	10.01d
9(402-447)	降黄色有大量深黄色沉淀	0.00d
10(448-565)	深黄色有沉淀	54.81b
11(566-611)	黄绿色有深绿色沉淀	0.00d
12(612-617)	黄色液体	24.78c
13(618-629)	无色液体	76.98a

注:表中同列数据后字母相同者表示经新复极差法检测差异不显著($P<5\%$ 水平)

2.3 F_{13} 牛津杯法生物活性测定

为进一步的考察 F_{13} 的生物活性,本试验用牛津杯抑菌圈法对桃褐腐病菌进行抑菌率测定,试验结果(见图2):由图中我们可以看出, F_{13} 的抑菌圈直径最大, F_{10} 其次,且 F_{13} 与 F_{10} 的抑菌率呈现差异显著性($P<5\%$)。而 F_1 、 F_4 、 F_5 、 F_9 和 F_{11} 的抑菌圈直径为0,没有抑菌效果。所以 F_{13} 里有较强的抑菌成分,具体成分还需要做进一步的研究与鉴定。

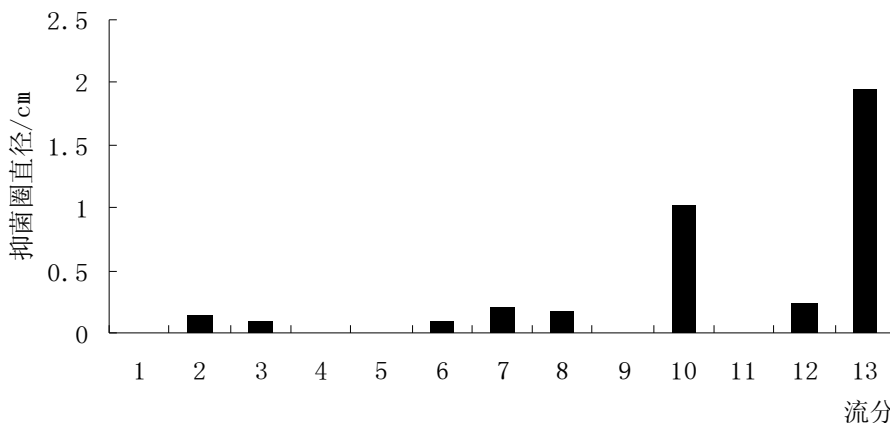


图2 抑菌圈法流分对桃褐腐菌的活性测定

3 结论与讨论

地肤适应性较强,南北各地均可栽种,对土壤要求不严,房前、屋后、地边、地脚等处均可生长。营养价值

高,又具有保健功能,是一种极好的野生蔬菜。目前,地肤还处于野生状态尚未开发利用,市场潜力巨大,极具开发价值^[9]。但在植物源农药方面,特别是对果树病害

的防治,至今仍鲜有报道。笔者通过对杀菌活性植物的筛选,发现地肤子对桃褐腐病菌有很强的生物活性,说明提取物中含有极性较高的杀菌活性成分。利用液-液分配法进行有效成分的分离发现:在3种萃取物中,甲醇萃取物的抑菌生物活性最强,且对四种植物病原菌中桃褐腐的抑菌效果最好,对其进行分离后得到有效流份 F₁₃。

由于人们对化学农药的不合理使用及其药剂本身的固有缺点,农药在使用中产生了一系列公害问题,例如环境污染、人畜中毒、杀伤天敌、破坏生态平衡、3R (Residue, Resistance, Resurgence)等严重问题,这些不良影响已引起人们的普遍关注,因此,对农药进行重新评价,开发对人畜及环境安全的合理性农药是解决上述问题的重要途径之一^[10]。因此,笔者从长远发展的角度出发,充分利用现有的植物资源,开发具有与生物、环境和谐的绿色植物源农药,为新农药的研制和先导化合物的发现提供理论依据和技术支撑,也为地肤这一植物资源的综合开发利用提供新的途径。到目前为止,地肤子杀菌抑菌活性成分的提纯、结构鉴定、及其杀菌抑菌的

作用方式和作用机理等也有待更深入的研究。

参考文献

- [1] SWAIN. Secondary compounds as protective agents. *Ann Rev Plant Physiol*, 1977, 28: 479-501.
- [2] 李典鹏,张厚瑞,陈海珊.植物源农药的研究利用. *广西植物*, 2003, 23(4): 373-378.
- [3] 夏玉凤,王强,戴岳.不同采收期地肤子中皂甙含量的变化. *植物资源与环境学报*, 2002, 11(4): 54-55.
- [4] 侯辉,赵莉茵,曹挥,等.地肤中杀螨活性成分的提取与初步分离. *山东农业科学*, 2004, 1: 47-48.
- [5] 吴文君.植物化学保护实验技术导论.西安:陕西科学技术出版社, 1988.
- [6] 孟昭礼,罗兰,袁忠林,等.人工模拟杀菌剂绿帝对8种植物病原菌的室内生测. *莱阳农学院学报*, 1998, 15(3): 159-162.
- [7] 孟昭礼,罗兰,袁忠林,等.人工模拟的植物源杀菌剂银泰防治番茄3种病害效果研究. *中国农业科学*, 2002, 35(7): 863-866.
- [8] 于平儒,邵红军,冯俊涛,等.62种植物样品对菌丝活性的测定. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001, 29(6): 65-69.
- [9] 朱学文.地肤的开发利用. *植物学通报*, 1996, 31(4): 47.
- [10] 吴新安,花日茂,岳永德,等.植物源抗菌、杀菌活性物质研究进展. *安徽农业大学学报*, 2002, 29(3): 245-249.