

狼爪瓦松全草粗提物体外抑菌作用研究

任荣¹ 柴军红¹ 金志民¹ 弥春霞¹ 肖杰¹ 熊需海²

(1. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江 157012; 2. 大连理工大学化工学院, 辽宁大连 116012)

摘要 [目的]研究狼爪瓦松(*Orostachys cartilaginosa* A. Bor)全草粗提物体外抑菌作用。[方法]采用液-液萃取法对狼爪瓦松的体积分数为0.75的丙酮提取液的活性成分进行初步分离,制备氯仿、乙酸乙酯、正丁醇及水相萃取物。采用滤纸片法和2倍连续稀释法测定了各相萃取物对4种供试菌的体外抑菌效果。[结果]狼爪瓦松全草体积分数为0.75的丙酮提取液各萃取相对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和普通变形杆菌有不同程度的抑菌活性,其中氯仿萃取相、乙酸乙酯萃取相相对金黄色葡萄球菌显示了较好的抑菌效果,最低抑菌浓度均为1.25 mg/ml。[结论]中药狼爪瓦松全草的抑菌活性成分主要存在于氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相中,为狼爪瓦松抑菌药物的开发提供了理论依据。

关键词 狼爪瓦松(*Orostachys cartilaginosa* A. Bor); 体外抑菌; 滤纸片法; 最低抑菌浓度

中图分类号 S567.23¹9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2011)14-08353-02

Study on Antibacterial Activities of Crude Extracts from the Whole Herb of *Orostachys cartilaginosa* A. Bor in Vitro

REN Rong et al (School of Life Science and Technology, Mudanjiang Teachers' College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract [Objective] To study antibacterial activities of crude extracts from the whole herb of *Orostachys cartilaginosa* A. Bor in vitro. [Method] liquid-liquid extraction technique was applied to isolate active ingredients from 0.75 acetone extracts for preparing chloroform, ethyl acetate, normal butanol and water phases. The antibacterial activities of extraction phases on 4 tested strains in vitro were investigated using the filter paper method and double dilution method. [Result] Extraction phases from 0.75 acetone extracts had antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg), *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris* in varying degrees. Chloroform and ethyl acetate extraction phases were provided with strong antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* with minimal inhibitory concentration at 1.25 mg/ml. [Conclusion] Active ingredients of *Orostachys cartilaginosa* A. Bor plant were mainly existed in chloroform and ethyl acetate phases, which could provide a scientific basis for developing antibacterial agents from *Orostachys cartilaginosa* A. Bor.

Key words *Orostachys cartilaginosa* A. Bor; Antibacterial activities in vitro; Filter paper method; Minimal inhibitory concentration

狼爪瓦松(*Orostachys cartilaginosa* A. Bor)属于景天科(Crassulaceae)瓦松属(*Orostachys*)植物,主要产于山东、内蒙古、辽宁、吉林和黑龙江^[1]。瓦松属植物具有较高的药用价值,有广阔的开发应用前景。临床应用广泛,多用于抗菌、消炎、抗肿瘤、强心等,目前以瓦松为原料开发的瓦松栓已成为治疗宫颈糜烂的常用药物^[2-3]。笔者以狼爪瓦松为材料,采用体积分数为0.75的丙酮水溶液提取,提取液经石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取其中的有效成分并对其抑菌活性进行了研究,以期寻找新的具有抑菌活性的中药资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。狼爪瓦松,采集于牡丹江市镜泊湖熔岩地区,经鉴定为景天科瓦松属植物。

1.1.2 供试菌种。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn)均由牡丹江师范学院生命科学与技术学院微生物学实验室提供。

1.1.3 主要试剂。二甲亚砜(DMSO),由天津市化学试剂一厂生产;头孢氨苄霉素(批号:20100209),由哈药集团三精制药四厂生产;丙酮、氯仿、乙酸乙酯、甲醇和正丁醇等化学试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器。YXQ-LS-50SI型立式压力蒸汽灭菌器,由

上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产;ZH-WY200B型摇床,由上海智城分析仪器制造有限公司生产;DHP-2000型电热恒温培养箱,由天津市华北试验有限公司生产;无菌操作台,由江苏苏州洁净技术研究所生产;SHZ-D(III)型循环水真空泵,由巩义市予华仪器责任有限公司生产;RE-52AA型旋转蒸发器,由上海亚荣生化仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 提取液的制备。将采集的狼爪瓦松全草清洗干净、阴处晒干,粉碎,过筛。准确称取300 g干粉,用体积分数为0.75的丙酮溶液室温下浸提3次(每次600 ml,2 d),合并提取液,减压浓缩至无丙酮味,静置过夜,得浓缩液500 ml,密封保存于4℃冰箱中备用。

1.2.2 活性物质的初步分离。将制备好的提取液依次用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,每种溶剂萃取3次,合并3次萃取液,减压浓缩至蒸干溶剂,分别获得石油醚萃取相(A₀)、氯仿萃取相(A₁)、乙酸乙酯萃取相(A₂)、正丁醇萃取相(A₃)和水萃取相(A₄)。其中氯仿相5 g用10 g粗硅胶(80~100目)拌样,200 g硅胶(100~200目)进行硅胶柱层析。以氯仿-甲醇(1:0、10:1、7:3、5:5、0:1)为流动相进行梯度洗脱,TLC监测合并相同馏分,得到5个极性段A₁₁~A₁₅段。A₁₁~A₁₃做了抑菌试验,A₁₄、A₁₅由于质量太少未做进一步研究。

1.2.3 样品的制备。称取适量的A₁、A₂、A₁₁~A₁₃,溶于DMSO中配制成10 mg/ml的溶液。称取适量的A₃和A₄,溶于DMSO中配制成100 mg/ml的溶液。头孢氨苄霉素(T)配制成10 mg/ml作为阳性对照。每种样品经微孔滤膜(孔径0.22 μm)过滤灭菌后待用。A₀萃取物质量太少,因此未被选用。

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551514);牡丹江师范学院教学改革工程项目(10-XY01038)。

作者简介 任荣(1982-),女,河南安阳人,助教,硕士,从事天然药物化学的科研和教学工作,E-mail: swxr1@126.com。

收稿日期 2011-02-21

1.2.4 培养基的配制。LB 固体和液体培养基均为常规配制^[4]。

1.2.5 菌液的制备。在无菌室中将供试菌种移接入相对应的试管斜面培养基上,进行活化,细菌置于 37 °C 培养箱中培养 24 h,用无菌水配制成 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/ml 的菌液。

1.2.6 体外抑菌试验(滤纸片法)^[5]。在每种待测样品中浸入直径为 10 mm 无菌滤纸片,充分浸泡后取出,晾干。将灭菌后的固体培养基倒入无菌培养皿中,每皿 20 ml 左右。待冷却凝固后,加入制备好的菌悬液各 0.1 ml,用涂布棒将菌液涂布均匀,制成含菌平板,然后取含样品液的滤纸片贴在平板上,每皿贴 3 片,每个菌种做 3 次平行,另每个菌种以 DMSO 浸泡的滤纸片做空白对照。10 min 后倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,测定滤纸片的抑菌圈直径,比较抑菌效果。

1.2.7 最低抑菌浓度(MIC)的测定^[6]。以 A₁ 为例,在无菌条件下将灭菌试管分成 4 组,每组 9 支。向每组的第 1 支试管中加入 2 ml 2 倍浓度的 LB 液体培养基,第 2~7 支试管中各加入 2 ml LB 液体培养基;向每组的第 1 支试管中加入 2 ml A₁ 样品液后按二倍稀释法使各管药液浓度分别为 5.00、2.50、1.25、0.63、0.31、0.16 和 0.078 mg/ml,第 8 支试管中加入 2 ml LB 液体培养基作为阳性对照,然后向各管中加入 0.1 ml 的菌液,第 9 支试管中加入提取液但不加菌悬液作为阴性对照,于 37 °C 培养 24 h,观察抑菌效果。试验重复 3 次。以无菌生长的最低样品液浓度作为最低抑菌浓度(MIC)。对不宜判定有无细菌生长者,在营养琼脂平板上划线接种,37 °C 恒温培养 24 h 后取出,以完全无细菌生长的平板所对应的样品液浓度作为此样品液对该菌株的最小抑菌浓度(MIC),其余样品操作方法如 A₁。

2 结果与分析

2.1 滤纸片法测定狼爪瓦松粗提物的抑菌作用 按照“1.2.6”操作,结果见表 1~2。从表 1~2 可知,各提取液对变形杆菌抑菌作用较小。各萃取相对金黄色葡萄球菌、枯草

杆菌、大肠杆菌均具有一定的抑菌作用,但 A₄ 与 A₃ 的抑菌作用明显弱于其他萃取相。A₂ 对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌及大肠杆菌的抑菌作用较 A₁ 及 A₁₁~A₁₃ 相的抑菌作用稍强,且 A₁₃ > A₁₂ > A₁₁。各萃取相对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌的抑菌效果基本相当且 > 大肠杆菌 > 变形杆菌。总之,不同的萃取相对同一种供试菌有不同的抑菌效果,同一种萃取相对不同供试菌的抑菌效果也不尽相同。

表 1 狼爪瓦松氯仿相和乙酸乙酯相滤纸片法的抑菌效果

Table 1 Antibacterial activity of chloroform and ethyl acetate phases from *Orostachys cartilaginosa* A. Bor by filter paper method

供试菌种 Tested strains	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone					
	A ₁	A ₂	A ₁₁	A ₁₂	A ₁₃	T
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	13.7	15.5	12.8	13.0	15.7	25.6
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	12.5	14.2	12.4	12.5	13.4	20.2
变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	11.8	12.0	11.8	-	11.6	-
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	13.3	15.6	12.7	13.5	14.5	15.8

注“-”没有抑菌活性;样品液浓度为 10 mg/ml。

Noté“-”represented no inhibitory effect; concentration of sample solution was 10 mg/ml.

表 2 狼爪瓦松正丁醇相和水相滤纸片法的抑菌效果

Table 2 Antibacterial activity of normal butanol and water phases from *Orostachys cartilaginosa* A. Bor by filter paper method

供试菌种 Tested strains	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	
	A ₃	A ₄
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	11.5	11.3
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	13.0	12.4
变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	-	-
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	11.8	11.1

注“-”没有抑菌活性;样品液浓度为 100 mg/ml。

Noté“-”represented no inhibitory effect; concentration of sample solution was 100 mg/ml.

表 3 狼爪瓦松粗提物对供试菌的最小抑菌浓度

Table 3 MIC of crude extracts from *Orostachys cartilaginosa* A. Bor against tested strains

萃取相 Extraction phases	MIC//mg/ml			
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn
A ₁	1.25	2.50	5.00	2.50
A ₂	1.25	1.25	5.00	1.25
A ₃	50.00	50.00	-	50.00
A ₄	50.00	50.00	-	-
A ₁₁	2.50	2.50	5.00	2.50
A ₁₂	2.50	5.00	-	2.50
A ₁₃	1.25	2.50	5.00	2.50
阳性 Positive	-	-	-	-
阴性 Negative	+	+	+	+
T	0.16	0.31	-	1.25

注“-”没有抑菌活性“+”无菌生长。

Noté“-”presented no inhibitory effect“+”presented no bacterial growth.

2.2 狼爪瓦松全草各萃取相对供试菌的最低抑菌浓度 由表 3 可知,狼爪瓦松粗提物的各溶剂萃取相(A₁~A₄、A₁₁~

A₁₃) 在试验质量浓度范围内对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌

(下转第 8356 页)

五味子酯甲峰面积积分值并计算含量,其RSD分别为1.32%、1.54%、1.28%。

表1 线性回归方程及线性范围

样品 Sample	线性范围/ mg/L Linearity range	线性回 归方程 Linear regre- ssion equation	检出限 μg/L Detection limit	R ²
五味子酯甲 Deoxyschizandrin	0~120.4	$Y=14.687X-33.725$	0.204	0.998 6
五味子甲素 Schisandrin A	0~156.0	$Y=23.161X-102.957$	0.202	0.994 6
五味子乙素 Schisantherin B	0~138.0	$Y=14.552X-68.431$	0.338	0.994 7

2.5 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、6、8、10 h进样,测定五味子甲素、五味子乙素以及五味子酯甲峰面积积分值,其RSD分别为1.25%、1.16%、1.35%。结果表明,供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.6 加标回收率计算 取已知量的五味子木脂素10.0 mg,加10.0 ml 甲醇,超声溶解并用0.45 μm 微孔滤膜过滤,加入一定量的对照品,测定相应对照品的峰面积,以得到加标回收率。得到五味子甲素、五味子乙素以及五味子酯甲的平均回收率($n=3$)分别为98.5%、99.4%和99.43%。相应的

(上接第8354页)

均有一定的抑制作用,其中A₁、A₂及A₁₃对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强,其MIC为1.25 mg/ml, A₂对大肠杆菌的抑菌作用最强,其MIC也为1.25 mg/ml, A₃和A₄对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌作用最弱,其MIC均为50.00 mg/ml。此外, A₃、A₄、A₁₂对变形杆菌不具抑菌作用, A₁、A₂、A₁₁、A₁₃对变形杆菌的抑菌作用较弱,其MIC均为50.00 mg/ml。A₂对枯草杆菌的抑菌作用最强,其MIC为1.25 mg/ml,其次为A₁、A₁₁~A₁₃,其MIC为2.50 mg/ml, A₃对枯草杆菌的抑菌作用最弱,其MIC为50 mg/ml, A₄对枯草杆菌不具抑菌效果。总体上, A₁、A₂及A₁₁~A₁₃对供试菌的抑菌效果要强于A₃和A₄。

3 结论与讨论

试验结果发现,从狼爪瓦松体积分数为0.75的丙酮提取液中萃取出的乙酸乙酯相(A₂)和氯仿相(A₁)对金黄色葡萄球菌显示了较好的抑菌效果,对枯草杆菌也表现出了一定的抑制活性。此外,狼爪瓦松对大肠杆菌的抑制作用主要表现在其中等强度的极性部位乙酸乙酯萃取相。狼爪瓦松的粗提物对变形杆菌的抑制作用最弱,可能是由于量较低,在该试验的质量浓度范围内尚不足以较好的抑制变形杆菌增殖。

近年来,由于抗生素的不合理使用,引起菌群失调、菌种变异、产生耐药性等一系列棘手问题。寻找和研制具有抗菌活性的新型抗菌药物成为当今世界迫切需要解决的问题。中草药是我国具有悠久历史的并被证明非常行之有效的医

RSD为1.10%、1.43%和1.68%。

2.7 供试品含量测定 取供试品北五味子木脂素10.3 mg,溶于加甲醇并定溶到10 ml,超声溶解,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,在甲醇:水为70%:30%流速1 ml/min,波长254 nm 色谱条件下进样50 μl;测定其含量($n=3$)分别为五味子甲素1.14 mg/g,五味子乙素2.55 mg/g,五味子酯甲3.26 mg/g。

3 结论

高效液相色谱法因其分析效果好,分离效率高,因此常用来进行北五味子木脂素的分析。该研究利用高效液相色谱法建立了测定北五味子中主要木脂素成分(五味子甲素、五味子乙素和五味子酯甲)的分析方法。结果表明,该方法操作简单,灵敏快速,样品中各组分的分离效果好,灵敏度高,为北五味子的成分以及药理活性提供了更丰富的数据支持。

参考文献

- [1] 饶君凤, 占小璐. 高效液相色谱法测定3种不同产地五味子中五味子醇甲含量[J]. 时珍国医国药 2008, 19(9): 2441-2442.
- [2] 杨博, 陈彤, 李学龙, 等. 高效液相色谱法测定南、北五味子中木脂素含量[J]. 大连工业大学学报 2009, 28(2): 102-106.
- [3] 李承鸿, 李振华, 张璐, 等. 五味子中营养元素的含量分析[J]. 湖北农业科学 2010, 49(6): 1456-1457.
- [4] 沙美, 史道夫, 欧阳强. 高效液相色谱法测定护肝胶囊中五味子醇甲的含量[J]. 时珍国医国药 2007, 18(7): 1671-1672.
- [5] 杨孝容, 向清祥, 刘静. 三种五味子荧光性质[J]. 理化检验-化学分册 2008, 44(8): 778-781.

药,深入开发研究中草药活性成分具有重大现实意义^[7-8]。该研究对牡丹江镜泊湖火山熔岩地区的狼爪瓦松植物进行了探索研究,初步揭示了狼爪瓦松的有效抑菌部位。这为今后对其抑菌活性成分的进一步分离与分析奠定了基础,对筛选天然药物,促进中药现代化,合理开发和利用植物资源有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 41-43.
- [2] 温学森, 任正伟, 王子伟. 瓦松药用历史及存在问题[J]. 中药材 2008, 31(1): 158-161.
- [3] 郑万金, 张萍, 仲英. 瓦松属植物的研究进展[J]. 齐鲁药事 2008, 27(3): 161-163.
- [4] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社 2004: 6-8.
- [5] 段江莲, 徐建国. 桑椹红色素抑菌作用的研究[J]. 食品科学 2007, 28(10): 87-89.
- [6] 李芳. 复方芸香片的体外抑菌作用实验研究[J]. 时珍国医国药 2001, 12(11): 971-972.
- [7] 李春正, 苏艳芳, 靳先军. 牡荆属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药 2005, 36(6): 930-938.
- [8] 王明奎, 梁健, 彭树林, 等. 白叶莓根部化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(4): 295-297.
- [9] 胡永金, 乔金玲, 朱仁俊, 等. 紫草与大青叶提取物体外抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学 2010, 38(9): 4565-4567.
- [10] 曹翠萍, 宁海强, 孙丽, 等. 中药对大肠杆菌抑制作用及耐药性诱导作用的研究[J]. 西南农业学报 2007(5): 1101-1104.
- [11] 吕平, 黄强. 苦丁茶不同提取物的体外抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学 2009, 37(34): 16838-16840.
- [12] 何永明, 王敏儒, 杨鸿, 等. 银翘解毒颗粒防治鸭实验性大肠杆菌病的药效试验[J]. 安徽农业科学 2009, 37(34): 1051-1052.