

醉马草提取物的抑菌特性研究

张伟^{1,2}, 李冠¹, 田聪¹

(1. 新疆大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆农科院微生物所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 用95%食用乙醇采用回流浸煮法提取醉马草各成分, 提取物分为总生物碱和非生物碱两部分, 总生物碱部分按极性大小又分4个部分。以此为供试液对大肠杆菌等6个菌种做抑菌谱、不同pH值下抑菌活性的变化和提取物热稳定性等实验。结果表明供试液对供试菌均有不同程度的抑制作用, 得到的各供试液的最低抑菌浓度(MIC), 提取物热稳定性比较好, 各供试液不同pH值下的抑菌活性发生一定的变化。

关键词: 醉马草; 提取物; 抑菌实验

Study on Antimicrobial Activity of *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng Extracts

ZHANG Wei^{1,2}, LI Guan^{1,*}, TIAN Cong¹

(1. College of Life Science, Xinjiang University, Wulumuqi 830046, China

2. Institute of Microorganism, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830000, China)

Abstract: The extracts from *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng with 95% edible-ethanol were used as antimicrobial agents in this paper. Six species of bacteria including *Echerichia coli* etc were taken as test-bacteria. The results showed that the extracts from *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng have the best antibacterial effect on the tested six bacteria. With the six species of the bacteria, the antibacterial effects are obtained for the minimal inhibitory concentration (MIC) and the antibacterial effects (the diameter of the antibacterial circle) of the five materials from *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng.

Key words *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng extracts; anti-bacteria

中图分类号: Q949.714.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0092-03

醉马草 [*Achnatherum inebrians* (Hance) Keng.]

别名有醉马茛、毒草等, 为茛草属 (*Achnatherum* Beauv.) 禾本科多年生草本植物。醉马草原产于欧亚, 广泛分布于我国西北地区。醉马草多生于高山及亚高山草原、山坡草地、田边、路旁、河滩, 海拔1700~4200m^[1]。它是哈萨克医常用的药材, 具有消肿止痛、清热解毒等功效, 对于腮腺炎和关节炎的治疗有很好的效果。由于其具有抗高寒、耐干旱等优势, 因而分布广、适应性强, 尤其是近些年来由于过度放牧造成草场退化, 而醉马草乘机蔓延, 成为畜牧业一大危害, 其毒性可能是由于内生真菌引起的^[2]。据调查, 在新疆维吾尔自治区, 醉马草广泛分布于天山南北, 覆盖度最高可达85%^[3]。醉马草已是我国北方尤其是西北草原上主要毒草之一。本文的目的在于调查研究醉马草各成分的抑菌特性, 希望能为这一资源的开发利用提供理论依据^[4]。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、材料

LABOROTA4000 型旋转蒸发仪 海道夫公司; 培养箱、天平等 国产。

95%乙醇(食用级) 国产; 石油醚(30~60℃)、氯仿、硫酸、氨水、正丁醇等(均为AR级) 国产; 732强酸性树脂 上海汇脂树脂厂。

醉马草采自新疆乌鲁木齐县天山北坡, 由新疆农业大学林学院周贵玲老师鉴定。供试用大肠杆菌 (*Echerichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、酵母、青霉 (*Penicillium* sp)、黑曲霉 (*Aspergillus* sp) 等6种菌种均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 供试液的制备^[5]

取醉马草干粉500g采用回流浸煮法, 样品分三次按1:4、1:3、1:3的样重与95%食用乙醇(质量体积比),

收稿日期: 2006-04-29

*通讯作者

作者简介: 张伟(1973-), 男, 硕士研究生, 主要从事分子生物学与植物化学研究。

于65℃回流煮沸3h的方法处理。每次浸煮完后抽滤浸煮液,合并3次抽滤出的浸液于65℃水浴旋转浓缩成浸膏,用0.5%的硫酸多次少量溶解抽滤。将滤过液反复缓慢通过提前处理好的732型强酸性阳离子树脂,直到流出液检测不到生物碱,此流出液即是醉马草非生物碱部分。然后用pH值为10的蒸馏水(氨水调)反复缓慢流过装有吸附有生物碱的732型树脂柱,回收所得流出液就是醉马草总生物碱,适当浓缩后依次用等体积石油醚、氯仿、正丁醇反复多次萃取,所得物质既是醉马草不同极性的生物碱。以上五种供试液于65℃水浴旋转浓缩成浸膏后,称重并用适当溶剂(非碱部位、生物碱的水和正丁醇部位用水溶,生物碱的氯仿、石油醚部位就用乙醇、石油醚溶)溶解配制成pH7的100mg/ml溶液备用。

1.2.2 供试菌和供试菌培养皿的准备

将滤纸片、镊子、装有蒸馏水的试管、培养皿等提前灭菌处理备用,固体培养基灭菌后倒好。细菌用LB培养基,霉菌用察氏培养基^[6],酵母菌用麦氏琼脂培养基^[6]。将供试的各种菌种进行液体和斜面两次复壮活化,取一定量已活化的供试菌于装有无菌水的试管中,制成适当浓度菌悬液,霉菌做成孢子悬液(约 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml,可以用显微镜直接记数法测菌体个数或分光光度法测OD值)。将每种菌悬液200μl分别用移液枪加入制备好的培养皿中,并用刮铲涂匀。细菌培养皿置于37℃培养箱培养3h,霉菌和酵母培养皿置于28℃培养箱培养5h后用做以下实验。

1.2.3 抑菌谱的确定

琼脂扩散纸片法^[6]。用镊子夹取滤纸片(直径7mm)在待测液中浸湿,吸去多余的液体在无菌操作台里晾干备用。用镊子夹取晾干的滤纸片顺次放在含菌平板上,每平板中待测液滤纸片各一片,无待测液的滤纸片做空白对照。细菌于37℃温箱培养过夜,霉菌和酵母置于28℃温箱培养过夜(以下的培养方法与此都相同),每一实验重复4次,观察结果。

1.2.4 抑菌活性的pH范围和热稳定性的实验

用氨水和盐酸把100mg/ml的各待测液分别调制成6、6.5、7、7.5、8的五个pH梯度,然后处理和培养方法与1.2.3相同,观察比较不同pH下抑菌圈和pH为7的抑菌圈的变化,大于pH为7的抑菌圈视为抑菌活性增强,小于pH为7的抑菌圈视为抑菌活性减弱。每一实验重复3次;将各测试液的100mg/ml的待测液分为3部分,并分别置于65℃、80℃水浴和100℃湿热条件下处理,处理后的待测液用来做抑菌活性变化的实验,方法与1.2.3节相同,并用pH为7的未加热处理的待测液做对照,培养后观察比较其抑菌效果。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)测定^[7]

采用牛津杯法。取试管数支,以无菌水将待测液进行一系列对倍稀释,浓度分别为100、50、25、12.5、6.25mg/ml,同时以乙醇做阳性对照。在各皿中均匀摆放6只牛津杯并编号后加入对映的稀释好的待测液50μl。培养后卡尺测量抑菌圈,每一实验重复3次,并计算平均值。

2 结果与分析

非生物碱部分对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌、青霉、黑曲霉都有抑菌活性。生物碱的水溶部分和正丁醇部分对以上6种菌都有抑菌活性。生物碱的氯仿和石油醚部分仅对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌有抑菌活性。

表1 不同pH下醉马草乙醇提取物抑菌圈的变化
Table 1 Changes of *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng alcohol extracts' inhibition diameter at different pH values

菌名	测试液	pH值				
		6	6.5	7	7.5	8
		抑菌圈的变化				
大肠杆菌	I	+	+	0	-	-
	II	-	-	0	0	-
	III	-	-	0	0	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
枯草杆菌	I	+	0	0	-	-
	II	-	0	0	0	-
	III	-	-	0	0	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	I	+	0	0	-	-
	II	-	0	0	0	-
	III	-	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
酵母菌	I	+	+	0	0	-
	II	-	0	0	-	-
	III	-	0	0	0	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
青霉	I	-	-	0	0	+
	II	+	+	0	-	-
	III	+	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
黑曲霉	I	-	-	0	0	+
	II	+	+	0	-	-
	III	+	0	0	-	-
	IV	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0

注: I 为非生物碱成分, II 为生物碱水溶成分, III 为生物碱正丁醇成分, IV 为生物碱的氯仿成分, V 为生物碱石油醚成分。+ 为抑菌圈增大, - 为抑菌圈减小, 0 为无变化。

通过醉马草提取物的热稳定性实验发现,提取物的各个部分处理完后抑菌效果并无明显变化,可能的原因是起到抑菌活性的物质对热不敏感,或者提取方法本来就是加热回流法,再加热后对其抑菌活性影响变化不大。但是待测液的 pH 改变却使大部分待试液的抑菌能力发生了变化。其中非生物碱部位在酸性条件下对大肠

杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌的抑菌活性都增强,对青霉、黑曲霉的抑菌活性都减弱,可能的原因是在酸性条件下提取物中的物质溶解释放发挥了抑菌活性,但这些物质对真菌不敏感。生物碱部位无论在酸性条件下还是在碱性条件下对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌的抑菌活性都无明显效果,其中的变化都集中在 pH 6 或 8 时,变化可能是由 pH 值本身引起的。生物碱部位在酸性条件下对青霉、黑曲霉都有抑菌活性,可能是其中的生物碱对真菌有抑菌活性。具体结果见表 1。

醉马草各成分对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌、青霉、黑曲霉等菌的抑菌活性和 MIC 测定结果见表 2。研究表明:醉马草粗提物的活性成分对热具有良好的稳定性,这对于以后的提取分离具有重要的意义,对提取物的长期贮存及实际应用也十分有利;醉马草的乙醇提取物抑菌活性较为复杂,起码受到两个方面的影响,即受试菌种的敏感性和提取物的不同极性部位;醉马草粗提物的抗菌谱广,对球菌、杆菌、霉菌等革兰氏阳性和阴性都有抑菌活性。我们的研究和相关的资料表明,醉马草当中含有水溶性生物碱和黄酮等多种成分,其中的生物碱是醉马草的有毒物质(这是我们把生物碱部分作为主要抑菌材料的原因),并且这些成分的含量会随着醉马草的生长有很大的变化。天然产物活性功能的机理很复杂,和其分子的结构有很大关系,因此醉马草中主要成分的分子结构和功能还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 史志诚. 中国草地重要有毒植物[M]. 北京: 中国农业出版社, 1987: 166-176.
- [2] BACON C W. Toxic endophyte-infected tall fescue and renege grasses: historic perspectives[J]. J Anim Sci, 1995, 73: 861-870.
- [3] 于振田. 醉马草的防治及开发利用[J]. 新疆畜牧业, 1993(4): 20-23.
- [4] 李云森, 陈子君, 王峥涛. 从有毒植物中开发新药的探讨[J]. 中草药, 2002, 33(5): 476-477.
- [5] 车宗铃, 维达里 G, 薇达菲因茨 P. 竹荪中弱极性 & 非极性有机物的提取、分离和鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(4): 51-56.
- [6] 郑钧镛, 王光宝. 药品微生物学及检测技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [7] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.

表 2 醉马草各成分对各测试菌的抑菌活性和 MIC 测定
Table 2 Antimicrobial activity and MIC of extraction from *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng against test-bacterium

菌名	测试液	提取物的浓度 (ng/ml)				
		100	50	25	12.5	6.25
		抑菌活性				
大肠杆菌	I	+	+	+	—	—
	Ⅱ	+	+	+	+	+
	Ⅲ	+	+	+	+	—
	Ⅳ	+	+	—	—	—
	Ⅴ	+	—	—	—	—
枯草杆菌	I	+	+	+	+	—
	Ⅱ	+	+	+	—	—
	Ⅲ	+	+	+	—	—
	Ⅳ	+	—	—	—	—
	Ⅴ	+	—	—	—	—
金黄色葡萄球菌	I	+	+	+	+	—
	Ⅱ	+	+	+	+	—
	Ⅲ	+	+	+	+	—
	Ⅳ	+	—	—	—	—
	Ⅴ	+	—	—	—	—
酵母菌	I	+	+	+	—	—
	Ⅱ	+	+	+	—	—
	Ⅲ	+	+	—	—	—
	Ⅳ	—	—	—	—	—
	Ⅴ	—	—	—	—	—
青霉	I	+	+	—	—	—
	Ⅱ	+	+	—	—	—
	Ⅲ	+	—	—	—	—
	Ⅳ	—	—	—	—	—
	Ⅴ	—	—	—	—	—
黑曲霉	I	+	+	—	—	—
	Ⅱ	+	+	—	—	—
	Ⅲ	+	—	—	—	—
	Ⅳ	—	—	—	—	—
	Ⅴ	—	—	—	—	—

注: I 为非生物碱成分, II 为生物碱水溶成分, III 为生物碱正丁醇成分, IV 为生物碱的氯仿成分, V 为生物碱石油醚成分。+ 为有抑菌活性, - 为无抑菌活性。

中国生物学文献数据库收录期刊