

周雍,王伟,魏磊,等. 苍耳子不同萃取相的抗菌及杀蚜活性[J]. 江苏农业科学,2019,47(21):165-167.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.038

苍耳子不同萃取相的抗菌及杀蚜活性

周雍,王伟,魏磊,景炳年,刘雨晴,王荣恒,马艳妮

(河南省科学院天然产物重点实验室/河南省生物技术开发中心,河南郑州 450002)

摘要:旨在研究苍耳子不同萃取相的体外抑菌活性和杀虫活性,并采用倍半稀释法测定苍耳子不同萃取相对9种常见菌的抑制作用,采用浸虫浸叶法测定不同萃取相对绣线菊蚜的毒杀作用。结果显示,乙酸乙酯萃取相的抑菌效果明显,最小抑菌浓度(MIC)均为3.91 mg/mL,对鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌的最小杀菌浓度(MBC)为31.25 mg/mL;石油醚、乙酸乙酯萃取相对绣线菊蚜有较好的毒杀作用,其24 h时的 LC_{50} 分别为2.368、2.524 mg/mL,48 h时的 LC_{50} 分别为1.743、1.774 mg/mL。由结果可知,苍耳子的有效抑菌杀虫活性集中在中低极性段。

关键词:苍耳子;抑菌作用;杀虫作用;萃取相;蚜虫

中图分类号:S482.2⁺92;S482.3⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)21-0165-03

苍耳子为菊科植物苍耳(*Xanthium sibiricum*)干燥成熟带总苞的果实,又名苍耳、老苍子、苍子、苍刺头、毛苍子、痴头、猛、羊带归等^[1]。苍耳子是一种常用的中药,其性温,味辛、苦,归肺、肝经,有小毒,具有散风除湿、通鼻窍之功效^[2],在《千金·食治》和《中华人民共和国药典》各版中都有记载。在临床上,苍耳子常用以治疗腰腿痛、变态反应性鼻炎、慢性鼻炎、疟疾、腮腺炎、下肢溃疡和泌尿系统感染等^[3]。

苍耳子作为传统中药,关于其药用价值的研究已经非常深入。目前的研究已证实,苍耳对多种植物病原菌具有强烈的抑制作用,刘林等研究表明,苍耳全株的不同溶剂提取物对病原菌菌丝生长的作用效果有差异^[4],同时有研究证明,苍耳子煎剂在体外对铜绿假单胞菌、炭疽杆菌、肺炎球菌、乙型链球菌和白喉杆菌等多种微生物也具有较强的抑制作用^[5-6]。但是,关于苍耳子不同萃取相对菊蚜的杀虫效果仍未见报道。众所周知,农药在病虫害综合防治中起着重要作用,对病虫害物高效、安全性高的生物性农药,成为当今新型农药的发展方向,特别是植物源杀虫剂的研究已经成为生物农药的研究热点^[7-8]。

苍耳子提取物中的有效成分是天然的,符合现代抑菌杀虫的新型农药的健康理念和要求,也满足人们日益增长的食品安全需求,有很大的开发价值和广阔的市场前景。本研究分析了苍耳子不同萃取相对9种致病菌的抑制作用和对绣线菊蚜的毒杀作用,旨在为进一步研究开发苍耳子作为抑菌、杀虫药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药物 苍耳子于2017年采自河南南召,由河南中医药大学药学专家董诚明教授鉴定为菊科苍耳属植物苍耳的干燥成熟带总苞的果实,将其置于50℃恒温干燥箱内烘干,粉碎过40目筛备用。阳性对照药物为银黄颗粒,购自成都神鹤药业有限责任公司。

1.1.2 供试菌株和虫体 标准菌株鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311、肺炎链球菌 ATCC 49619、大肠杆菌 ATCC 25922、化脓性链球菌 ATCC 19615、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,均购自南京便诊生物科技有限公司。

临床菌株鸡大肠杆菌 CVCC 1555、鸡金黄色葡萄球菌 CVCC 548、鸡白痢沙门氏菌 CVCC 1887、牛无乳链球菌 CVCC 540,均购自中国兽医药品监察所。绣线菊蚜采集自河南省开封市菊花培育基地。

1.1.3 主要试验试剂与仪器 胰蛋白胨,美国 Oxoid 公司;牛肉浸膏,北京双旋微生物培养基制品厂;葡萄糖、NaCl,上海华彭实业有限公司;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;ME204型分析天平,美国 Mettler;LDZX-50型高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;MJX-100B-Z型恒温培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;KYC-100B型恒温培养摇床,上海福玛实验设备有限公司;YJ-VS-2 无菌操作台,无锡一净化设备有限公司;wi93008型麦氏比浊仪,东西仪北京科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 苍耳子不同萃取相的制备 准确称量300 g苍耳子粗粉,用95%乙醇回流提取3次,每次1 h,料液比分别为1 g:10 mL、1 g:8 mL、1 g:8 mL,趁热抽滤,将滤液浓缩至无醇味,用水稀释至800 mL,依次用石油醚(300 mL×3次)、乙酸乙酯(300 mL×3次)、正丁醇(300 mL×3次)萃取,浓缩各有机相及水相,分别标记为A相、B相、C相、D相。

1.2.2 抗菌试验

1.2.2.1 细菌复苏及菌悬液的制备 将9种供试细菌先进

收稿日期:2019-05-17

基金项目:河南省科学院基本科研项目(编号:190613035、190413008、190613034)。

作者简介:周雍(1990—),女,河南周口人,硕士,研究实习员,主要从事天然产物的功能活性研究。Tel:(0371)65353099;E-mail:1483724982@qq.com。

通信作者:马艳妮,博士,助理研究员,主要从事天然产物化学研究。Tel:(0371)55935563;E-mail:ni-2003@163.com。

行斜面复苏,然后接种于固体培养基上,37℃恒温培养16~18 h。从固体培养基上挑取明显的单菌落接种到液体培养基中,再培养24 h,然后将该菌液用液体培养基稀释成浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL的菌悬液,备用。

1.2.2.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用倍半稀释法^[9-11]测定各样品的最小抑菌浓度。首先将各样品与阳性药物银黄颗粒配制成初始质量浓度为500 mg/mL的水溶液,即样品原液。再用液体培养基依次对配好的样品、阳性药物进行倍半稀释,一共稀释为7个浓度,即浓度依次为250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91 mg/mL。将稀释液按浓度大小依次加入96孔板中,每孔100 μL,然后分别加入各供试菌液100 μL。对每种菌液分别设置阴性对照组(100 μL菌液+100 μL液体培养基)和空白对照组(只加100 μL液体培养基)。将制备好的96孔板放入37℃恒温培养箱中培养16~18 h,观察结果。各测试组中明显澄清的孔所对应的最小检测质量浓度即为该组的MIC。

1.2.2.3 最小杀菌浓度(MBC)的测定 MIC试验结束后,分别从各澄清孔取少量液体,用平板划线法在固体培养基上划线,于37℃恒温培养24 h后观察结果。完全无细菌生长的各平板所对应的最小检测质量浓度即为其最小杀菌浓度。

1.2.3 杀虫活性的测定 绣线菊蚜毒力试验采用浸虫浸液法^[12]。将各待测样品用5%二甲亚砜(DMSO)+0.5%吐温-80水溶液溶解配制10 mg/mL浓度的初筛浓度,将带有蚜虫的菊叶采下,用毛笔仔细剔除不合要求的个体,将其浸入待测样品溶液中,5 s后取出并用滤纸吸除多余药液,然后置于加盖保湿培养皿中,在室内20~25℃下培养,光—暗周期为12 h—12 h,分别于24、48 h记录活虫数,每个浓度重复处理3次,以5% DMSO+0.5%吐温-80水溶液处理作对照。再根据初筛结果设置浓度梯度进行检测,按照下列公式计算:

$$\text{死亡率} = \text{死虫数} / \text{总虫数} \times 100\%$$

校正死亡率 = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) × 100%。

1.3 数据处理

用SPSS 17.0方差分析程序对试验数据进行统计分析,用Finney概率分析法求得毒力回归方程和LC₅₀。

2 结果与分析

2.1 苍耳子不同萃取相的得率

苍耳子用95%乙醇回流提取、浓缩后加水稀释,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取后,得到不同极性的A相、B相、C相、D相,结果见表1,其中D相(水相)得率最高,其次是A相,B相的得率最低。

表1 苍耳子不同萃取相的质量与得率

组别	萃取相质量(g)	得率(%)
A相	4.4	1.8
B相	1.4	0.6
C相	3.4	1.4
D相	7.7	3.1

注:得率是以原药材为基数计算的。

2.2 苍耳子不同溶剂萃取相对9种供试菌的MIC

采用倍半稀释法测定不同溶剂萃取相对9种供试菌的最小抑菌浓度,从表2可以看出,B相、C相、D相这3个萃取相都有抑菌性,而且B相、C相的抑菌效果比阳性对照组银黄颗粒好。其中,B相的抑菌效果最为明显,对于9种供试菌的MIC均为3.91 mg/mL;C相对金黄色葡萄球菌、鸡大肠杆菌、鸡金黄色葡萄球菌、牛无乳链球菌这4种菌的效果较好,MIC均为15.63 mg/mL,对于其他5种菌的MIC均为31.25 mg/mL;D相对大肠杆菌、鸡金黄色葡萄球菌的抑菌效果较差,对于其他7种菌的MIC均为62.5 mg/mL。

表2 待测样品对9种供试菌MIC的测定结果

组别	标准菌 MIC(mg/mL)				临床菌 MIC(mg/mL)				
	鼠伤寒沙门氏菌	肺炎链球菌	大肠杆菌	化脓性链球菌	金黄色葡萄球菌	鸡大肠杆菌	鸡金黄色葡萄球菌	鸡白痢沙门氏菌	牛无乳链球菌
A相	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B相	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91
C相	31.25	31.25	31.25	31.25	15.63	15.63	15.63	31.25	15.63
D相	62.50	62.50	125.00	62.50	62.50	62.50	125.00	62.50	62.50
银黄颗粒	125.00	62.50	125.00	125.00	62.50	62.50	62.50	125.00	125.00

注:“—”表示因试验组较浑浊,无法判断其MIC值。

2.3 苍耳子不同溶剂萃取相对9种供试菌的MBC

从表3可以看出,B相、C相这2个萃取相都有杀菌活性,而且普遍比阳性对照组银黄颗粒的杀菌效果好。通过对比发现,B相对鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌的杀菌效果最强,MBC为31.25 mg/mL,对其他7种菌的MBC为62.50 mg/mL;C相对鸡金黄色葡萄球菌的杀菌效果最好,MBC为31.25 mg/mL,对于金黄色葡萄球菌、鸡大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌、牛无乳链球菌的MBC为62.50 mg/mL,说明C相对禽畜病原菌具有较好的杀灭效果。

2.4 苍耳子不同溶剂萃取相对绣线菊蚜的杀虫活性测试结果

由表4可以看出,浓度为10 mg/mL的各组样品处理24 h后,A相、B相对绣线菊蚜的杀虫率(校正死亡率)分别为91.96%、89.47%,处理48 h后的杀虫率分别为94.39%、95.82%。C相、D相的杀虫率均低于50%,作用效果不明显。针对效果好的A相、B相进一步进行毒力测试,浓度梯度分别为10、8、6、4、2 mg/mL。由表5可以看出,A相24、48 h的半数致死浓度(LC₅₀)分别为2.368、1.743 mg/mL,B萃取相24、

表3 各待测样品对9种供试菌MBC的测定结果

组别	标准菌 MBC(mg/mL)					临床菌 MBC(mg/mL)			
	鼠伤寒沙门氏菌	肺炎链球菌	大肠杆菌	化脓性链球菌	金黄色葡萄球菌	鸡大肠杆菌	鸡金黄色葡萄球菌	鸡白痢沙门氏菌	牛无乳链球菌
A相	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
B相	31.25	62.50	31.25	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50
C相	125.00	125.00	125.00	125.00	62.50	62.50	31.25	62.50	62.50
D相	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	250.00	250.00	>250.00	>250.00
银黄颗粒	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00	>250.00

表4 苍耳子不同萃取相的杀虫活性

组别	24 h 死亡率(%)		48 h 死亡率(%)	
	死亡率	校正死亡率	死亡率	校正死亡率
对照	2.00	—	2.00	—
A相	92.12	91.96	94.50	94.39
B相	89.68	89.47	95.90	95.82
C相	43.29	42.13	47.96	46.90
D相	5.00	3.06	7.00	5.10

48 h 的 LC_{50} 分别为 2.524、1.774 mg/mL, 这说明苍耳子石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相对绣线菊蚜有明显的毒杀活性。

3 讨论与结论

本研究表明, 苍耳子具有较好的杀菌作用, 且广谱抗菌性强, 其中, 乙酸乙酯萃取部位对 5 种待测标准菌和 4 种畜禽病原菌的杀菌效果最好, 这也为苍耳子药材资源的进一步开发提供了新的思路。

苍耳子有较好的杀虫活性, 且杀虫谱广, 例如赵茜研究发

表5 A和B相分别对绣线菊蚜的毒力

样品-时间	LC_{50} (mg/mL)	LC_{50} 的95%置信区间 (mg/mL)	回归方程	相关系数 r
A-24 h	2.368	0.844~3.430	$y = 3.188x - 1.194$	0.992
A-48 h	1.743	1.156~2.235	$y = 3.044x - 0.734$	0.992
B-24 h	2.524	1.774~3.142	$y = 2.524x - 1.015$	0.999
B-48 h	1.774	1.074~2.353	$y = 2.534x - 0.631$	0.994

现, 苍耳子无水乙醇提取物浓度为 2 mg/mL 时, 对菜蚜的校正死亡率为 80.7%, 浓度为 1 mg/mL 时, 对菜蚜的校正死亡率达到 50%^[13]; 马丽等研究发现, 苍耳子乙醇提取物具有选择性杀虫作用, 在终浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时, 对棉铃虫的毒杀率达 100%^[14]。本研究中对绣线菊蚜的杀虫试验结果表明, 苍耳子石油醚、乙酸乙酯萃取部位具有明显的杀虫活性, 处理 24 h 后的 LC_{50} 分别为 2.368、2.524 mg/mL, 处理 48 h 后的 LC_{50} 分别为 1.743、1.774 mg/mL。

刘娟娟等研究发现, 苍耳子对甘蓝蚜的触杀作用较好, 经与百部、瑞香狼毒、藜芦复配后其校正死亡率可达 93.1%, 明显高于单味药材^[15]。因此, 后续可开展苍耳子和其他中药的配伍活性研究。

参考文献:

- [1] 阙长生, 王家顺, 曾玉亮. 10 种具有开发潜力的林下经济植物研究[J]. 今日科技, 2012(6): 56-57.
- [2] 陈健明, 黄水强, 李汉荣. 两种炮制方法对苍耳子成分及药效的影响[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(5): 127, 180.
- [3] 刘奥迪, 危冲, 张强. 苍耳子挥发油的提取及化学成分分析的研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2016(3): 13-16.
- [4] 刘林, 孟昭礼. 苍耳抑菌活性的初步研究[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(4): 261-263.
- [5] 庄延双, 胡静, 蔡皓, 等. 苍耳子化学成分及药理作用研究进

- 展[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(4): 428-432.
- [6] 熊颖. 苍耳子免疫抑制活性部位初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [7] 邵仁志, 刘小安, 孙兰, 等. 中国植物源农药的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(8): 1401-1405.
- [8] 刘双清, 张亚, 廖晓兰, 等. 我国植物源农药的研究现状与应用前景[J]. 湖南农业科学, 2016(2): 115-119.
- [9] Adetutu A, Morgan W A, Corcoran O. Antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(1): 116-119.
- [10] 黄传奇, 张林碧, 章习哲, 等. 北美圆柏与侧柏挥发性成分体外抑菌活性的比较[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(2): 42-44.
- [11] 马艳妮, 王志尧, 郭展展, 等. 忍冬叶总黄酮的测定及其体外抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 55-59.
- [12] 唐杰, 冯甦, 候若彤, 等. 川芎提取物的抑菌杀虫作用研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2437-2439.
- [13] 赵茜. 20 种中草药乙醇提取物对瓜蚜的防治效果[J]. 黑龙江农业科学, 2015(6): 55-57.
- [14] 马丽, 王开梅, 李维林, 等. 苍耳子提取物作为生物农药的潜力研究[J]. 江西农业学报, 2013, 25(10): 65-67.
- [15] 刘娟娟, 景明, 陈正君, 等. 常用杀虫中药杀虫效果比较及其配伍的初步研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(7): 54-58.