

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.07

# 草药白接骨不同方法提取物体外抑菌活性比较

张森<sup>1\*</sup>, 欧婧<sup>1</sup>, 熊绍斌<sup>2</sup>, 赵婵娟<sup>3</sup>

(1. 黔东南民族职业技术学院, 贵州凯里 556000; 2. 贵州省雷山县丹江镇农业服务中心, 贵州雷山 557100;

3. 重庆三峡职业技术学院, 重庆万州)

[收稿日期] 2018-01-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0038-06 [中图分类号] S853.74

**[摘要]** 为了观察草药白接骨不同提取方法对其抑菌活性的影响, 试验对白接骨分别进行水提和醇提, 联用管碟法、微量稀释法和琼脂平板计数法, 通过测量抑菌圈直径、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 观察了水提液和醇提液对大肠杆菌、沙门氏杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的体外抑菌效果。结果显示, 白接骨醇提液对大肠杆菌、沙门氏杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌的抑菌圈直径分别为  $22.92 \pm 0.74$ 、 $35.10 \pm 1.27$ 、 $42.93 \pm 0.81$  和  $31.95 \pm 0.49$  mm; MIC 分别为 3.12、1.56、0.78 和 1.56 mg/mL; MBC 分别为 6.25、3.12、1.56 和 1.56 mg/mL。但水提液对这 4 种细菌的平均抑菌圈直径均小于 6 mm, MIC 和 MBC 均大于 200 mg/L。由此可见, 草药白接骨醇提液的体外抑菌效果明显优于水提液, 推测其主要抑菌成分可能是醇溶性的。

**[关键词]** 草药; 体外抑菌; 水提; 醇提; 白接骨

## The Comparison of Antimicrobial Effect of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau Extraction by Different Methods *in Vitro*

ZHANG Sen<sup>1\*</sup>, OU Jing<sup>1</sup>, XIONG Shao-bin<sup>2</sup>, ZHAO Chan-juan<sup>3</sup>

(1. Qiandongnan Vocational and Technical College for Nationalities, Kaili Guizhou, 556000 China; 2. Agricultural Service Centre in Danjiang Town in Leishan County in Guizhou, Leishan Guizhou 557100 China; 3. Chongqing Three Gorges Vocational College, Wanzhou Chongqing, 404155 China)

Corresponding author: Zhang Sen, E-mail: 34954919@qq.com

**Abstract:** To observe the bacteriostatic effect of Miao medicines (*Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau) on *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Klasiella pneumoniae in Vitro* by cylinder plate method, micro-dilution method and agar plate count method. The results suggested that the inhibition zone of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau alcohol extract on these 4 kinds of pathogenic bacteria was  $22.92 \pm 0.74$ ,  $35.10 \pm 1.27$ ,  $42.93 \pm 0.81$  and  $31.95 \pm 0.49$  mm respectively. The MIC was 3.12, 1.56, 0.78 and 1.56 mg/mL respectively. The MBC was 6.25, 3.12, 1.56 and 1.56 mg/mL respectively. The aqueous extract of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau have no obvious bacteriostatic effect on these 4 kinds of pathogenic bacteria *in Vitro*. The conclusion is that

基金项目: 黔东南州科技计划项目(黔东南科合 J[2017]009); 凯里市科技计划项目(凯教科合[2016]-2-7 号)。

作者简介: 张森, 副教授, 硕士, 从事畜牧兽医教学和民族兽医药临床应用及研究。E-mail: 34954919@qq.com

*Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau has strong antibacterial action *in Vitro*, and its antibacterial ingredients is possibly alcohol-soluble.

**Key words:** *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau; antibacterial action *in Vitro*; aqueous extract; alcohol extract

白接骨(*Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau) 为爵床科白接骨属草本植物,又名接骨草、接骨丹、血见愁等,广泛分布于我国西南地区,是一味民间常用草药,黔东南地区用其新鲜的根茎或全草,捣浆外敷,治疗跌打损伤、骨折和出血等外科疾病,效果尤佳。《全国中草药汇编》、《纲目拾遗》、《湖南药物志》、《贵州民间药物》等均记载了该草药的功能主治及用法,具有较好临床应用价值。但是该草药的现代药理研究鲜有报道。前期试验发现,白接骨对大肠杆菌、沙门氏杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌均有较好的体外抑菌效果,是一味具有较好开发前景的民间草药。本试验通过醇提和水提两种常见的方法对白接骨进行提取,观察两种不同的提取方法对白接骨体外抑菌效果的影响,为该民间草药的开发利用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试药物与菌株 试验药物:白接骨(全草,2017 年 7 月份采集)由黔东南民族职业技术学院植物组织培养中心鉴定。

试验菌株:大肠杆菌猪(*Escherichia coli*) [CVCC 1510],肺炎克雷伯氏菌(*Klasiella pneumoniae*) [ATCC 10031],由青岛农业大学兽医微生物教研室保存提供;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [ATCC 25923],沙门氏杆菌(*S. choleraesuis*) [33HX],由贵州大学动物科学院动物传染病教研室保存提供。

1.1.2 主要仪器与试剂 SW-CJ-2D 净化工作台(苏州净化);LS-30 高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);KJ14 麦氏比浊管(北京哲成科技有限公司);JA003 电子秤(上海舜宇横平科学仪器有限公司);DHP-500 电热恒温培养箱(金坛大地自动化仪器厂);DHG-9075A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);营养肉汤培养

基(杭州百思生物技术有限公司,批号:20170508001),95%乙醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),庆大霉素药敏片(温州市康泰生物科技有限公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 药液制备 将采集的药物置恒温鼓风干燥箱中,40 ℃条件下烘干。将烘干的药物粉碎成粗粉,备用。

醇提液制备:准确称取 10 g 药物粗粉,放入三角烧瓶中,加 100 mL 80%乙醇,置于超声波机中超声助溶 1 h,减压抽滤提取液。按此方法提取 3 次,合并 3 次提取液,旋转蒸发仪回收乙醇,给浓缩液中加吐温-80 0.25 mL 助溶,再用蒸馏水定容至 25 mL,最终药液生药浓度为 400 mg/mL,过滤除菌,备用。

水提液制备:准确称取 10 g 药物粗粉,放入三角烧瓶中,加 100 mL 蒸馏水,浸泡 2 h 后,煮沸 30 min 后,冷却后减压抽滤,二次加 100 mL 蒸馏水煮沸 30 min,冷却后减压抽滤,混合两次滤液,用旋转蒸发仪浓缩,给浓缩液中加吐温-80 0.25 mL 助溶,再用蒸馏水定容至 25 mL,最终药液生药浓度为 400 mg/mL,过滤除菌,备用。

1.2.2 菌液的制备 按无菌操作法,将保存的个菌种划线接种于 1%琼脂营养肉汤培养基上,37 ℃条件下培养 18 h,挑取单个菌落接种于 5 mL 无菌营养肉汤液体培养基中,37 ℃条件下培养 12 h,用灭菌的肉汤培养基稀释至 0.5 麦氏浊度,即约  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL。取适量菌液用灭菌肉汤培养基进行 100 倍稀释,菌悬液浓度为  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL,备用。

1.2.3 草药白接骨抑菌作用分析 采用管碟法<sup>[1]</sup>,按无菌操作要求,分别吸取 150  $\mu$ L 各配制备用的细菌液至 1%的琼脂肉汤培养板上,用“L”棒涂布均匀,在超净工作台上室温条件下放置 5 min,等距离放置灭菌牛津杯(规格 10 mm $\times$ 8 mm $\times$ 6 mm),静置 10 min 使其和培养板表面严实无缝。给每个牛

津杯中加入相应的药物 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 8 h, 使药物扩散, 然后将培养皿置 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h, 观察, 并用游标卡尺十字法测量抑菌圈直径, 取平均值。每种药物和菌株平行做 3 次重复。结果判定: 抑菌圈 < 10 mm 为不敏感, 10~19 mm 为中度敏感,  $\geq 20$  mm 为高度敏感<sup>[2]</sup>。

1.2.4 草药白接骨 MIC 和 MBC 的测定 采用微量法<sup>[3]</sup>。按操作方法, 取一次性无菌 96 孔培养板, 每行 12 孔, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  肉汤培养基, 吸取 100  $\mu\text{L}$  药物加入第 1 孔, 混匀后, 吸取 100  $\mu\text{L}$  到第 2 孔, 以此类推至第 10 孔, 混匀后, 弃 100  $\mu\text{L}$ , 每孔接种 10  $\mu\text{L}$  菌液; 第 11 孔加入 10  $\mu\text{L}$  无菌蒸馏水, 为阴性对照, 第 12 孔接种 10  $\mu\text{L}$  菌液, 为细菌生长对照。将 96 孔培养板加盖置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 18 h, 观察细菌生长情况。结果判定: 与阴性对

照对比, 如浑浊或有沉淀, 则判断为有菌生长; 如透明度与阴性对照相同, 则判断无菌生长。以无菌生长所对应的最低药物浓度为该药物对此菌的 MIC。然后, 将每孔培养液划线接种 1% 琼脂营养肉汤培养板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h, 观测细菌生长情况, 无菌落生成对应的最低药物浓度为该药物对此菌的 MBC。每种菌株做 3 次平行重复。

## 2 结果与分析

2.1 白接骨抑菌作用结果 通过管碟法观察了白接骨醇提物和水提物分别对大肠杆菌、沙门氏杆菌、肺炎克雷伯氏菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用, 结果如表 1 所示, 白接骨醇提液对 4 种细菌均有较强的体外抑制作用, 抑菌圈的直径均超过了 20 mm。而对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径超过了 40 mm, 作用显著强于其他三种细菌。

表 1 白接骨抑菌作用结果(单位: mm)

Tab 1 The bacteriostatic effect of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau

菌株 Strain	抑菌圈直径 The diameter of inhibition zone			
	白接骨醇提物 Alcohol extract	白接骨水提物 Aqueous extract	庆大霉素对照 Gentamycin control	阴性对照 Negative control
大肠杆菌 [CVCC1510] <i>Escherichia coli</i> [CVCC1510]	22.92 $\pm$ 0.74	$\leq 6$	21.70 $\pm$ 0.14	$\leq 6$
沙门氏杆菌 [33HX] <i>Salmonella</i> [33HX]	35.10 $\pm$ 1.27	$\leq 6$	21.5 $\pm$ 0.71	$\leq 6$
肺炎克雷伯氏菌 [ATCC10031] <i>Klasiella pneumoniae</i> [ATCC10031]	31.95 $\pm$ 0.49	$\leq 6$	24.61 $\pm$ 0.13	$\leq 6$
金黄色葡萄球菌 [ATCC25923] <i>Staphylococcus aureus</i> [ATCC25923]	42.93 $\pm$ 0.81	$\leq 6$	$\leq 6$	$\leq 6$

2.2 MIC 测定结果 采用微量法测定白接骨水提液和醇提液对 4 种细菌的 MIC, 结果如表 2 所示, 白接骨醇提液抑制大肠杆菌、沙门氏杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌体外生长的最高稀释倍数分别达到了 27(3.12 mg/mL)、28(1.56 mg/mL)、28(1.56 mg/mL) 和 29(0.78 mg/mL); 而白接骨水提液所有药物稀释浓度均有明显的细菌生长, 表明白接骨水提液对这 4 种细菌无明显的抑制作用。

2.3 MBC 测定结果 在无菌条件下, 将测定 MIC 后的每孔液体接种于琼脂平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12~18 h, 观察是否有菌落生长, 结果如表 3 所示, 白接骨醇提液分别在 26(6.25 mg/mL)、27(3.12 mg/mL)、28(1.56 mg/mL) 和 28(1.56 mg/mL) 无大肠杆菌、沙门氏杆菌、肺炎克雷伯氏菌和金黄色葡萄球菌无菌落生长。而白接骨水提液均有明显的细菌生长, 与 2.2 结果对应。

表 2 草药白接骨对 4 种细菌 MIC 测定结果

Tab 2 The MIC of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau on 4 kinds of strain

菌株 Strain		21	22	23	24	25	26	27	28	29	210	P	N
大肠杆菌[ CVCC1510] <i>Escherichia coli</i> [ CVCC1510]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
沙门氏杆菌[ 33HX] <i>Salmonella</i> [ 33HX]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
肺炎克雷伯氏菌 [ ATCC10031] <i>Klasiella pneumoniae</i> [ ATCC10031]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
金黄色葡萄球菌 [ ATCC25923] <i>Staphylococcus aureus</i> [ ATCC25923]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-

"P"为细菌生长对照,"N"为空白对照;"-"菌液澄清,"+"菌液轻度浑浊。"++"菌液明显浑浊;"21-210"为药物的稀释倍数

"P" indicated positive control; "N" indicated negative control; "-" indicated the bacteria solution was clear; "+" indicated the bacteria solution was a little muddy; "++" indicated the bacteria solution was apparently muddy; "21-210" indicated the dilute times of medicine

表 3 草药白接骨对 4 种细菌 MIC 测定结果

Tab 3 The MIC of *Asystasiella neesiana* (Wall.) Lindau on 4 kinds of strain

菌株 Strain		21	22	23	24	25	26	27	28	29	210	P	N
大肠杆菌[ CVCC1510] <i>Escherichia coli</i> [ CVCC1510]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
沙门氏杆菌[ 33HX] <i>Salmonella</i> [ 33HX]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
肺炎克雷伯氏菌 [ ATCC10031] <i>Klasiella pneumoniae</i> [ ATCC10031]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
金黄色葡萄球菌 [ ATCC25923] <i>Staphylococcus aureus</i> [ ATCC25923]	醇提 Alcohol extract	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-
	水提 Aqueous extract	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-

"P"为细菌生长对照,"N"为空白对照;"-"无菌落生长,"+"有稀疏菌落生长。"++"有大量菌落生长;"21-210"为药物的稀释倍数

"P" indicated positive control; "N" indicated negative control; "-" indicated no colony growth; "+" indicated a small amount of colony growth; "++" indicated a lot of colony growth

### 3 讨论与结论

随着养殖集约化程度越来越高, 畜禽流动越来越频繁, 而检疫和防疫水平相对不足, 导致我国畜牧生产中病原微生物愈发猖獗。有调查, 从我国部分养殖场分离的大肠杆菌和沙门氏杆菌, 其中 80% 以上有多重耐药<sup>[6-7]</sup>。据研究 90% 以上的金黄色葡萄球菌可产生  $\beta$ -内酰胺酶, 使青霉素水解失活, 特别是耐甲氧西林 SA (MRSA), 它不仅对甲氧西林耐药, 而且对其它多种抗生素亦耐药<sup>[8]</sup>。此外, 在畜牧生产中大量的使用抗生素或抗菌药物, 畜产品中药物残留超标, 对人类的健康造成一定的威胁。研究表明, 某些中草药具有抗病原微生物的作用, 由于中药多成分的整体量效作用、多靶点作用和不同于化学药物的抗菌机制, 不少具有抗菌作用的中草药对耐药性细菌仍有抗菌作用<sup>[9]</sup>。

白接骨是广泛分布于我国南部及西南部的爵床科植物, 有止血, 祛瘀, 清热解毒的功效。《纲目拾遗》、《中草药学》、《贵州民间药物》等均有该草药治疗外伤出血, 吐血, 便血, 扭伤及咽喉肿痛病症的记载, 是一味我国南方地区常用的民间草药。但其现代药理研究尚未见任何报道。试验采用管碟法联合微量稀释法和琼脂平板计数法观察了其大肠杆菌、沙门氏杆菌、克雷伯肺炎菌和金黄色葡萄球菌 4 种兽医临床常见致病菌的体外抑制作用, 结果表明, 白接骨醇提液对这 4 种病原菌在体外有较强的抑制作用, 其抑菌圈直径均超过了 20 mm, 经测定, MIC 均低于 3.12 mg/mL。对金黄色葡萄球菌的作用效果尤佳。其是否在畜牧生产中也有如此卓越的抗菌效果尚需进一步的临床试验。

中草药化学成分繁多复杂, 不同的提取部位、不同的提取方法药物效果可能均不同。本试验对白接骨分别采用水提法和醇提法进行提取, 进行体外抑菌试验, 结果发现, 醇提液呈现较好的体外抑菌效果, 而水提液没有表现明显的体外抑菌作用, 推测白接骨的抑菌成分可能是醇溶性的, 而非水溶性。也有学者认为中药在高温煎煮时会造成某些抑菌活性成分被破坏<sup>[10]</sup>。这也可能是白接骨水提液没有明显体外抑菌活性的原因之一。白接骨目

前虽然没有现代药理研究的相关报道, 但是穿心莲和白接骨同为爵床科植物, 其研究较多, 而且已经应用于畜牧兽医临床。据研究穿心莲内脂是穿心莲的主要活性成分之一, 属于二萜内脂类, 水溶性差, 被誉为天然抗生素, 对细菌性痢疾的疗效优于氯霉素和呋喃唑酮<sup>[11]</sup>。白接骨是否具有和穿心莲类似的抗菌成分, 尚需进一步的成分分析与药理研究。

综上所述, 白接骨醇提液对大肠杆菌、沙门氏杆菌、克雷伯肺炎菌和金黄色葡萄球菌有较强的体外抑菌的活性, 而水提液抗菌效果不明显。白接骨是否在动物体内也有强的抗菌效果, 其主要的抑菌成分、抑菌机理以及其他的药理作用尚有待进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 265.  
Ma X R, Su D M. Manual of Medicinal Microbiological Detection [M]. Beijing: China Science Publishing, 2000: 265.
- [2] 杜锐, 韩文瑜, 雷连成. 金黄色葡萄球菌中草药抑制剂的筛选研究[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(9): 10-13.  
Du R, Han W Y, Lei L C. Screening the Chinese herbal medicine bacterial inhibitor on *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2006, 40(9): 10-13.
- [3] 陈琦. 中药药理研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 69-71.  
Chen Q. Research methods in pharmacology of Chinese materia [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011, 333-334.
- [4] Anderson, Scully, Buurman. *Staphylococcus aureus* clumping factor a remains a viable vaccine target for prevention of *S. aureus* infection [J]. *Mbio*, 2016(2): 103-106.
- [5] Gordon, Williams, Chan. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective [J]. *Med Chem*, 2013, 56: 1389-1404.
- [6] 刘艳红, 吕淑霞, 李颖, 等. 大肠杆菌耐药性及氟苯尼考耐药基因 floR 的研究 [J]. 中国畜牧兽医杂志, 2017, 1: 115-118.  
Liu Y H, Lv S X, Li Y, et al. The research of the resistance and the resistance genes to florfenicol in *E. coli* [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2017, 53(1): 115-118.

- [7] 朱顺,彭忠,王帅,等. 我国部分地区猪沙门菌的耐药性[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(7): 1283-1287.  
Zhu S, Peng Z, Wang S, *et al.* Antimicrobial resistance of pig originated *Salmonellae* isolates[J]. *Chin J Vet Sci*, 2017, 37(7): 1283-1287.
- [8] Sharon JP, Gavin KP. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 577-601.
- [9] 韩飞,幸仁汇,陈琳琦等. 中药抗细菌耐药性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 813-817.  
Han F, Xing R H, Chen L Q, *et al.* Research progress of anti-drug resistance in Traditional Chinese Medicine[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(5): 813-817.
- [10] 田立杰,赵晴,宋晓言,等. 20 味中草药与抗生素联用对猪源链球菌体外抑菌作用的分析[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(1): 45-48.  
Tian L J, Zhao Q, Song X Y, *et al.* Antibacterial effect of combination of twenty Chinese herbs with ciprofloxacin against *streptococcus suis in Vitro*[J]. *Chin J of Vet Drug*, 2014, 48(1): 45-48.
- [11] 彭宇然,孙亦诚,王德才,等. 8,17-环氧穿心莲内脂衍生物的合成与抗菌活性[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2016, 4: 67-78.  
Peng Y R, Sun Y R, Wang D C, *et al.* Synthesis and antibacterial activity of 8,17-epoxyandrographolide derivatives[J]. *Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 4: 67-78.

(编辑:陈希)