

中药大黄提取物对几种畜禽致病菌的抑菌作用研究

张海晖 裘爱泳 刘军海 王绞呈

大黄是常用中药,作用广泛,长期以来大黄的研究倍受国内外学者的重视。全世界共有 60 余种大黄,我国就有 40 余种,而且正品大黄只产于中国。我国是世界上最大的大黄产地,2003 年我国大黄总产量为 1 万吨,近年来我国大黄年用量仅为 5 000t 左右,而且由于我国中药还没有真正进入国际医药主流市场,中药的发展比较落后,大黄的出口量尚十分有限,造成产品大量积压,给经济带来巨大损失。因此,如何充分利用我国大黄的资源优势是当前急需解决的课题。近年来,人们对大黄的研究多集中于医疗卫生,而对其在饲料添加剂方面的应用研究相对较少,而且由于各自试验条件不一,报道结果差异较大。本文选用大黄各种提取物在相同条件下对常见畜禽病原菌抑菌对比试验,旨在开发一种天然的抑菌剂,尤其在当前滥用各类抗菌药包括用中药来预防治疗疾病情况下,为兽医临床组方,选药提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 金黄色葡萄球菌 6538(Staphylococcus aureus 6538)、绿脓杆菌 ATCC27553(Bacterium pyocyaneum ATCC27553)、大肠志贺氏菌 51302(Shigella dysenteriae 51302)由无锡市疾病预防控制中心提供;猪大肠杆菌(Swine Ecoli.)、禽大肠杆菌(Poultry colibacillosis)、禽多杀性巴氏杆菌 C₄₈-1(Poultry Pasteurella multocida C₄₈-1)、链球菌 ATCC35246(Streptococcus ATCC35246)、停乳链球菌(Milk withholding Streptococcus)由南京农业大学动物医学院提供。

1.1.2 培养基 肉汤蛋白胨液体培养基和肉汤蛋白胨固体培养基。

1.1.3 药品 青霉素(160 万单位);大黄提取物为分离得到的大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚纯品,以及游离蒽醌(上述物质混合物);大黄鞣质。

1.2 抑菌试验

1.2.1 菌悬液的制备

将活化后的菌种分别从各新鲜菌种斜面上沾取少量菌苔接种到营养肉汤中,于 37℃ 培养箱中培养 24h 后作为原菌液,分别用灭菌生理盐水将各原菌液配制成含菌数 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 的菌悬液备用。细菌数的确定参乔军等(1996)方法。

1.2.2 供试液的制备

分别将各种大黄提取物溶于适量 70% 乙醇中,用微滤膜过滤,测定浓度,鞣质浓度采用干酪素法直接进行测定,所得溶液备用。

1.2.3 滤纸片法

将厚度为 1.5mm 的滤纸用打孔机打成直径为 6mm 的纸片,并将滤纸片灭菌、烘干,置于不同浓度的大黄各提取物溶液中,浸泡 2h 留用。将各种待试菌液各取 0.2ml 在固体培养基上涂布制得含菌平板,用无菌镊子将浸透各种浓度滤纸片贴在含菌平板上,每个平皿等距离放 5 片。其中 3 片浸过样品,1 片浸有生理盐水,另外一片浸有 40 万单位的青霉素,置于中间。每个处理做 3 次重复,把每个处理过的培养皿放到 37℃ 培养箱中倒置培养 24h。测定抑菌圈直径的大小。

1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)测定

采用倍比稀释法,将每种供试液作为一个试验组,每组取 13 只试管,每管中分别加液体培养基 1.0ml 和浓度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 的菌悬液 0.2ml,然后在第一只试管中加 0.8ml 供试液,并做 2 倍连续稀释至第 12 只试管,每步都用混匀器混匀。随后从第 12 只试管中移去 1.0ml 溶液,将第 13 只试管作为生长对照,同时作空白对照,置 37℃ 培养 16~24h。取出后,对各澄清试验管划线于营养琼脂平板上,再置 37℃ 培养 24h,观察有无菌落生长。阴性对照不长菌,空白对照长菌,则试验方法成立,即无菌增殖的最高

张海晖,江南大学食品学院,214036,江苏省无锡市惠河路 170 号。

裘爱泳、刘军海、王绞呈,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2004-09-07

稀释管的供试液浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.5 温度对抑菌活性的影响

以禽巴氏杆菌为试验菌,将大黄各提取物溶液分别在60、70、80、90、100℃下加热3h,加70%乙醇至原体积。采用滤纸片法进行试验,研究温度对大黄各提取物抑菌活性的影响。

1.2.6 加热时间对抑菌活性的影响

以禽巴氏杆菌为试验菌,将大黄提取物溶液分别在90℃下加热2、3、4、5、6h,加70%乙醇至原体积。采用滤纸片法进行试验,研究加热时间对抑菌活性的影响。

1.2.7 pH对大黄提取物抑菌活性的影响

以禽巴氏杆菌为试验菌,将各供试液调配成不同的pH,采用滤纸片法分别测定其抑菌活性,以观察不同pH下大黄各提取物抑菌活性的变化。

2 结果与讨论

2.1 大黄提取物的抑菌效果

各种大黄提取物的抑菌效果见表1。 $W > 3\text{mm}$ 强抑菌, $1 \sim 2.5\text{mm}$ 抑菌, $W < 0.9\text{mm}$ 弱或无抑菌作用。

$$W = (D - d) / 2$$

式中:W——抑菌环宽度;

D——样品和抑菌环总直径;

d——样品直径。

表1 大黄提取物的抑菌效果(mm)(n=3)

菌种	大黄酸	芦荟大黄素	大黄素	大黄素甲醚	大黄酚	游离蒽醌	鞣质
金黄色葡萄球菌	2.38	3.32	3.01	1.91	2.01	1.54	2.04
绿脓杆菌	2.87	2.01	2.51	1.69	1.72	1.36	1.84
大肠志贺氏菌	2.73	2.07	2.65	1.75	1.63	1.27	1.71
禽巴氏杆菌	3.09	2.23	3.01	2.07	1.99	2.01	2.01
禽大肠杆菌	2.39	3.33	3.15	1.83	2.13	2.04	2.13
猪大肠杆菌	2.98	3.48	2.34	2.03	2.43	1.36	2.63
链球菌	2.64	2.34	2.18	1.81	1.13	1.92	2.30
停乳链球菌	3.03	1.85	1.57	1.45	1.59	1.63	1.93

由表1可以看出,各种大黄提取物均有一定的抑菌效果。试验结果表明,当大黄酸浓度为 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对禽巴氏杆菌、停乳链球菌即有强抑菌作用;而芦荟大黄素浓度为 $424\mu\text{g}/\text{ml}$,大黄素浓度为 $450\mu\text{g}/\text{ml}$

时对金黄色葡萄球菌、禽大肠杆菌、猪大肠杆菌有强抑菌作用。

2.2 大黄提取物对各种细菌的最低抑菌浓度(MIC)

表2 大黄提取物的最低抑菌浓度(MIC)($\mu\text{g}/\text{ml}$)

菌种	大黄酸	芦荟大黄素	大黄素	大黄素甲醚	大黄酚	游离蒽醌	鞣质
金黄色葡萄球菌	21.25	26.5	28.13	45.00	65.00	45.00	31.25
绿脓杆菌	42.50	53.00	56.25	45.00	130.00	90.00	62.50
大肠志贺氏菌	42.50	53.00	56.25	90.00	130.00	90.00	62.50
禽巴氏杆菌	21.25	26.50	56.25	22.50	32.50	45.00	31.25
禽大肠杆菌	10.63	53.00	28.13	11.25	65.00	45.00	31.25
猪大肠杆菌	10.63	26.50	28.13	11.25	32.50	45.00	31.25
链球菌	42.50	53.00	56.25	45.00	130.00	90.00	62.50
停乳链球菌	21.25	26.50	28.13	90.00	65.00	90.00	31.25

从表2可以看出,对于金黄色葡萄球菌、停乳链球菌,大黄酸、芦荟大黄素、大黄素较为敏感,鞣质在较低浓度条件下也有明显抑菌作用;对于绿脓杆菌、大肠志贺氏菌以及链球菌,各种提取物的MIC都较高(在 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上),其中以大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚的抑菌效果较好;对于禽巴氏杆菌、禽大肠杆菌、猪大肠杆菌,各种提取物在较低浓度时都有明显抑菌作用,其中大黄酸表现最为突出,而大黄素甲醚对这3种细菌尤为敏感,其MIC和大黄酸

相当。从试验结果看,7种大黄提取物中,大黄酸抑菌作用最强,芦荟大黄素、大黄素、鞣质次之,游离蒽醌、大黄素甲醚、大黄酚的抑菌作用相对较弱,这与报道相符,但具体某种物质对不同细菌的抑菌作用有其特异性,往往表现出较强的抑菌效果,如在本试验中,大黄素甲醚对禽巴氏杆菌、禽大肠杆菌、猪大肠杆菌表现极为敏感,而相对芦荟大黄素、大黄素、大黄酚对其也有较强的抑菌作用。

2.3 温度对大黄提取物抑菌活性的影响

表3 温度对大黄提取物抑菌活性的影响(mm)(n=3)

加热温度(℃)	大黄酸	芦荟大黄素	大黄素	大黄素甲醚	大黄酚	游离蒽醌	鞣质
60	3.06	2.87	3.12	2.31	2.17	2.06	2.14
70	3.11	2.93	3.07	2.37	2.25	2.11	2.16
80	3.08	2.81	3.02	2.42	2.21	2.09	1.93
90	3.05	2.86	3.11	2.33	2.16	2.15	1.35
100	3.10	2.92	3.08	2.41	2.19	2.13	0.84

从表3可以看出,在60~100℃范围内,温度对大黄蒽醌类衍生物的抑菌活性并没有影响,即使在100℃加热3h,仍然明显抑菌效果,可见在提取大黄蒽醌类衍生物时,即使在高温下长时间进行,也不会

对其抑菌活性造成影响。而对鞣质而言,随着温度逐渐升高,其抑菌活性呈下降趋势,当温度达到100℃时加热3h其抑菌圈直径小于1mm,已无抑菌活性。

2.4 加热时间对大黄提取物抑菌活性的影响

表4 加热时间对大黄提取物抑菌活性的影响(mm)(n=3)

加热时间(h)	大黄酸	芦荟大黄素	大黄素	大黄素甲醚	大黄酚	游离蒽醌	鞣质
2	3.09	2.79	3.19	2.37	2.21	2.09	1.78
3	3.05	2.86	3.11	2.33	2.16	2.15	1.35
4	3.11	2.81	3.04	2.31	2.12	2.11	0.81
5	3.06	2.92	3.13	2.44	2.08	2.23	-
6	3.08	2.84	3.16	2.35	2.15	2.18	-

注:“-”表示无抑菌圈。

从表4可以看出,对大黄蒽醌类衍生物来说,在90℃下加热6h对其抑菌活性没有影响,而对于鞣质,随着加热时间延长,其抑菌活性明显下降,加热时间超过3h,大黄鞣质已无抑菌活性。

2.5 pH对大黄提取物抑菌活性的影响

表5 不同pH大黄提取物对禽多杀性巴氏杆菌C₄₈-1的抑菌效果(mm)

大黄提取物	pH(3~4)	pH(4~5)	pH(5~6)	pH(6~7)	pH(7~8)	pH(8~9)
大黄酸	3.02	2.76	2.58	2.41	2.27	1.93
芦荟大黄素	2.81	2.59	2.25	2.11	2.02	1.87
大黄素	3.11	2.83	2.54	2.39	2.21	1.95
大黄素甲醚	2.27	2.01	1.89	1.72	1.56	1.35
大黄酚	2.19	1.95	1.81	1.63	1.47	1.26
游离蒽醌	2.09	1.93	1.78	1.56	1.39	1.21
鞣质	2.14	1.98	1.72	1.63	1.35	1.09

从表5可以看出,各种大黄提取物在酸性条件下抑菌作用最强,中性条件下次之,在碱性条件下抑菌效果较弱。

3 小结

3.1 本试验结果表明,各种大黄提取物对一些畜禽易染病原菌均有显著的抑菌效果,提取条件的变化不会破坏其抑菌有效成分,对热有较强的稳定性。

3.2 不同种类的大黄提取物对不同病原菌抑菌效果差异很大。据文献报道,大黄酚和大黄素甲醚抑菌效果有限。而大黄酸、大黄素和芦荟大黄素抑菌作用最强。但本试验研究发现,大黄素甲醚、大黄酚对禽巴氏杆菌、禽大肠杆菌、猪大肠杆菌这些细菌的抑菌作用

与上述3种物质相当,甚至更强,提示不同大黄提取物对不同细菌的抑菌作用不同,在实践中应合理应用。

3.3 大黄中鞣质含量为10%~30%,是一种复杂的多元酚类化合物,具有降低血清尿素氮(BUN)含量等多种生理活性,本试验证实,大黄鞣质对各种畜禽易染病原菌具有很强的抑制作用,值得重视和开发利用,但由于其在长时间高温加热条件下不稳定,容易降解,在提取过程中应注意控制提取条件。

3.4 大黄提取物在酸性条件下抑菌活性最强,中性条件下次之,在碱性条件下抑菌效果较弱。

3.5 大黄提取物抑菌活性强,添加剂量小,是一种天然的抑菌剂,不仅具有防病治病,促进生长发育,提高生产性能,调节机体免疫力的作用,而且长期使用毒副作用小,不容易产生抗药性,应用于饲料添加剂领域必将有着极为广阔的前景。

参考文献

- 1 乔军,孟庆龄,贾桂珍.运用OD值法进行细菌计数的研究.中国家禽[J],1996,(4):26~27
- 2 王玲,张富宝.中药大黄提取色素的抑菌作用研究.食品工业科技[J],2000,21(6):27~28
- 3 李树明,张凤鸣,雷燕.50味中药对8种畜禽病原菌抑菌对比研究.中兽医学杂志[J],2000,(4):5~8
- 4 张海晖,袁爱泳.开发中草药饲料添加剂促进畜牧业健康发展.饲料工业[J],2003,24(7):44~47
- 5 王晶钰,张朝红,张彦明.中草药制剂防治鸡白痢病的研究.西北农业大学学报[J],1999,27(6):102~107