

黔产生黄精多糖的抑菌活性研究

龙杰凤 胡秀虹 范成念 杨违仙¹

(凯里学院大健康学院, 贵州 凯里 556011)

【摘要】目的:探究贵州生黄精多糖的体外抑菌作用。方法:采用石油醚脱脂后超声提取再纯化得到黄精多糖,以白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌为抑菌试验对象,通过纸片法,探究黔产生黄精多糖对这五种菌的抑菌效果。结果:实验表明黔产生黄精多糖对五种供试菌株均有明显的抑菌作用,抑菌效果:巨大芽孢杆菌>解淀粉芽孢杆菌>蜡样芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>白色念珠菌。结论:在药液浓度相同的条件下,黔产生黄精多糖对巨大芽孢杆菌的抑制效果最优,本实验为真菌性或者细菌性感染寻求绿色天然且毒副作用小的抑菌剂提供参考。

【关键词】生黄精 多糖 体外抑菌 活性研究

【中图分类号】:R284.2 **【文献标识码】**:A **【文章编号】**:1003-6563(2022)01-0005-05

0 引言

黄精属百合科多年生草本植物,别名鸡头黄精、老虎姜。黄精作为传统的滋补类中药,被广泛应用于中医临床,2020年版《中国药典》记载的三种黄精为黄精、滇黄精、多花黄精的干燥根茎,且药典规定的黄精炮制方法为“置沸水中略烫或蒸至透心,干燥”^[1];而在贵州苗族地区喜用鲜黄精治疗胃肠炎、皮肤癣等病症,具有一定的疗效。大量学者的研究多集中在制黄精的成分分析及抗氧化活性上,对生黄精的药用研究甚少,且对生黄精多糖抑菌活性研究未见报道^[2,3,4]。本文通过提取生黄精多糖,探究生黄精多糖对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌五种致病菌的抑菌作用,为开发苗药具有一定的推进作用,为生黄精相关产品的开发利用提供数据参考。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材的购买与处理

生黄精来源于笔者参加全国第四次中药资源普查中在贵州省镇远县、黄平县、印江县、梵净山等多个地区采集而得,将生黄精药材清洗干净,新鲜切片,捣碎,密封存放于2~8℃冰箱中备用。

1.1.2 实验菌株

作者简介:龙杰凤(1987-),女,贵州施秉人,凯里学院大健康学院讲师,研究方向为天然药物化学。

基金项目:贵州省教育厅青年科技人才成长项目:黔东南苗药黄精的种质资源调查及其抑菌活性研究(黔教合KY字[2019]191);凯里学院“博士教授服务团”专项课题(BJFWT201909)

由凯里学院民族药工程中心提供的五种菌：白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌。

1.1.3 实验设备与试剂

超声仪 SK8200HP(上海科导超声仪器有限公司)、立式压力蒸汽灭菌器 BXM-30R(上海博讯实业有限公司)、生化培养箱 BSP-150(上海博讯实业有限公司)、消毒柜 ZTP-78L-A01(佛山市六百年电器)、净化工作台(上海博讯实业有限公司)、数显水浴恒温振荡器、抑菌圈(抗生素效价)测量仪；无水乙醇、石油醚、 α -萘酚，均为试剂纯，购于重庆川东化工。

1.1.4 供试培养基

牛肉膏蛋白胨培养基：蛋白胨 20g、牛肉膏 3g、氯化钠 5g、琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL；沙氏培养基：琼脂 20g、蛋白胨 10g、葡萄糖 40g、蒸馏水 1000mL。

1.2 实验方法

1.2.1 药材的预处理(石油醚脱脂)

分别称取 3 份 50g 生黄精碎末，加入 3 个三角瓶中，再向三角瓶中加入适量石油醚进行脱脂^[6](没过药材约 2~3cm)。将 3 个三角瓶用铁架台固定于超声波清洗器中，设置时间为 30min、功率 90%、工作频率为 53kHz，开启超声。石油醚脱脂结束后，倾出提取液，弃液留渣，自然状态下，挥干剩余的石油醚，作为提取的原料。

1.2.2 超声波辅助提取多花黄精

按照料液比 1 : 15, 向已脱脂处理的 3 个三角瓶中分别加入已灭菌好的蒸馏水，将三角瓶用铁架台固定于超声波清洗器中，设置提取时间 40min, 超声波作用功率 90%, 工作频率 53kHz, 提取结束后，用脱脂棉过滤 2 次，再用滤纸过滤 1 次，将滤液转移至 3 个三角瓶中，将提取液用电磁炉水浴加热浓缩到 50mL, 得到浓缩液的浓度为 0.5g/mL。用保鲜膜将瓶口封好，冷却至室温或者更低温度后，放入冰箱 5℃ 保存备用^[5,6]。

1.2.3 菌种活化

在无菌操作条件下^[7], 用接种环刮取金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的菌落在制备好牛肉膏蛋白胨培养基的固体培养基上划线培养，放入生化培养箱(BSP-150)中 37℃ 下，倒置培养 24h。白色念珠菌则在制备好的沙氏固体培养基上划线培养，放入霉菌培养箱(BMJ-160)中 28℃ 下，培养 24h, 即得到活化后的供试菌种。

1.2.4 菌液制备

将活化的菌种用接种环刮取菌落接到 25mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基(若接白色念珠菌则用沙氏液体培养基)中，放入水浴恒温振荡器(SPCC-SHA-C)中 37℃ 摇床培养 22h, 即得到菌液^[8]。在净化工作台(SW-CJ-1FD)中，开启紫外 30min, 风机 10min, 用无菌注射器分别吸取 9.9mL 已灭菌的 0.9% 生理盐水加入到 5 支已灭菌的试管中，再用移液枪吸取 100 μ L 经水浴恒温振荡培养好的菌液，加入试管中稀释成实验所需要的菌悬液。

1.2.5 体外抑菌试验

按照滤纸片法进行试验操作^[6]:分别用移液枪吸取 0.2mL 各菌悬液,加到牛肉膏蛋白胨固体培养基表面上并涂布均匀。将生黄精多糖用对倍稀释法,分别配制成浓度为 0.5g/mL、0.25g/mL、0.125g/mL、0.0625g/mL、0.03125g/mL 的抑菌药液,用移液枪各吸取 5mL 上述浓度的药液(对照则用无菌水代替药液,其他条件不变)分别放入已灭菌好的培养皿中,然后将已灭菌并烘干的滤纸片(直径 6mm)放入培养皿中进行浸泡,每个培养皿放 25 片,浸泡 2h 后,用镊子取出后等待微干,放入培养皿中,每个培养皿等距离放置不同浓度抑菌液浸泡过的滤纸片,每个菌种做 3 个平行。然后倒置于生化培养箱(BSP-150)中培养,37℃下培养 24h(白色念珠菌则放入霉菌培养箱(BMJ-160)中培养,27℃下培养 24h),观察并记录结果,取出培养皿后,用讯数-抑菌圈(抗生素效价)测量仪(CzoneG67)对培养基进行图像的拍摄,并标定抑菌圈,进行抑菌圈直径的大小的测量,比较抑菌效果。

2 实验结果及数据分析

2.1 抑菌活性测定

通过纸片法,将不同浓度的黔产生黄精多糖对 5 种供试菌株进行抑制试验,采用讯数-抑菌圈(抗生素效价)测量仪(CzoneG67)对抑菌圈直径进行测量。综上分析,结果见表 1-表 6。

表 1 黔产生黄精多糖对白色念珠菌抑菌圈的测定

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm			抑菌圈直径范围/mm
	平行 1	平行 2	平行 3	
0	8.915	8.912	8.887	8.905±0.018
31.25	9.408	9.329	9.192	9.310±0.118
62.5	9.562	9.578	9.239	9.460±0.221
125	9.421	9.435	9.116	9.324±0.208
250	9.194	9.211	8.910	9.105±0.195
500	8.992	8.856	8.886	8.911±0.081

表 2 黔产生黄精多糖对金黄色葡萄球菌抑菌圈的测定

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm			抑菌圈直径范围/mm
	平行 1	平行 2	平行 3	
0	9.669	9.216	9.328	9.404±0.265
31.25	9.897	9.379	9.579	9.618±0.279
62.5	10.004	9.504	9.633	9.714±0.290
125	10.339	10.190	10.378	10.302±0.112

250	10.381	9.629	9.737	9.916±0.465
500	10.212	9.585	9.665	9.821±0.391

实验结果表明，黔产多花黄精药液浓度在 31.25~500mg/mL 范围内，对 5 种供试菌种均具有抑菌效果，抑菌圈直径大小为：巨大芽孢杆菌>解淀粉芽孢杆菌>蜡样芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>白色念珠菌。其中，在药液浓度为 125mg/mL 时，对巨大芽孢杆菌的抑菌效果最佳，抑菌圈直径为 12.826mm。

表 3 黔产生黄精多糖对蜡样芽孢杆菌抑菌圈的测定

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm			抑菌圈直径范围/mm
	平行 1	平行 2	平行 3	
0	9.482	9.831	9.410	9.574±0.257
31.25	9.791	10.198	9.473	9.821±0.377
62.5	9.997	10.574	9.928	10.166±0.408
125	9.999	10.993	10.109	10.367±0.626
250	9.965	10.483	10.279	10.242±0.277
500	9.831	10.390	9.713	9.978±0.421

表 4 黔产生黄精多糖对巨大芽孢杆菌抑菌圈的测定

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm			抑菌圈直径范围/mm
	平行 1	平行 2	平行 3	
0	10.483	10.781	10.669	10.644±0.161
31.25	10.895	11.130	10.912	10.979±0.151
62.5	11.287	12.137	11.381	11.602±0.535
125	13.235	13.605	11.639	12.826±1.187
250	11.583	11.651	10.897	11.377±0.480
500	11.810	11.114	10.004	10.976±0.972

表 5 黔产生黄精多糖对解淀粉芽孢杆菌抑菌圈的测定

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm			抑菌圈直径范围/mm
	平行 1	平行 2	平行 3	
0	9.058	9.189	9.569	9.272±0.297
31.25	9.456	9.358	9.904	9.573±0.331
62.5	9.619	10.041	10.146	9.935±0.316
125	10.627	11.117	10.739	10.828±0.289
250	9.921	10.340	10.428	10.230±0.309
500	9.254	9.358	10.100	9.571±0.529

表 6 黔产生黄精多糖对 5 种菌株抑菌圈平均直径表

药液浓度/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm				
	白色念珠菌	金黄色葡萄球菌	解淀粉芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌
0	8.905	9.404	9.272	9.574	10.644
31.25	9.310	9.618	9.573	9.821	10.979
62.5	9.460	9.714	9.935	10.166	11.602
125	9.324	10.302	10.828	10.367	12.826
250	9.105	9.916	10.230	10.242	11.377
500	8.911	9.821	9.571	9.978	10.976

2.2 稳定性实验(方差分析)

用 SPSS24.0 对药液浓度与抑菌圈直径大小的关系进行单因素方差分析, 所得结果如表 7 至表 11 所示, 分别为白色念珠菌抑菌圈直径方差分析、解淀粉芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析、金黄色葡萄球菌抑菌圈直径方差分析、巨大芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析、蜡样芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析, 通过数据可知, 黔产多花黄精对 5 种实验菌的抑菌圈直径方差显著性 $P < 0.05$, 具有统计学意义, 即黔产生黄精多糖对白色念珠菌、解淀粉芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌这 5 种菌的生长, 均具有良好的抑制效果。

表 7 白色念珠菌抑菌圈直径方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
组间	0.806	5	0.161	8.413	0.001

组内	0.230	12	0.019		
总计	1.036	17			

表 8 解淀粉芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
组间	1.427	5	0.285	6.406	0.004
组内	0.535	12	0.045		
总计	1.962	17			

表 9 金黄色葡萄球菌抑菌圈直径方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
组间	1.582	5	0.316	6.646	0.003
组内	0.571	12	0.048		
总计	2.154	17			

表 10 巨大芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
组间	11.524	5	2.305	27.029	0.001
组内	1.023	12	0.085		
总计	12.547	17			

表 11 蜡样芽孢杆菌抑菌圈直径方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
组间	2.930	5	0.586	6.849	0.003
组内	1.027	12	0.086		
总计	3.957	17			

2.3 抑菌剂活性测定

由图 1 可知，黔产生黄精多糖对这 5 种供试菌株均具有良好的抑菌效果。其中对巨大芽孢杆菌的抑菌效果最为明显，当药液浓度为 125mg/mL 时抑菌效果最好，作用最优；对白色念珠菌抑菌作用最弱。

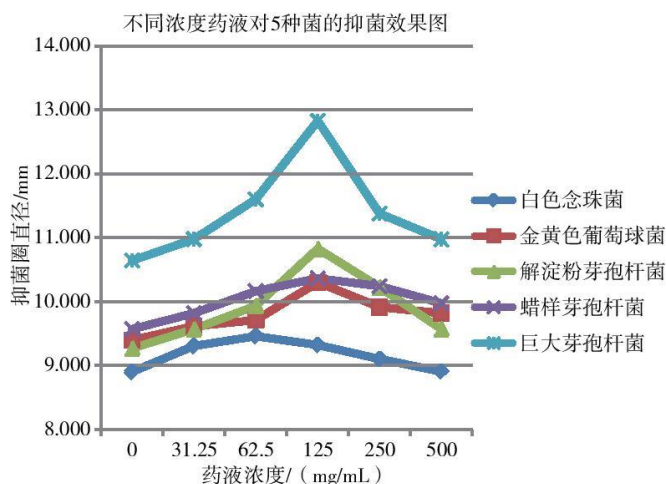


图 1 不同药物浓度对 5 种菌的抑菌效果

3 结论与讨论

1) 实验研究表明，黔产生黄精多糖对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌这 5 种试验菌株均具有良好的抑菌活性。其中，对白色念珠菌的最佳抑菌浓度为 62.5mg/mL, 对其他 4 个供试菌株的最佳抑菌浓度都为 125mg/mL。对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的最大平均抑菌圈直径分别为 9.460mm、10.302mm、10.367mm、10.828mm、12.826mm, 由此可见，黔产生黄精多糖对巨大芽孢杆菌的抑菌效果最优，最适浓度为 125mg/mL。

2) 生黄精多糖具有广谱抗菌性，本实验的研究结果将为生黄精进一步开发成天然抑菌剂提供理论基础和数据参考^[10]。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:306-307.
- [2] 王硕. 黄精的研究现状[J]. 农业科技通讯, 2020(1):46-47.
- [3] TANG C, YU Y M, QI Q L, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Polygonatum sibiricum*[J]. Journal of Asian natural products research, 2019, 21(3):197-206.
- [4] 李小沛, 张亚玉, 赵立春, 等. 黄精的化学成分和药理作用研究进展[J]. 植物学研究, 2017(5):255-261.
- [5] 骆文灿. 超声波辅助提取长梗黄精多糖工艺的研究[J]. 福建农业学报, 2016, 31(4):431-436.

[6]林志銮, 金晓怀, 张传海, 等. 超声辅助提取多花黄精多糖工艺及生物活性研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20):221-225.

[7]刘娜. 黄精多糖的分离、鉴定及免疫调节功效研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

[8]曹冠华, 李泽东, 赵荣华, 等. 生黄精多糖与制黄精多糖抑菌效果比较研究[J]. 食品科技, 2017, 42(9):202-206.

[9]周秋艳, 卿朕, 骆海玉, 等. 两株广西地不容内生真菌的抑菌活性研究[J]. 广东农业科学, 2016, 43(4):111-116.

[10]寸鹏飞, 张尹. 黄精在皮肤病中的应用举隅[J]. 亚太传统医药, 2017(22):85-86.