

落新妇苷对土茯苓醇提物体外抑菌活性的影响

魏玉娇¹, 郭晓强^{2*}, 周婷¹, 杨淞瑞², 何顺东², 余思琦¹, 周俊龙¹, 刘达玉¹

¹成都大学 食品与生物工程学院; ²成都大学 药学院, 成都 610106

摘要:落新妇苷是药食同源中药饮片土茯苓的主要活性成分, 具有抗氧化、抗菌和免疫抑制等多种生物活性, 本文重点探讨了落新妇苷含量对土茯苓醇提物体外抑菌活性的影响。以 70% 乙醇为溶剂超声波法提取制备土茯苓醇提物, HPLC 法测定醇提物中落新妇苷含量; 分别采用二倍稀释法和牛津杯法测定落新妇苷、土茯苓醇提物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌效果, 考察土茯苓醇提物中落新妇苷含量与其抑菌效果的量效关系。结果表明, 土茯苓醇提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 10、2.5、0.625 mg/mL, 均小于阳性对照乳酸链球菌素 (5 mg/mL); 醇提物浓度以及落新妇苷含量分别对 3 种供试菌株的抑菌效果均具有明显影响, 并呈一定的量效关系。落新妇苷与醇提物中其他成分之间可能存在联合抑菌效应, 尤其对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌作用显著。

关键词:土茯苓; 醇提取物; 落新妇苷; 抑菌活性

中图分类号: R281.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)Suppl-0008-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.002

Effect of astilbin on *in vitro* antibacterial activity of ethanol extracts from Smilacis Glabrae Rhizoma

WEI Yu-jiao¹, GUO Xiao-qiang^{2*}, ZHOU-Ting¹,
YANG Song-rui², HE Shun-dong², YU Si-qi¹, ZHOU Jun-long¹, LIU Da-yu¹

¹School of Food and Bioengineering, Chengdu University;

²School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Astilbin is the main active ingredient of Smilacis Glabrae Rhizoma (SGR) of the same origin of medicine and food, which has a variety of biological activities such as antioxidation, antibacteria and immunosuppression. In this paper, the effect of the content of astilbin on the antibacterial activity of SGR ethanol extracts was researched. With 70% ethanol as solvent, SGR extraction was prepared by ultrasonic wave. The contents of astilbin in the extracts were measured by HPLC. Two dilution method and Oxford cup method were used respectively to determine the bacteriostatic effect of astilbin and the extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, to explore the dose-effect relationship between the content of astilbin in the extracts and its antibacterial effect. The results showed that the MIC values of the extracts for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were 10, 2.5 and 0.625 mg/mL, respectively, which were lower than the positive control group of nisin (5 mg/mL). The concentration of the extracts and the content of astilbin had obvious influence on the antibacterial effect of the three strains, and showed a certain dose-effect relationship. There may be a combined bacteriostasis between astilbin and other components in the extracts, especially for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

Key words: Smilacis Glabrae Rhizoma; ethanol extracts; astilbin; antibacterial

土茯苓是百合科植物光叶菝葜的干燥茎根, 性味甘、淡、平。具除湿, 解毒, 通利关节之功能^[1]。始载于《名医别录》, 名禹余粮, 《本草纲目》始称土

茯苓, 属于药食两用植物。土茯苓中含有生物碱、甾体皂苷、黄酮及黄酮苷类、苯丙素类、鞣质等活性成分, 具有抗病毒、抗癌, 保护心血管, 改善血液循环, 预防糖尿病, 免疫抑制, 抗炎镇痛以及抑菌等药理作用^[2,3]。黄酮类化合物是土茯苓中最重要的活性成分, 其中, 落新妇苷是一种二氢黄酮醇鼠李糖

收稿日期: 2020-09-07

接受日期: 2021-01-13

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (2019YFS0525); 成都市科技局技术创新研发项目 (2018-YF05-01510-GX)

* 通信作者 Tel: 86-28-84200889; E-mail: gq2002@edu.edu.cn

苷,化学结构为 2(*R*),3(*R*)-3,3',4',5,7-四羟基黄烷酮-3- α -*L*-吡喃鼠李糖苷,是土茯苓中药饮片的质量控制指标和生物活性成分,中国药典规定其含量不得少于 0.45%^[4]。

土茯苓提取物具有的良好抗菌活性和药食同源特性,将其开发成天然食品防腐剂具有明显的优势。纪莉莲采用滤纸片扩散法研究了土茯苓水煎液对金黄色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等 8 种细菌均具有一定的抑制作用^[5]。Wang^[6]用同样的方法测定 100% 土茯苓浸出液对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌等 7 种细菌均具有明显的体外抑菌作用。Qin^[7]用水解蛋白胨肉汤测定粤东土茯苓水煎液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等 5 种细菌的体外实验,对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌有较强的抑菌作用。

黄酮类化合物对细菌具有抗菌活性,Zhao 等^[8]研究表明桑葚总黄酮对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌均具有不同程度的抑制作用。Zhang^[9]采用滤纸片法测定了金丝小枣黄酮对细菌和真菌有抑制生长的作用。黄酮类化合物通过损伤细菌细胞质膜,抑制细菌核酸的合成,抑制细菌的能量代谢,抑制细菌细胞壁的合成,抑制细菌细胞膜的合成等途径来达到抑菌效果^[10]。以上研究表明土茯苓水煎液具有良好的抑菌效果,落新妇苷作为土茯苓中主要黄酮类物质在抑菌方面的研究还未见报道。落新妇苷水溶性差,易溶于乙醇,不同的提取条件对提取物组成影响较大,从而影响其抗菌活性。研究土茯苓醇提物的抑菌活性与其主要活性成分落新妇苷的量效关系,有利于加速土茯苓作为天然食品防腐剂的研究与开发。本文采用超声波法制备土茯苓醇提物,以落新妇苷作为定量指标,研究落新妇苷含量影响土茯苓醇提物对食品中 3 种常见细菌的抑菌效果,及其量效关系。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

土茯苓(四川千方中药股份有限公司),蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉、芦丁、落新妇苷(纯度 $\geq 98\%$,上海泰坦科技股份有限公司),无水乙醇、氯化钠均为分析纯。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*),均由成都大学食品与生物工程学院实验中心微

生物实验室保存。

1.1.2 主要仪器设备

DHP060 恒温培养箱(上海实验仪器厂有限公司);SHZ-B 恒温振荡器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);UV5100B 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);LD-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津);RE-2000A 旋转蒸发仪(上海一科仪器有限公司);LDZX-75KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

2 实验方法

2.1 土茯苓醇提物的制备

土茯苓醇提物的制备参照魏玉娇^[11]等的文献,将土茯苓饮片放于 60℃ 烘箱中至恒重,然后粉碎并过 60 目筛。准确称取一定量的土茯苓粉末按照料液比 1:10 加入 70% 乙醇,浸泡 12 h。然后,25℃,40 kHz 下超声提取 30 min,静置 10 min 倒出上层提取液,剩余残渣再加入等体积的 70% 乙醇相同条件下超声 30 min,合并两次提取液,过滤,减压浓缩滤液至浸膏状,收率为 23.73%,加入适量的水溶解,真空冷冻干燥,制得土茯苓醇提物样品。

2.2 落新妇苷含量测定

2.2.1 落新妇苷色谱条件

色谱柱:SinoChrom ODS-BP 5 μm (4.6 mm \times 150 mm) 流动相:甲醇-0.1% 冰醋酸(35:65, V/V) 流速:1.0 mL/min,检测波长:291 nm,柱温:30℃,进样量:10 μL 。

2.2.2 落新妇苷标准曲线的绘制

精密称取 0.300 g 落新妇苷,用 70% 乙醇溶解配制成浓度分别为 30、15、7.5、3.75、1.875 mg/mL 的溶液。分别吸取溶液 10 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。以浓度(*C*, mg/mL)为横坐标,峰面积积分值(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $A = 4 \times 10^6 C - 3 \times 10^6$ ($R^2 = 0.9993$),表明落新妇苷在 1.875 ~ 30 mg/mL 之间具有良好的线性关系,可用来测定土茯苓醇提物中落新妇苷含量。

2.2.3 落新妇苷含量测定

用 70% 乙醇分别配制不同浓度的土茯苓醇提物样品溶液。用 0.22 μm 的针头滤膜过滤,按照“2.2.1”的条件进样,测定其峰面积,并将峰面积带入“2.2.2”的回归方程中,计算落新妇苷含量。

2.3 抑菌活性检测

2.3.1 培养基制备与菌种活化

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基。金黄色葡

萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 20 μL 分别接种于 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm 振荡培养 24 h, 进行活化, 紫外可见分光光度计 600 nm 下测 OD 值, 使菌液浓度达到 1×10^8 CFU/mL, 备用。

2.3.2 醇提物抑菌活性的测定

准确称取土茯苓醇提物样品 2.000 g, 用 70% 乙醇定容至 10 mL。参考文献^[12]采用牛津杯法测定抑菌活性, 实验组为 100 μL 浓度为 200 mg/mL 土茯苓醇提物, 空白对照组为 100 μL 70% 乙醇, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 观察抑菌圈的大小; 将牛津杯取出, 并用游标卡尺测量形成的抑菌圈直径(包含牛津杯直径 6 mm), 做三组重复实验。

2.3.3 醇提物最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

准确称取 2.000 g 土茯苓醇提物样品, 用 70% 乙醇溶解稀释为 200 ~ 0.781 0 mg/mL 的 9 个浓度梯度。采用二倍稀释法^[13]测定最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。每个样品浓度 3 个重复实验, 以及 1 个空白对照组。将各实验组置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 观察菌体的生长情况, 无菌平板的最低样品浓度即为最小抑菌浓度(MIC)。将样品浓度增加到高于及等于 MIC 的培养皿, 继续培养 24 h, 观察菌体的生长情况, 以无菌生长的最低样品浓度为土茯苓醇提物的 MBC 值。

2.3.4 醇提物浓度对抑菌效果的影响

取土茯苓醇提物样品 2.5 g, 加入 70% 乙醇溶解, 定容至 10 mL, 配制浓度为 0.25 g/mL 的储备液, 备用。将储备液稀释为 250、125、62.5、31.25、15.625 mg/mL 的样品溶液, 分别取 200 μL 加入到牛津杯中测定抑菌效果, 测量抑菌圈直径, 判断醇提物浓度与抑菌效果之间的关系。

2.3.5 落新妇苷浓度对抑菌效果的影响

准确称取 0.250 g 落新妇苷, 用 70% 乙醇定容到 10 mL, 超声波使其完全溶解, 作为落新妇苷储备液。然后将储备液稀释成 25、12.5、6.25、3.125 mg/mL 4 个浓度。测定落新妇苷溶液的抑菌性, 阴性对照为 70% 乙醇, 通过抑菌圈直径判断落新妇苷的抑菌效果。

2.3.6 落新妇苷含量对醇提物抑菌效果的影响

为了进一步研究土茯苓中落新妇苷含量对 3 种供试菌株抑菌效果的影响, 在上一步实验的基础上, 分别称取 50、30、10、5 mg 落新妇苷, 然后用 2 mL 土

茯苓醇提物样品溶液(0.1 mg/mL)溶解, 作为样品溶液。用 HPLC 法测定落新妇苷含量, 并取以上各个浓度的样品溶液 200 μL 测定其抑菌效果, 以 5 mg/mL 的乳酸链球菌素为阳性对照, 0.1 mg/mL 的样品溶液作为空白对照, 判断落新妇苷含量与土茯苓醇提物抑菌效果之间的关系。

2.4 统计方法

应用 spss17.0 软件进行统计分析, 各组测定值以平均值 \pm 标准差表示, 作图软件使用 Origin8.0。

3 结果与分析

3.1 醇提物抑菌活性的测定

牛津杯法测定土茯苓醇提物抑菌活性实验结果见表 1 和图 1, 200 mg/mL 的土茯苓醇提物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有一定的抑制作用, 其抑菌圈直径分别 20.91 ± 0.52 、 19.58 ± 0.58 、 13.80 ± 1.20 mm, 试样抑菌圈直径均大于空白对照(70% 乙醇), 且枯草芽孢杆菌抑菌圈直径最大, 表明土茯苓醇提物对枯草芽孢杆菌的抑制效果最好。

3.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

采用二倍稀释法测定土茯苓醇提物的 MIC 和 MBC, 实验结果见表 2。土茯苓醇提物对供试菌株的最小抑菌浓度(MIC)分别为大肠杆菌 10.00 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 2.50 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 0.625 mg/mL。最小杀菌浓度(MBC)分别为大肠杆菌 10 mg/mL, 金黄色葡萄球菌为 5 mg/mL, 枯草芽孢杆菌为 2.5 mg/mL。由 MIC 和 MBC 可以看出土茯苓醇提物对供试菌株的抑菌效果为: 枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌, 这与“3.1”中牛津杯法实验结果一致。土茯苓醇提物对革兰氏阳性和阴性菌均有抑制作用。

3.3 醇提物浓度对抑菌效果的影响

土茯苓醇提物浓度对供试菌株的抑菌效果具有

表 1 土茯苓醇提物抑菌活性的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

供试菌株 Bacterias	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	13.80 ± 1.20
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	19.58 ± 0.58
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	20.91 ± 0.52
空白对照 Control	6.00 ± 0.00

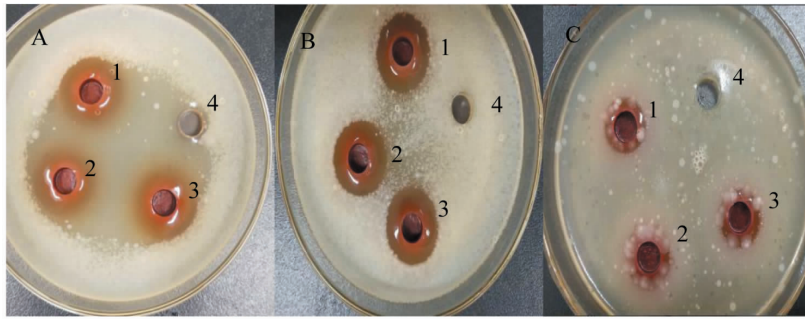


图1 土茯苓醇提物对供试菌株抑菌效果的比较

Fig.1 Comparison of antibacterial effects of the extracts

注:A为枯草芽孢杆菌;B为金黄色葡萄球菌;C为大肠杆菌;1、2、3分别为平行试验组;4为70%乙醇空白对照。Note:A is *B. subtilis*; B is *S. aureus*; C is *E. coli*. 1, 2 and 3 are parallel test groups respectively, and 4 is 70% ethanol blank control.

表2 土茯苓醇提物对供试菌株的MIC和MBC

Table 2 MIC and MBC of the extracts for the tested bacterias

供试菌株 Bacterias	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	10.00	10.00
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	2.50	5
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	0.625	2.5

明显影响,并呈明显的量效关系,浓度相同的试样对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果差异不明显,均明显优于大肠杆菌;随着醇提物浓度的不断增大,3种供试菌株的抑菌圈直径也不断增大,表明土茯苓醇提物浓度对3种供试菌株的抑菌效果有明显影响(表3)。

表3 土茯苓醇提物浓度对供试菌株的抑菌影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 The effect of the concentration of the extracts on the antibacteria of the tested strains($\bar{x} \pm s, n = 3$)

供试菌株 Bacterias	阴性对照 Negative control	醇提物浓度 Concentration of the extracts (mg/mL)				
		250	125	62.5	31.25	15.625
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	14.90 ± 0.55	12.94 ± 0.88	12.02 ± 0.10	11.10 ± 0.90	10.82 ± 0.53
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	24.28 ± 0.12	21.98 ± 0.86	20.46 ± 0.44	19.90 ± 0.61	17.74 ± 1.31
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	-	26.88 ± 0.93	23.30 ± 0.90	20.38 ± 0.98	19.20 ± 0.30	15.58 ± 0.74

注:“-”表示无抑菌圈;阴性对照为70%乙醇;牛津杯的直径为6mm;表中数据均为3组重复实验的平均值,下同。

Note:“-” means no zone of inhibition. The negative control is 70% ethanol. The diameter of the Oxford cup is 6 mm. The data in the table are the mean of 3 repeated experiments, the same below.

3.4 落新妇苷浓度对抑制效果的影响

由表4可知,落新妇苷浓度在25~3.125 mg/mL范围内对3种供试菌株有一定的抑菌效果,当落新妇苷浓度为25 mg/mL时,最大抑菌圈分别为大肠杆菌13.30 ± 0.92 mm,金黄色葡萄球菌14.98 ± 0.48 mm,枯草芽孢杆菌16.02 ± 0.98 mm。落新妇苷各实验组(25、12.5、6.25、3.125 mg/mL)对大肠杆菌的抑菌效果与落新妇苷浓度之间呈现一定的量效关系,但12.5、25 mg/mL实验组抑菌效果基本一致,提示落新妇苷浓度大于等于12.5 mg/mL时,抑制大肠杆菌的效果提高不明显;落新妇苷各实验组(25、12.5、6.25、3.125 mg/mL)对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果与落新妇苷浓度之间呈明显的量效关系。

落新妇苷各实验组对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑菌效果均明显优于大肠杆菌,提示落新妇苷对革兰氏阳性菌的抑菌效果可能优于革兰氏阴性菌。随着落新妇苷浓度(3.125~25 mg/mL)的提高,对供试菌株的抑菌圈直径增加,并且呈一定的量效关系,提示落新妇苷含量对土茯苓醇提物的抑菌效果可能是重要影响因素。

3.5 醇提物中落新妇苷含量对抑菌效果的影响

为了进一步验证落新妇苷含量对土茯苓醇提物抑菌效果的影响,按照“2.3.6”进行实验,HPLC法测定落新妇苷含量分别为0.76、3.26、5.76、15.76、25.76 mg/mL,抑菌实验结果见表5。随着土茯苓醇提物中落新妇苷浓度(0.76~25.76 mg/mL)的增加,三种供试菌株的抑菌圈直径也逐渐增加,呈现明

表4 落新妇苷浓度对供试菌株抑菌圈的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 The effect of the concentration of astilbin on the antibacteria of the tested strains($\bar{x} \pm s, n = 3$)

供试菌株 Bacterias	阴性对照 Negative control	落新妇苷浓度 Astilbin concentration(mg/mL)			
		3.125	6.25	12.5	25
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	11.64 ± 0.59	12.78 ± 0.47	13.28 ± 0.78	13.30 ± 0.92
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	13.30 ± 0.66	13.90 ± 0.16	14.28 ± 0.73	14.98 ± 0.48
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	-	13.70 ± 0.30	14.80 ± 0.14	15.34 ± 0.90	16.02 ± 0.98

显的量效关系;对比分析“3.4”和“3.5”实验结果,落新妇苷含量可能是土茯苓醇提物抑菌作用的重要

影响因素,对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果影响尤为显著。

表5 醇提物中落新妇苷含量对供试菌株抑菌圈的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 The effect of the content of astilbin in the extracts on the antibacteria of the tested strains($\bar{x} \pm s, n = 3$)(mm)

供试菌株 Bacterias	阳性对照 Positive control	落新妇苷含量 Astilbin content(mg/mL)				
		空白对照 Control		试样实验组 Sample experiment group		
		0 [#] (0.76)	1 [#] (3.26)	2 [#] (5.76)	3 [#] (15.76)	4 [#] (25.76)
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	10.92 ± 0.60	9.98 ± 0.19	10.02 ± 0.20	11.50 ± 0.31	12.88 ± 0.30	14.98 ± 0.40
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	9.92 ± 0.63	13.40 ± 0.71	13.98 ± 0.48	14.60 ± 0.50	16.18 ± 0.80	16.54 ± 0.63
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	9.40 ± 0.24	13.26 ± 0.50	14.36 ± 0.18	15.40 ± 0.35	16.02 ± 0.40	17.72 ± 0.82

注:阳性对照为5 mg/mL的乳酸链球菌素;空白对照为0.1 mg/mL的土茯苓醇提物;牛津杯的直径为6 mm;表中数据均为平均值。

Note: The positive control is 5 mg/mL nisin, and the blank control is 0.1 mg/mL the extracts. The diameter of the Oxford cup is 6 mm, and the data in the table are mean.

3.5.1 对大肠杆菌的影响

醇提物中落新妇苷含量对大肠杆菌抑菌性的影响如图2所示。试样实验组(3.26 mg/mL, 10.02 ± 0.20 mm)对大肠杆菌的抑制效果与阳性对照组(5 mg/mL 乳酸链球菌素, 10.92 ± 0.60 mm)基本接近,提示土茯苓醇提物对大肠杆菌的抑制效果优于乳酸链球菌素。试样实验组(15.76 mg/mL, 12.88 ± 0.30 mm)对大肠杆菌的抑菌效果次于落新妇苷实验组(12.5 mg/mL, 13.28 ± 0.78 mm),试样实验组(25.76 mg/mL, 14.98 ± 1.04 mm)对大肠杆菌的抑菌效果明显优于落新妇苷实验组(25 mg/mL, 13.30 ± 0.92 mm),提示高含量组(≥15.76 mg/mL)的土茯苓醇提物可能得益于落新妇苷和其他组分联合抑制大肠杆菌的效应,而低含量组(≤5.76 mg/mL)可能不具有联合抑菌效应。

3.5.2 对金黄色葡萄球菌的影响

醇提物中落新妇苷含量对金黄色葡萄球菌抑菌性的影响如图3所示。试样各实验组及空白对照组对金黄色葡萄球菌的抑制效果均显著优于阳性对照组(5 mg/mL 乳酸链球菌素)。试样实验组(5.76 mg/mL, 14.60 ± 0.05 mm)对于金黄色葡萄球菌的抑菌效果优于落新妇苷实验组(6.25 mg/mL, 13.90 ± 0.16 mm; 12.5 mg/mL, 14.28 ± 0.73 mm),提示

落新妇苷与醇提物中其他组分联合抑制金黄色葡萄球菌的效果显著。试样实验组(15.76 mg/mL, 16.18 ± 0.80 mm; 25.76 mg/mL, 16.54 ± 0.63 mm)抑菌效果均显著优于落新妇苷实验组(25 mg/mL, 14.98 ± 0.48 mm),但25.76 mg/mL实验组(16.54 ± 0.63 mm)较15.76 mg/mL实验组(16.18 ± 0.80 mm)的量效关系不显著;提示土茯苓醇提物中落新妇苷含量约为15.76 mg/mL时,对金黄色葡萄球菌可获得较好的量效比。

3.5.3 对枯草芽孢杆菌的影响

醇提物中落新妇苷含量对枯草芽孢杆菌抑菌性的影响如图4所示。试样各实验组及空白对照组对

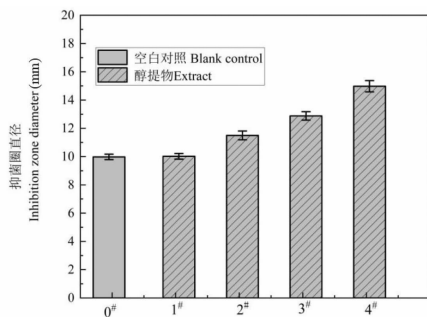


图2 醇提物中落新妇苷含量对大肠杆菌的影响

Fig. 2 The effect of the content of astilbin in the extracts on the antibacteria of *Escherichia coli*

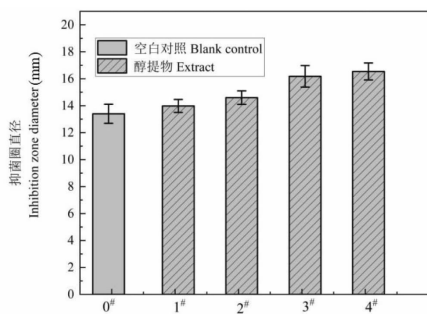


图3 醇提物中落新妇苷含量对金黄色葡萄球菌的影响

Fig. 3 The effect of the content of astilbin in the extracts on the antibacteria of *Staphylococcus aureus*

枯草芽孢杆菌的抑制效果均显著优于阳性对照组(5 mg/mL 乳酸链球菌素)。试样实验组(5.76 mg/mL、15.40 ± 0.35 mm)对于枯草芽孢杆菌的抑菌效果优于落新妇苷实验组(6.25 mg/mL、14.80 ± 0.14 mm; 12.5 mg/mL、15.34 ± 0.90 mm), 试样实验组(15.76 mg/mL、16.02 ± 0.40 mm)抑菌效果接近于落新妇苷实验组(25 mg/mL、16.02 ± 0.98 mm), 试样实验组(25.76 mg/mL、17.72 ± 0.82 mm)抑菌效果显著优于落新妇苷实验组(25 mg/mL、16.02 ± 0.98 mm);提示落新妇苷与醇提物中其他组分联合抑制枯草芽孢杆菌的效果显著,试样各实验组对枯草芽孢杆菌的抑制效果与醇提取中落新妇苷含量具有明显的量效关系。

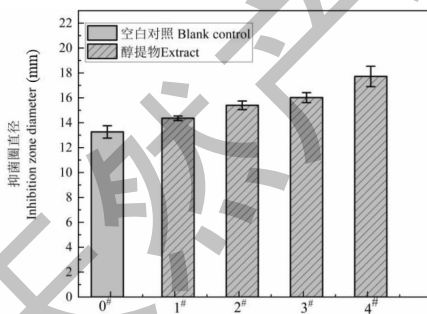


图4 醇提物中落新妇苷含量对枯草芽孢杆菌抑菌性的影响

Fig. 4 The effect of the content of astilbin in the extracts on the antibacteria of *Bacillus subtilis*

4 结论

分别采用牛津杯法和二倍稀释法考察土茯苓醇提物的体外抑菌效果,土茯苓醇提物对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 10、2.5、0.625 mg/mL, MBC 分别为 10、5、2.5 mg/mL,

抑菌效果顺序为枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌。土茯苓醇提物浓度对供试菌株的抑菌效果具有明显影响,并呈明显的量效关系,浓度相同的试样对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果差异不明显,但均明显优于大肠杆菌。不同浓度的落新妇苷对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑菌效果明显优于大肠杆菌,在实验浓度范围内(3.125 ~ 25 mg/mL)对 3 种供试菌株均呈现一定的量效关系,落新妇苷含量对土茯苓醇提物的抑菌效果可能产生重要影响。

通过在土茯苓醇提物中定量添加落新妇苷来验证其对醇提物抑菌效果的影响,醇提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制效果均明显优于乳酸链球菌素;随着土茯苓醇提物中落新妇苷含量(0.76 ~ 25.76 mg/mL)的增加,3 种供试菌株的抑菌圈直径也逐渐增加,且呈明显的量效关系;落新妇苷与醇提物中其他成分之间可能存在不同程度的联合抑菌效应,尤其对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑制作用显著。由于土茯苓醇提物组分复杂,落新妇苷与其他组分的联合抑菌机制还有待进一步研究。

因此,以药食同源植物土茯苓开发天然食品防腐剂的过程中,应以落新妇苷作为指标成分优化提取工艺的研究,提高其抑菌活性和资源利用率。土茯苓黄酮类化合物具有很大的应用前景,既可以作为天然防腐剂,也可用于保健食品开发,达到抑菌防腐和保健的双重效果。

参考文献

- Bai ZX, Cao XH, Sun CY, et al. A network pharmacology approach to explore the functional mechanisms of Bixie and Tufuling for treating gouty arthritis[J]. J Hainan Med Univ(海南医学院学报), 2020, 26: 611-617.
- Wang JP, Zhang HY, Fu XC. Advances in the research on chemical constituents and pharmacological action of *Smilax glabra* Roxb[[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2013, 25(1): 42-44.
- Fan GM, Ma Z. Research progress of *Smilax glabra* Roxb in pharmacy[J]. J Anhui Agr Sci(安徽农业科学), 2018, 46(8): 36-37.
- Zhang QF, Fu YJ, Huang ZW, et al. Aqueous stability of astilbin: effects of pH, temperature, and solvent[J]. J Agr Food Chem, 2013, 61: 12085-12091.
- Ji LL, Fan YM. Antibacterial activity of *Smilax glabra* Roxb

- decoction[J]. Chin J Biol Pharm(中国生化药物杂志), 2002,23:239-241.
- 6 Wang ZQ, Qiu SC, Song HY, et al. Study on in vitro antibacterial effect of *Smilax glabra* Roxb[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006,17:2203-2204.
 - 7 Qin R, Wu DR. Test on the antibacterial effect of the decocting liquid of *Smilax glabra* Roxb in eastern Guangdong[J]. J Mod Med Health(现代医药卫生), 2006,22:1039-1040.
 - 8 Zhao ZY, Huo Y, Zhang YM, et al. Analysis of antioxidant and antibacterial activity of total flavonoids of mulberry[J]. Feed Res(饲料研究), 2020,43(10):69-73.
 - 9 Zhang ZY, Song LL, Kang JJ, et al. Study on extraction method and antioxidant resistance of flavonoids *Ziziphus jujuba* [J]. North Horticulture(北方园艺), 2020(8):101-108.
 - 10 You TH, Liu F, Wen L, et al. Advance in studies on antibacterial effect of flavonoids[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013,38:3645-3650.
 - 11 Wei YJ, Guo XQ, Yang SR, et al. Technical study on optimization of extraction process of astilbin from *Smilax glabra* Roxb by response surface method[J]. J Chengdu Univ: Nat Sci(成都大学学报:自科版), 2019,38:251-255.
 - 12 Zhou F, Xiong HT, Zhang J. The inhibitory effect of antimicrobial peptide against four kinds of harmful microorganisms by the Oxford cup method[J]. Feed Ind(饲料工业), 2018,39(6):48-51.
 - 13 Feng LH, Li YQ, Zhang X. Study on bacteriostatic effects of three natural preservatives on five common microorganisms [J]. Chin Condiment(中国调味品), 2019,44(1):63-66.
-
- (上接第 69 页)
- 15 Zheng YL, Zhang CX. Progress of research of chemical constituents from *Panax quinquefolius* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 1989,24:524-526.
 - 16 Chen GG, Wu LJ, Guo DA, et al. Microbial transformation of 20(S)-protopanaxatriol-type saponins by *Absidia coerulea* [J]. J Nat Prod, 2007,70:1203-1206.
 - 17 Teng RG, Li HZ, Chen JT, et al. Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR data for nine protopanaxatriol glycosides [J]. Magn Reson Chem, 2002,40:483-488.
 - 18 Lee JH, Choi SH, Lee BH, et al. Modifications of aliphatic side chain of 20(S)-ginsenoside Rg₃ cause an enhancement or loss of brain Na channel current inhibitions [J]. Biol Pharm Bull, 2008,31:480-486.
 - 19 Liao PY, Wang D, Zhang YJ, et al. Dammarane-type glycosides from steamed notoginseng [J]. J Agr Food Chem, 2008,56:1751-1756.
 - 20 Gu CZ, Xu M, Zhang YJ, et al. Triterpenoids with promoting effects on the differentiation of PC12 Cells from the steamed roots of *Panax notoginseng* [J]. J Nat Prod, 2015,78:1829-1840.
 - 21 Liu XY, Wang S, Zhang DM, et al. Dammarane-type saponins from the leaves of *Panax notoginseng* and their neuroprotective effects on damaged SH-SY5Y cells [J]. Phytochem, 2018,145:10-17.
 - 22 Yoshizaki K, Yahara S. New triterpenoid saponins from fruits specimens of *Panax japonicus* collected in Kumamoto and Miyazaki prefectures(1) [J]. Chem Pharm Bull, 2012,60:354-362.
 - 23 Yao CL, Pan HP, Guo DA, et al. Global profiling combined with predicted metabolites screening for discovery of natural compounds: characterization of ginsenosides in the leaves of *Panax notoginseng* as a case study [J]. J Chromatogr A, 2018,1538:34-44.
 - 24 Li PY. NMR Standard Chromatogram of Ginsenoside(人参皂苷 NMR 标准图谱) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012.
 - 25 Matsumori N, Kaneno D, Murata M, et al. Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. a method of configuration analysis for natural products [J]. J Org Chem, 1999,64:866-876.
 - 26 Jeanneret-Gris G, Pousaz P. Enantiomers of Mosher's acid chloride first unambiguous determination of their maximum rotatory power [J]. Tetrahedron Lett, 1990,31(1):75-76.
 - 27 Bari LD, Pescitelli G, Pratelli C, et al. Determination of absolute configuration of acyclic 1,2-diols with Mo₂(OAc)₄. 1. Sznatke's method revisited [J]. J Org Chem, 2001,66:4819-4825.