

何首乌不同溶剂提取液的体外抑菌活性研究

潘小翠, 边才苗, 管 铭

(台州学院生命科学学院, 浙江 台州 318000)

摘要:采用 60% 丙酮、70% 乙醇、沸水 3 种溶剂制备何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thumb) 块根粉末提取液, 以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为供试菌株, 通过滤纸片琼脂扩散法测定提取液的抑菌圈大小, 以平板二倍稀释法测定最低抑菌浓度 (MIC), 以试管二倍稀释法测定最低杀菌浓度 (MBC)。结果表明, 何首乌 3 种溶剂提取液对供试菌株均有明显的抑制作用, 其中 60% 丙酮提取液和 70% 乙醇提取液抑菌效果优于沸水提取液, 且对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强, 丙酮提取液和乙醇提取液的抑菌、杀菌效果随浓度的降低而下降。

关键词:何首乌; 抑菌活性; 体外测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2013)18-4390-04

In vitro Antimicrobial Activity of Different Solvent Extracts from *Polygonum multiflorum*

PAN Xiao-cui, BIAN Cai-miao, GUAN Ming

(College of Life Science, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China)

Abstract: *Polygonum multiflorum* root tuber was extracted with 60% acetone, 70% ethanol and boiled water, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* were used as the tested strains. The diameters of inhibition zone were determined by agar diffusion method using filter paper. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by agar dilution method and minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by tube dilution method. The results showed that three extracts of *P. multiflorum* all had significant inhibition on the tested strains, the inhibitory effect of acetone and ethanol extracts was higher than that of water extracts, and the inhibition was the strongest on *Staphylococcus aureu*. The antimicrobial activity of acetone and ethanol extracts decreased with the reduction of the concentration.

Key words: *Polygonum multiflorum*; antimicrobial activity; *in vitro* determination

何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thumb) 为蓼科蓼属植物, 其块茎为滋补良药^[1], 中医用于治疗肝肾精血亏虚、头昏目眩、须发早白、腰酸遗精、胆固醇过高等^[2]。

植物中的萜类、酚类、生物碱类、黄酮类、苷类和醌类等化合物具有杀菌作用^[3]。何首乌中含有蒽醌类化合物、二苯乙烯苷类化合物和磷脂类化合物等活性成分, 其中二苯乙烯苷可能是主要的活性成分^[4]。研究表明何首乌能提高或改善小鼠的记忆能力, 减轻钙超载引起的脑损伤, 保护神经系统^[5,6]; 能明显提高小鼠的记忆力, 提高脑内超氧化物歧化酶

和过氧化氢酶活性^[7]; 何首乌 70% 乙醇提取液可有效对抗 D-半乳糖所致的小鼠亚急性衰老, 具有抗衰老作用^[8]。试验探讨了何首乌 3 种不同溶剂提取液对 4 种常见致病菌的抑菌活性, 以期为何首乌的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 何首乌块根, 购于临海市临江大药房, 经 70 °C 烘干后研磨成粉末, 贮存于干燥皿中。

1.1.2 供试菌株与培养基 供试菌株为金黄色葡

收稿日期: 2012-12-14

基金项目: 台州学院青年基金项目 (2013QN15)

作者简介: 潘小翠 (1986-), 女, 安徽安庆人, 硕士, 主要从事微生物学教学实验工作, (电话) 13575827596 (电子信箱) panxiaocui061003@163.com; 通讯作者: 边才苗, 副教授, (电子信箱) bcm@tzc.edu.cn。

萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*),均由浙江省台州医院惠赠,为临床分离菌株。牛肉膏蛋白胨培养基按文献[9]配制,121 °C高压灭菌 20 min 备用。

1.1.3 主要仪器 HVE-50 型高压灭菌锅 (日本 Hirayama Manufacturing 公司);YJ 型医用净化工作台 (苏州洁净技术研究所);RE-52CS 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂);DNP-9272 型电热恒温培养箱 (上海精宏实验设备公司),QYC-2102C 型全温培养摇床 (宁波江南仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 何首乌提取液制备 称取何首乌粉末 100 g,分别用 60%丙酮、70%乙醇和沸水 3 种溶剂浸提,反复多次,直至浸出液颜色变淡为止。将浸出液合并浓缩至 80 mL,用 NaOH 调 pH 至 7.0,定容至 100 mL,制成浓度为 1 000 mg/mL 的何首乌提取液,提取液过 0.22 μm 滤膜除菌,贮存于 4 °C 冰箱中。

1.2.2 菌液的制备 菌种接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中,30 °C 活化 24 h 后取 50 μL 接入 5 mL 牛肉膏液体培养基中,30 °C 培养 6 h 后,取出稀释 10⁴、10⁵、10⁶ 倍,涂牛肉膏蛋白胨平板,30 °C 倒置培养 24 h,统计菌落。

1.2.3 抑菌圈的测定 用滤纸片琼脂扩散法测定何首乌不同溶剂提取液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和肺炎克氏菌的抑菌活性。将直径为 6 mm 的无菌滤纸片分别置于何首乌乙醇提取液、丙酮提取液和沸水提取液中浸泡 20 min。将菌液稀释至 10⁶ CFU/mL,取 100 μL 涂平板,于培养箱内倒置培养 15~20 min,待培养基表面干燥后,分别贴上已浸泡过的滤纸片,每处理 4 个重复,于 30 °C 恒温培养 24 h,测量抑菌圈直径。以涂布 100 U/mL 硫酸链霉素溶液为的阳性对照,以涂布无菌水的为阴性对照。

1.2.4 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定 用平板二倍稀释法测定丙酮提取液和乙醇提取液对 4 种供试菌的抑菌效果。分别配制提取液终浓度为 200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 mg/mL 的牛肉膏蛋白胨平皿固体培养基,每组 4 个重复。平皿中涂布活化后的菌液 (10⁴ CFU/mL) 20 μL,30 °C 倒置培养 24 h,进行菌落计数,与对照 (无菌水) 相比计算抑菌率。以没有供试菌生长的最小浓度为提取液的 MIC。

1.2.5 最低杀菌浓度 (MBC) 的测定 用试管二倍稀释法测定丙酮提取液和乙醇提取液对 4 种供试菌的杀菌效果。配制提取液终浓度为 500.0、250.0、125.0、62.5 mg/mL 的试管液体培养基,每组 4 个重

复。每支试管中加入菌液 (10⁵ CFU/mL) 100 μL,30 °C 振荡培养 3、6、12 h 后,分别取培养液 20 μL,涂布于牛肉膏固体平板上,30 °C 倒置培养 24 h 后进行菌落计数,与对照 (无菌水) 相比计算杀菌率和最低杀菌浓度 (MBC)。以平板上菌落少于 5 个的最小浓度为提取液的 MBC。

1.2.6 数据统计分析 数据用 Excel、SPSS 13.0 软件辅助处理,结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 何首乌不同提取液的抑菌效果

滤纸片琼脂扩散法测定结果 (表 1) 显示,何首乌 3 种溶剂提取液对 4 种供试菌株均有明显的抑制作用,丙酮提取液和乙醇提取液抑菌效果优于沸水提取液。对于金黄色葡萄球菌和肺炎克氏菌,丙酮提取液和乙醇提取液的抑菌圈均显著大于沸水提取液;对于大肠杆菌,丙酮提取液的抑菌圈最大,显著大于沸水提取液;对于绿脓杆菌,乙醇提取液的抑菌圈最大,显著大于沸水提取液。

表 1 何首乌不同提取液的抑菌圈情况 (单位:mm)

菌株	丙酮提取液	乙醇提取液	沸水提取液	硫酸链霉素
金黄色葡萄球菌	11.38±0.64 a	11.83±0.67 a	9.33±0.57 b	27.43±1.18
绿脓杆菌	10.13±0.43 ab	10.87±0.53 a	9.10±0.52 b	24.38±1.10
大肠杆菌	10.43±0.56 a	10.05±0.47 ab	9.28±0.56 b	29.45±1.03
肺炎克氏菌	11.03±0.71 a	10.33±0.61 a	9.13±0.48 b	26.38±1.08

注:表中同行数字后不同小写字母表示在 0.05 水平上有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 何首乌不同提取液的最低抑菌浓度

2.2.1 丙酮提取液的最低抑菌浓度 何首乌丙酮提取液最低抑菌浓度的测定结果 (表 2) 显示,何首乌丙酮提取液对 4 种供试菌株的抑菌效果不尽相同。最低抑菌浓度,金黄色葡萄球菌为 50.0 mg/mL,大肠杆菌为 100.0 mg/mL,绿脓杆菌和肺炎克氏菌均为 200.0 mg/mL;在未达到完全抑制的浓度下,抑菌效果随着提取液作用浓度的降低而显著降低。在提取液浓度为 50.0 mg/mL 时,抑菌效果从高到低依次为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克氏菌、绿脓杆菌,100.0 mg/mL 提取液也表现出相近情况。

2.2.2 乙醇提取液的最低抑菌浓度 乙醇提取液的最低抑菌浓度测定结果 (表 3) 显示,何首乌乙醇提取液对 4 种供试菌株的抑菌效果不同。对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度为 100.0 mg/mL,对其他 3 种均为 200.0 mg/mL;在未达到完全抑制时,抑菌效果随着提取液作用浓度的降低而显著降低。在提取液浓度为 25.0 mg/mL 时,抑菌效果从高到低依次为金黄色葡萄球菌、肺炎克氏菌、绿脓杆菌、大肠杆

表2 何首乌丙酮提取液的最低抑菌浓度测定结果

菌株	抑菌率/%				
	200.0 mg/mL	100.0 mg/mL	50.0 mg/mL	25.0 mg/mL	12.5 mg/mL
金黄色葡萄球菌	100.00±0.00 aA	100.00±0.00 aA	100.00±0.00 aA	88.76±2.04 bB	68.94±1.57 cC
绿脓杆菌	100.00±0.00 aA	94.19±1.34 bB	87.37±2.51 cC	73.23±2.14 dD	57.19±2.42 eE
大肠杆菌	100.00±0.00 aA	100.00±0.00 aA	96.34±1.12 bB	79.92±2.42 cC	56.94±2.45 dD
肺炎克氏菌	100.00±0.00 aA	98.23±1.05 bA	91.16±1.96 cB	72.47±2.62 dC	56.44±2.55 eD

注:表中同行数字后不同小写字母表示在0.05水平上有显著性差异($P<0.05$),不同大写字母表示在0.01水平上有显著性差异($P<0.01$),下表同。

表3 何首乌乙醇提取液的最低抑菌浓度测定结果

菌株	抑菌率/%				
	200.0 mg/mL	100.0 mg/mL	50.0 mg/mL	25.0 mg/mL	12.5 mg/mL
金黄色葡萄球菌	100.00±0.00 aA	100.00±0.00 aA	88.76±2.41 bB	73.23±2.51 cC	57.83±2.62 dD
绿脓杆菌	100.00±0.00 aA	89.77±2.31 bB	76.14±2.31 cC	58.08±2.89 dD	49.87±2.20 eE
大肠杆菌	100.00±0.00 aA	83.21±2.68 bB	71.21±2.77 cC	56.82±2.62 dD	50.38±2.16 eE
肺炎克氏菌	100.00±0.00 aA	99.12±0.48 bA	85.86±2.89 cB	70.83±2.55 dC	56.06±2.67 eD

菌,100.0、50.0 mg/mL提取液也表现出类似情况。

2.3 何首乌提取液的最低杀菌浓度

何首乌丙酮提取液的最低杀菌浓度测定结果(表4)显示,丙酮提取液对4种供试菌均有一定的杀菌效果。在提取液浓度为500.0 mg/mL时,杀菌率均超过96%;而浓度低于500.0 mg/mL时,只有对金黄色葡萄球菌的杀菌率能达到95%,且随着作用浓度的降低,杀菌效果显著下降。随着培养时间的延长,作用浓度为500.0 mg/mL时的杀菌率总体上略有提高,其他浓度则明显下降,其中3 h与12 h的差异达到显著水平,说明丙酮提取液的杀菌效果不仅决定于浓度,还与培养时间有一定的关系。

何首乌乙醇提取液的最低杀菌浓度测定结果(表5)显示,乙醇提取液对4种供试菌株均有一定的杀菌效果。在提取液浓度为500.0 mg/mL时,杀菌率均超过96%;在低于500.0 mg/mL时,杀菌率均

未达到95%,且随着作用浓度的降低,杀菌效果显著下降。随着培养时间的延长,浓度为500.0 mg/mL时总体上杀菌率略有提高,其他浓度则明显下降,其中3 h与12 h的差异达到显著水平,说明乙醇提取液的杀菌效果不仅决定于浓度,还与培养时间有一定的关系。

3 小结与讨论

何首乌具有抗菌、抗氧化、抗衰老、抗动脉粥样硬化、降血脂以及提高免疫系统功能等多种作用,临床上主要用于治疗高血脂^[10,11]。何首乌水煎液对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌、宋内氏痢疾杆菌、伤寒杆菌等均有不同程度的抑制作用,其有效作用成分可能是蒽醌类化合物及其衍生物^[12]。本研究采用丙酮、乙醇和沸水3种溶剂对何首乌块根进行提取,结果表明,3种溶剂提取液对金

表4 何首乌丙酮提取液的最低杀菌浓度测定结果

培养时间 h	菌株	杀菌率/%			
		500.0 mg/mL	250.0 mg/mL	125.0 mg/mL	62.5 mg/mL
3	金黄色葡萄球菌	97.12±1.32 aA	95.03±1.31 aA	83.77±2.49 bB	71.73±2.70 cC
	绿脓杆菌	96.07±1.57 aA	92.15±2.49 bA	79.84±3.13 cB	68.32±2.32 dC
	大肠杆菌	96.60±1.79 aA	92.41±2.16 bA	80.89±2.75 cB	69.11±3.02 dC
	肺炎克氏菌	96.86±1.91 aA	92.93±2.32 bA	81.41±2.32 cB	69.37±3.13 dC
6	金黄色葡萄球菌	97.91±1.48 aA	93.46±1.79 bA	80.37±2.16 cB	69.11±3.26 dC
	绿脓杆菌	96.34±1.35 aA	90.84±1.57 bA	78.80±2.32 cB	67.54±2.56 dC
	大肠杆菌	96.86±1.48 aA	91.36±2.16 bA	77.75±2.16 cB	68.59±2.70 dC
	肺炎克氏菌	97.38±1.81 aA	91.62±1.91 bA	79.06±2.70 cB	67.28±2.88 dC
12	金黄色葡萄球菌	98.17±1.57 aA	90.05±1.35 bB	78.01±1.91 cC	66.23±2.62 dD
	绿脓杆菌	97.12±1.79 aA	86.39±2.26 bB	75.92±3.31 cC	65.18±2.47 dD
	大肠杆菌	97.38±1.35 aA	87.17±2.62 bB	76.70±2.62 cC	64.66±3.13 dD
	肺炎克氏菌	97.91±0.85 aA	86.91±2.18 bB	75.65±3.46 cC	64.40±3.31 dD

表 5 何首乌乙醇提取液的最低杀菌浓度测定结果

培养时间 h	菌株	杀菌率/%			
		500.0 mg/mL	250.0 mg/mL	125.0 mg/mL	62.5 mg/mL
3	金黄色葡萄球菌	97.38±1.35 aA	94.76±1.48 aA	82.46±2.88 bB	71.20±2.77 cC
	绿脓杆菌	96.86±1.21 aA	93.19±2.18 bA	80.37±2.62 cB	68.85±2.62 dC
	大肠杆菌	96.07±1.57 aA	90.31±2.32 bA	79.84±3.13 cB	68.32±3.13 cC
	肺炎克氏菌	97.12±1.32 aA	93.46±1.79 aA	80.63±2.77 bB	68.59±2.26 cC
6	金黄色葡萄球菌	98.17±1.32 aA	92.93±2.32 bA	79.58±3.26 cB	67.54±1.91 dC
	绿脓杆菌	97.38±2.00 aA	91.36±2.16 bA	78.80±2.32 cB	66.49±3.08 dC
	大肠杆菌	96.34±0.43 aA	89.53±1.91 bA	77.75±2.16 cB	65.97±3.26 dC
	肺炎克氏菌	97.64±1.79 aA	92.15±1.35 bA	79.06±2.70 cB	67.02±2.77 dC
12	金黄色葡萄球菌	97.91±1.71 aA	91.10±2.18 aA	76.18±2.32 bB	63.61±2.32 cC
	绿脓杆菌	97.64±1.32 aA	88.74±2.32 bB	75.65±2.88 cC	61.26±2.56 dD
	大肠杆菌	96.07±1.32 aA	86.39±2.70 bB	73.33±3.26 cC	60.21±2.70 dD
	肺炎克氏菌	97.38±1.81 aA	89.79±2.16 bB	74.61±2.62 cC	61.78±2.18 dD

黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和肺炎克氏菌均有明显的抑制作用,且丙酮提取液和乙醇提取液作用效果优于沸水提取液。说明何首乌块根中主要抑菌成分可能是脂溶性的,如醌类化合物及其衍生物;但沸水提取液也有一定的抑菌作用,说明何首乌的抑菌物质还包含一些水溶性成分。何首乌中主要活性成分二苯乙烯苷具有良好的水溶性,沸水提取液表现出的抑菌活性可能与二苯乙烯苷类有一定的关系,具体情况有待进一步研究。丙酮提取液和乙醇提取液对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,最低抑菌浓度分别为 50.0 和 100.0 mg/mL。但最低杀菌浓度检测显示,在作用浓度低于 500.0 mg/mL 时,培养液中的活菌数随培养时间延长呈现增加趋势,说明两种提取液的主要作用是抑菌。丙酮提取液和乙醇提取液杀菌效果不仅取决于浓度,且与作用时间、菌株有一定的关系,提示临床用药要综合考虑药物的作用时间、浓度和所针对的菌株。

参考文献:

- [1] 张 芹.何首乌的滋补功效[J].养生保健中成药,2006(4):45.
 [2] 庄玉林.何首乌补肾益血[J].医药与保健,1997(10):45.
 [3] 吴传万,杜小凤,王伟中.植物源抑菌活性成分研究进展[J].淮阴

工学院学报,2004,13(3):28-33.

- [4] 李建北,林 茂.何首乌化学成分的研究[J].中草药,1993,24(3):115-118.
 [5] 楚 晋,叶翠飞,李 林,等.二苯乙烯苷对 D-半乳糖致脑老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响[J].中国药房,2005,16(1):13-16.
 [6] 刘治军,李 林,叶翠飞,等.二苯乙烯苷对脑缺血啮齿动物脑 NMDA 受体及细胞内钙离子的影响[J].中国药理学通报,2003,19(10):1112-1115.
 [7] 杨小燕.制何首乌多糖对痴呆模型小鼠学习记忆能力及脑内酶活性的影响[J].药学进展,2005,29(12):557-559.
 [8] 宋士军,李芳芳,岳 华.何首乌的抗衰老作用研究[J].河北医科大学学报,2003,24(2):90-91.
 [9] 沈 萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].第三版.北京:高等教育出版社,1999.
 [10] RYU G, JU J H, PARK Y J, et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum* [J]. Arch Pharm Res, 2002,25(5):636-639.
 [11] 方 微,秦彦文,王绿娅.何首乌总苷调血脂抗氧化的实验研究[J].中国药物应用与监测,2005(1):48-51.
 [12] 苏焕群,陈再智.何首乌药理研究进展[J].中药材,1993,16(2):34-35.

(责任编辑 陈 焰)