

文章编号: 1674-7054(2017)02-0220-05

## 黄芩抗金黄色葡萄球菌提取工艺的优化

葛慧芳<sup>1,2</sup> 陈继承<sup>1</sup> 张孝林<sup>2</sup> 庞杰<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学, 福州 350002; 2. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100)

**摘要:** 以纸片扩散法测抑菌圈大小为指标, 设计正交试验确定黄芩水提物中活性组分抗金黄色葡萄球菌的最佳浸提工艺。并进一步研究黄芩水提物最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)。结果表明: 黄芩水提物抗金黄色葡萄球菌的最佳提取工艺为提取温度 80 ℃, 料液比 1: 60 (g · mL<sup>-1</sup>), 提取时间 1 h。MIC 为 6.25 g · L<sup>-1</sup>; MBC 为 25 g · L<sup>-1</sup>。

**关键词:** 黄芩; 水提物; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: Q 949.777.6

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2017.02.016

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* S. a)是常见革兰氏阳性致病菌,能够引起临床上化脓性感染。因滥用抗生素及医学植入材料 S. a 的感染率呈逐年上升,多重耐药 S. a 及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的检出率尤为突出。S. a 耐药机制中细菌生物膜(Bacterial biofilm, BF)是引起 S. a 耐药主要因素,是目前研究的热点<sup>[1-2]</sup>。葡萄球菌生存能力强,是导致伪膜性肠炎、心包炎、肺炎、全身感染、败血症等的罪魁祸首<sup>[3]</sup>。金黄色葡萄球菌给人们的日常生活造成困扰,亟待解决。黄芩<sup>[4-5]</sup>(*Scutellaria baicalensis georgii*)是唇形科植物黄芩的干燥根,有抗病毒、抗炎、抗菌、抗氧化、抗癌及保护心脑血管等作用<sup>[6-7]</sup>,对呼吸道感染、温热病、痢疾、高血压等症也有较好疗效<sup>[4]</sup>。目前黄芩的研究较多,姚亚红、张立伟<sup>[8]</sup>采用超声提取黄芩乙醇提取物,结果显示以 1:10 的料液比超声提取 2 次,时间 30 min,可得到较高量的黄芩乙醇提取物。杜仲业等进行了黄芩素对金黄色葡萄球菌生物膜抑制作用的体外研究<sup>[1-3]</sup>,其他研究表明黄芩发挥抑菌效果的部分有效成分有黄芩苷<sup>[8-9]</sup>、汉黄芩苷<sup>[10]</sup>、黄芩素<sup>[11-14]</sup>和汉黄芩素<sup>[15]</sup>等。王雪等<sup>[16]</sup>通过中心组合设计-响应面法探究其对白色念珠菌的作用,还有研究黄芩抗龋菌活性等<sup>[17-18]</sup>。这些研究主要集中在药物活性物质提取方法、含量测定等方面,提取工艺有待进一步研究。本研究从影响水提物活性成分的浸提温度、浸提时间和料液比确定黄芩水提物的最佳浸提工艺,采用倍比稀释法确定黄芩水提物的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),为应用黄芩治疗金黄色葡萄球菌感染提供理论依据和技术方法。

### 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** 黄芩(购自凤阳华佗大药房,由安徽科技学院时维静教授鉴定为正品),黄芩根放置于烘箱 50 ℃烘干 12 h,然后用粉碎机粉碎并过 40 目筛备用。LB 肉汤、LB 琼脂、金黄色葡萄球菌(保存于安徽科技学院细胞与分子生物学实验中心)。DK-8D 恒温水浴锅、ZWYR-D2402 恒温培养振荡器、SHZ-DIII 循环水式多用真空泵、LDZX-30KBS 高压蒸汽灭菌箱、超洁净工作台、SPX-8013 生化培养箱。

**1.2 菌种的复苏和活化** 将保存的金黄色葡萄球菌放置恒温培养箱中复活,待用。

**1.3 含药纸片的制备** 用打孔机将质地均匀的滤纸打成直径 5 mm 的圆片,存放于干燥洁净试管中,120 ℃干热灭菌 2 h。每 10 张圆片加 1 mL 提取液浸泡,真空干燥备用。

收稿日期: 2016-12-12

修回日期: 2017-02-13

作者简介: 葛慧芳(1992-)女,福建农林大学 2016 级硕士研究生. E-mail: ghfjulia@163.com

通信作者: 陈继承(1978-)男,副教授,研究方向:生物活性成分检测与功能性食品. E-mail: newtaicjc@163.com

1.4 抑菌效果的检测 琼脂培养基制备方法均参照说明书进行。将供试菌接种到琼脂培养基上,用无菌镊子将1.3的滤纸均匀贴在培养皿表面,并置37℃恒温培养24h,用游标卡尺测量抑菌圈大小。一般情况下抑菌圈越大表示药物抑菌作用越强,即此菌对此药敏感度越高。

1.5 提取物抑菌作用的单因素考察 取黄芩粗粉5g,用蒸馏水按1:20的料液比分别在60,70,80,90,100℃水浴提取3次,每次0.5h,将提取液合并浓缩制成 $0.50\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水溶液,用纸片法测抑菌圈大小,确定最佳提取温度;在最佳提取温度下,以料液比为1:20,1:30,1:40,1:50,1:60( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )按上述操作,确定最佳料液比。在最佳料液比和提取温度下,分别在0.5,1,1.5,2,2.5h按上述操作,确定最佳提取时间。

1.6 正交试验设计 分析1.3结果确定最佳因素,设计3因素和3水平的正交试验。

### 1.7 黄芩抑菌效果的检测

1.7.1 最小抑菌浓度的检测 参考王江桥等<sup>[19-21]</sup>采用试管2倍稀释法检测中草药的MIC,此方法中采用药物前后自身对照。取原黄芩水提原液用肉汤培养基稀释2.5倍,稀释后的黄芩水浓度为 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,再按倍比稀释法稀释至 $2^{-9}$ 共10个稀释度,稀释的倍数依次为1:1,1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256,1:512。同时设置阳性对照为肉汤培养基2mL;阴性对照组为提取原液1:1稀释,即提取原液与肉汤培养基各取1mL。所用试管经高压灭菌箱121℃灭菌30min,除阴性对照外,各处理分别接种20μL的菌悬液,并置于37℃恒温箱中培养24h后观察结果。

1.7.2 结果判定 以观察阳性对照管呈浑浊状长菌,阴性对照管呈透明状不长菌为前提,药物前后自身对照。依次观察剩余试管的浑浊情况,判断药液的不同浓度抑菌作用,若试管内出现浑浊,说明有细菌生长(+),若试管内澄清透明,证明无菌生长(-)<sup>[22-24]</sup>。肉眼观察出现浑浊前一试管的药物浓度记为MIC;如果药液有很深的色素,可采取重新接种后观察。取上述各培养液分别接种于普通琼脂培养基,置37℃恒温箱内培养24h后观察结果。若培养皿上无金黄色葡萄球菌生长,说明药物具有杀菌的作用,无菌落出现的前一试管药物浓度记为MBC。

## 2 结果与分析

2.1 黄芩水提物对金黄色葡萄球菌抑制作用单因素试验结果 图1-A显示随时间延长,黄芩水提物抑菌效果呈下降趋势,这可能是持续高温破坏了黄芩水提物的部分活性成分,同时黄芩水提物的成分也可能有变化,在1h时抑菌效果最好;不同温度单因素试验结果(图1-B)表明,料液比为1:20提取0.5h时,黄芩水提物抑菌效果随着温度的升高,抑菌效果呈上升趋势,在90℃时达到最大值,随后有所下降,这可能是高温破坏了部分活性成分,因此,笔者采用80,90,100℃作为正交试验温度因素3水平;图1-C显示料液比越大有效成分析出越多,抑菌效果越明显,抑菌圈在1:60时达到17.25mm,因各料液比前后比例增加量不大,故选择1:20,1:40,1:60作为正交实验料液比因素,这样可减小误差。依据单因素结果建立表1正交试验的因素和水平。

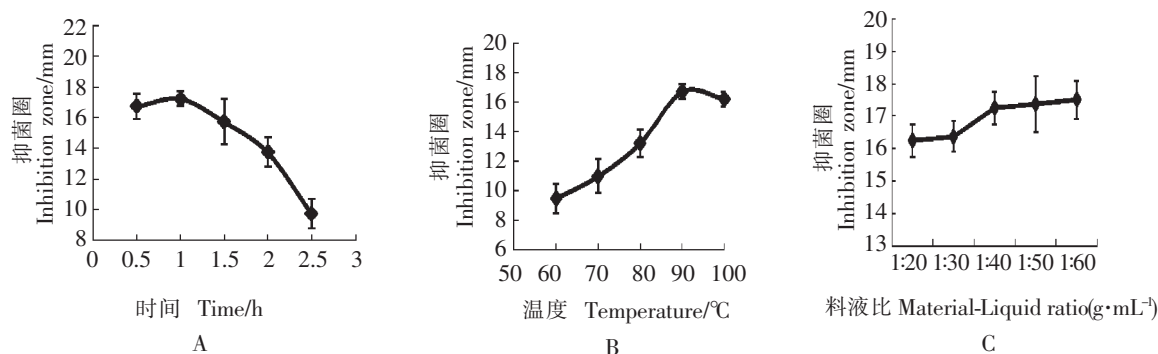


图1 不同单因素黄芩水提物抗菌效果

Fig.1 Effect of aqueous extracts of *S. baicalensis georgi* with different single factors on antibacterial activity

表 1 黄芩水提物正交试验各因素水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test for extraction of *Scutellaria baicalensis georgi*

| 水平 Level | 提取时间/h<br>Extraction time | 提取温度/℃<br>Extraction temperature | 料液比/(g · mL <sup>-1</sup> )<br>Ratio of material to distilled water |
|----------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1        | 0.5                       | 80                               | 1(1:20)                                                             |
| 2        | 1.0                       | 90                               | 2(1:40)                                                             |
| 3        | 1.5                       | 100                              | 3(1:60)                                                             |

2.2 黄芩水提物对金黄葡萄球菌抑制作用正交试验结果 表 2 显示为黄芩水提物抑制金黄葡萄球菌的 3 因素和 3 水平对作用正交试验结果,表 2 显示:黄芩水提物对金黄葡萄球菌抑制作用的 3 因素中,水提物温度(因素 B)影响最大,提取料液比(因素 C)影响次之,提取时间(因素 A)影响最小。黄芩水提物对金黄葡萄球菌抑制作用的最佳提取组合是 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>,即以 1:60 的料液比在 80℃ 下提取时间 1 h 得到的水提物抑菌效果最明显。由于 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub> 条件不在正交试验表中,需对该结果做验证试验,验证试验结果 3 次求抑菌圈大小平均值为 15.5 mm,大于正交试验表中的最大值 15 mm,本试验所得黄芩提取最佳条件 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub> 是科学的结果。

表 2 黄芩水提物对金黄葡萄球菌抑菌作用正交试验结果

Tab. 2 The results of orthogonal test of aqueous extracts of *S. baicalensis georgi* against bacterial activities

| 试验号<br>Test code | 因素 Factor    |                     |                                                                     | 抑菌圈直径/mm<br>Inhibition zone diameter |
|------------------|--------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                  | A            | B                   | C                                                                   |                                      |
|                  | 时间/h<br>Time | 温度/℃<br>Temperature | 料液比/(g · mL <sup>-1</sup> )<br>Ratio of material to distilled water |                                      |
| 1                | 1(0.5)       | 1(80)               | 1(1:20)                                                             | 15.00                                |
| 2                | 1            | 2(90)               | 2(1:40)                                                             | 11.00                                |
| 3                | 1            | 3(100)              | 3(1:60)                                                             | 13.00                                |
| 4                | 2(1.0)       | 1                   | 1                                                                   | 13.00                                |
| 5                | 2            | 2                   | 3                                                                   | 14.50                                |
| 6                | 2            | 3                   | 2                                                                   | 13.50                                |
| 7                | 3(1.5h)      | 1                   | 2                                                                   | 13.75                                |
| 8                | 3            | 2                   | 3                                                                   | 12.25                                |
| 9                | 3            | 3                   | 1                                                                   | 13.50                                |
| K1               | 13.000       | 13.917              | 13.583                                                              |                                      |
| K2               | 13.667       | 12.583              | 12.500                                                              |                                      |
| K3               | 13.167       | 13.330              | 13.750                                                              |                                      |
| R                | 0.667        | 1.334               | 1.250                                                               |                                      |

2.3 黄芩水提物抗金黄葡萄球菌 MIC 和 MBC 试验结果 在黄芩水提物的最小抑菌实验中发现第 6 管 3.125 g · L<sup>-1</sup> 开始出现浑浊,且随浓度降低浑浊度增加,说明第 5 管 6.25 g · L<sup>-1</sup> 为黄芩水提物的最小抑菌浓度,进一步从 3~6 管取培养液接种于琼脂培养基培养观察菌落的生长状况。结果显示药液浓度为 3.125 g · L<sup>-1</sup> 时出现较多菌落,浓度为 12.5 g · L<sup>-1</sup> 管中无细菌,6.25 g · L<sup>-1</sup> 有少许菌群生长。由此看出 MBC 浓度为 25 g · L<sup>-1</sup>,MIC 为 6.25 g · L<sup>-1</sup>。实验证明:黄芩水提物对金黄葡萄球菌不但有抑制作用,同时有杀灭作用且杀菌浓度高于抑菌浓度,且实验测得 MIC 值较王德海<sup>[23]</sup> 实验测得 MIC 12.5 g · L<sup>-1</sup> 要小,说明本研究条件下黄芩抑菌效果更明显。

表3 测定 MIC 与 MBC 的实验结果

Tab.3 Tests of minimum inhibition concentration ( MIC) and minimum bactericidal concentration ( MBC)

| 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 阳性对照* | 阴性对照** |
|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| -   | -   | -   | -   | -    | +    | +    | +     | +     | +     | +     | -      |

注 “-”表示无菌生长,“+”表示有细菌生长

Note “-” means sterile growth “+” means bacterial growth. \* positive control; \*\* negative control

### 3 结 论

本研究利用正交实验确定了黄芩水提物抗金黄色葡萄球菌的最佳浸提工艺。结果显示最优的提取工艺为:料液比 1: 60 ,提取时间 1 h ,提取温度 80 ℃。考虑在实际生产中 ,料液比为 1: 60 时会极大提高生产成本 ,建议采用 1: 30 的料液比进行 2 次提取。在本实验室条件下 ,以正交实验最优条件制备的黄芩水提物对金黄色葡萄球菌最小抑制浓度为  $6.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ,当浓度达  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时可起到很好的杀菌作用 ,存在一定的药学应用价值 ,同时证明了此工艺合理、可行 ,能为以后健康产品的生产提供依据。本研究只研究了黄芩水提物浸提工艺 ,当提取方法、提取溶剂等发生变化时 ,其抑菌效果如何有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 杜仲业,陈一强,孔晋亮,等.黄芩素对金黄色葡萄球菌生物膜抑制作用的体外研究[J].中国现代医学杂志,2012,22(12):19-23.
- [2] 孙丽莉,范锡英,张冬红,等.黄芩微量元素的含量分析[J].微量元素与健康研究,2005,22(1):68-68.
- [3] 兰方宇,陈洪涛.黄芩及其有效成分对细菌生物膜抑制作用研究进展[J].广西中医药大学学报,2015(1):84-86.
- [4] 肖蓉,袁志芳,王春英,等.不同产地黄芩药材 HPLC 指纹图谱的研究[J].中草药,2005,36(5):743-747.
- [5] 云宝仪,周磊.黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究[J].药学学报,2012,47(12):1587-1592.
- [6] 冀春茹.中药化学实验技术与实验[M].郑州:河南科学技术出版社,1986.
- [7] 中华人民共和国药典委员.中国药典一部[M].北京:化学工业出版社,2005:562-563.
- [8] 姚亚红,张立伟.黄芩素提取工艺研究[J].西北药学杂志,2008,23(5):280-282.
- [9] 吴兆斌.黄芩苷清热功效药理作用研究进展[J].医学信息,2011(5):438-440.
- [10] 邓远雄,俞森,陈天焱,等.黄芩提取物中有效成分黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠中的药动学研究[J].中国新药杂志,2007(19):1573-1577.
- [11] 高声传,王童超.黄芩中黄芩素的提取方法考察[J].解放军药科学报,2011(6):502-505.
- [12] 张曦,李宏,侯茂君.黄芩及其有效成分的药理学研究进展[J].天津药学,2000(4):8-11.
- [13] 李成文,闫东海,陈建玉.黄芩苷提取工艺研究[J].中成药,2003(8):854-856.
- [14] 王宏志,喻春皓,高钧,等.酶法提取黄芩中黄芩素、汉黄芩素[J].中药材,2007(7):851-854.
- [15] 李文娟,潘馨,陈晓兰,等.黄芩中汉黄芩素的提取制备[J].亚太传统医药,2014,9(5):33-35.
- [16] 王雪,刘燕隔,遯家辉,等.黄芩中抗菌有效成分提取工艺研究[J].生物化学工程,2015,49(5):34-38.
- [17] Lam P L, Li L, Yuen C W M et al. Effects of multiple washing on cotton fabrics containing berberine microcapsules with anti-*Staphylococcus aureus* activity[J]. Journal of Microencapsulation, 2013, 30(2):143-150.
- [18] Xia Wu, Yan Li, Qiu Wang et al. Effects of berberine and pomegranate seed oil on plasma phospholipid metabolites associated with risks of type 2 diabetes mellitus by U-HPLC/Q-TOF-MS[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1007:110-120.
- [19] 董建萍,陈定一.川黄芩黄酮成分的研究[J].医学教育探索,1992,23(12):619-624.
- [20] 王江桥,罗君,蔡珠,等.金黄色葡萄球菌感染的特征及其耐药性[J].实用预防医学,2007,14(4):990-992.
- [21] 张孝林,何培培,吴研祥,等.苦瓜水提物抗幽门螺杆菌作用及其浸提工艺研究[J].食品与机械,2016(8):136-139.
- [22] 夏薛梅,裴春.中草药对大肠埃希菌的试验[J].中兽医医药杂志,1998(3):35-37.
- [23] 王德海,程国富.10种中草药对金黄色葡萄球菌的体外抗菌试验[J].动物医学进展,2005,26(6):95-98.
- [24] 魏长志.黄芩黄连黄柏体外抗金黄色葡萄球菌和痢疾杆菌对比实验[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(3):159-160.

## Optimization of Extraction of *Scutellaria baicalensis georgi* Against *Staphylococcus aureus*

GE Huifang<sup>1,2</sup>, CHEN Jicheng<sup>1</sup>, ZHANG Xiaolin<sup>2</sup>, PANG Jie<sup>1</sup>

(1. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350001, China; 2. Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China)

**Abstract:** *Scutellaria baicalensis georgi* was extracted with distilled water at different ratio to analyze their inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*. The extraction methods were optimized by using orthogonal array design, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous extracts of *S. baicalensis georgi* was analyzed based on inhibitory zone size of the bacteria by using paper disc diffusion method. The results showed that *S. baicalensis georgi* extracted with distilled water at a ratio of 1: 60 for 1 hour at the temperature of 80 °C had the best inhibition effect on *S. aureus*, with its MIC and MBC being 6.25 g · L<sup>-1</sup> and 25 g · L<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** *Scutellaria baicalensis georgi*; aqueous extracts; *Staphylococcus aureus*

(上接第 195 页)

## Effect of Tea Tree Oil on Postharvest Fruit Quality and Inhibition of Pathogenic Fungi of *Syzygium Samarangense* During Storage

CHEN Yangzhen, LI Tingge, GONG Sheng, ZHANG Ke, SUN Haiyan,  
SUN Xuefang, ZHANG Li, WANG Jian

(College of Tropical Agriculture and Forestry/College of Horticulture and Landscape Architecture/Ministry of Education Key Laboratory of Conservation, Development and Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Wax apple (*Syzygium samarangense*) fruits were dipped or fumigated with tea tree oil at different concentrations to investigate the effects of tea tree oil treatments on postharvest fruit quality of wax apple during storage, and the inhibition effect of tea tree oil on the postharvest pathogenic fungi infecting wax apple. The inhibition effects of the treatments were observed according to the mycelial growth rate of the pathogenic fungi by using the filter paper diffusion method. The results showed that tea tree oil treatments reduced the fruit decay index, and that the treated fruits had higher firmness and higher contents of soluble solids, titratable acid and vitamin C under storage. The treatments significantly improved the postharvest quality of wax apple during storage. Dipping treatment with 10% or fumigation treatment with 500 μL · L<sup>-1</sup> of tea tree oil had the best effects on the postharvest quality of the wax apple fruits. The result also proved the tea tree oil can significantly inhibit the growth of the pathogenic fungi of *Pestalotiopsis guepinii* and *Phytophthora palmivora* infecting wax apple fruit.

**Keywords:** tea tree oil; *Syzygium samarangense*; pathogenic fungi; fruit quality