

# 白毛藤多糖的提取及体外抑菌试验

杨惠麟,孙志良,丁榕,曹桂

(湖南农业大学动物科技学院,湖南长沙 410128)

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2005)04-0024-02

白毛藤,又名白英(*Solanum lyratum* Thumb.),毛风藤、毛葫芦、毛秀才,系茄科植物白英全草。白毛藤具有清热利湿、解毒、消肿、抗癌等功能<sup>[1]</sup>,对细菌和病毒具有较强的抑制作用,并且能增强动物机体非特异性免疫功能。白毛藤以其独特的药理作用越来越受到人们的关注。尽管对白毛藤各组分的研究已作了大量的工作,但对白毛藤多糖的报道却并不多。本实验对白毛藤多糖进行了提取,并进行了体外抑菌实验,为进一步开发天然抗菌药物提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 白毛藤采自湖南省张家界中草药园,洗净,晒干粉碎后备用,其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 菌种 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、巴氏杆菌、链球菌、沙门氏菌由湖南农业大学动物科技学院预防兽医学实验室提供。

1.1.3 主要仪器 RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);岛津电子分析天平(岛津国际贸易上海有限公司);JY98-3D超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);SW-CJ-IF净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 白毛藤多糖的提取及鉴定<sup>[2]</sup> 取白毛藤全草粉末100g,加适量95%乙醇浸泡数小时,超声处理2次,800~1200W,每次10min(工作10s,间隔20s),再用95%乙醇500ml,置圆底烧瓶回流提取2次(每次1h,90℃),合并提取液,减压浓缩,离心(3000r/min,8min),取上清液,上清液中加95%乙醇醇沉5~8次(含醇量达80%以上),置4℃冷藏。沉淀离心(同上),取上清液,上清液加等体积10%三氯乙酸,静置,上清液离心(同上),收集上清液,用NaOH调pH至7。溶液减压浓缩,至适当体积,再加5倍量无水乙醇,使多糖全部析出。收集沉淀,再用95%乙醇、丙酮、无水乙醚依次洗涤。收集沉淀、静置、抽滤、加水溶解、用活性炭脱色,溶液于60℃干燥,得精制多糖。取少量多糖观察其性状、颜色、水溶性,并用蒽酮硫酸法、苯酚硫酸法、甲醇法、Molish试剂作鉴定试验。

### 1.2.2 体外抑菌实验

1.2.2.1 菌液制备 所用菌株使用前先接种平板于37℃

培养24h后,挑选典型菌落接种于肉汤中,再经37℃肉汤培养18h,以后以平板培养,计数法测定其生长浊度,然后将菌液稀释至 $10^5 \sim 10^6$ 个菌/ml,备用。

1.2.2.2 抑菌效果测定 采用杯碟法,将溶化的琼脂培养基冷却至50℃,加入适量的检测菌悬液与琼脂培养基混匀,吸取15ml,置平皿内待凝固后,将牛津杯放置平皿菌层上,每杯加入药液0.2ml,后将平皿盖好,置37℃恒温箱中培养24h,测定平皿内抑菌圈直径大小,实验重复3次,取其平均值,判断标准为:D=8mm为不敏感,8mm<D=13mm,为低度敏感,13mm<D=19mm,为中度敏感,D=19mm为高度敏感。

## 2 结果与分析

### 2.1 白毛藤多糖的提取及鉴定结果

在100g白毛藤全草粉末中得水溶性多糖为0.9637g,该多糖溶于水,易溶于热水,不溶于高浓度乙醇和丙酮,经4种多糖试剂鉴定,均呈明显多糖反应,详见表1。

### 2.2 白毛藤多糖的抑菌试验结果

水溶性多糖对链球菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定抑制作用,浓度为120mg/ml时,抑菌圈均>13mm,属中度敏感,且抑菌圈直径随多糖浓度增大而增大,详见表2。

## 3 讨论

### 3.1 多糖的提取

本实验探索出提取白毛藤多糖较合适的方法,因水溶性多糖的生物活性较大,故采用水提醇沉法。对白毛藤粉末预处理先用95%乙醇浸泡以除去单糖、低聚糖、甙类及生物碱等干扰成分,后做超声处理,主要是利用超声技术的三大效应(热作用、机械作用、空化作用)加速多糖在溶剂中的溶解与扩散,从而提高提取率。在提取过程中,温度控制在90℃较好,醇沉时的含醇量不能低于80%,且重复多次,则除杂质效果较理想,用水提取的多糖常含有蛋白质,故本实验采用适合植物多糖的三氯乙酸法除蛋白,利用三氯乙酸能使蛋白质变性,使其沉淀,以达到除去蛋白质的目的,但要注意静置时间以2h为宜。为除去不溶于水的亲脂性物质,用乙醇、丙酮、无水乙醚依次洗涤。除蛋白质后再脱色效果较理想,可能是因为色素与蛋白质以某种共价键结合而较难除去,故先除蛋白质再脱色。

### 3.2 抑菌效果

由抑菌实验结果可知,白毛藤多糖对链球菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有较强的抑菌作用,且

收稿日期:2005-03-04

项目来源:湖南农业大学科技创新团队资助项目(04TD04)

作者简介:杨惠麟(1981-),女,在读硕士研究生,主要从事兽医药理学与药剂学研究。

表1 白毛藤多糖的定性鉴定结果

成分	性状	苯酚-硫酸法	蒽酮硫酸法	Molish反应	甲醇法
水溶性多糖	黄白色粉末状固体	棕色环	变为蓝绿色	紫红色环	白色混浊

表2 白毛藤多糖的抑菌试验结果 /mm

菌种	120 mg/ml	60 mg/ml	30 mg/ml	15 mg/ml	7.5 mg/ml
链球菌	14.03 ± 1.12	13.47 ± 0.24	12.57 ± 0.17	12.13 ± 1.20	11.16 ± 0.09
沙门氏菌	14.83 ± 0.20	12.01 ± 1.29	11.20 ± 1.19	9.77 ± 0.14	7.43 ± 0.12
巴氏杆菌	15.17 ± 1.20	14.17 ± 0.25	13.60 ± 1.13	11.03 ± 0.12	8.03 ± 0.14
大肠杆菌	16.80 ± 0.15	12.63 ± 1.31	11.13 ± 0.36	10.00 ± 1.29	8.50 ± 0.17
金葡球菌	17.17 ± 1.25	14.50 ± 0.17	12.50 ± 1.15	11.91 ± 0.32	9.67 ± 0.09

抑菌作用随多糖浓度增大而增强,其中多糖浓度为 120 mg/ml 和 60 mg/ml 时,抑菌效果均达到中度敏感。白毛藤多糖为纯天然活性成分,具有病原体不易产生耐药性、药物残留少、极少有毒副作用等优点,对防治动物疾病具有重要意义。另有研究表明,植物多糖还有提高动物机体免疫力的作用。SB Han 等<sup>[3]</sup>发现一种从 *Platycodon grandiflorum* (PG)根中分离的多糖,此多糖具有能显著增加 IgM 的产生,促进 B 细胞增殖等作用;鸡眼藤多糖可刺激鼠效应细胞释放几种细胞因子包括 L-1、L-10、L-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等,并可抑制 L-4 的释放<sup>[4]</sup>。此外,人参、柴胡、香菇、银耳等多糖都能增强巨嗜细胞的吞噬功能。白毛藤多糖是否具有此生物活性还有待于今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 冯洪钱. 民间兽医本草 [M]. 北京:科学技术文献出版社,1993,307~308.
- [2] 吴亚林,黄静,潘远江. 白毛藤多糖的分离和生物免疫活性研究 [J]. 浙江大学学报理学版,2004,(3):319~321.
- [3] HAN SB, PAUL S, LEEK, et al. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells [J]. International Immunopharmacology, 2001, (1): 1969~1979.
- [4] Hirazumi A, Furuaawa E. An immunomodulatory polysaccharide substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity [J]. Phytotherapy Research, 1999, 13(5): 380~387.

## 中草药复方对人工感染鸡大肠杆菌防治试验

李世宏<sup>1</sup>,杨国林<sup>1</sup>,巩忠福<sup>1</sup>,谢家声<sup>1</sup>,严作庭<sup>1</sup>,李宏胜<sup>1</sup>,罗金印<sup>1</sup>,陈亚民<sup>2</sup>,陈国顺<sup>2</sup>,李国智<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,甘肃兰州 730050; 2. 兰州博亚农业科技发展有限公司)

中图分类号: S853.75

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2005)04-0025-02

鸡大肠杆菌病发病率与死亡淘汰率极高(据报道,某鸡场发病率与死亡率为 15.5% 和 8.38%),是目前养禽业危害较为严重的一种疾病,对养鸡业造成巨大的经济损失。该病有时还继发于某些疾病如新城疫 (ND)、传染性支气管炎 (D)、慢性呼吸道病 (CRD)、法氏囊病 (BD) 等。临床上用抗生素类药物来防治,虽能取得较好的疗效,但易造成抗药性,大剂量使用会造成药物残留,危害人体健康。由于中草药能改善机体的免疫机能,提高动物防御疾病的能力,同时无抗药性、残留及副作用小等优点。为了充分利用当地药材资源,因药制宜,课题组研究人员研制了 6 个中药复方制剂,采用人工诱发鸡发生大肠杆菌病为模型,观察了 6 个方剂防治效果。

收稿日期: 2004-12-28

作者简介:李世宏(1974-),男,助理研究员,主要从事奶牛产科疾病研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验药物

扶正方、白头翁汤、三黄汤、固本方、活鸡宝、康毒威 6 个中药复方由课题组研制。所选药材均购自兰州黄河药材市场的地道药材。各个方剂均水煎 3 次,合并煎液、过滤,浓缩至含生药 100% 的浓度,加入 8% 的双乙酸钠防腐剂,分装、灭菌、冷藏,备用。西药喹乙醇由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所提供。

#### 1.2 试验动物与分组

从兰州市西固区郊区购回 26 日龄三黄肉杂鸡 170 羽,雌雄各半,未经大肠杆菌疫苗免疫,按常规饲喂全价饲料,自由采食及饮水,饲养 1 周后,剔除弱雏,雌雄搭配,按体重随机分为 8 组,每组 18 羽,共 144 羽,分笼饲养。

#### 1.3 人工感染方法

扶正方、白头翁汤、固本方、活鸡宝、康毒威 5 组攻菌前