



刘秀丽,马世荣,李博萍,等.不同产地甘草抑菌性及甘草酸和甘草苷含量分析[J].黑龙江农业科学,2021(3):103-105,114.

不同产地甘草抑菌性及甘草酸和甘草苷含量分析

刘秀丽^{1,2},马世荣^{1,2},李博萍³,牛森玲¹,单振东¹

(1. 甘肃省陇东生物资源保护利用与生态修复重点实验室,甘肃 庆阳 745000;2. 陇东学院生命科学与技术学院,甘肃 庆阳 745000;3. 陇东学院 岐伯医学院,甘肃 庆阳 745000)

摘要:为促进甘草种质资源保护研究,以来自6个产地三年龄甘草根为材料,采用热回流水提法提取甘草酸,超声-微波协同法提取甘草总黄酮,通过紫外分光光度法检测甘草酸和甘草苷含量,以打孔法进行抑菌试验,分析不同产地甘草的有效成分含量和抑菌效果。结果表明:甘肃庆阳甘草的甘草酸含量最高,与除新疆巴州以外其他产区有显著区别,甘草苷含量也仅次于新疆甘草。抑菌试验分析表明甘草浸提液对金黄色葡萄球菌具有良好抑制效果,但对沙门氏菌抑制效果较差,且甘肃庆阳产的野生甘草抑菌效果最好。

关键词:甘草;甘草酸;甘草苷;抑菌

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)属于豆科、多年生草本,别名国老、甜草、乌拉尔甘草、甜根子,是一种补益中草药,在陕西、内蒙古、甘肃、新疆及山东等地均有分布。甘草的药材部分为根和根茎,其中主要成分包括三萜类和黄酮类^[1],而三萜类代表活性成分甘草酸在临床上常制成口服或注射用制剂,用于治疗各种急慢性肝炎、支气管炎和消化道溃疡等^[2],也被用作食品中的甜味剂^[3]。甘草黄酮具有抗肿瘤、抗溃疡、抗菌和镇痛的作用,还对爱滋病毒有很强的抑制增殖作用^[4-5],甘草苷是甘草黄酮的主要成分,是反映甘草黄酮内在质量的一个重要指标^[6]。然而产于不同地区甘草所包含有效成分及功效参差不齐。因此本研究以采集自不同地区的三年龄野生乌拉尔甘草根为材料,测定甘草酸、甘草苷含量及水浸提液对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)两种致病菌的抑菌性,分析不同产地甘草的有效成分含量和抑菌效果,为甘草的种质资源分布提供一定的理论研究支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甘草来源 由于甘草皂苷、黄酮含量受栽

培年限和采收期影响^[7],本研究所使用甘草均为三年龄,9月采收。分别采挖自甘肃省庆阳市、甘肃省张掖市、宁夏回族自治区盐池县、陕西省秦岭、山东省临沂市、新疆维吾尔自治区巴州。

菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)均由庆阳市疾控中心提供并由本院微生物实验室保存。

1.1.2 供试仪器与试剂 立式高压蒸汽灭菌器(上海申安 LDZX-30KBS)、超净化工作台(上海苏净 SW-CJ-ID 型)、隔水式恒温培养箱(上海一恒 GHP-9080)、数控超声波清洗器(昆山禾创 KH5200DE 型)、冷冻离心机(SIGMA3K30)、旋转蒸发器(上海亚荣 E-52AA)、紫外可见分光光度计(北京普析 T6)。

牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、无水乙醇等试剂均为国产分析纯,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;甘草酸、甘草苷标准品购于卫生部中国药品生物所。

1.2 方法

1.2.1 甘草酸和总黄酮的提取 对来自6种不同产地的甘草根进行处理,粉碎机粉碎并过筛,装入瓶中,放置阴凉地方备用。每次使用之前取甘草粉于电热鼓风干燥机中(65℃)烘至恒重。

分别取甘草粉10g,采用热回流水提法^[8]提取甘草酸:料液比30 mL·g⁻¹,提取温度90℃,提取时间0.5h,提取5次,合并浸提液用纯净水定容。

各取10g干燥甘草粉末,加乙醇溶液浸泡15min,采用超声-微波协同法提取甘草总黄

收稿日期:2020-10-05

基金项目:甘肃省高等学校科研项目(2017B-63);国家公益性行业科研专项(GSZYPC201809,GSZYPC201810,GSZYPC2018Z03);陇东学院科技创新项目(XYZK1901);甘肃省高等学校科研项目(2019B-158)。

第一作者:刘秀丽(1979—),女,硕士,副教授,从事植物学及分子生物学教学与研究工作。E-mail:80711070@qq.com。

通信作者:马世荣(1980—),男,硕士,副教授,从事资源植物开发利用教学与研究工作。E-mail:419168021@qq.com。

酮^[9]:超声波功率 300 W,乙醇浓度 79%,微波功率125 W,料液比 28.4 mL·g⁻¹,提取时间 32 min,用 79%乙醇定容。

1.2.2 甘草酸和甘草苷含量测定 采用紫外分光光度法测定甘草酸和甘草苷含量。精密称取甘草酸标准品加水溶解,甘草苷标准品加 79%乙醇溶解,并配置成 0.2 mg·mL⁻¹的标准溶液,分别以水和 79%乙醇为空白,通过全波长范围内扫描得:甘草酸标准品溶液在 248 nm 处有最大吸收峰,甘草苷标准品溶液在 276 nm 处有最大吸收峰。精密量取甘草酸、甘草苷标准品溶液 0.500,1.000,2.000,3.000,4.000 和 5.000 mL,分别用纯净水和 79%乙醇定容至 10 mL,放置 10 min 后,在波长在 248 nm、276 nm 处测定光吸收,以标准品浓度为横坐标,吸光值 E 为纵坐标做标准曲线。对所提浸提液适当稀释,测吸光度值,由标准曲线和稀释倍数计算甘草酸、甘草苷含量。

1.2.3 不同产地甘草浸提液抑菌活性测定 取定量甘草粉剂,加温水浸泡 30 min,用常规中药熬制方法煮药,第一次 30 min,第二次 25 min,过滤并合并滤液,旋转蒸发并定容至 1 g 甘草粉剂 1 mL,于无菌离心管中 4 ℃备用。

将保藏的金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌菌种于平板划线,转至对应液体培养基中培养(245 r·min⁻¹,37 ℃,14 h)增殖,取活化的菌液转接液体培养基培养至对数期,通过麦氏比浊管法标定细菌浓度,通过倾注法制作带有细菌的培养基,通过打孔法测定甘草浸提液的抑菌活性^[10],即在 50 ℃左右的固体培养基中加入定量定浓度预先活化的菌液,充分混合均匀后倒平板,凝固后在平板上打孔并向孔中加入定量无菌药液,4 ℃冰箱中预扩散 2 h,然后置于 37 ℃培养观察,测量抑菌圈大小,记录抑菌持续时间。并对甘草浸提液采用二倍稀释法稀释^[11],以打孔法进行抑菌试验,观察抑菌效果,得出最低抑菌浓度。

1.2.4 数据分析 试验数据采用 Excel 2010,SPSS 20.0 进行分析,最终结果均用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 不同区域甘草根提取液中甘草酸和甘草苷含量测定

甘草酸标准曲线回归方程:
 $y=10.981x-0.033\ 1(R^2=0.983\ 2)$
甘草苷标准曲线回归方程:

$y=15.888x+0.001\ 8(R^2=0.998\ 0)$

把甘草酸浸提液和总黄酮浸提液稀释适当倍数,测定在 248 和 276 nm 处的光吸光值,对照标准曲线,计算甘草酸和甘草苷浓度,通过总体积和稀释倍数计算单位质量甘草粉所含甘草酸和甘草苷百分比。由表 1 可知,6 个产区甘草中以甘肃庆阳甘草的甘草酸含量最高,与其他 5 个产地的甘草酸含量相比具有显著性差异。甘草苷含量是新疆巴州产地最高,甘肃庆阳产地稍低,与其他产地相比具有显著性差异。

表 1 不同产地甘草甘草酸和甘草苷含量

产地	甘草酸含量/%	甘草苷含量/%
甘肃庆阳	9.908±0.086 a	4.333±0.055 a
甘肃张掖	3.160±0.023 c	1.719±0.016 b
宁夏盐池	3.516±0.064 c	1.511±0.025 b
陕西秦岭	2.234±0.031 d	1.917±0.014 b
山东临沂	6.056±0.005 b	1.722±0.005 b
新疆巴州	5.853±0.043 b	4.948±0.113 a

注:成分含量为平均值±标准误;同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下同。

2.2 不同区域甘草浸提液抑菌活性测定

2.2.1 抑菌圈直径测量 把菌液培养至对数期,测定浓度,按固定比例添加至培养基中,制作含菌体平板,通过打孔法测定甘草浸提液的抑菌效果,如表 2 所示,6 种不同产地的甘草均对金黄葡萄球菌的抑制效果强于肠炎沙门氏菌,各产地甘草浸提液对金黄葡萄球菌的抑菌圈大小为甘肃庆阳>陕西秦岭>宁夏盐池>新疆巴州>山东临沂>甘肃张掖。而对沙门氏菌只有甘肃庆阳、甘肃张掖和新疆巴州产的甘草浸提液有一定抑菌效果。

表 2 不同产地甘草浸提液抑菌圈直径 (mm)

产地	金黄色葡萄球菌	肠炎沙门氏菌
甘肃庆阳	21.22±0.52 a	12.28±0.35 a
甘肃张掖	16.61±0.16 d	11.00±0.34 b
宁夏盐池	20.06±0.26 bc	-
陕西秦岭	20.78±0.22 ab	-
山东临沂	17.51±0.24 d	-
新疆巴州	19.56±0.55 c	12.72±0.21 a

注:表中抑菌圈直径包含打孔孔直径 7 mm;“-”表示抑菌圈小于等于 7 mm,抑菌效果不明显。

2.2.2 抑菌持续时间和最低抑菌浓度测定 记录抑菌圈维持时间,并通过对甘草浸提液逐级二

倍稀释后测定抑菌情况,由此获取最低抑菌浓度,如表3所示,甘肃庆阳和新疆巴州产的甘草浸提液抑制金黄葡萄球菌持续时间最长,直接使菌致死。甘肃庆阳产的甘草抑制金黄葡萄球菌最低抑菌浓度为 $0.0625\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,是6种甘草中最低抑制浓度。对沙门氏菌而言,有抑菌效果的3个产地甘草抑菌时间均不长,最小抑菌浓度皆为 $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

产地	金黄葡萄球菌		肠炎沙门氏菌	
	抑菌持续	最低抑菌浓	抑菌持续	最低抑菌浓
	时间/h	度/($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	时间/h	度/($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
甘肃庆阳	永久	0.0625	24	0.25
甘肃张掖	93	0.1250	20	0.25
宁夏盐池	74	0.1250	-	-
陕西秦岭	35	0.1250	-	-
山东临沂	35	0.2500	-	-
新疆巴州	永久	0.1250	34	0.25

3 结论与讨论

甘草酸和甘草苷的含量是甘草的质量优劣的重要评判指标。然而生长环境不同、采收时间不同,对甘草有效成分含量影响很大^[7],也因此导致甘草浸提液抑菌效果明显不同。本研究显示6个产区甘草中甘肃庆阳甘草的甘草酸含量最高,与除新疆巴州以外其他产区特别是陕西秦岭甘草有显著区别;甘草苷含量也仅次于新疆巴州甘草,且二者与其他产区差异显著。抑菌效果试验显示,除甘肃庆阳和张掖及新疆巴州甘草外,宁夏盐池、陕西秦岭产地甘草浸提液金黄葡萄球菌也具有较好的抑制效果,说明甘草酸和甘草苷的含量和抑菌性并不呈正相关。有学者表明甘草组织内可能存在着一定数量的内生真菌,其内生真菌可以产生丰富的抑菌活性代谢物质,他们具有不同程度的抑菌作用^[12],因此甘草浸提液的抑菌性也可能和内生真菌的种类和数量有关。

Analysis on Antibacterial Effect and the Glycyrrhizic Acid and Glycyrrhizin Contents of Licorice Root Extracts from Different Producing Areas

LIU Xiu-li^{1,2}, MA Shi-rong^{1,2}, LI Bo-ping³, NIU Miao-ling¹, SHAN Zhen-dong¹

(1. Gansu Key Laboratory of Protection and Utilization for Biological Resources and Ecological Restoration, Qingyang 745000, China; 2. College of Life Science and Technology, Longdong University, Qingyang 745000, China; 3. Qibo Medical College, Longdong University, Qingyang 745000, China)

研究中显示,甘草浸提液对金黄葡萄球菌具有良好抑制效果,但对沙门氏菌抑制效果较差。分析原因可能为沙门氏菌是革兰氏阴性菌,金黄葡萄球菌为革兰氏阳性菌,虽然细胞壁中含有大量肽聚糖,但经常缺乏革兰氏阴性菌所拥有的第二层膜和脂多糖层,因此研究中草药中的成分对细菌的抑制作用很有必要。

本试验由于试验条件限制,对甘草酸、甘草苷的成分测定选用了紫外分光光度法,和高效液相色谱对比,测定结果会受一定杂质成分影响,另外本研究中采挖的各地区甘草,也仅代表其一个地点,不能作为整个地区的代表,不具有普遍性,今后应扩大采样范围进行进一步的分析。

参考文献:

[1] 冯月. 甘草酸和甘草苷提取工艺及抗氧化活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.

[2] 李明. 甘草的研究概况[J]. 甘肃中医学院学报,2000,17(3):59-63.

[3] 盛丽,苏碧泉. 天然食品甜味剂甘草酸[J]. 化学教育,2006,1(9):1-2.

[4] 邢国秀,李楠,王童,等. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):593.

[5] 郭艳茹,林洁. 乙醇浸提甘草中总黄酮的工艺研究[J]. 北方园艺,2013(24):158-161.

[6] 伍尉萍,阎宏涛,孙文基. HPLC法测定甘草中甘草苷的含量[J]. 药物分析杂志,2004,24(4):425.

[7] 冯薇,王文全,赵平然. 栽培年限和采收期对甘草总皂苷、总黄酮含量的影响[J]. 中药材,2008(2):11-13.

[8] 王振强,耿悦,王浩,等. 热回流法提取甘草中甘草酸的工艺优化及HPLC法测定含量[J]. 食品工业,2019,40(12):166-169.

[9] 袁茹楠. 甘草渣中总黄酮的提取、纯化及分离特性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.

[10] 刘如运. 几种常见抑菌试验方法的评价及比较[J]. 现代企业教育,2013(14):341-342.

[11] 陈巧,窦磊. 甘草提取物对四种牙周常见致病菌的抑菌作用[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(10):1147-1149,1168.

[12] 王惠敏. 甘草药理作用及其临床应用[J]. 天津中医学院学报,2004,23(4):184-185.

参考文献:

- [1] 杜浦,卜伟. 基于 SWOT 分析的中国农机产业发展研究[J]. 中国农机化学报,2014(4):3001-304.
- [2] 张萌,张宗毅. 我国农机产品出口贸易流量及潜力——基于引力模型的实证分析[J]. 国际贸易问题,2015(6):148-154.
- [3] 穆晓路,马彩雯,史慧锋,等. 哈萨克斯坦设施农业发展现状与趋势分析研究[J]. 新疆农业科学,2014(4):777-784.
- [4] 张萌,谢建国. 中国农机产品出口竞争力研究——基于出口技术复杂度视角[J]. 经济问题探索,2016(2):159-165.
- [5] 黄满盈,邓晓虹. 中国对美国出口的商品结构、比较优势及其稳定性分析[J]. 世界经济文汇,2010(5):78-94.
- [6] 郭瑞敏. 新疆与中亚五国农机产品贸易潜力研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2016.
- [7] 高振,赵顺,倪卫红,等. “一带一路”沿线国家农业标准协同研究——以中国与东盟国家农机贸易为例[J]. 科技管理研究,2020(1):144-149.
- [8] 郭瑞敏,陈其钢,孙莉. 中国农机产品出口中亚的潜力分析[J]. 价格月刊,2016(2):65-68.
- [9] 布娲鹁·阿布拉,陈俭,肖霞,等. 中国与中亚国家的农业机械产品贸易研究[J]. 新疆农业科学,2012(2):384-389.
- [10] 孙凝晖,张玉成,石晶林. 构建我国第三代农机的创新体系[J]. 中国科学院院刊,2020(2):154-165.

Research on the Trade Potential of Agricultural Machinery Products Between China and Kazakhstan

HU Guo-liang, LIU Ming-shuang

(Institute of International Business and Economics, Xinjiang University of Finance and Economics, Urumqi 830001, China)

Abstract: In order to promote Chinese machinery enterprises to actively explore the market of Kazakhstan and enhance the competitiveness of China's agricultural machinery products, this article first analyzed the current situation of China's agricultural machinery products exported to Kazakhstan and the current market development status. Secondly, it used the regional display comparative advantage index to analyze the international competitiveness of China's agricultural machinery products. Finally, it analyzed the trade potential of China's export of agricultural machinery products to Kazakhstan. In view of the problems faced by China in exporting agricultural machinery products to Kazakhstan, and put forward relevant countermeasures and suggestions, that is to promote the negotiation of the China-Kazakhstan Free Trade Zone and break the barriers to trade; promote the formation of strategic alliances between China's small and medium-sized enterprises and give play to the advantages of leading enterprises; and invest in scientific research to improve the technical level of agricultural machinery.

Keywords: agricultural machinery products; market share; dominant comparative advantage

(上接第 105 页)

Abstract: In order to promote the protection of *Glycyrrhiza* germplasm resources, using the roots of *Glycyrrhiza uralensis* of three years old from six producing areas as materials, glycyrrhizic acid was extracted by the hot reflux method and total flavonoids of *Glycyrrhiza* were extracted by the ultrasound-microwave-synergized extraction method, the contents of glycyrrhizic acid and glycyrrhizin were detected by UV spectrophotometry, the bacteriostatic test was carried out by drilling method, the content of effective components and antibacterial effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. from different producing areas were analyzed. The results showed that the content of glycyrrhizic acid in Qingyang *Glycyrrhiza* was the highest, which was significantly different from other regions except Bazhou, Xinjiang, and the content of glycyrrhizin was next to that in Xinjiang. Based on bacteriostatic experiment, the results showed that the licorice extract had a good inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, but a bad inhibitory effect on *Salmonella*, and the wild licorice from Qingyang had the best inhibitory effect.

Keywords: *Glycyrrhiza*; glycyrrhizic acid; glycyrrhizin; bacteriostasis