复方中草药提取物抑菌活性成分研究

Study on active antibacterial constituents of Chinese herbal formulation extract

刘敏 周茜 郝红伟 王唯霖 刘新愚 赵文

LIU Min ZHOU Qian HAO Hong-wei WANG Wei-lin LIU Xin-yu ZHAO Wen

(河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001)

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

摘要:为探究以乌梅、马齿苋、大青叶等为主要成分的复方中草药提取物中的抑菌活性成分,以不同含醇量的溶液处理复方中草药水提物,进一步除去水提物中的杂质,进而采用有机溶剂萃取法将水提醇沉后的复方中草药按照极性由小到大的顺序分为正己烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相 4 个极性部分,以抑菌圈的大小作为评价指标研究各极性部位的抑菌能力。结果表明:含醇量为 70% 时能够有效去除复方中草药水提物中的杂质,减少对活性成分分离过程中杂质的干扰。各组分的抑菌作用强弱顺序为:正丁醇相 > 水相 > 乙酸乙酯相 > 正己烷相。说明该复方中草药提取物抑菌活性物质主要是一些高极性的物质,其余物质发挥协同作用。

关键词:中草药;水提醇沉;有机溶剂萃取;极性部分;抑菌作用

Abstract: The research was aimed to investigate the antibacterial active ingredient of Chinese herbal formulation extract. Different concentration of ethanol was used to process the water extract of the Chinese herbal formulation, in order to remove the impurity in the water extract. Four polarity extracts were obtained by using different polarities of solvents such as n-hexane, ethyl acetate, n-butanol and water. The antibacterial ability of each polar parts was judged according to the size of the antibacterial circle. 70% concentration of ethanol can effectively remove the impurity in the water extract which can reduce the interference in the separation of active constituents. Different polarity fractions of extracts from the Chinese herbal formulation showed different bacteriostasis. N-butanol fraction and water fraction had better bacteriostasis than ethyl acetate fraction and n-hexane fraction. This study showed that the antibacterial active constituents are mainly high polarity fractions and the other polarity fractions may have synergy.

Keywords: Chinese herbal; water-extraction and ethanol precipitation

基金项目:河北省科技计划项目(编号:13226602D)

作者简介:刘敏(1990—),女,河北农业大学在读硕士研究生。

E-mail: liumin0820@163.com

通讯作者:赵文

收稿日期:2015-05-22

on; organic solvent extraction; different polarity fractions; antibacterial

从中草药筛选抗菌药物用于防治疾病已经成为解决抗生素滥用问题的有效途径之一。近年来,有很多研究^[1-7]从不同的角度,对中草药的抑菌作用进行了多方面的探讨。结果显示,很多中药能阻止病原微生物的生长,属天然的抑菌材料。但是中药是典型的复杂物质体系,如何从中筛选出药效物质,又如何将它们进行有效分离,其被分离产物能否代表中药的功用,这些实质上就是中药提取分离技术领域所面临的科学问题。

目前对中药复方有效部位研究常采用现代分离提取方法,将其分离成为各个有效部分,如挥发油、生物碱类、黄酮类、香豆素类、多糖类等。每个有效部分又可以分为化学性质相近的化合物群,这样一个复杂的中药复方就可以分为几种或十几种有效部位,再和药效学相结合就可以阐明中药复方协同配伍的化学物质基础。因此研究人员提出了包括现代分离方法提取有效成分,指纹图谱定性,指标成分定量,有效成分和药效学研究相结合的整体中药复方研究思路,如对银翘散^[8]、四逆散^[9]、清脑宣窍方^[10]等中药材的研究。本课题组^[11]前期研究表明,以乌梅、马齿苋、大青叶为主要成分的复方中草药具有一定的抑菌作用。目前,中国关于乌梅、马齿苋、大青叶的抑菌作用及成分的报道较多。刘梦茵等^[12]通过薄层析—生物自显影技术初步确定了乌梅醇提物中起主要抑菌作用的是有机酸。马齿苋中含有有机酸类、黄酮类、萜类、香豆素类、生物碱类、挥发油和多糖^[13],其中马齿苋多糖具有一定的抑菌、消炎作用^[14]。大青叶对脆弱类无芽孢厌氧杆菌也有较强的抑制作用。其抗菌有效成分为色胺酮和一些吲哚类衍生物^[15]。本研究拟在前期研究^[11,16]的基础上,采用有机溶剂萃取法确定该复方中草药的抑菌活性部位。课题研究初期,考虑到中草药成分的复杂性,不可能把每一种成分都提取出来进行成分的鉴定,参照组分中药研究的思路,采用系统分离的方法将中草药水提液精制后分为低、中、高三类不同的极性组分,而后通过体外抑

菌试验筛选出了抑菌作用最强的组分。旨在为进一步研究该复方的药效成分提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

乌梅、马齿苋、大青叶、野菊花、鱼腥草、柴胡、黄柏、香薷、生地：购于保定市某药房。

1.2 试剂

95%乙醇：分析纯，天津市红岩化学试剂厂；

正己烷、二甲基亚砜(DMSO)：分析纯，天津市福晨化学试剂厂；

乙酸乙酯：分析纯，天津市致远化学试剂有限公司；

正丁醇：分析纯，天津市光复科技发展有限公司；

氯化钠：分析纯，天津市瑞金特化学品有限公司；

营养琼脂：分析纯，北京奥博星生物技术有限责任公司；

牛肉膏、蛋白胨、酵母浸出物：分析纯，北京双旋微生物培养基制品厂。

1.3 菌种

大肠杆菌 O157:H7、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌：

由河北农业大学食品科技学院微生物实验室提供，本实验室斜面保藏。

1.4 仪器与设备

旋转蒸发器：RE-52A 型，上海亚荣生化仪器厂；

冰箱：BCD-205F/T 型，海尔集团；

电子天平：SB1. T-014 型，上海奥豪斯国际贸易有限公司；

电热恒温干燥箱：202-1-BS 型，上海跃进医疗器械厂；

生化培养箱：SPX-150S-II 型，上海新黄医疗器械制造有限公司；

洁净工作台：SW-CJ-1FD 型，苏州安泰空气技术有限公司；

手提式压力蒸汽灭菌器：YXQ. SG41. 280 型，上海华线医用核子仪器有限公司；

移液枪：DS14364 型，容量 100~1 000 μL ，大龙兴创实验仪器(北京)有限公司；

高速多功能粉碎机：BL-100 型，浙江省永康市松青五金工具厂；

超声波清洗机：QTSX/6150 型，奇拓仪器有限公司；

水浴锅：HH-2 型，江苏省常州国华电器有限公司；

酸度计：PHS-3C 型，上海康仪仪器有限公司。

1.5 方法

1.5.1 复方中草药提取物的制备 将乌梅、马齿苋、大青叶、野菊花、鱼腥草、柴胡、黄柏、香薷、生地按文献[11]的方法制备中草药水煎液，4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.5.2 醇沉条件的优化 醇沉技术可以有效去除水提液中的大分子及多糖类物质，达到精制的目的。在醇沉条件优化中，根据参考文献[17~19]以及预试验的结果，得到浓缩液的密度为 0.5 g/mL 和醇沉 24 h 效果最好，所以只考察了含醇量的影响。选取乙醇终体积分数为 60%，70%，75%，80%，85%，90% 进行醇沉提取。

按前期研究^[16]的处方量称取乌梅等 100 g，按水提工艺提取，浓缩至质量浓度为 0.5 g/mL，药液放冷后，用 90% 的乙醇边搅拌边加入至规定体积分数，4 $^{\circ}\text{C}$ 密闭冷藏 24 h，倾取上清液滤过，沉淀用规定浓度的乙醇洗涤，合并滤液，滤液回收乙醇至无醇味，回收液置已恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h，移至干燥器中冷却 30 min，迅速精密称定重量，以浸出物与原生药量之比作为干膏率。根据干膏率确定最佳提取工艺。

1.5.3 复方中草药的抑菌活性部位确定

(1) 样品溶剂的选择：考虑到有机溶剂会对微生物的生长有一定的影响，影响后期抑菌试验的进行^[20]，需要选取一种既能溶解不同极性的物质，又不会对微生物的生长产生影响的溶剂。

试验选用蒸馏水、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、20% DMSO、40% DMSO、60% DMSO、80% DMSO 及纯 DMSO 进行提取物溶解能力的试验。同时用这几种溶剂进行大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌抑菌试验。

(2) 提取方法：采用不同极性的溶剂对提取物进行萃取，富集抑菌有效组分，依次用正己烷、乙酸乙酯和正丁醇进行，每种溶剂等体积萃取 3 次。而后减压旋蒸回收溶剂，真空干燥至干，得 4 种极性的浸膏。

(3) 抑菌试验：在明确了不同溶剂抑菌作用的前提下，选择各部浸膏适合的溶剂，均配制成 2.0 g/mL 溶液备用。

将已计数的大肠杆菌 O157:H7、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌菌液稀释到 10^6 CFU/mL，采用牛津杯法对不同极性复方中草药提取物进行抑菌试验。培养结束后，观察牛津杯周围是否有透明圈，若有，测量其大小；若没有，表明该极性部分对菌无抑制作用。

2 结果与分析

2.1 醇沉条件的优化

由表 1 可知，当乙醇体积分数达到 70% 时，干膏率趋于平稳，乙醇浓度达到 85% 以上时，干膏率逐渐降低。因此，根据试验结果，结合生产成本，选择 70% 做为最佳醇沉浓度。由此得到醇沉最佳工艺条件为：水煎液密度 0.5 g/mL，乙醇体积分数 70%，4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 24 h。

表 1 醇沉条件选择

Table 1 Optimization of ethanol-precipitation ($n=3$) %

醇沉浓度	干膏率	醇沉浓度	干膏率
0	25.1	75	23.8
60	24.9	80	23.1
65	24.8	85	20.9
70	23.9	90	20.6

2.2 复方中草药的抑菌活性部位确定

2.2.1 样品溶剂的选择 由表 2 可知，正己烷及乙酸乙酯均无抑菌作用，可以作为正己烷相及乙酸乙酯相的溶剂，正丁醇有极强的抑菌作用，不可作为正丁醇相的溶剂。溶解能

表 2 溶剂抑菌效果[†]Table 2 The antibacterial effect of the solvent ($n=3$)

溶剂	大肠杆菌 O157:H7	肠炎沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
正己烷	6.00	6.00	6.00
乙酸乙酯	6.00	6.00	6.00
正丁醇	—	—	—

† “—”表示无细菌生长,被完全抑制。

力试验中正己烷能够完全溶解正己烷相浸膏,而乙酸乙酯不能完全溶解乙酸乙酯相浸膏。因此,选用正己烷为正己烷相浸膏的溶剂。

由表 3 可知,20%的 DMSO 对微生物的生长无影响,DMSO 的浓度越大,抑菌作用越大。而 80%的 DMSO 才能全部溶解乙酸乙酯相浸膏。

表 3 DMSO 对两种致病菌的抑菌圈直径[†]Table 3 Antibacterial diameter of DMSO ($n=3$)

DMSO 浓度/%	大肠杆菌 O157:H7	金黄色葡萄球菌
20	—	—
40	8.13±0.21	5.97±0.25
60	11.06±0.32	12.10±0.36
80	16.13±0.30	15.70±0.66
100	19.87±0.51	18.86±0.32

† “—”表示无抑菌效果。

综合所述,本试验中样品溶剂选择方式为:正己烷溶解正己烷相浸膏,80%的 DMSO 溶解乙酸乙酯相浸膏,蒸馏水溶解正丁醇相、水相浸膏。

2.2.2 抑菌试验结果 由表 4 可知,复方中草药水煎液对 3 种菌均有一定的抑制作用。对肠炎沙门氏菌的抑制作用最强,金黄色葡萄球菌次之,对大肠杆菌 O157:H7 的抑制作用最弱。醇沉上清液对 3 种菌都有明显的抑制作用,并且抑菌强度较水煎液有明显的增强。醇沉后的沉淀物对 3 种菌基本无抑制作用。由此可知,水提醇沉起到了很好的去除中药水煎液中杂质的作用。

由表 5 可知,正己烷相无抑菌作用,其余各相对 3 种致病菌均有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯相对 3 种菌的实际抑菌圈直径均需扣除空白 80% DMSO 的抑菌圈直径。乙酸乙酯相对 3 种菌的抑制作用强弱顺序为:肠炎沙门氏菌>大肠杆菌 O157:H7>金黄色葡萄球菌。正丁醇相有较强的抑

表 4 样品的抑菌圈直径

Table 4 Antibacterial diameter of the samples ($n=3$)

样品	大肠杆菌 O157:H7	金黄色葡萄球菌	肠炎沙门氏菌
中药水煎液	10.98±0.36	10.93±0.86	12.80±1.25
醇沉上清液	18.93±0.75	16.76±0.87	19.20±0.75
醇沉渣	8.18±1.65	7.23±1.70	8.25±1.45

表 5 样品的抑菌圈直径

Table 5 Antibacterial diameter of the samples ($n=3$)

样品	大肠杆菌 O157:H7	金黄色葡萄球菌	肠炎沙门氏菌
80% DMSO	16.20±0.86	16.18±0.87	16.03±0.82
正己烷相	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
乙酸乙酯相	22.95±0.71	20.80±0.99	22.60±1.83
正丁醇相	21.93±0.82	21.25±1.44	21.70±0.77
水相	18.18±0.82	17.13±0.87	18.95±0.87

菌作用,对 3 种菌的抑制作用强弱相近。水相也有较好的抑菌作用,对大肠杆菌 O157:H7 及肠炎沙门氏菌的抑制作用较强,金黄色葡萄球菌抑制作用次之。各相抑菌作用强弱顺序为:正丁醇相>水相>乙酸乙酯相>正己烷相。由此可见,抑菌活性物质主要是一些高极性的物质,其余物质发挥协同作用。

3 结论

本研究确定了复方中草药提取物中的抑菌活性成分探究的前处理方式水提醇沉。醇沉最佳工艺条件为:水煎液密度 0.5 g/mL,乙醇体积分数 70%,4℃静置 24 h。采用有机溶剂萃取法将复方中草药提取物中的成分分为 4 个不同的极性部分。体外抑菌试验中,溶剂的选择是一个难点。本研究选用的溶剂 DMSO 本身就对微生物的生长有很大的影响,试验的目的是确定该极性部分是否有抑菌作用,因此对试验结果有一定的干扰。通过试验,正己烷提取物与空白相比抑菌圈直径相近,因此认为其无抑菌作用,而乙酸乙酯提取物抑菌圈直径比空白的大,因此判定这部分物质有一定的抑菌作用。各相的抑菌作用强弱顺序为:正丁醇相>水相>乙酸乙酯相>正己烷相。表明抑菌活性物质主要是一些高极性的物质,其余物质发挥协同作用。这与刘梦茵等^[12-15]关于乌梅、马齿苋、大青叶中抑菌物质的研究结果相一致。在今后的研究中需对强极性部分的主要成分进行阐述,进一步揭示该复方的抑菌活性成分。

参考文献

- 刘富来,陈志华,冯翠兰,等. 中草药对禽大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 甘肃畜牧兽医,2003,33(2):12~14.
- 张海晖,裴爱泳,刘军海,等. 中药大黄提取物对几种畜禽致病菌的抑菌作用研究[J]. 饲料工业,2004,25(11):24~26.
- 李树明,张凤鸣,雷燕,等. 50 味中药对 8 种畜禽病原菌对比研究[J]. 中兽医学杂志,2000(4):5~8.
- 胡建军,刘利林,黄金奎,等. 植物提取物体外抑菌试验的研究[J]. 塔里木农垦大学学报,2004,16(2):5~8.
- 毛琼,罗宗铭,宋晓岗. 几种中草药提取物抑菌作用研究[J]. 食品与机械,1999(1):38~39.
- Akubu M Bello, Odama L E, Nandita B De. Studies on the antibacterial activity of the extract of stachysarpheta angustifolia[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nan Jing,2003,23(4):424~424.

(下转第 177 页)

- 171; 272~279.
- 4 刘蓉, 张利蕾, 范亚苇, 等. 茶渣中粗茶皂素的纯化及其抗氧化和抑菌活性[J]. 南昌大学学报(工科版), 2013, 35(1): 17~21.
 - 5 李祥, 曹江绒, 种亚莉. 正丁醇萃取茶皂素的研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2014, 32(1): 87~90.
 - 6 赵娟, 黄健花, 蔡春明, 等. 沉淀法纯化茶皂素的工艺研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(11): 58~61.
 - 7 Chen Junghui, Wu Hsingyu, Liao Bingchung, et al. Identification and evaluation of antioxidants defatted *Camellia oleifera* seeds by isopropanol salting-out pretreatment[J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1 246~1 254.
 - 8 涂云飞, 杜先锋, 张雪波. 干柱层析法制备油茶总皂苷对照品初探[J]. 中国农学通报, 2006, 22(10): 343~345.
 - 9 Yang Peng-jie, Zhou Ming-da, Zhou Cheng-yun, et al. Separation and purification of both tea seed polysaccharide and saponin from camellia cake extract using macroporous resin[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(4): 656~662.
 - 10 程铁群, 赵敬娟, 夏涛, 等. 茶皂素的陶瓷膜纯化工艺优化及脱色研究[J]. 农产品加工(学刊), 2011(11): 11~15.
 - 11 韩晓彤, 库海福, 李霞, 等. 大孔树脂 HPD400 分离茶皂素的研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(6): 39~43.
 - 12 曹江绒. 茶皂素的提取、纯化及在洗发液中的应用研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
 - 13 吴丽, 黄福平. 茶籽中茶皂素的分离纯化及脱色工艺研究进展[J]. 南方林业科学, 2015(1): 32~35.
 - 14 胡婕伦, 聂少平, 龚毅, 等. 响应曲面法优化茶皂素提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 106~109.
 - 15 张海龙. 冷榨茶籽饼中茶皂素的提取纯化及鉴定[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
 - 16 郭辉力, 邓泽元, 彭游, 等. 微波/光波辅助提取茶皂素的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 168~170.
 - 17 张新富. 油茶皂苷分离纯化及生物活性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
 - 18 赵敬娟. 油茶皂苷的提取及膜分离纯化的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
 - 19 贾存勤, 李阳春, 屠鹏飞, 等. HPD 系列大孔吸附树脂预处理方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 30(18): 1 425~1 427.
 - 20 Rigano L, Lionetti N, Otero R. Quillaja triterpenic saponins—the natural foamers[J]. SOFW-Journal, 2009, 135(4): 1~9.
 - 21 Buran T J, Sandhu A K, Li Zheng, et al. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 128(1): 167~173.
 - 22 孟维, 李湘洲, 吴志平, 等. AB-8 型大孔吸附树脂分离纯化茶皂素工艺[J]. 食品科技, 2013, 38(9): 213~217.

(上接第 161 页)

- 7 Zakaria El Astal. The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria[J]. European Food Research and Technology, 2004, 218(5): 460~464.
- 8 李军, 石任兵, 刘斌. 反相高效液相色谱法测定四逆散抗抑郁有效部位中新橙皮苷的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(1): 54~56.
- 9 陈玉平, 石任兵, 刘斌. RP—HPLC 法测定清脑宣窍方有效部位中藏红花酸含量[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 63~65.
- 10 李铮, 石任兵, 刘斌. HPLC 法测定参芍心欣方有效部位中药药苷含量[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(2): 47~49.
- 11 王思思. 选择性抑菌中草药筛选及组方研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- 12 刘梦茵, 刘芳, 周涛, 等. 乌梅乙醇提取物抑菌作用及其抑菌成分分析[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 190~193.
- 13 解思友, 逢美芳, 孙艳, 等. 马齿苋的化学成分与药理作用最新研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(3): 212~215.
- 14 杨哲, 肖根生, 杨永生. 马齿苋多糖的提取功效及其在畜禽饲料生产中的应用[J]. 湖南饲料, 2012(4): 19~20.
- 15 侯家玉, 方泰惠. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 54~55.
- 16 杨建乔. 复方中草药提取物替代饲用抗生素的应用研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- 17 张黎明, 朱丽, 李雪, 等. 玉屏风总多糖水提醇沉工艺条件优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 26.
- 18 阎雪梅, 李凤丽, 宋洁瑾. 暑热宁合剂水提醇沉工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(8): 703~704.
- 19 肖琼, 沈平婵. 中药醇沉工艺的关键影响因素[J]. 中成药, 2005, 27(2): 143~144.
- 20 高微微, 李展, 林文卫, 等. 中草药提取物对沙门氏菌的抑菌试验[J]. 中兽医医学杂志, 1998(5): 11~13.

(上接第 166 页)

- 18 Zhong Kai, Wang Qiang. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 19~25.
- 19 赵保路. 电子自旋共振技术在生物和医学中的应用[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2009: 58~59.
- 20 Falch E, Velasco J, Aursand M, et al. Detection of radical development by ESR spectroscopy techniques for assessment of oxidative susceptibility of fish oils[J]. European Food Research and Technology. A, 2005, 221(5): 667~674.
- 21 Lee S J, Cheong S H, Kim Y S, et al. Antioxidant activity of a novel synthetic hexa-peptide derived from an enzymatic hydrolysate of duck skin by-products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013(62): 276~280.
- 22 何传波, 魏好程, 熊何健, 等. 酶与微波处理对海带多糖提取及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 51~53.