

乌梅等三味具有抑菌活性中药的最佳提取工艺研究

康 帅¹, 殷中琼^{1*}, 贾仁勇^{2,3}, 彭练慈¹, 曲 径¹, 梁 陈¹

¹四川农业大学动物医学院; ²四川农业大学预防兽医学研究所; ³动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014

摘 要: 优选乌梅等三味具有抗胸膜肺炎放线杆菌活性中药的有效物质提取工艺。以浸膏得率、最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)为指标, 采用正交设计实验, 综合考虑溶剂浓度、料液比、提取次数、提取时间、提取温度等影响因素, 对三味中药有效物质提取工艺进行优选研究。优选出的最佳提取工艺为: 黄连粗粉 70% 乙醇浓度(8 倍量), 加热回流提取 2 次, 每次 2 h; 乌梅粗粉 95% 乙醇浓度(10 倍量), 90 °C 加热回流提取 1 次, 每次 8 h; 虎杖粗粉 60% 乙醇浓度(6 倍量), 90 °C 加热回流提取 3 次, 每次 2 h。最佳提取工艺下, 黄连、乌梅和虎杖三种提取物浸膏对胸膜肺炎放线杆菌的 MIC 值分别为 15.60、10.40、15.60 mg/mL, MBC 值分别为 26.00、18.20、15.60 mg/mL。

关键词: 乌梅; 提取工艺; 正交设计; 抑菌活性

中图分类号: R852.6

文献标识码: A

Optimization of Extraction Processes of Three Traditional Chinese Medicines with Antibacterial Activity

KANG Shuai¹, YIN Zhong-qiong^{1*}, JIA Ren-yong^{2,3}, PENG Lian-ci¹, QU Jing¹, LIANG Chen¹

¹College of Veterinary Medicine of Sichuan Agricultural University ²Preventive Veterinary Research Institute of Sichuan Agricultural University,

³Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China

Abstract: This study was designed to obtain the optimized extracting process for the extraction of active substance from 3 traditional Chinese medicines with antibacterial activity against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The orthogonal array design was used with several factors, including solvent concentration, solid-liquid ratio, extraction frequency, extraction duration and extraction temperature. The extraction yield, MIC and MBC were selected as indexes. The results showed that the optimal extraction conditions for *Rhizoma coptidis* were as follows: 1:8 as the ratio of raw material to liquid, 70% as ethanol concentration, and 2 h as extraction duration; the optimal extraction conditions for *Fructus mume* were as follows: 1:10 as the ratio of raw material to liquid, 95% as ethanol concentration, 90 °C as extraction temperature and 8 h as extraction duration; the optimal extraction conditions for *Polygonum cuspidatum* were as follows: 1:6 as the ratio of raw material to liquid, 60% as ethanol concentration, 90 °C as extraction temperature, 2 h as extraction duration and reflux extraction for 3 times. Under the optimal extraction conditions, the MIC values of 3 traditional Chinese medicines were 15.60, 10.20 and 15.60 mg/mL, respectively, and the MBC values were 26.00, 18.20, 15.60 mg/mL, respectively.

Key words: *Fructus mume*; extraction process; orthogonal array design; antibacterial activity

黄连(*Rhizoma coptidis*)为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎,具有清热燥湿、泻火解毒等功效。其中主要有效成分是以小檗碱为代表的季铵型生物碱,具有抗病毒、抗炎、抗菌、降血糖及免疫调节等作用。因此黄连小檗碱的提取工艺研究对抗菌抗病毒及临床研究有着重大的意义。乌梅

(*Fructus mume*)是蔷薇科植物梅的干燥近成熟果实,具有清热燥湿、泻火解毒、保护胃肠、抗菌消炎等功效。主要成分是酸类化合物,其中熊果酸、枸橼酸等具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、延缓衰老等作用^[1]。虎杖(*Polygonum cuspidatum*)为蓼科植物虎杖的干燥根茎及根,具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效。虎杖中主要含有蒽醌类和芪类化合物,其中芪类成分白藜芦醇具有抗菌、抗炎、抗癌、抗过敏、降血脂和抗氧化等多方面的药理活性。

本实验室前期试验结果表明,黄连、乌梅和虎杖

收稿日期:2013-11-07 投稿日期:2014-03-05

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(2011BAD34B03);四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015);水禽疫病控制四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015)

* 通讯作者 E-mail: yinzhongq@163.com

三味中药的提取物对胸膜肺炎放线杆菌有很好的抑菌效果,且三味药均为协同或相加作用。为了提高三味中药对胸膜肺炎放线杆菌的抑菌活性,本研究对其有效物质的提取工艺进行优化,以便提高各味中药有效物质的产量达到更好的抑菌效果。目前,在对黄连、乌梅和虎杖三味药的提取工艺研究中,以测定三种中药有效成分含量为指标的研究较多^[2],以浸膏得率为指标的提取工艺研究较少,综合文献资料,本研究以溶剂浓度、料液比、提取次数、提取时间、提取温度为影响因素,采用正交设计实验,以浸膏得率及对胸膜肺炎放线杆菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)为指标,对三味中药提取工艺条件进行优选研究。

1 材料与仪器

1.1 材料

黄连 *Rhizoma coptidis* (产地四川,批次:080406)、乌梅 *Fructus mume* (产地四川,批次:120315)、虎杖 *Polygonum cuspidatum* (产地四川,批次:081102) 3种中药均购于四川雅安惠民堂药业连锁有限责任公司,由四川农业大学药理学系副教授范巧佳鉴定为正品。胸膜肺炎放线杆菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ATCC265), 购买于中国兽药监察所。含质量分数为 0.02% NAD 的 TSB 液体培养基、含质量分数为 0.02% NAD 的 TSA 固体培养基、二甲亚砜、无水乙醇、T 型涂布棒、90 mm 玻璃培养皿。

1.2 仪器

电热恒温培养箱(上海琅轩实验设备有限公

司),超净工作台(上海博讯实业有限公司),旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂),微量进样器(南京奥仪佳科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 虎杖最佳提取工艺研究

2.1.1 虎杖有效成分提取单因素实验

影响虎杖有效成分提取率的因素较多,其中以料液比、乙醇浓度、提取时间和提取温度对提出率影响较大^[3],故本研究对以上四个因素进行了单因素实验设计。分别固定四因素中的一因素作为单因素变量,以浸膏得率为指标,得到虎杖提取较优条件为料液比 1:6,乙醇浓度 70%,提取时间 1.5 h,提取温度 90 ℃。

2.1.2 虎杖有效成分提取工艺正交实验设计

以单因素实验结果拟定各因素的三水平(见表 1),以提取有效物质的浸膏得率, MIC 和 MBC 值为综合考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行实验,从而筛选出最佳的提取工艺。

按规定量称取药物 9 份,每份约 30 g,分别粉碎并编号 1、2、3、4、5、6、7、8、9,精确称量 9 份药物粉末,将精确称量后的各药物粉末于溶媒中加热回流提取,为充分提取,每组都提取 3 次,合并滤液并浓缩滤液至糊状,放入 55 ℃ 烘箱中 3 d,直至烘干到恒重浸膏状态,称重并计算得率,封存备用,分别重复 9 次。

表 1 虎杖正交实验因素表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for the extraction of *P. cuspidatum*

水平 Levels	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	C 提取时间 Extraction duration(h)	D 提取温度 Temperature(℃)
1	1:5	60	1	85
2	1:6	70	1.5	90
3	1:8	80	2	95

2.2 黄连最佳提取工艺研究

2.2.1 黄连有效成分提取单因素实验

影响黄连有效成分提取率的因素主要有料液比、乙醇浓度、提取时间和提取次数^[4]。故本研究对以上四个因素进行了单因素实验设计。分别固定四因素中的一因素作为单因素变量,以浸膏得率为指标,得到黄连提取较优条件为料液比 1:10,乙醇

浓度 70%,提取时间 1.5 h,提取次数 2 次。

2.2.2 黄连有效成分提取工艺正交实验设计

以单因素实验结果拟定各因素的三水平(见表 2),以提取有效物质的浸膏得率, MIC 和 MBC 值为综合考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行实验,从而筛选出最佳的提取工艺。提取方法同“2.1.2”所述。

表2 黄连正交实验因素表

Table 2 Factors and levels of orthogonal test for the extraction of Rhizoma Coptidis

水平 Levels	A 料液比 Solid-liquid ratio	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 提取时间 Extraction duration(h)	D 提取次数 Times of extraction
1	1:8	60	1	1
2	1:10	70	1.5	2
3	1:12	80	2	3

2.3 乌梅最佳提取工艺研究

2.3.1 乌梅有效成分提取单因素实验

影响乌梅有效成分提取率的因素主要是料液比、提取温度、提取时间和乙醇浓度^[5]。故本研究对以上四个因素进行了单因素实验设计。分别固定四因素中的一因素作为单因素变量,以浸膏得率为指标,得到乌梅提取较优条件为料液比 1:10,提取

温度 80 ℃,提取时间 10 h,乙醇浓度为 70%。

2.3.2 乌梅有效成分提取工艺正交实验设计

以单因素实验结果拟定各因素的三水平(见表 3),以提取有效物质的浸膏得率, MIC 和 MBC 值为综合考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行实验,从而筛选出最佳的提取工艺。提取方法同“2.1.2”所述。

表3 乌梅正交实验因素表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test for the extraction of Fructus Mume

水平 Levels	A 料液比 Solid-liquid ratio	B 提取温度 Temperature(℃)	C 提取时间 Extraction duration(h)	D 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)
1	1:8	70	8	60
2	1:10	80	10	70
3	1:12	90	12	95

2.4 正交实验中药有效成分的体外抑菌活性实验

2.4.1 细菌菌悬液的制备

采用平板菌落计数法确定菌液浓度。将胸膜肺炎放线杆菌菌液进行 10 倍系列稀释,分别取不同稀释度的菌液 0.1 mL 滴加于含质量分数为 0.02% NAD 的 TSA 平板上,用无菌涂布器涂布均匀,每稀释度重复 2 块平板,37 ℃ 温箱中培养 18~24 h。选取菌落数在 30~300 间的平板进行计数,每组稀释度相同的平板取平均值作为菌落数。计算出原菌液细菌浓度,作为细菌菌液的标准浓度。临用前将菌液用液体培养基稀释成菌液浓度为 1.6×10^7 CFU/mL。

2.4.2 药液的制备

将 3 种中药提取物浸膏溶于二甲亚砜中,配制质量浓度为 1 g/mL 的储备液,高压蒸汽灭菌,4 ℃ 冰箱保存。临用前用含质量分数为 0.02% NAD 的 TSB 培养液将药液按倍比稀释法稀释至工作浓度。最后的工作浓度为 500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.60、7.80 mg/mL。

2.4.3 药敏实验

采用试管二倍稀释法。取无菌试管 16 支,分为实验组和对照组,每组 8 支。分组编号后向实验组 8 支试管中各加 1 mL TSB 肉汤,以无菌操作吸取已稀释好的药物 1 mL 加入第 1 管,混匀后依次倍比稀释至第 7 管,混匀后自第 7 管弃去 1 mL,此时试管内药液浓度比依次为 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128,相当于药液质量浓度为 500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.60、7.80 mg/mL,第 8 管不加药物为对照组管。对照组操作同实验组。用微量加样器取已校正浓度的菌液 0.1 mL,依次由低浓度向高浓度加到实验组各管中,混匀后,置于 37 ℃ 培养箱培养 18~24 h 后分别观察细菌的生长状况,以浑浊度为指标,以对照组为参考对象检查试管中有无细菌生长,以药物最低浓度管中无细菌生长者为该实验菌最小抑菌浓度 MIC。将 MIC 测定中判定未生长细菌的实验组中药肉汤 1 mL 接涂布于 TSA 琼脂平板上,37 ℃ 条件培养 18~24 h,观察结果,以细菌菌落个数不超 5 个的管内的药物的浓度,为该药的最小杀菌浓度。

2.5 最佳提取工艺下各味中药提取物的体外抑菌活性验证实验

按照“2.4”中的实验方法,将筛选出的各味中药在最佳提取工艺下的有效物质进行体外抑菌活性研究的验证。

3 实验结果

3.1 虎杖最佳提取工艺的优选

按照正交实验设计的提取方法对虎杖进行有效物质的提取,得到9份虎杖有效提取物。通过对虎杖提取物各浸膏得率的计算及提取物对胸膜肺炎放线杆菌 MIC 和 MBC 的研究,筛选出最佳提取工艺,结果见表4和表5。

表4 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 直观分析

Table 4 Direct analysis of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

	试验号 Trial No.	A	B	C	D	浸膏得率 Extraction yield(%)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC + MBC (mg/mL)
	1	1:5	60	1	85	26.70	31.25	31.25	62.50
	2	1:5	70	1.5	90	28.89	31.25	62.50	93.75
	3	1:5	80	2	95	25.63	15.60	15.60	31.25
	4	1:6	60	1.5	95	24.82	15.60	31.25	46.85
	5	1:6	70	2	85	30.40	31.25	62.50	93.75
	6	1:6	80	1	90	29.28	15.60	31.25	46.85
	7	1:8	60	2	90	32.03	15.60	31.25	46.85
	8	1:8	70	1	95	24.96	31.25	62.50	93.75
	9	1:8	80	1.5	85	27.40	31.25	62.50	93.75
浸膏得率 Extraction yield (%)	K1	27.07	27.85	26.98	28.17	D > C > A > B			
	K2	28.17	28.08	27.04	30.07				
	K3	28.13	27.44	29.35	25.14				
	R	1.10	0.65	2.37	4.93				
MIC + MBC(mg/mL)	K1'	62.5	52.07	67.70	83.33	A > C > D > B			
	K2'	62.48	93.75	78.12	62.48				
	K3'	78.12	57.28	57.28	57.28				
	R2	15.63	41.68	20.83	26.05				

表5 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 的方差分析

Table 5 Analysis of variance of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

指标 Index	方差来源 Source of variation	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P value
浸膏得率 Extraction yield	A	2.31	2	3.61	>0.05
	B(Error)	0.64	2	1.00	
	C	11.00	2	17.19	>0.05
	D	37.10	2	57.97	<0.05
MIC + MBC	A	488.28	2	1.00	
	B(Error)	3094.53	2	6.34	>0.05
	C	651.04	2	1.33	>0.05
	D	1140.37	2	2.34	>0.05

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$; $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

4 个因素对虎杖提取物浸膏得率的影响大小顺序为 $D > C > A > B$, 最优水平组合为 $A_2B_2C_3D_2$, 即料液比为 1:6, 乙醇浓度为 70%, 提取温度 90 °C, 一次 2 h, 提取 3 次。对 MIC、MBC 之和的影响顺序为 $A > C > D > B$, 使 MIC、MBC 之和最小的最优水平为 $A_2B_1C_3D_3$, 即料液比为 1:6, 乙醇浓度为 70%, 提取温度 95 °C, 一次提取 2 h, 共提取 3 次。

以浸膏得率, MIC、MBC 之和为指标时所得工艺的差异时间和料液比两因素均不显著, 为节约成本, 将料液比设定为 1:6, 乙醇浓度为 70%, 温度对浸膏得率的影响显著, 但对 MIC、MBC 之和的影响不显

著, 所以设定温度为 90 °C, 提取时间设定为 2 h。所以筛选虎杖的最优水平为 $A_2B_2C_3D_2$, 即料液比为 1:6, 乙醇浓度为 60%, 提取温度为 90 °C, 一次 2 h, 共提取 3 次。

3.2 黄连最佳提取工艺的优选

按照正交实验设计的提取方法对黄连进行有效物质的提取, 得到 9 份黄连有效提取物。通过对黄连提取物各浸膏得率的计算及提取物对胸膜肺炎放线杆菌 MIC 和 MBC 的研究, 筛选出最佳提取工艺, 结果见表 6 和表 7。

表 6 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 直观分析

Table 6 Direct analysis of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

试验号 Trial No.	A	B	C	D	浸膏得率 Extraction yield(%)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC + MBC (mg/mL)	
1	1:8	60	1	1	3.71	31.25	62.50	93.75	
2	1:8	70	1.5	2	20.80	15.60	31.25	46.85	
3	1:8	80	2	3	20.01	7.80	15.60	23.40	
4	1:10	60	1.5	3	20.99	15.60	31.25	46.85	
5	1:10	70	2	1	5.90	31.25	62.50	93.75	
6	1:10	80	1	2	16.96	15.60	15.60	31.25	
7	1:12	60	2	2	15.46	7.80	15.60	23.40	
8	1:12	70	1	3	8.29	62.50	125.0	187.50	
9	1:12	80	1.5	1	12.16	31.25	62.50	93.75	
浸膏率 Extraction yield (%)	K1	14.84	13.39	9.65	7.26	D > C > B > A			
	K2	14.62	11.66	17.98	17.74				
	K3	11.97	16.38	13.79	16.43				
	R	2.87	4.71	8.33	10.48				
MIC + MBC (mg/mL)	K1'	54.67	54.67	104.17	93.50	A > C > B > D			
	K2'	57.28	109.37	62.48	33.83				
	K3'	101.55	49.47	46.85	85.92				
	R2	46.88	59.90	57.32	59.92				

表 7 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 的方差分析

Table 7 Analysis of variance of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

指标 Index	方差来源 Source of variation	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P value
浸膏得率 Extraction yield	A (Error)	7.65	2	1.00	
	B	17.06	2	2.23	>0.05
	C	52.04	2	6.81	>0.05
	D	97.88	2	12.80	>0.05
MIC + MBC	A (Error)	4164.43	2	1.00	

B	6607.14	2	1.59	>0.05
C	5267.10	2	1.26	>0.05
D	6364.04	2	1.53	>0.05

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$; $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

4 个因素对黄连提取物浸膏得率的影响大小顺序为 $D > C > B > A$, 以得率为指标的最优水平组合为 $A_1B_3C_2D_2$, 即料液比 1:8, 乙醇浓度 80%, 1.5 h 一次, 提取 2 次。以 MIC、MBC 之和最小为指标的最优水平组合为 $A_1B_3C_3D_2$, 即料液比为 1:8, 乙醇浓度 80%, 提取 2 h, 提取 2 次。

以浸膏得率, MIC、MBC 之和为指标时所得工艺的差异因素都是料液比, 料液比对浸膏影响很小, 另外乙醇浓度和提取时间之间对浸膏率差异不显著,

为节约成本, 将料液比设定为 1:8, 提取时间为 2 h, 提取次数为 2 次。所以选择黄连的最优水平为 $A_1B_2C_3D_2$, 即料液比为 1:8, 乙醇浓度 70%, 2 h 一次, 提取 2 次。

3.3 乌梅最佳提取工艺的优选

按照正交实验设计的提取方法对乌梅进行有效物质的提取, 得到 9 份乌梅有效提取物。通过对乌梅提取物各浸膏得率的计算及提取物对胸膜肺炎放线杆菌 MIC 和 MBC 的研究, 结果见表 8 和表 9。

表 8 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 直观分析

Table 8 Direct analysis of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

	试验号 Trial No.	A	B	C	D	浸膏得率 Extraction yield(%)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC + MBC (mg/mL)
	1	1:8	90	8	60	33.93	7.80	31.25	39.05
	2	1:8	70	10	70	21.60	31.25	62.50	93.75
	3	1:8	80	12	95	37.00	15.60	15.60	31.25
	4	1:10	90	10	95	34.07	62.50	62.50	125.00
	5	1:10	70	12	60	22.47	7.80	15.60	23.40
	6	1:10	80	8	70	39.83	7.80	15.60	23.40
	7	1:12	90	12	70	37.07	7.80	15.60	23.40
	8	1:12	70	8	95	26.26	15.60	15.60	31.25
	9	1:12	80	10	60	28.13	31.25	31.25	62.50
浸膏得率 Extraction yield (%)	K_1	30.84	35.02	33.34	28.18	B > C > D > A			
	K_2	32.12	23.44	27.93	32.83				
	K_3	30.49	34.99	32.18	32.44				
	R	1.64	11.58	5.41	4.67				
MIC + MBC (mg/mL)	K'_1	62.48	31.23	41.65	54.68	D > C > A > B			
	K'_2	49.67	93.75	46.85	57.27				
	K'_3	39.05	26.02	62.50	39.05				
	R_2	23.43	67.73	20.85	18.22				

表 9 以浸膏得率和 MIC 与 MBC 值之和为指标的实验 $L_9(3^4)$ 的方差分析¹⁾

Table 9 Analysis of variance of $L_9(3^4)$ test by taking extraction yield and the sum of MIC and MBC as indexes

指标 Index	方差来源 Source of variation	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P value
浸膏得率 Extraction yield	A (Error)	4.44	2	1.00	
	B	267.35	2	60.21	<0.05
	C	48.61	2	10.95	>0.05

	D	40.04	2	9.02	>0.05
MIC + MBC	A (Error)	582.92	2	1.00	
	B	827.06	2	1.42	>0.05
	C	8523.35	2	14.62	>0.05
	D	10640.02	2	18.25	>0.05

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$; $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

4个因素对乌梅提取物浸膏得率的影响大小顺序为 $B > C > D > A$, 以浸膏得率最优组合为 $A_2B_1C_1D_2$, 即料液比为 1:10, 乙醇浓度为 70%, 提取温度为 90 °C, 一次提取 8 h, 共提取 1 次。对 MIC、MBC 之和的影响顺序为 $D > C > A > B$, 使 MIC、MBC 之和最小最优水平组合为 $A_3B_3C_1D_3$, 即料液比为 1:12, 乙醇浓度为 95%, 提取温度为 80 °C, 一次提取 8 h, 共提取 1 次。

以浸膏得率, MIC、MBC 之和为指标, 其中料液比影响最小, 故采用 1:10 的料液比, 温度对得率影

表 10 最佳提取工艺下的 3 种中药对胸膜肺炎放线杆菌的 MIC 和 MBC 值

Table 10 The MIC and MBC values of the 3 investigated traditional Chinese medicines against *A. pleuropneumoniae* (unit: mg/mL)

药物 Drugs	浸膏得率 Extraction yield (%)	MIC	MBC	MIC 平均 Average MIC	MBC 平均 Average MBC
乌梅 <i>Fructus Mume</i>	34.57	7.80	15.60	10.40	18.22
		15.60	31.25		
		7.80	7.80		
黄连 <i>Rhizoma Coptidis</i>	17.13	15.60	15.60	15.60	26.03
		15.60	31.25		
		15.60	31.25		
虎杖 <i>P. Cuspidatum</i>	27.43	15.60	15.60	15.60	15.60
		15.60	15.60		
		15.60	15.60		

4 讨论

中药化学成分复杂, 抗菌成分多样, 不同的提取方式对不同成分提出率不一样, 甚至对同一成分的提出率也不尽相同, 影响抑菌实验结果。在提取中药有效成分时, 溶媒量、提取时间、提取次数、提取温度、乙醇浓度等因素影响着中药提取得率。本研究采用正交实验设计, 综合考虑对 3 种中药影响较大的几因素进行正交实验, 以期得到稳定有效的提取工艺。

黄连、黄芩和虎杖有效物质最佳提取工艺较严格的选择标准为高效液相色谱法分别定量测定其中单一有效物质含量。但本研究只为从少量的原料药

响显著, 选用提取温度为 90 °C, 同时为了保证得率和保证抑菌效果, 选用提取时间 8 h 和 95% 的乙醇浓度。即筛选乌梅的最优组合为 $A_2B_2C_1D_3$, 即料液比为 1:10, 乙醇浓度为 95%, 提取温度为 90 °C, 一次提取 8 h, 共提取 1 次。

3.4 最佳提取工艺下各味中药提取物的体外抑菌活性验证实验

3 味中药在本研究筛选出的最佳提取工艺下得到的浸膏物质得率及对胸膜肺炎放线杆菌的 MIC、MBC 值 3 次结果的平均值见表 10。

材中得到更多的抑菌效果好的有效物质, 因而以浸膏得率及其抗胸膜肺炎放线杆菌的最低抑菌浓度值和最低杀菌浓度值为综合评价指标, 从中筛选出抑菌活性好的优异的提取方法及条件。

在本研究中, 黄连、乌梅、虎杖三种中药按正交实验设计对其浸膏得率以及 MIC 和 MBC 值进行测定和分析, 得出了三种中药的最优提取工艺, 其中虎杖最佳提取工艺为料液比 1:6, 60% 乙醇浓度, 90 °C 加热回流提取 3 次, 每次 2 h; 黄连最佳工艺为料液比 1:8, 70% 乙醇浓度, 加热回流提取 2 次, 每次 2 h; 乌梅最佳提取工艺为料液比 1:10, 95% 乙醇浓度, 90 °C 加热回流提取 1 次, 每次 8 h。通过验证, 乌梅、黄连、虎杖在最优提取工艺下的浸膏得率分别

为 34.57%、17.13% 和 27.43%, 得率均优于三种中药正交实验中的其他 5 组。同时, 经验证, 黄连、乌梅、虎杖最佳提取工艺下的有效物质抑菌效果明显强于一般提取工艺的有效物质^[6]。黄连的 MIC 和 MBC 均值分别为 15.60 mg/mL 和 26.03 mg/mL, 乌梅的 MIC 和 MBC 均值分别为 10.40 mg/mL 和 18.22 mg/mL, 虎杖的 MIC 和 MBC 均值分别为 15.60 mg/mL 和 15.60 mg/mL。因此, 该工艺能稳定、有效、可行, 可用于 3 种中药有效成分的提取和后续抗菌活性研究。

参考文献

- Kurek A, Grudniak AM, Szwed M, *et al.* Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009, 97: 61-68.
- Tu YS(涂瑶生), Jiang ZQ(江志强), Sun DM(孙冬梅), *et al.* Extraction and purification process of total alkaloids in Rhizome *Coptidis*. *Trad Chin Med Res* (中医研究), 2012: 208-209.
- Liu D(刘丹), Tang HF(汤海峰), Zhang SQ(张三奇), *et al.* The optimization of extraction process of effective ingredients in *Polygonum Cuspidatum*. *Chin Trad Patent Med* (中成药), 2007, 29: 516-521.
- Wang K(汪坤), Zhang ZL(张振凌), Jia XM(贾秀梅), *et al.* Optimization of extraction technology of *Coptis chinensis* with multi-components quantitation by one marker. *Chin J Exper Trad Med Formulae* (中国实验方剂杂志), 2011, 17(24): 9-11.
- Liu MY(刘梦茵), Liu F(刘芳), Zhou T(周涛), *et al.* Antibacterial activity and composition of ethanol extract from *Fractus Mume*. *Food Sci Tech* (食品科技), 2011(32): 190-193.
- Wu SX(邬苏晓), Xiao ZZ(肖正中), Li SY(李淑仪). Bacteriostatic test *in vitro* on water extracts of 20 Chinese herbs. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 8104-8105.
- He LW(何立巍), Li X(李祥), Wang HL(王洪兰), *et al.* Structures and bioactivity of polysaccharides from *Isatidis Radix*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36: 2179-2182.
- Huang SQ(黄生权), Ao H(敖宏), Guo AL(郭爱玲). Comparison of methods for determination of polysaccharides content in epiphyte health foods. *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技), 2010, 26: 767-771.
- Chen H(陈瀚), Li J(李进), Li X(李祥), *et al.* Antioxidation of different extracts from *Isatidis indigotica in vitro*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18: 184-186.
- Wang GS(王戈莎). The study of isolation and purification of rice peptide and its antioxidant activity. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), MSc. 2008.
- Liao CY(廖春燕), Huang M(黄敏), Huang Y(黄瑶). Decoloring process of polysaccharide extracted from *Plantago asiatica L.* *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技), 2012, 28: 1028-1030.
- Du Z, Liu H, Zhang Z. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of Radix *Isatidis* polysaccharide in murine alveolar macrophages. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 329-335.
- Wei ZY, Wang XB, Zhang HY, *et al.* Inhibitory effects of indigowoad root polysaccharides on porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication *in vitro*. *Antivir Ther*, 2011, 16: 357-363.
- Zhang P(张萍), Liu J(刘捷), Deng YW(邓扬悟), *et al.* The separation of polysaccharides from indigowoad root and its free radical quenching capability. *J Henan Univ Tech* (河南工业大学学报, 自科版), 2006(03): 36-38.
- Zhang M(张明). Comparison of free radical scavenging activity *in vitro* of IRPS from different producing area. *Chin Brew* (中国酿造), 2008, 24: 66-69.
- Chen HR(陈浩然), Li X(李祥), He LW(何立巍), *et al.* Isolation and purification of polysaccharide A from *isatidis indigotica* and study on its structure. *Chin Pharm* (中国药房), 2009, 20: 1642-1644.

(上接第 2045 页)