

下降, CD₄⁺ T细胞比例增加, 表明在 UC中由于 CD₄⁺ CD₂₅⁺ T细胞的异常, 机体出现免疫失衡, 使得效应性 CD₄⁺ T细胞附集于炎症损伤的肠黏膜内, 导致消化道黏膜免疫系统处于高活性状态, 诱发肠道免疫反应增强, 对自身抗原发生不耐受, 损伤性免疫因子(如 TNF- α 、IL-10等)的释放增加, 引起肠粘膜的损伤。安晓霞等研究中发现中药灌肠 1号和柳氮磺胺吡啶均能较好调控小鼠外周血和肠系膜淋巴结 CD₄⁺ CD₂₅⁺ Tregs细胞数量和功能的增加, 一方面可有效抑制过度的免疫反应, 另一方面可调节机体的免疫平衡, 维持机体内环境的相对稳定, 达到有效治疗 UC的目的^[7]。王晓娣^[5]研究 UC患者 CD₄⁺ CD₂₅⁺ T细胞占 CD₄⁺ T细胞的比例明显低于对照组(P<0.01)并且与疾病的活动指数及血沉水平均呈显著负相关(P<0.01); UC患者 FoxP3 mRNA的表达也明显低于对照组(P<0.01)得出 UC患者外周血 CD₄⁺ CD₂₅⁺调节性 T细胞明显降低, 与疾病活动性相关, 提示这类细胞可能在 UC的病理机制中发挥作用, FoxP3表达降低可能是导致 CD₄⁺ CD₂₅⁺ T细胞发育障碍的重要因素。

UC的治疗一直为临床难点, 目前临床上西药常用免疫抑制剂治疗, 但疗效也不甚理想, 且毒副作用大。中药方剂中不乏具有抗炎、止泻、黏膜保护、抑制免疫反应等作用的药物, 可辨证施治, 适当选用^[9]。中药 KKL以猴头菌为君药, 其味甘性平, 归脾胃经, 补脾益气、利五脏、抗肿瘤, 近年报道猴头菌提取物能调节机体的非特异性免疫(巨噬细胞的吞噬作用)和特异性免疫(主要由淋巴细胞介导的细胞免疫和体液免疫)功能, 改善肠黏膜的免疫状态, 具有抗氧化作用, 能有效清除氧自由基, 减轻局部炎症损害, 促进炎症消退, 改善肠黏膜血液循环及营养状态, 促进肠黏膜上皮细胞再生、组织修复和溃疡愈合^[10], 并具有黏膜保护作用和良好的免疫调节作用^[11-12]。方剂中的半枝莲、黄连、厚朴、苍术等具有抗菌消炎、生肌、调节肠道功能等作用^[13-15], 故以半枝莲、黄连、厚朴、苍术为臣; 佐以调和气血之白芍, 兼能柔肝缓急止痛, 清热凉血之马齿苋、槐花; 使以健脾利湿之厚朴、土茯苓。全方选药精炼, 共奏补脾解毒、清热利湿、排脓敛疮、调和气血、凉血止血、止痛止痢之功。KKL先期实验研究已经证实, 中药 KKL对 TNBS模型大鼠结肠炎的发生具有一定预防保护作用, 可能与下调 CD₄⁺/CD₈⁺比值、抑制促炎因子 IL-1 β 分泌和促进抗炎因子 IL-10分泌等免疫调节机制有关^[16]。本实验结果表明, 中药 KKL对 UC大鼠一般状态, 结肠大体损伤和病理组织学损伤均有较好的改善作用, 可以看出 KKL是一种有效的治疗 UC的药物。

提高 UC模型大鼠外周血和肠系膜淋巴结 CD₄⁺ CD₂₅⁺调节性 T细胞可能是其治疗机制之一。但复方中药制剂的实际作用机制可能更为复杂, 有效成分尚不清楚, 及 KKL对 FoxP3基因表达的影响等仍需今后进一步深入研究加以阐明。

参考文献:

[1] Hendrickson BA, Goldfarb R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease[J]. Clin Microbiol Rev 2002, 15(1): 79
 [2] 王旭丹, 袁学勤. 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(18): 2257
 [3] Peipelebosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease[J]. Gut 2004, 53(11): 1556
 [4] 蔡春晓, 刘玉兰. 溃疡性结肠炎的免疫机制[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(5): 496
 [5] 王晓娣. CD₄⁺ CD₂₅⁺ T细胞在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义[J]. 临床内科杂志, 2008, 25(1): 33
 [6] 郭敏, 王静, 王洪武. 溃疡性结肠炎大鼠 CD₄⁺ CD₂₅⁺ T细胞的改变[J]. 中华临床医学杂志, 2008, 9(5): 3
 [7] 安晓霞, 崔玉芳, 刘萍, 等. 中药灌肠 1号对小鼠结肠炎免疫作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1736
 [8] 崔玉芳, 徐茵, 安晓霞, 等. T辅助细胞亚群与炎症性肠病的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20): 2464
 [9] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 胃肠病学, 2007, 12(8): 488
 [10] 李桂珍, 江必武, 胡伟, 等. 猴头菌提取物颗粒治疗轻中度溃疡性结肠炎 80例疗效观察[J]. 临床消化病杂志, 2007, 19(2): 113
 [11] 于成功, 徐肇敏, 祝其凯, 等. 猴头菌对实验大鼠胃粘膜保护作用的研究[J]. 胃肠病学, 1999, 4(2): 93
 [12] 王贤惠, 范秀容. 猴头菌多糖对 T淋巴细胞的调节作用[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1990, 2(4): 40
 [13] 谭永红, 王诗华, 梁容梅. 中药半枝莲的研究进展[J]. 西南国防医药, 2002, 12(2): 152
 [14] 李曼玲, 范莉, 冯伟红, 等. 苍术的化学药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 11(9): 79
 [15] 朱自平, 张明发, 沈雅琴, 等. 厚朴对消化系统的药理作用[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(11): 686
 [16] 龚黎, 于成功, 杨璐. 中药预处理对结肠炎模型大鼠的免疫调节效应[J]. 胃肠病学, 2008, 13(6): 364

葫芦茶根中总多酚提取富集工艺研究

史丽颖, 周旭东, 石海峰, 王永奇*

(大连大学药物研究所, 辽宁 大连 116622)

摘要:目的 优选葫芦茶根中总多酚提取富集工艺。方法 以总多酚含量为考察指标, 采用单因素实验和正交实验结合的方法优选葫芦茶根中总多酚的提取工艺, 并优选 D101型大孔树脂富集葫芦茶根中总多酚的最优条件。结果 优化条件结合工业生产实际, 确定其最佳提取工艺条件为 30℃, 50%丙酮, 8倍量溶剂提取 3次, 4.5 h/次, 此条件下总多酚收率大于 6%。以 D101型大孔树脂对总多酚进行富集, 最佳工艺条件为 2 BV/h流速, 收集 6 BV 30%乙醇洗脱液, 总多酚含量为 77.2%, 收率为 32.3%。结论 该法能有效提取富集葫芦茶根中总多酚。

关键词: 葫芦茶; 总多酚; 提取; 富集; 正交设计

DOI标识: dq:10.3969/j.issn.1008-0805.2010.07.057

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2010)07-1690-02

收稿日期: 2009-11-19 修订日期: 2010-02-20

基金项目: 辽宁省大连市科技计划项目(N \circ 2007A13GX087)

作者简介: 史丽颖(1975-), 女(汉族), 吉林长春人, 现任大连大学讲师, 博士学位, 主要从事天然活性物质研究工作。

*通讯作者简介: 王永奇(1946-), 男(汉族), 吉林德惠人, 现任大连大学教授, 博士学位, 主要从事天然活性物质研究工作。

葫芦茶系豆科葫芦茶属植物葫芦茶 Tadehagi triquetrum (L.) Ohashi的全草, 为民间常用中草药, 主产于广西、江西、广东、福建等地^[1-2]。本品性凉, 味微苦、涩, 具有清热解毒、消积利湿、杀虫防腐等功效, 临床用于预防中暑, 治疗感冒发热、咽喉肿痛、急性肾炎、黄疸肝炎、肠炎、细菌性痢疾、妊娠呕吐等^[3]。目前对该植物的化学成分和生物活性的研究已有报道^[4-6], 发现其

具有抑菌和杀灭椎实螺的作用。我们在研究中发现葫芦茶根中多酚类成分具有较强的杀软体动物作用,因此我们对其富含的多酚类成分的提取和富集工艺进行了考察,旨在提高总多酚的收率,为其综合开发利用奠定基础。

1 仪器与试剂

Unico7200可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司); Labo-ra 4000型旋转蒸发仪(Heidolph公司); BP210S十万分之一电子天平(Sartorius公司); V-560紫外可见分光光度计(Jasco公司)。

葫芦茶全草,2006-03采集于广西壮族自治区平南县,经辽宁师范大学陈辰教授鉴定为 *Tadehagi trichetum* (L.) Ohashi没食子酸(南京泽朗医药科技有限公司,批号:Z120090403 YG纯度99.68%); D101型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司); 所用试剂均为分析纯; 实验用水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总多酚含量测定方法^[7-9]

2.1.1 标准曲线的绘制 精确称取干燥至恒重的没食子酸对照品 10 mg置于 100 mL棕色容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 25 mL置于 100 mL棕色容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 0.025 mg/mL的对照品溶液。分别精确吸取没食子酸对照品溶液 0.05 mL、0.15 mL、0.25 mL置于 100 mL棕色容量瓶中,各加水至 5 mL再分别加入 Folin试剂 1 mL用 29% Na_2CO_3 溶液稀释至刻度,摇匀,以相应的试剂为空白,30 min后,在 754 nm波长下测定吸光度值,以吸光度值为纵坐标,浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程 $C = 3.023A + 0.0405$ ($r = 0.9995$),其线性范围为 0.0025~0.0125 mg/mL。

2.1.2 样品溶液的测定 准确称取 30.0 g粉碎后葫芦茶根,置于 500 mL的圆底烧瓶中,按实验设置的处理条件提取,回收溶剂后冷冻干燥,准确称取待测样品 50 mg用水溶解,置于 100 mL的容量瓶中并定容。摇匀,精密量取 10 mL置于 100 mL棕色容量瓶中定容,摇匀,准确量取 2 mL于 10 mL棕色容量瓶中,按“2.1.1”项下自“各加水至 5 mL”起,同法测定吸光度,计算总多酚的含量和收率。

2.2 葫芦茶根中总多酚提取工艺优选^[10-11]

2.2.1 因素与水平 首先对溶媒浓度、提取温度、提取时间、料液比和提取次数进行了单因素实验,确定了各因素最佳条件分别为:60%丙酮,40℃,6 h 1:8和3次。对各因素进行综合分析,固定提取次数3次,对温度(A)、溶媒浓度(B)、提取时间(C)、料液比(D)进行考察,以总多酚含量为考核指标,按4因素3水平进行 $L_9(3^4)$ 正交实验。各因素水平安排见表1。

表1 考察因素及水平

水平	A	B	C	D
	温度 T/℃	溶媒浓度 (%)	提取时间 t/h	料液比 V:V
1	30	50	4.5	1:6
2	40	60	6.0	1:8
3	50	70	7.5	1:10

2.2.2 正交实验设计及结果 按 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排实验,正交设计及实验结果见表2。

由表2分析结果可知,在葫芦茶总多酚的提取工艺中,各因素对提取效果的影响程度依次为 A>B>C>D,最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1 D_2$,即最佳提取工艺为8倍量50%丙酮,30℃提取3次,4.5 h/次。

2.2.3 验证实验 精确称取粉碎后葫芦茶根 30.0 g(平行6份),置于 500 mL的圆底烧瓶中,加入8倍量50%丙酮,30℃提取4.5 h提取3次。回收溶剂后冷冻干燥。按“2.1.2”项下操作在754 nm波长下测定吸光度。6次测定结果,总多酚平均含量为27.34%,总多酚平均收率为6.26%。结果表明确定的工艺条件优于正交实验中的任何一组,且重复性较好,说明确定的工艺合理。

2.3 葫芦茶根中总多酚富集工艺优选^[12]

2.3.1 D101型大孔吸附树脂的预处理 取一定量的 D101大孔树脂,95%乙醇浸泡24 h将其装入树脂柱内,先以95%乙醇洗至流出液中加3倍量水后无白色混浊现象,改用蒸馏水冲洗至无醇味,备用。

表2 正交设计及实验结果(±s)

序号	A	B	C	D	多酚收率 (%)
1	1	1	1	1	6.20
2	1	2	2	2	5.09
3	1	3	3	3	4.91
4	2	1	2	3	5.25
5	2	2	3	1	5.11
6	2	3	1	2	5.38
7	3	1	3	2	5.00
8	3	2	1	3	4.35
9	3	3	2	1	4.10
K_1	16.20	16.45	15.93	15.41	
K_2	15.63	14.55	14.44	15.47	
K_3	13.45	14.39	15.02	14.51	
k_1	5.40	5.48	5.31	5.14	
k_2	5.21	4.85	4.81	5.16	
k_3	4.48	4.80	5.01	4.84	
R	0.92	0.68	0.50	0.35	

2.3.2 静态吸附量的确定 在250 mL的锥形瓶中加入5 g经处理后的 D101大孔吸附树脂以及100 mL样品溶液(浓度为9.36 mg/mL)。室温条件下振荡24 h取上清液测定总多酚含量。计算物料平衡吸附量: $q = (C_0 - C)V/G$ 式中 C_0 和 C 分别是初始和平衡时溶液中总多酚的浓度(mg/mL), V 为供试品液的体积(mL), G 为树脂量(g)。计算得 D101树脂对多酚的静态吸附量为27.82 mg/g。

2.3.3 动态吸附量的确定 取30 g经处理后 D101大孔树脂装入内径为2.5 cm的树脂柱,取浓度为10.33 mg/mL的葫芦茶根50%丙酮提取液,以2 BV/h的流速连续通过树脂柱,收集流出液,每30 mL收集1个洗脱馏分,测定每个洗脱馏分中总多酚浓度。结果表明,当上柱样品溶液加至300 mL时, D101大孔树脂吸附达到饱和。

2.3.4 D101树脂洗脱条件的选择 洗脱剂浓度的考察:取30 g经预处理后的 D101大孔吸附树脂装柱,取5 g葫芦茶根50%丙酮提取物,用水溶解,过滤,以2 BV/h的流速上柱,吸附完全后用蒸馏水及10%,30%,50%,95%乙醇,以2 BV/h流速进行洗脱,收集每个梯度洗脱液,浓缩干燥并进行含量测定。结果见表3。结果表明,10%和30%乙醇洗脱液中总多酚含量高,收率为33.0%,所以选择用水及30%乙醇进行洗脱。

表3 洗脱剂浓度对洗脱量的影响

洗脱剂	洗脱量 m/mg	总多酚含量 (%)	收率 (%)
水	175	43.2	3.5
10%乙醇	360	79.8	7.2
30%乙醇	1290	77.6	25.8
50%乙醇	315	2.8	6.3
95%乙醇	400	1.5	8.0

洗脱剂用量的确定:分别用水、30%乙醇对已饱和和吸附的 D101大孔吸附树脂(柱体积为30 mL)进行洗脱,分别用去离子水5个柱体积,30%乙醇8个柱体积进行洗脱,测定每个洗脱体积中多酚的含量。结果见表4。

从表4可以看出,水洗脱过程中从第2个柱体积开始洗脱液中总多酚的含量大于50%,30%乙醇洗脱过程中从第7个柱体积开始洗脱液中总多酚的含量小于70%,为富集葫芦茶根中多酚,所以选用1 BV的水水洗脱后用6 BV的30%乙醇洗脱。

采用洗脱条件为1 BV的水水洗脱,6 BV的30%乙醇洗脱,洗脱流速为2 BV/h葫芦茶根中总多酚富集在30%乙醇洗脱液部分,富集物中总多酚含量为77.2%,收率为32.3%。

表 4 洗脱剂用量的影响

水洗脱		30%乙醇洗脱	
洗脱体积编号	多酚含量(%)	洗脱体积编号	多酚含量(%)
1	32.4	1	73.0
2	50.7	2	77.6
3	52.9	3	84.0
4	59.4	4	83.9
5	62.3	5	88.3
		6	71.8
		7	40.3
		8	33.5

3 讨论

在对葫芦茶根杀软体动物实验中发现其具有较强的杀软体动物作用,经化学成分分析发现其富含多酚类成分^[9],因此我们对葫芦茶根中富含的多酚类成分的提取和富集工艺进行了优化。确定了最佳提取工艺条件为 30℃, 50%丙酮, 8倍溶剂提取 3次, 4.5 h/次, 此条件下总多酚收率大于 6%。以 D101型大孔树脂对总多酚进行富集, 最佳工艺条件为 2 BV/h流速, 收集 6 BV 30%乙醇洗脱液, 总多酚含量为 77.2%, 收率为 32.3%。D101树脂对葫芦茶多酚的吸附容量大, 吸附性能稳定, 吸附柱可按比例放大用于工业富集葫芦茶多酚。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1995.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.

[3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.

[4] 文东旭, 郑学忠, 史剑侠, 等. 葫芦茶化学成分的研究(I)[J]. 中草药, 1999, 30(4): 252

[5] 文东旭, 陆敏仪, 唐人九, 等. 葫芦茶化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 2000, 31(1): 3.

[6] 李树荣, 李琦华, 张菁, 等. 葫芦茶对椎实螺的杀灭实验[J]. 中兽医学杂志, 2003, 13.

[7] 国家药典委员会. 中国药典, I部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[8] 吴小娟, 林红景, 唐玲, 等. 山茶种子抗骨质疏松有效部位群化学成分的含量测定[J]. 中草药学, 2007, 5(2): 107

[9] 史丽颖, 于大永, 冯宝民, 等. 葫芦茶根和叶中化学成分定量分析[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 289

[10] 赵子剑, 连琰, 陈迪钊. 正交实验优选鱼腥草总黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2389

[11] 吴国宏, 熊何健. 荔枝叶中多酚类物质的提取制备[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 131

[12] 刘欣, 高月娟, 王建明, 等. 大孔吸附树脂对丁香叶中丁香苷的富集工艺研究[J]. 中草药, 2008, 39(11): 1655

五指毛桃水提液体外抗菌作用的实验研究

王晓平¹, 段丽菊², 陈晓白¹, 李丽梅³, 陆奇丰³, 李鉴清³

(1. 玉林师范学院 化学与生物系, 广西 玉林 537000

2. 郑州大学 公共卫生学院, 河南 郑州 450001;

3. 玉林师范学院 化学与生物系 本科生, 广西 玉林 537000)

摘要:目的 研究五指毛桃水提液体外抗菌作用, 为其在临床的应用提供依据。方法 制备五指毛桃水提液, 采用圆滤纸片法测定其对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、黄曲霉的抗菌效果; 采用圆滤纸片一二倍连续稀释法测定其最低抑菌浓度。结果 在一定的浓度下, 五指毛桃水提液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均具有抑制作用, 最低抑菌浓度均为 1 g/ml 而对黑曲霉、黄曲霉没有抑制作用。结论 五指毛桃水提液对细菌具有较强的抑制作用, 具有良好的开发前景。

关键词:五指毛桃; 体外抗菌; 最低抑菌浓度

DO 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2010.07.058

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2010)07-1692-02

五指毛桃 Radix ficus Hirae 为桑科植物粗叶榕 Ficus hirta Vahl. 的干燥根, 又名“南芪”“五爪龙”“五指牛奶”“土北芪”^[1]。五指毛桃味辛、甘, 性平, 具有健脾利湿、益肺止咳、舒筋通络的功效, 在临床上主要用于治疗脾虚浮肿、食少无力、肝炎、风湿痹痛、肺痿咳嗽等症^[2]。原植物分布在我国南部及西南部地区, 因疗效独特而在华南地区较为广泛地应用。五指毛桃具有抗炎镇痛作用, 在临床上用来治疗慢性盆腔炎、慢性支气管炎、肝炎、膀胱炎、肺结核等病^[3,4]。但其药理研究报道较少, 本文初次对其水提液的抗菌作用进行了研究, 为其在临床的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验菌种 金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus, 枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis, 大肠杆菌 Escherichia coli, 黑曲霉 Aspergillus niger, 黄曲霉 Aspergillus flavus 均由本系微生物与制药工程实验室提供。

1.2 试剂和仪器 五指毛桃购于玉林市中药材市场。牛肉膏蛋白胨培养基, 查氏培养基。细菌培养箱、低温离心机等。

2 方法

2.1 五指毛桃水提液的制备 称取五指毛桃 200g 加蒸馏水 10 倍, 浸泡 1h 加热煮沸后文火煎煮 2h 趁热滤取药液。药渣再加 5 倍水, 煎煮 1h 后取滤液。2 次滤液合并后, 加热浓缩, 药液浓缩至 4g/ml, 115℃ 灭菌 30 min 置 4℃ 冰箱保存备用^[5]。

2.2 细菌悬液的制备 将菌种分别接种到相应斜面培养基上, 置于恒温箱中活化, 细菌和霉菌的活化条件分别为 28℃ 下培养 48h, 37℃ 下培养 24h 经活化后的菌种用生理盐水稀释到

收稿日期: 2009-11-10 修订日期: 2010-02-08

基金项目: 广西教育厅科研项目 (No. 200809MS124 200911MS195)

作者简介: 王晓平 (1968—), 女 (汉族), 广西玉林人, 现任玉林师范学院化学与生物系副教授, 学士学位, 主要从事药理学和生理学研究工作。