

构树皮总黄酮提取及抗菌活性研究

开伟华¹, 寇婉青², 程正³, 钱世兵³, 陈叶平³

(1. 铜陵职业技术学院医学系, 安徽 铜陵 244000; 安徽中医药大学药学院 安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230012; 3. 铜陵市食品药品检验所, 安徽 铜陵 244000)

[摘要]目的 提取构树皮有效的抑菌活性部位。方法 采用正交试验法优化构树皮黄酮最佳超声提取工艺, 并采用 AB-8 大孔吸附树脂富集构树皮总黄酮提取物活性部位, 用平皿药基法比较不同部位的抑菌效果。结果 构树皮总黄酮的最佳提取工艺为: 以 10 倍体积的 70% 乙醇为溶剂, 超声提取 20 min, 功率 300 W。经 AB-8 大孔吸附树脂富集分离后, 70% 乙醇洗脱部位对浅部真菌红色毛癣菌和白色念珠菌均有良好的抑制作用。结论 所采用的工艺操作简单、耗能低、总黄酮提取率高, 抑菌作用强。

[关键词] 构树皮; 总黄酮; 有效成分提取; 正交试验; 抑菌试验

[中图分类号] R284.2; R285 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2015.03.030

构树(*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.) 为桑科构属乔木, 雌雄异株, 又名谷浆树、楮桃树、沙纸树。构树的药用价值很高, 其根、皮、叶、浆、果实和种子均可入药, 具有抗氧化、抗血小板凝聚、降压、抗肿瘤、增强免疫和抑菌等作用^[1]。其中, 构树的抑菌作用一直受到人们的关注, 如《本草纲目》云: “去风湿肿胀, 癣疮。”《圣惠方》记载: “治癣湿痒不可忍, 构

树叶半斤, 细切, 捣令极烂, 敷于癣上。”

构树皮又名楮树皮, 性味甘平, 能祛风、活血、利尿, 可用于治疗风湿痹痛、跌打损伤、虚肿、皮炎等。构树皮的化学成分主要为黄酮类、二苯丙烷类化合物以及香豆素、萜类、生物碱、脂肪油等^[2-4], 黄酮类成分是构树皮多类化学成分中的主要成分, 可作为特征性成分对其提取物进行表征。本研究采用正交设计法优化构树皮黄酮最佳提取工艺, 并采用大孔吸附树脂富集构树皮总黄酮, 比较不同洗脱部位抑菌效果, 寻找构树皮有效的抑菌活性部位。

作者简介: 开伟华(1979-), 女, 硕士, 讲师

通信作者: 寇婉青, 12629009@qq.com

Identification of *Carthamus tinctorius* Flower and Its Counterfeits by Microscopic Characteristics

ZHANG Fan^{1,2}, ZHAO Xin-lei¹, ZHANG Wei², FANG Cheng-wu^{1,2}, ZHOU Jian-li², LIU Yao-wu¹

(1. Bozhou Vocational and Technical College & Bozhou Institute of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Bozhou 236800, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To identify *Carthamus tinctorius* flower and its counterfeits in the traditional Chinese herbal medicine market. **Methods** The observation and identification of *Carthamus tinctorius* flower and its counterfeits were performed by identification of microscopic characteristics. **Results** There were substantial differences between *Carthamus tinctorius* flower and its counterfeits. The authentic *Carthamus tinctorius* flower could be identified by the color and microscopic characteristics of its corolla. The color of filaments and anthers, as well as the color of corolla after being soaked in water, could help tell if the active components were extracted or not. The features of substances attached to the surface of corolla could help tell if extra mass was added in *Carthamus tinctorius* flower or not. The stained *Carthamus tinctorius* flower could be identified by the red color of pollen grains. **Conclusion** Identification of microscopic characteristics can precisely distinguish the authentic *Carthamus tinctorius* flower from its counterfeits, which can be used as a reference method for identification of traditional Chinese medicine.

[Key words] *Carthamus tinctorius* flower; counterfeit; identification of microscopic characteristics

1 材料

1.1 药品与试剂 构树皮:安徽亳州中药材市场; 98%槲皮素对照品:Sigma Aldrich; AB-8大孔树脂:国药集团化学试剂有限公司;三氯化铝(分析纯):Sigma Aldrich;其他试剂均为分析纯。红色毛癣菌、白色念珠菌:安徽铜陵市食品药品检验所微生物室提供。

1.2 主要仪器 T6紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限公司;旋转蒸发器:上海申生科技有限公司;电子分析天平:Shimadzu;鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 测定波长的选择^[5-7] 取构树皮粗提物适量,精密称定,加甲醇使溶解,摇匀,制成含10 mg/mL构树皮提取物溶液,作为供试品溶液。另取105℃干燥至恒质量的槲皮素对照品适量,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成0.1 mg/mL槲皮素溶液,作为对照品储备液。精密量取槲皮素对照品储备液和供试品溶液各1.0 mL,分别加入1%三氯化铝甲醇溶液各1 mL,摇匀,放置15 min后,在200~600 nm波长范围内进行扫描,以不加槲皮素标准液为空白,记录扫描图(见图1)。样品在270 nm处的最大吸收峰和槲皮素吸收峰的重合度好,因此选择270 nm为测定波长。

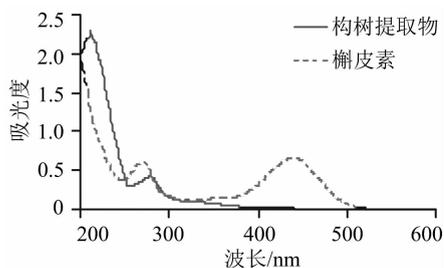


图1 槲皮素和构树皮提取物的紫外扫描图

2.2 标准曲线绘制 精密量取槲皮素对照品储备液0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置10 mL具塞试管中,各加入1%三氯化铝-甲醇溶液1 mL,并加甲醇稀释至刻度,摇匀,放置15 min,以不加槲皮素标准液为空白,于270 nm波长下测定吸光度,得出标准曲线 $A=0.027 C+0.004 9$, $r=0.999 8$,说明槲皮素含量在0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内具有良好的线性关系。

2.3 构树皮总黄酮提取 称取构树皮干燥粉末10.0 g,加入不同体积倍数的乙醇,采用超声处理,滤过,合并滤液,减压回收溶剂浓缩至干,得到构树皮粗提物。分别称取构树皮粗提物,配置成10 mg/mL供试品溶液,精密量取供试品液各1.0 mL,分别加入1%三氯化铝甲醇溶液各1 mL,摇匀,放置显色15

min后,由回归方程求出稀释液中总黄酮类化合物浓度,计算出构树皮总黄酮提取率。总黄酮提取率按下式计算:总黄酮含量=(总黄酮量/浸膏量) \times 100%。

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,选用不同的乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声时间(C)、超声功率(D)为试验因素,优化超声法提取构树皮总黄酮最佳工艺参数,具体因素水平安排见表1。

表1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A/%	B	C/min	D/W
1	55	1:10	20	300
2	70	1:15	30	350
3	85	1:20	40	400

2.4 构树皮总黄酮富集 称取构树皮干燥粉末100.0 g,按最佳提取工艺,超声提取,滤过,合并滤液,减压回收溶剂至无醇味,浓缩液过滤后加水稀释为0.5 g/mL生药溶液,按照药液-树脂比约1:5上AB-8大孔吸附树脂,依次以蒸馏水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇梯度洗脱,分别收集各流分,回收溶剂至干,分别得到30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位,按照“2.3”项下方法操作,自“加1%三氯化铝甲醇溶液”起,依法测定吸收度,计算出不同洗脱部位中总黄酮含量。

2.5 构树皮不同活性部位体外抑菌作用试验^[8-9] 选用红色毛癣菌和白色念珠菌,用平皿药基法^[10-11],以沙堡琼脂为基础培养基,分别取30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位浓缩提取物0.1 g溶于适量水中,置100 mL量瓶中,用灭菌双蒸馏水稀释至刻度。精密量取药液0.1 mL加入8 mL琼脂培养基中混匀,用灭菌双蒸馏水稀释成不同浓度,以溶剂及其基础为对照,用菌悬液法配成相当于0.5麦氏浊度的菌悬液备用,接种,培养,培养温度 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$,时间为7 d,观测抑菌效果。

3 结果

3.1 构树皮总黄酮提取试验 正交试验结果见表2。方差分析结果见表3。由方差分析结果可知,总黄酮提取优选工艺条件为 $A_2B_1C_2D_3$,而从极差看出影响总黄酮含量的主要影响因素为乙醇浓度和超声时间,从节约能源角度确定总黄酮提取最佳工艺为 $A_2B_1C_1D_1$,即以10倍体积70%乙醇冷浸,超声20 min,功率300 W,总黄酮提取率最高。由表3可知,因素A对提取工艺有显著性影响,因素B、C、D对提取工艺的影响无统计学意义。

3.2 构树皮总黄酮验证试验 称取构树皮干燥粉

末 10.0 g,按最佳工艺重复做 3 次,测得总黄酮含量平均值为 2.18%。

表 2 构树皮总黄酮的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

因素	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	0.97
2	1	2	2	2	1.56
3	1	3	3	3	1.62
4	2	1	2	3	2.26
5	2	2	3	1	2.22
6	2	3	1	2	2.19
7	3	1	3	2	1.92
8	3	2	1	3	1.76
9	3	3	2	1	1.87
1 水平和	4.149	5.151	4.920	5.061	
2 水平和	6.669	5.541	5.691	5.670	
3 水平和	5.550	5.679	5.760	5.640	
全距	2.520	0.528	0.840	0.609	

3.3 验证试验 称取构树皮干燥粉末 10.0 g,按最佳工艺重复做 3 次,测得总黄酮含量平均值为 2.18%。

3.4 构树皮总黄酮富集分离 对得到的各乙醇洗脱部位测定总黄酮含量,结果见表 4。总黄酮含量:

表 5 不同浓度乙醇洗脱部位双蒸馏水液的抑菌作用

洗脱部位	菌株	抑菌试验结果									
		1:10 稀释	1:20 稀释	1:40 稀释	1:80 稀释	1:160 稀释	1:320 稀释	1:640 稀释	双蒸 馏水	对照	
30%乙醇	红色毛癣菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
50%乙醇	红色毛癣菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
70%乙醇	红色毛癣菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
90%乙醇	红色毛癣菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

注:菌生长用“+”号表示,菌不生长用“-”号表示;对照品为不加提取药液的基础培养基。

4 讨论

浅部真菌病是皮肤科临床最常见的皮肤病,是由寄生于角蛋白组织的致病真菌所引起的皮肤病。致病菌主要为皮肤癣菌,其次为浅部念珠菌,感染人体后可引起组织反应而发生红斑丘疹、水疱、鳞屑、断发、脱发和甲板改变等。目前,针对浅部真菌病的治疗,已开发了多种口服和外用抗真菌药物。化学药物具有一定的抗真菌作用,但由于真菌感染率的不断增加,真菌耐药菌株日益增多,加之化学药物的毒性和不良反应以及耐药性的产生,使得化学药物治疗难度不断增大,这种现状迫切要求人们不断寻

70%乙醇洗脱部位>50%乙醇洗脱部位>30%乙醇洗脱部位>90%乙醇洗脱部位。

表 3 正交试验结果方差分析

差异来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	1.063	2	21.260	21.260	<0.05
B	0.050	2	1.000	1.000	>0.05
C	0.145	2	2.900	2.900	>0.05
D	0.079	2	1.580	1.580	>0.05

表 4 构树皮各部位总黄酮含量

部位	浸膏量/g	总黄酮含量/%
30%乙醇洗脱部位	2.05	12.7
50%乙醇洗脱部位	1.69	20.7
70%乙醇洗脱部位	0.99	33.0
90%乙醇洗脱部位	0.28	12.0

3.5 构树皮各部位体外抑菌试验 构树皮提取物 30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位提取物对红色毛癣菌和白色念珠菌均有一定的抑制作用,70%乙醇洗脱部位抑菌作用最强,50%乙醇洗脱部位次之,30%乙醇洗脱部位和 90%乙醇洗脱部位抑菌作用最差,这与各部位总黄酮含量呈对应关系。见表 5。

找高效低毒的抗真菌药物。因此,从中草药中有效地提取、筛选抗真菌活性成分,寻找安全性好、抗菌谱广、疗效高的抗真菌药物已成为一个重要的研究方向^[12]。

构树因其耐旱、耐湿、耐冷、萌芽力强,在自然界中有很强的适应性,在我国黄河两岸、大江南北、平原山区随处可见,资源非常丰富。本研究通过对构树皮总黄酮的提取、纯化以及不同洗脱部位的体外抑菌试验,确定构树皮最佳提取工艺为:取构树皮粉末,以 10 倍体积的 70%乙醇为溶剂,超声提取 20 min,功率 300 W,过滤,合并滤液,减压回收溶剂至

无醇味,再经 AB-8 大孔吸附树脂富集,依次以蒸馏水、30%、50%、70%和 90%乙醇洗脱,收集 70%乙醇洗脱部位,浓缩至干,即得。该工艺操作简单、耗能低、总黄酮提取率高,对浅部真菌红色毛癣菌和白色念珠菌均有良好的抑制作用,为进一步开发抑菌活性强、质量可控、性质稳定且毒性和不良反应小的抑制浅部真菌制剂奠定了基础。

(铜陵市食品药品检验所管大平对构树原料进行了鉴定,铜陵市食品药品检验所微生物室提供了菌种,谨致谢意!)

参考文献:

- [1] 朱开梅,刘建楠,顾生玖,等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(1):198-201.
- [2] Oueslati MH, Ben Jannet H, Mighri Z, et al. Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra* [J]. J Nat Prod, 2006, 69(9):1366-1369.
- [3] 巢剑非,殷志琦,叶文才,等. 构树化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13):1078-1070.
- [4] 殷志琦,巢剑非,张雷红,等. 构树化学成分研究[J]. 天

- 然产物研究与开发, 2006, 18(3):420-422, 425.
- [5] 张沐新,张新茹,刘松艳,等. 分蘖葱头水溶性总黄酮含量测定方法的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 915-916.
- [6] 郡海燕,邹纯才. 瓜蒌薤白颗粒中总黄酮的含量测定[J]. 皖南医学院学报, 2012, 31(5):444-446.
- [7] 罗美红,吕寒,李维林. 枇杷叶中总黄酮含量的高效液相色谱测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3):582-583.
- [8] 李万仓. 构树叶活性成分分析及抑菌作用研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2008:22-25.
- [9] 邹雅,朱敬先,蒙秉新,等. 3种外制剂对某部新兵集训中皮肤真菌病的预防作用[J]. 武警后勤学院学报, 2011, 20(3):182-185.
- [10] 李影林,宋文纲,王艾琳,等. 临床微生物学及检验[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1991:586.
- [11] 方玉复,魏玉平,于香安,等. 陈皮对浅部真菌的试管内抑菌实验及临床疗效观察[J]. 中国皮肤性病杂志, 1997, 11(5):275.
- [12] 徐文晖,李兴从. 抗真菌天然化合物研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(5):1009-1013.

(收稿日期:2014-09-24;编辑:曹健)

Extraction and Antimicrobial Activity of Total Flavonoids from Cortex of *Broussonetia papyrifera*

KAI Wei-hua¹, KOU Wan-qing², CHENG Zheng³, QIAN Shi-bing³, CHEN Ye-ping³

(1. Department of Medicine, Tongling Vocational and Technical College, Anhui Tongling 244000, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Materia Medica, Anhui Hefei 230012, China; 3. Tongling Institute for Food and Drug Control, Anhui Tongling 244000, China)

[Abstract] **Objective** To extract the potentially antimicrobial components from cortex of *Broussonetia papyrifera*. **Methods** The optimization of ultrasonic extraction of flavonoids from cortex of *Broussonetia papyrifera* was performed using the orthogonal design. The active components of flavonoids extract from cortex of *Broussonetia papyrifera* were enriched using AB-8 macroporous resin. Comparison of antimicrobial effects between different components was performed using drug-containing culture medium. **Results** The optimal extraction of total flavonoids from cortex of *Broussonetia papyrifera* was performed by 20-min ultrasonic extraction (300 W) using 10 volumes of 70% ethanol as a solvent. After enrichment and separation using AB-8 macroporous resin, the 70% ethanol elution fraction had good inhibitory effects on superficial fungi including *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **Conclusion** This extraction technique features simple operation, low power consumption, high extraction rate of total flavonoids, and potent antimicrobial activity of antimicrobial components.

[Key words] cortex of *Broussonetia papyrifera*; total flavonoids; extraction of active components; orthogonal test; antimicrobial assay