

香鳞毛蕨提取工艺的正交优化设计

樊锐锋^{1,2}, 黄庆阳², 常 纓³

(1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省科学院 自然与生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040;

3. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:用 $L_9(3^4)$ 正交设计优化香鳞毛蕨有效成分超声法提取工艺, 用滤纸片扩散法检测抑菌效果。结果表明: 醇提超声法为最佳的提取方法, 最佳提取条件为 60℃, 乙醇浓度为 50%, 提取 10 min。

关键词: 香鳞毛蕨; 提取方法; 抑菌效果

中图分类号: S 682.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)04-0194-03

香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans* (L.) Schott) 是以黑龙江省为分布区的岩生蕨类植物。民间验方利用香鳞毛蕨已有几十年的历史, 通过多年的人体试验, 发现香鳞毛蕨对老年性皮肤瘙痒、青少年的痤疮、扁平疣的治疗效果极其显著, 具有极大的开发潜力和应用前景。目前, 有关香鳞毛蕨的抑菌、抗肿瘤活性的研究报道较多^[1-2], 现利用正交分析方法优化了香鳞毛蕨有效成分的超声提取工艺, 该项研究对于保护香鳞毛蕨资源和开发利用提供了新的信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 采自五大连池、镜泊湖、伊春和呼中地区的香鳞毛蕨植株数株阴干备用, 并于 5~10 月间每月 15 号在五大连池地区采集香鳞毛蕨植株数株阴干备用。供试材料香鳞毛蕨植株由中科院植物研究所张宪春研究员和哈尔滨师范大学刘保东教授鉴定。香鳞毛蕨植株标本保存于东北农业大学植物教研室(标本号 WDLC~1、WDLC~2、OP~1、HZ~1、YC~1、JPH~1、JPH~2)。

1.1.2 试验仪器 索氏提取器(北京宏达化学仪器有限公司); SHB-B95 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); ZFQ-972 旋转薄膜蒸发器(天津市玻璃仪器厂)。

1.1.3 供试细菌 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽

孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 购自黑龙江微生物研究所。牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 18 g、水 1 000 mL、pH 7.2~7.4。

1.2 试验方法

1.2.1 离体试验抑菌活性测定 在超净工作台内, 将上述供试菌用斜面活化后, 活化菌种接种于灭菌后装有液体培养液的小三角瓶中摇床培养 28℃ 培养 12 h, 4℃ 放置备用或马上接种使用。抑菌效果验证采用滤纸片扩散法^[3]。

1.2.2 香鳞毛蕨提取优化设计 香鳞毛蕨植株粉碎后过 80 目筛, 每份称取 5 g, 根据沈志滨的香鳞毛蕨生药学的研究和对香鳞毛蕨提取液进行的初步抑菌试验结果^[1], 分别采用水提液、醇提液常规浸泡法、回流提取法、超声提取法提取香鳞毛蕨提取液, 并以提取所用的溶媒水和 70% 乙醇溶液作为对照, 探讨对几种细菌的抑制作用, 找出最佳的提取方法及最佳的指示菌。

根据上述试验结果, 采用滤纸片法考察乙醇浓度、提取温度、提取时间对提取物抑菌效果的影响。用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以乙醇浓度、提取温度、提取时间 3 个因素, 选择 4 个水平进行正交实验^[4], 因素水平表见表 4。以指示菌枯草芽孢杆菌为研究对象, 以试验抑菌圈直径的平均值为指标评价提取液的抑菌效果。

表 1 正交设计因素水平表

水平	提取时间 A/h	提取温度 B/℃	乙醇浓度 C/%
1	10	30	25
2	20	45	50
3	30	60	75
4	40	75	90

2 结果与分析

2.1 香鳞毛蕨不同提取液的抑菌效果

由表 2 可知, 醇提液效果明显好于水提液的抑菌效

第一作者简介: 樊锐锋(1980-), 男, 在读博士, 讲师, 现主要从事资源植物学和植物分子生物学研究工作。

通讯作者: 常纓(1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向为资源植物学与分子生物学。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070291/C020601)。

收稿日期: 2010-12-08

果。醇提超声法明显好于回流法和常规浸泡法。香鳞毛蕨水提取液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果不明显,70%乙醇对照组的抑制效果也不明显,且超声波提取方法简单、便捷、省时,是香鳞毛蕨有效成分提取的最佳方法。

试验结果也显示了香鳞毛蕨提取液对枯草芽孢杆菌的抑制效果好于金黄色葡萄球菌,对大肠杆菌的抑制效果最差。以下试验中均选取枯草芽孢杆菌作为指示菌。

表2 不同提取方法的提取液对供试菌的抑制效果

组别	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
水提液	—	+	—
醇提常规法	—	++	+
醇提回流法	+	++	+
醇提超声法	+	+++	+++
70%乙醇	—	+	+

注:“—”无抑菌圈,“+”表示有抑菌圈但不明显(仅小纸片没有长菌),“++”“+++”表示抑菌圈明显。

表3 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

试验号	提取时间 A/h	提取温度 B/℃	乙醇浓度 C/%	抑菌圈直径 平均值
1	1	1	1	1.38
2	1	2	2	1.92
3	1	3	3	1.61
4	1	4	4	1.49
5	2	1	2	1.62
6	2	2	1	1.74
7	2	3	4	1.82
8	2	4	3	1.58
9	3	1	3	1.53
10	3	2	4	1.73
11	3	3	1	1.75
12	3	4	2	1.56
13	4	1	4	1.36
14	4	2	3	1.58
15	4	3	2	2.68
16	4	4	1	1.61

表4 极差分析

变量	平方和	自由度	均方	F值
时间	0.01907075	3	0.006356917	0.618261835
温度	0.22766075	3	0.075886917	7.380619696
浓度	0.12833075	3	0.042776917	4.160402973
误差	0.06169150	6	0.010281917	
总计	0.43675375	15	0.029116917	

2.2 提取工艺条件的优化

采用 $L_9(3^4)$ 正交表,以乙醇浓度、提取温度、提取时间3个因素,选择4个水平进行正交实验,因素水平见表4。以指示菌枯草芽孢杆菌为研究对象,以试验抑菌圈直径的平均值为指标评价提取液的抑菌效果。

通过正交实验和极差分析可知,各因素对提取效果影响的大小顺序为 $B > C > A$,即提取温度 $>$ 乙醇浓度 $>$ 提取时间。根据F值大小发现,超声波法提取的不同超

声温度效果影响最大,最佳提取温度应为 60°C ;乙醇浓度对抑菌效果也有影响,最佳浓度应为 50% ;提取过程对时间相关性最小,不同时间对香鳞毛蕨提取液的提取效果几乎没有差异,因此时间确定为 10 min 。由此确定最佳提取工艺为 60°C ,乙醇浓度为 50% ,提取 10 min 。按此工艺获得的提取液抑菌圈直径平均值为 2.18 ,工艺稳定,结果可靠。

3 讨论

3.1 提取工艺条件的优化

该研究中超声波法获得的香鳞毛蕨提取液的抑菌效果最好。超声波法的最大优点是大大缩短了提取时间,操作简单。不需要高温浓缩,减少了有效成分在高温下的分解^[5]。采用超声提取方法,以枯草芽孢杆菌为指示菌,考察乙醇浓度、提取温度、提取时间对提取物抑菌效果的影响。经过试验比较,提取时间 5 min ,提取温度 60°C , 50% 乙醇浓度为提取香鳞毛蕨有效成分的最优条件。

3.2 提取温度

在 60°C 时,提取液对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径达最大,抑菌效果最好,但随着温度继续升高,抑菌效果反而降低;这可能是因为温度过高,在超声波作用下溶出的杂质增多,导致抑菌效果下降。较高的温度也可能使香鳞毛蕨中的有效成分失活,这也可能是在浸提方法和回流加热法中使用旋转蒸发器导致温度过高而使药效降低的原因。

3.3 乙醇浓度

随着乙醇浓度的提高,抑菌圈增大,浓度在 50% 时,抑菌圈直径最大,为 2.36 cm ,抑菌效果最好。浓度继续增大时,抑菌圈反而减小,抑菌作用降低,这可能由于一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出增多,干扰因素随之增大,导致抑菌效果下降。

香鳞毛蕨的抑菌作用是经多年民间用药检验的,对其进行的研究具有重大的实践意义,与其同属植物相同,其具有的抑菌作用主要是因为其含有间苯三酚衍生物,虽然已有学者对其所含间苯三酚衍生物进行了研究^[6],但未能明确指出其中主要起作用的是哪些成分,也未对比各有效成分之间抑菌效果的差异,这有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 沈志滨,马英丽,江蔚新. 香鳞毛蕨对真菌的抑制作用[J]. 中草药, 2005, 36(5): 735-736.
- [2] 沈志滨,金哲雄,张德连. 香鳞毛蕨治疗银屑病的药理作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(5): 844-845.
- [3] Lara S K, Qing L, Chen W, et al. 4-Aryl-1,2,3-triazole: A novel template for a reversible methionine aminopeptidase inhibitor, optimized to inhibit angiogenesis *in vivo* [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(18): 5644-5647.

药用植物红大戟快速繁殖技术研究

黄 浩^{1,2}, 文 学³, 韦 莹¹, 凌征柱¹, 刘 芳⁴

(1. 广西药用植物园, 广西 南宁 530023; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642; 3. 南宁市试验中心, 广西 南宁 530005;

4. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005)

摘 要:对药用植物红大戟快速繁殖的研究进行了详细对比分析,指出在不同快速繁殖方法中存在的问题和不足,提出与快速繁殖关键技术相关的建议,为红大戟种质资源保护和规范化种植奠定理论基础。

关键词:红大戟;营养繁殖;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0196-03

红大戟(*Knoxia valerianoides* Thorel et Pitard.)为茜草科红芽大戟属多年生草本植物,主产广东、广西和云南。药用部分为块根,有利尿、消肿、散结和治痛肿疮毒的功效。大多作为外用消肿类药品的主要成分。由于缺乏人工栽培种植,野生资源遭受严重乱采滥挖,导致价格不断飚升,2009 年底,市场价格每公斤高达 330 元,野生药材已无法满足企业正常生产,市场需求缺口较大。

第一作者简介:黄浩(1972-),男,在读博士,助理研究员,研究方向为植物遗传育种,现从事药用植物保育工作。

基金项目:广西省卫生厅自筹基金资助项目(Z2009343);南宁市科技开发计划资助项目(201002049C);广西药用植物园青年基金资助项目(桂药基 200815)。

收稿日期:2010-12-17

在自然条件下,红大戟主要利用种子繁殖,因种子未充分成熟或胚发育不完全,自然散落地上的种子的生活力和萌发率较低^[1]。目前,人工种植大都处于研究阶段,具有一定规模的种植尚无任何相关报道。另外,因生长至药材收获期的时间长达 2~3 a,并且管护难度大,药农往往从眼前经济利益出发,只采不种。近几年来,因自然繁殖缓慢和药材供给不足引发的滥采乱挖,野生资源已濒临灭绝^[2]。经初步调查,目前仅在广西南明、广西百色和云南保山等小部分适生地发现数量不多的野生资源。

现就红大戟在国内的研究状况,指出在不同快速繁殖方式中存在的问题和不足,结合课题组对红大戟已做的研究,对繁殖关键技术提出一些建议,为红大戟种质资源保护和规范化种植奠定理论基础。

[4] 吴杰,翁涛,薛巧星.仙人掌中槲皮素提取条件的正交设计优化[J]. 武汉生物工程学院学报,2006(2):95-97.

[5] 江蔚新,朱正兰.超声波提取龙胆多糖的研究[J].中草药,2005,36

(6):862-864.

[6] 沈志滨,罗文英,严优苟,等.香鳞毛蕨中间苯三酚衍生物的研究[J]. 中药材,2006,29(6):560-561.

Comparative Studies on the Excellent Technological Designing and Effects of Antimicrobia of *Dryopteris fragrans* (L.) Schott

FAN Rui-feng¹, HUANG Qing-yang², CHANG Ying³

(1. Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040 ; 2. Institute of Nature and Ecology Academy of Sciences of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150040; 3. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: The L₉ (3⁴) orthogonal test was applied to optimize the ultrasonic extraction technology and the effect of bacteriostasis was determined with slip diffusion method. The results showed that conclusion ethanol concentration was the best extraction method, 60℃, 50% ethanol concentration, 10 min were the best extraction condition. .

Key words: *Dryopteris fragrans* (L.) Schott; technological designing; effects of antimicrobia