

正交试验优选丁香抑马拉色菌活性物质提取工艺

宋杰¹,董银卯¹,孟宏^{2*}

(1. 北京工商大学,北京 100048; 2. 中国中医科学院针灸研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:优选丁香中抑菌成分的提取工艺。方法:以糠秕马拉色菌为供试菌,通过管碟法测试抑菌效果,通过单因素试验和正交试验确定丁香提取物的最优提取工艺。结果:丁香最优提取工艺为70%乙醇回流提取,料液比1:25,提取时间2 h,提取温度65℃。丁香醇提取物对糠秕马拉色菌的抑菌圈直径为(23.08±0.46)mm,抑菌活力为高度敏感。结论:优选的提取工艺稳定可行。

[关键词] 丁香;糠秕马拉色菌;提取;抑菌

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0068-04

Optimization of Extraction Technology for Anti-Malassezia Furfur Active Substances from *Eugenia caryophyllata* by Orthogonal Test

SONG Jie¹, DONG Yin-mao¹, MENG Hong^{2*}

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize of extraction technology of antibacterial substances from *Eugenia caryophyllata*. **Method:** With malassezia furfur as test bacteria, antibacterial effect was tested by cup-plate method, extraction technology of extract from *E. caryophyllata* was optimized by single factor test and orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology was as following: refluxing extracted 2 h with 25 times the amount of

[收稿日期] 20120620(416)

[第一作者] 宋杰,在读硕士生,E-mail: sj5850@126.com

[通讯作者] *孟宏,副教授,从事中医药对损容性疾病的作用研究及对相关优势病种的作用研究,Tel: 010-68987110, E-mail: menghong2000@163.com

虑,选用LX-18型大孔树脂来纯化茶多酚。最终确定的纯化工艺为样品液中生药与干树脂质量比1:1,依次用10 BV水、10 BV 50%乙醇以速度2 mL·min⁻¹洗脱,收集50%乙醇洗脱液,减压浓缩至干,茶多酚纯度>50.0%,可有效去除杂质,便于制剂工艺研究,为茶梗的充分利用提供试验依据,具有一定的生产实用价值。

[参考文献]

[1] 傅维康. 医药文化随笔[M]. 上海:上海古籍出版社, 2006:178.
[2] 冯秋月. 探讨茶梗开发应用的途径[J]. 福建茶叶, 2010,32(12):35.

[3] 徐芑,刘东成. 茶多酚抗氧化和抑菌机制的研究[J]. 中国医药导报,2008,5(23):21.
[4] 吴顺德. 茶多酚-天然的心血管保健师[J]. 健康指南:中老年,2012,19(1):38.
[5] 郑笑男. 茶多酚抗氧化功能及保护实验性肝损伤作用的研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2011,4(5):126.
[6] 林宁. 药剂学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2008:243.
[7] 国家标准局信息分类编码研究所. GB/T 8313-2008 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008:3.
[8] 肖婷,闫智勇,左长英,等. 蜘蛛香总黄酮大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):36.

[责任编辑 全燕]

70% ethanol at 65 °C. diameter of inhibition zone was (23.08 ± 0.46) mm, antibacterial activity was hypersensitive. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible.

[**Key words**] *Eugenia caryophyllata*; malassezia furfur; extraction; antibacterial

马拉色菌是人体和其他温血动物皮肤表面的条件致病菌,与该菌有关的疾病较多,包括花斑糠疹、马拉色菌毛囊炎、脂溢性皮炎、特应性皮炎等。因涉及病种较多,对其治疗也越来越受到重视^[1]。目前,抑制马拉色菌的药物研究主要以化学类的抗真菌制剂为主,如酮康唑、氯咪巴唑、吡硫翁锌等,但此类物质刺激性较大,且容易产生耐药性^[2]。以常用去屑剂吡硫翁锌(ZPT)为例,张旋等研究证明ZPT对麦穗鱼、青鳉、直突摇蚊亚科2龄幼虫属剧毒物质^[3]。SarahD.等研究指出,ZPT可能导致人类角质形成细胞和黑素细胞的热休克并引起DNA损伤^[4]。虽然,早在1981年美国FDA就公布并认可ZPT在微量用于日用品成分的情况下对人体没有危害,但此类物质仍存在一定的安全风险^[5]。因此,筛选安全、温和、低刺激的植物源抗菌活性成分具有重要意义。

丁香具有温中降逆、温肾助阳的功效,具有抗菌、抗炎、抗病毒、清除自由基、镇痛、麻醉等作用,在疾病防治中具有良好的药理学基础和治疗作用^[6]。因此,本研究以丁香为研究对象,以糠秕马拉色菌为指示菌,对其提取工艺进行优化,为研究开发与马拉色菌相关疾病植物治疗药物提供一定的理论研究基础。

1 材料

丁香(同仁堂国药店,经作者鉴定),阳性对照ZPT(滨海明红精细化工有限公司),菌种糠秕马拉色菌 ATCC44344(广东微生物菌种保藏中心),培养基橄榄油培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,酵母浸膏 0.1 g,单硬脂酸甘油酯 2.5 g,聚山梨酯-80 2 mL,橄榄油 40 mL,琼脂 18 g,水 1 L^[7]。SZCL-L型数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司),TELSTAR mini-V/PCR型超净工作台(西班牙泰事达 TELSTAR),SHP-150型生化培养箱(上海森信实验仪器责任有限公司),LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 丁香提取液的制备 丁香,粉碎,精密称量 10 g,装入 500 mL 三口圆底烧瓶中,加入适量提取溶剂,在恒温水浴锅中回流提取,粗过滤,抽滤,减压浓

缩去除乙醇,加丙二醇复溶至 0.2 g·mL⁻¹的丁香提取液,灭菌保存,备用。

2.2 抑菌效果的测定

2.2.1 菌种的活化 菌种购来时均为装入安瓿管中的冻干粉。无菌操作下乙醇擦拭,用移液枪滴加 0.1 mL 的液体培养基于安瓿管中,震荡摇匀,此时安瓿管中菌种冻干粉为黏稠状。用接菌环挑菌接入相对应的平板和斜面上进行活化,置于 35 °C 恒温培养箱中培养 48 h。

2.2.2 菌悬液的制备 取活化好的菌种若干,在无菌条件下,将已活化好的菌种分级制成一系列菌悬液。麦氏比浊管制成菌悬液密度为 1 × 10⁶ cfu·mL⁻¹。

2.2.3 抑菌试验(管碟法) 将预先融化好、并灭菌处理过的培养基,轻轻摇匀后倾注平板,冷却凝固,每个平板 15 mL 左右。取马拉色菌的菌悬液 200 μL 于培养基中,均匀涂布,盖好平皿,置室温干燥 5 min。在每个培养皿上方均匀摆放 3 个牛津杯,3 个牛津杯中每个注入 260 μL 同种中药提取液,作为 3 个平行皿,以无菌水为阴性对照,同时选用常用抗真菌剂 ZPT 做阳性对照。将培养皿放入 35 °C 培养箱培养 72 h,然后取出,观察,拍照,用游标卡尺测定抑菌圈直径。

2.2.4 结果判定标准 抑菌圈直径 < 8 mm 为不敏感(-),8 ~ 13 mm 为低度敏感(+),13 ~ 19 mm 为中度敏感(++),> 19 mm 为高度敏感(+++)^[8]。3 次重复试验均有抑菌作用结果者,判为合格,阴性对照组无抑菌环产生,否则试验无效。

2.3 提取方法的选择 分别用水浴提取、回流提取、超声提取、微波提取、闪式提取 5 种方法提取丁香中的功效成分,试验条件为料液比 1:10,提取溶剂 70% 乙醇,提取时间 60 min,提取温度 75 °C。以糠秕马拉色菌为公试菌株,采用管碟法对丁香抑菌活性进行测定,通过比较 5 种提取方法对丁香抑制物的菌效果,确定适合的提取方法。结果抑菌圈直径分别为 (16.56 ± 0.84), (20.78 ± 1.02), (18.64 ± 1.38), (17.32 ± 0.96), (6.78 ± 0.67) mm,回流提取方法抑菌效果最好,因此确定回流提取为最终提取方法。

2.4 提取溶剂的选择 分别用水、乙醇、丙二醇、丁

二醇 4 种溶剂提取丁香中的功效成分, 试验条件为料液比 1:10, 提取时间 60 min, 提取温度 75 ℃。采用管碟法对丁香抑菌活性进行测定, 通过比较 4 种溶剂提取对丁香提取物的抑菌效果确定适合的提取溶剂。结果抑菌圈直径分别为 (6.18 ± 0.32), (24.78 ± 1.02), (7.86 ± 0.58), (13.12 ± 0.74) mm, 乙醇溶液提取物的抑菌效果最好, 因此确定乙醇作为提取溶剂。

2.5 单因素试验

2.5.1 乙醇体积分数对提取物抑菌效果的影响

分别用体积分数 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 乙醇回流提取丁香中的功效成分, 试验条件和方法同 2.3, 料液比 1:10, 提取时间 60 min, 提取温度 75 ℃。采用管碟法对丁香抑菌活性进行测定, 确定适合的浓度。抑菌圈直径分别为 (8.48 ± 0.51), (10.82 ± 0.88), (20.32 ± 0.59), (20.78 ± 1.02), (16.04 ± 0.68) mm, 说明随着乙醇体积分数的提高, 抑菌圈增大, 70% 乙醇抑菌效果最好。体积分数继续增大时, 一些醇溶性杂质成分溶出, 干扰因素增多, 导致抑菌效果下降^[9]。因此, 选择在 70% 乙醇较为适宜。

2.5.2 提取时间对提取物抑菌效果的影响

分别按时间 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h 回流提取丁香中的功效成分, 试验条件和方法同 2.3, 确定适合的提取时间。抑菌圈直径分别为 (8.48 ± 0.52), (20.78 ± 1.02), (19.76 ± 0.65), (20.82 ± 0.28), (17.04 ± 0.92) mm, 说明随着提取时间的延长, 丁香抑菌圈逐渐增大, 但增加的幅度并不明显, 当提取时间为 2 h 时提取物抑菌效果最好。提取时间继续延长时, 提取液抑菌效果降低。原因可能是长时间的加热提取破坏了部分抑菌活性物质。因此, 提取时间选择在 2 h。

2.5.3 提取温度对提取物抑菌效果的影响

分别在温度为 45, 55, 65, 75, 85 ℃ 的恒温电热加热套中回流提取丁香中的功效成分, 试验条件和方法同 2.3, 确定适合的提取温度。结果抑菌圈直径分别为 (12.02 ± 0.86), (14.64 ± 1.01), (13.12 ± 1.22), (20.78 ± 1.02), (14.56 ± 0.98) mm, 说明随着提取温度的提高, 抑菌圈增大, 温度在 75 ℃ 时抑菌效果最好。温度继续增加时, 抑菌活性下降, 可能是高温破坏了一些抑菌成分。因此提取温度选择在 75 ℃ 较为适宜。

2.5.4 料液比对提取物抑菌效果的影响

分别按料液比 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 回流提取丁香中的功效成分, 条件和方法同 2.3, 确定适合的料液

比。结果抑菌圈直径分别为 (17.82 ± 0.80), (20.78 ± 1.02), (18.98 ± 0.79), (14.52 ± 1.16), (13.26 ± 1.04) mm, 说明随着料液比的增大, 抑菌效果增加不明显, 在 1:15 时, 抑菌效果最好。料液比继续增大时, 抑菌活性下降, 原因可能是溶剂量增加, 水溶性杂质溶出率增加, 导致抑菌效果下降。因此料液比选择 1:15 较为适宜。

2.6 提取工艺条件的优化

在单因素试验基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 选取料液比、乙醇溶液体积分数、提取时间、提取温度为考察因素, 进行正交试验, 优化丁香抑菌成分的提取工艺, 因素水平设计见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 丁香抑马拉色菌活性物质提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比 /g·mL ⁻¹	B 乙醇体积 分数/%	C 时间 /h	D 温度 /℃
1	1:5	50	1	65
2	1:15	70	2	75
3	1:25	90	3	85

由表 2 极差 R 值可知, 4 个因素对抑菌率影响程度 $B > C > A > D$, 即乙醇体积分数 > 反应时间 > 料液比 > 反应温度, 由正交试验 K 值可知, 最佳提取条件为 $A_3B_2C_2D_1$, 与正交表中最优抑菌组合 $A_3B_3C_2D_1$ 不相符, 重复 $A_3B_2C_2D_1$ 试验, 抑菌圈直径 (23.08 ± 0.46) mm, 大于 $A_3B_3C_2D_1$ 的 (21.87 ± 0.98) mm。因此丁香抑菌成分最优提取条件为 $A_3B_2C_2D_1$, 即料液比 1:25, 乙醇体积分数 70%, 提取时间 2 h, 提取温度 65 ℃。由表 3 对试验结果进行方差分析可知, 因素 B 即乙醇体积分数对结果有显著性影响。

3 讨论

目前对丁香药理作用以及其活性物质的研究相对较多^[10-14], 但对丁香抑制马拉色菌的研究还相对较少。同时对于丁香的应用研究主要集中在药用或食品应用方面, 对其在抑制头屑的日用化学工业产品方面的应用研究相对较少。本研究主要用乙醇回流提取丁香中的活性成分, 产品体系稳定, 配伍性好, 同时提取工艺简单, 且容易工业化大生产。本实验研究探讨了不同提取方法、提取溶剂、提取料液比、提取时间、提取温度对丁香抑菌效果的影响, 通过单因素试验和正交试验确定了丁香抑菌活性物质的最佳提取工艺条件为料液比 1:25, 70% 乙醇, 时

表2 丁香抑马拉色菌活性物质提取工艺 L₉(3⁴)

正交试验安排

No.	A	B	C	D	抑菌圈直径 /mm
1	1	1	1	1	10.78
2	1	2	2	2	20.72
3	1	3	3	3	19.05
4	2	1	2	3	9.08
5	2	2	3	1	19.75
6	2	3	1	2	13.61
7	3	1	3	2	10.57
8	3	2	1	3	18.33
9	3	3	2	1	21.87
K ₁	16.850	10.143	14.240	17.467	
K ₂	14.147	19.600	17.223	14.967	
K ₃	16.923	18.177	16.457	15.487	
R	2.776	9.457	2.983	2.500	

表3 抑菌直径方差分析

因素	SS	f	F	P
A	15.023	2	1.44	>0.05
B	155.989	2	14.94	<0.01
C	14.402	2	1.38	>0.05
D(误差)	10.441	2	1.00	

注: F_{0.1}(2,2) = 9。

间 2h, 温度 65 ℃。本研究只对丁香抑菌活性物质提取工艺进行了初步的研究, 对其主要抑菌成分及其构效关系, 以及其在日用产品中的应用还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 黄欣, 沈亮亮, 徐红, 等. 8 种中药单体抗球形马拉色菌的体外药敏实验 [J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(2): 98.

[2] 约翰·格雷. 头皮屑发生机理及诊疗 [M]. 王学民, 译. 11 版, 北京: 化学工业出版社, 2005: 43.

[3] 张旋, 刘利民, 皮钰珍, 等. 吡啶硫酮锌对水生生物的急性毒性 [J]. 生态毒理学报, 2010, 5(1): 83.

[4] Sarah D Lamore, Christopher M. Cabello, Georg T Wondrak. The topical antimicrobial zinc pyrithione is a heat shock response inducer that causes DNA damage and PARP-dependent energy crisis in human skin cells [J]. Cell Stress & Chaperones, 2010, 15(6): 309.

[5] Daisuke Yasokawa. DNA microarray analysis suggests that zinc pyrithione causes iron starvation to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109(5): 479.

[6] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 676.

[7] 王佳, 王艳, 史健波, 等. 13 种中草药对从头皮屑中分离纯化的限制性马拉色菌体外抑菌作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(11): 915.

[8] 林楠, 董银卯, 时宇静, 等. 5 种中药醇提物体外抑制 2 种革兰阳性菌的活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 206.

[9] Mcallister T A, Annett C B, Cockwill C L, et al. Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis [J]. Vet Parasito, 2001, 97(2): 85.

[10] 翟华强, 王双艳, 张硕峰, 等. 黄连、丁香外用药物作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 192.

[11] 宋光西, 马玲云, 魏锋, 等. 丁香属植物的化学成分分类及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医学, 2011, 7(5): 179.

[12] 刘普, 杨友亮, 邓瑞雪, 等. 小叶丁香苷类化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 12.

[13] 顾仁勇, 汪果利. 丁香精油抑菌及抗氧化作用研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(6): 80.

[14] 罗红梅, 马云淑, 黄金娥, 等. 丁香挥发油对磷酸川芎嗪贴剂的经皮促渗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 40.

[责任编辑 全燕]