

唐远江,杨粤黔,周思璇,等. 杠板归槲皮素提取工艺优化及体外抑菌效果[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):207-212.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.039

# 杠板归槲皮素提取工艺优化及体外抑菌效果

唐远江<sup>1</sup>, 杨粤黔<sup>1</sup>, 周思璇<sup>1</sup>, 张 涛<sup>1</sup>, 卢昱希<sup>1</sup>, 黄炳香<sup>2</sup>

(1. 贵州省农业科学院畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州师范学院, 贵州贵阳 550000)

**摘要:**为优化杠板归中槲皮素的最佳提取工艺, 检验提取物体外抑菌活性, 以槲皮素提取量为评价指标, 采用 Plackett - Burnman Design(PBD)设计联合 Box - Behnken Design(BBD)对槲皮素的提取工艺进行考察, 并采用微量肉汤二倍稀释法和琼脂平板培养计数法研究提取物和槲皮素对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌和杀菌作用。结果可知, 最佳提取工艺为加 25 倍 59.92% 乙醇浸泡 24 h, 60 ℃ 下回流提取时间 3.4 h, 提取 2 次。提取物对 3 株细菌的最小抑菌浓度(MIC)介于 3.12 ~ 6.31 g/L, 最小杀菌浓度(MBC)介于 12.52 ~ 25.41 g/L, 槲皮素对大肠杆菌 and 金黄色葡萄球菌 MIC 分别为 7.11、3.16 g/L, MBC 分别为 100.18、50.56 g/L, 其杀菌效果不如提取物, 对沙门氏菌的 MIC 和 MBC 均为 3.27 g/L, 杀菌效果优于提取物。优化后的提取工艺稳定合理, 且提取物具有良好抑菌活性。

**关键词:**杠板归; 槲皮素; PBD; BBD; MIC; MBC

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)22-0207-06

杠板归为蓼科蓼属植物杠板归(*Polygonum perfoliatum* L.)的全草, 民间习称蛇倒退、猫爪刺、杠板归等<sup>[1]</sup>, 其主要成分有黄酮类、有机酸类、萜类等<sup>[2-6]</sup>。《中国兽药典》2015 版第二部中规定, 槲皮素为杠板归的主要成分<sup>[7]</sup>。现代药理学研究表明, 杠板归具有抗菌、抗病毒、降血压、抗肿瘤等作

用<sup>[8-10]</sup>, 临床上杠板归常用于治疗慢性湿疹、乳腺炎、百日咳、泻痢、黄疸、跌打肿痛等疾病。杠板归的煎煮剂对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌、炭疽杆菌等均有较强抑制作用, 乙酸乙酯、正丁醇提取物对大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌具有较强的抑制作用, 75% 乙醇提取物对多种细菌具有广谱抗菌性<sup>[11-12]</sup>。槲皮素具有广谱抗菌性, 并且对革兰氏阴性菌的抗菌作用强于革兰氏阳性菌<sup>[13]</sup>。

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌是引起畜禽细菌性疾病的常见致病菌<sup>[14-17]</sup>。因致病性细菌血清型众多, 难以制备出具有针对性的疫苗<sup>[18]</sup>。抗生素是治疗此类疾病有效的手段, 但长期使用抗生素导致致病菌的耐药性严重, 研究表明, 大肠杆

收稿日期: 2020-02-27

基金项目: 贵州省农业科学院创新基金(编号: 黔农科院青年基金[2018]54 号); 贵州省农业攻关计划项目(编号: 黔科合支撑[2016]2503 号)。

作者简介: 唐远江(1987—), 男, 贵州遵义人, 硕士, 研究实习员, 主要从事中兽药研发。E-mail: tangyjia0909@126.com。

通信作者: 杨粤黔, 副研究员, 主要从事中兽药研发。E-mail: 252184152@qq.com。

陕西科技大学学报(自然科学版), 2017, 35(1): 139-144, 150.

[2] 李明泽, 张霁红, 宋 娟, 等. 苹果醋发展现状及研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2018(7): 83-87.

[3] Bouderbala H, Kaddouri H, Kheroua O, et al. Anti-obesogenic effect of apple cider vinegar in rats subjected to a high fat diet[J]. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie, 2016, 65(3): 208-213.

[4] Widayastuti Y, Febrisantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation[J]. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5(4): 435-442.

[5] Liu S N, Ye H, Zhou Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.

[6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.

[7] 何铁群, 雷赵民, 吴 润, 等. 青贮饲料中优良乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 生物技术通报, 2013(5): 177-183.

[8] 武俊瑞, 李 欣, 张 苗, 等. 自然发酵酸菜汁中乳杆菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 191-194.

[9] 潘晓倩, 赵 燕, 张顺亮, 等. 中温乳香肠中一株优势腐败菌的分离鉴定与生物学特性[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 93-98.

[10] 刘恒霞, 余 鹏, 王慧忠. 高效液相色谱测定蕨类植物中氨基酸含量[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(3): 30-33.

[11] 李占清, 魏海英. 分光光度法测定新鲜蔬菜中维生素 C 的含量[J]. 中国无机分析化学, 2014, 4(3): 79-81.

[12] Di Cagno R, Surico R F, Paradiso A, et al. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 128(3): 473-483.

菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌对多种抗生素具有耐药作用<sup>[19]</sup>。抗生素残留可导致致病菌的耐药性增强并转移给人类,引起动物内源性感染和二重感染,使动物免疫力降低,抗原质量降低,降低疫苗的使用效果。寻找抗生素替代物和新途径,消除或减轻禁用抗生素带来的一系列影响,是我国畜牧业急需解决的问题<sup>[20]</sup>。

相比抗生素,中兽药具有无残留、不易产生耐药性、价格便宜等优点,在畜牧养殖中的作用日趋重要<sup>[21]</sup>。2020 年,饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料,使得中兽药的发展迎来重大契机。前期研究发现,杠板归汁液对大肠杆菌具有良好的抑菌活性,但未对其提取液进行研究。虽然杠板归在临床上的应用研究较多,但其有效成分的提取优化以及在兽医上的开发应用较少。因此,为拓展中药杠板归的运用,笔者运用 Plackett - Burnman Design (PBD) 和 Box - Behnken Design 法(BBD)设计,优化建立杠板归中槲皮素的提取工艺,并检验提取物的抗菌活性,以期为该中药的开发和利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试菌株,大肠杆菌 ATCC® 25922 标准株、沙门氏菌 ATCC® 13076 标准株、金黄色葡萄球菌 ATCC® 6538 标准株,均由贵州省畜牧兽医研究所兽用中草药研究室保存;杠板归分析样品,由贵州省畜牧兽医研究所兽用中草药研究室提供,经贵州省畜牧兽医研究所尚杨粤黔鉴定为 *Polygonum perfoliatum* L.。槲皮素对照品,购于中国食品药品检定研究院,批号 110957—201808;水解酪蛋白肉汤(MH broth)和水解酪蛋白琼脂(MH agar),购自广州环凯微生物科技有限公司。其他试剂为色谱纯或分析纯。

### 1.2 主要设备与仪器

LC-20 型岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司)、HH-4 数显恒温水浴锅(成都美普达仪器有限公司)、BSA224S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)、洁拓超声波清洗仪(深圳市洁拓超声清洗设备有限公司)、DHG-9240A 电热恒温干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、RE-5205 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 槲皮素的定量检测方法<sup>[7]</sup> (1)色谱条件,

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50)为流动相;检测波长为 360 nm,流速:1.0 mL/min,柱温:30 ℃,进样量 10 μL。

(2)对照品溶液的制备,取槲皮素对照品适量,精确称定,加甲醇制成每 1 mL 含 30 μg 的溶液,即得对照品溶液。

(3)供试品溶液的制备,取本品粉末(过三号筛)约 0.7 g,精确称定,置于具塞锥形瓶中,精确加入甲醇-盐酸(4:1)混合溶液 50 mL,称定质量,置 90 ℃水浴中加热回流 1 h,放冷,再称定质量,采用甲醇补足减失的质量,摇匀、滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

(4)线性关系考察,精确称取槲皮素对照品 16.05 mg 置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,分别吸取对照品溶液 1.6、3.2、7.8、12.5、17.2 mL 于 50 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,所得对照品质量浓度分别为 10.00、20.50、50.00、80.02、110.40 μg/mL,分别取各质量浓度标准品溶液 10 μL 进样,记录色谱图峰面积。以峰面积值( $y$ )对对照品质量浓度( $x$ )进行回归,绘制标准曲线方程。

(5)精密度试验,精确吸取槲皮素对照品溶液(20.50 μg/mL)10 μL,按上述色谱条件,重复进样 6 次,记录峰面积,计算峰面积的相对标准偏差(RSD)。

(6)稳定性试验,取供试品溶液,于制备后 0、1、2、4、8、12 h 分别进样 10 μL,计算峰面积的 RSD。

(7)重现性试验,取杠板归药材 6 份,制备样品供试品溶液,取供试品溶液进样 10 μL 检测,计算槲皮素含量。

(8)加样回收试验,取已知含量(0.32 mg/g)的样品 0.5 g,共 6 份,精确称定,置于具塞锥形瓶中,分别加入槲皮素对照品溶液(20.50 μg/mL)5 mL,制备样品供试品溶液,进行测定,以供试品溶液中对照品绝对质量分数计算加样回收率。

1.3.2 PBD 筛选主要因素 取 10 g 杠板归采用水浴回流提取,取滤液检测槲皮素含量,运用 Minitab 19 进行 PBD 试验。考察各个因素对槲皮素提取量的影响,试验对 A(浸泡时间)、B(乙醇体积分数)、C(溶剂量)、D(温度)、E(提取时间)、F(提取次数)等 6 个主要因素进行评价,根据预试验结果确定每个因素高(代码:1)、低(代码:-1)2 个水平共 12 组试验,筛选对槲皮素提取量的影响主要因子。PBD 试验因素和水平见表 1。

表 1 PBD 试验设计

因素	编码	低水平(-1)	高水平(1)
浸泡时间(h)	A	0	24
乙醇体积分数(%)	B	0	80
溶剂量(倍)	C	10	30
温度(℃)	D	60	80
提取时间(h)	E	1	5
提取次数(次)	F	1	3

1.3.3 BBD 试验优化提取工艺 取 10 g 杠板归采用水浴回流进行提取,根据 PBD 试验结果,以槲皮素含量( $y$ )为目标响应值,选取乙醇体积分数( $x_1$ )、溶剂量( $x_2$ )和提取时间( $x_3$ )设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验,响应因素水平见表 2。

表 2 提取工艺的响应面试验设计

水平	乙醇体积分数 $x_1$ (%)	溶剂量 $x_2$ (倍)	时间 $x_3$ (h)
-1	55	15	2.5
0	60	20	3.0
1	65	25	3.5

1.3.4 中药提取物制备 称取杠板归中草药 200 g 粉末,采用优化后的工艺提取,合并提取液,过滤,烘干并粉碎,采用 10% 甲醇溶解并稀释成不同浓度的溶液,相同方法配制槲皮素溶液,置于 4 ℃ 冰箱中贮存,备用。

1.3.5 菌液制备 将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌接种于含 MH 液体培养基的试管中,置于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 12 h,并采用液体培养基将菌液的  $D_{600\text{ nm}}$  调整为 0.8,再用培养基稀释 1 000 倍,相当于菌液浓度为  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL,保存备用。

1.3.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用微量肉汤二倍稀释法,于无菌 96 孔板每一孔中均加入 100  $\mu\text{L}$  肉汤,再分别向第一孔中加入 100  $\mu\text{L}$  配备好的药液,混匀后依次倍比稀释,直到最后一孔混匀后弃去 100  $\mu\text{L}$  混合液。每孔加入配备好的 100  $\mu\text{L}$  细菌稀释液,同时设置阳性对照组(加菌不加药)和阴性对照组(不加菌不加药)。在正式试验之前设置有机溶剂对照组,即对每株菌进行有机溶剂的对照试验,将药液换成甲醇,保证所有供试菌株存活的最大溶剂含量,以便制备药液所用的溶剂含量远低于此值。将供试菌株 37 ℃ 恒温培养 24 h 后取出,观察细菌生长情况。每组试验至少重复 3 次。采用 TTC 法对 MIC 结果进行判定。向上述培养 24 h 后

的 96 孔板每孔分别加入 20  $\mu\text{L}$  0.5% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),37 ℃ 避光培养 2 h,观察菌液的颜色变化。试验组眼观溶液澄清、颜色未发生变化的最低药物质量浓度则作为该药的 MIC。

1.3.7 最小杀菌浓度(MBC)的测定 将上述试验组澄清的各孔中液体取 100  $\mu\text{L}$  涂布于相应的营养培养基上,于 37 ℃ 培养 48 h,以肉眼观察无菌落生长的最低药物质量浓度为其 MBC<sup>[19]</sup>。

2 结果与分析

2.1 槲皮素定量检测试验的可靠性

线性关系试验得出标准曲线方程为  $y = 4 \times 10^7 x - 35\ 941$ ,  $r^2 = 0.999\ 6$ ,进样浓度在 10.00 ~ 110.40  $\mu\text{g/mL}$ ,表明进样浓度和峰面积线性关系良好。槲皮素对照样品和检测样品的 HPLC 色谱图见图 1。精密度试验得出对照品平均峰面积为 674 579.33,  $RSD < 2\%$ ,说明仪器精密性良好。稳定性试验表明,槲皮素色谱峰面积  $RSD$  值为 1.56%,样品供试液在 12 h 内稳定性良好。重现性试验得出杠板归样品平均含量为 0.31 mg/g,  $RSD < 2\%$ ,表明该样品处理方法重现性好。加样回收试验表明,槲皮素平均回收率为 99.73%,  $RSD$  为 0.98%,说明本方法可靠、准确度高,符合含量测定的要求。

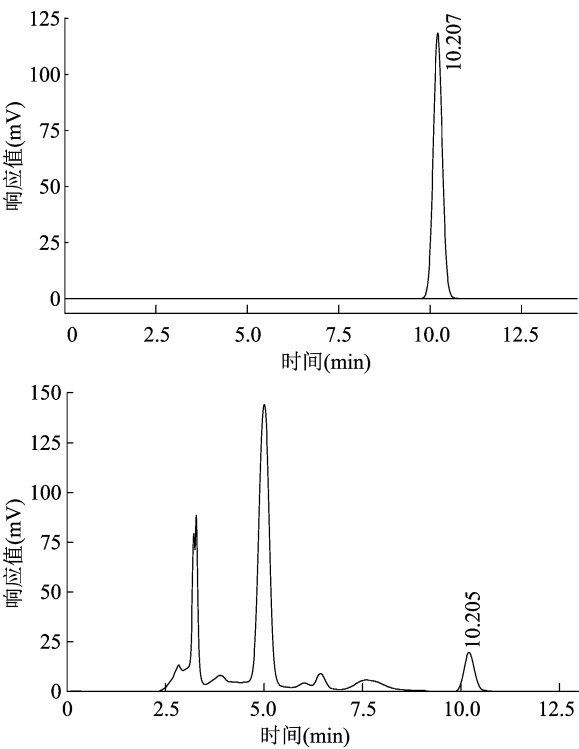


图1 槲皮素对照品和样品的 HPLC 图

2.2 影响杠板归提取工艺的主要因素

按照 PBD 试验设计,得到各处理组的槲皮素提取量(表 3)。运用 Minitab 19 软件对各个因素进行显著性分析,由表 4 可知,乙醇体积分数、溶剂量、提取时间对槲皮素提取量的影响显著,浸泡时间、提取次数、温度的影响不显著。因此,选取乙醇体积分数、溶剂量、提取时间进行 BBD 试验设计。

表 3 PBD 试验结果							
试验号	试验因子与水平						槲皮素提取量 (mg/g)
	A	B	C	D	E	F	
1	-1	-1	1	1	1	-1	0.05
2	1	-1	1	1	-1	1	0.04
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.03
4	-1	1	1	-1	1	-1	0.29
5	-1	1	-1	-1	-1	1	0.18
6	1	-1	-1	-1	1	1	0.04
7	-1	-1	-1	1	1	1	0.05
8	1	1	1	-1	1	1	0.28
9	1	1	-1	1	-1	-1	0.21
10	1	1	-1	1	1	-1	0.23
11	1	-1	1	-1	-1	-1	0.02
12	-1	1	1	1	-1	1	0.22

表 4 PBD 试验各因素槲皮素提取量的方差分析					
来源	自由度	Adj SS	Adj MS	F 值	P 值
模型	6	0.123 133	0.020 522	40.50	0.000
线性	6	0.123 133	0.020 522	40.50	0.000
A	1	0.000 000	0.000 000	0.00	1.000
B	1	0.116 033	0.116 033	229.01	0.001 **
C	1	0.002 133	0.002 133	4.21	0.035 *
D	1	0.000 133	0.000 133	0.26	0.630
E	1	0.004 800	0.004 800	9.47	0.028 *
F	1	0.000 033	0.000 033	0.07	0.808
误差	5	0.002 533	0.000 507	—	—
合计	11	0.125667	—	—	—

注:\*\* 和 \* 分别表示影响程度极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )水平。下同。

2.3 槲皮素提取工艺回归模型的建立

根据 BBD 试验设计,得到不同水平条件下槲皮素的提取量(表 5)。运用 Designexpert 10.3.2 软件,以槲皮素含量( $y$ )为响应值分别对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,得到  $y$  对  $x_1$ 、 $x_2$  和  $x_3$  的二次多项回归方程: $y = 0.322 - 0.002 5x_1 + 0.000 1x_2 + 0.015x_3 + 0.007 5x_1x_2 - 0.007 5x_1x_3 + 0.012 5x_2x_3 - 0.032 2x_1^2 - 0.002 2x_2^2 - 0.017 3x_3^2$ 。模型  $F$  值为

3.18, $P < 0.05$ ,响应回归模型显著,失拟项  $P > 0.05$ ,失拟不显著,由表 6 可知,根据模型拟合规律<sup>[22]</sup>,说明该回归模型拟合程度较好。

表 5 BBD 试验不同处理的槲皮素提取量				
试验号	试验因子与水平			槲皮素提取量 $y$ (mg/g)
	乙醇体积分 数 $x_1$	溶剂量 $x_2$	提取时间 $x_3$	
1	0	0	0	0.31
2	0	0	0	0.32
3	1	0	-1	0.27
4	0	-1	-1	0.28
5	-1	0	-1	0.27
6	0	1	1	0.35
7	-1	0	1	0.29
8	-1	-1	0	0.30
9	-1	1	0	0.27
10	1	0	1	0.26
11	0	0	0	0.33
12	0	0	0	0.33
13	0	1	-1	0.27
14	0	-1	1	0.31
15	1	1	0	0.29
16	0	0	0	0.32
17	1	-1	0	0.29

表 6 提取工艺的方差分析					
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.008 9	9	0.001 0	3.180 0	0.040 4 *
$x_1$	0.000 1	1	0.000 1	0.160 6	0.700 6
$x_2$	0.000 0	1	0.000 0	0.000 0	1.000 0
$x_3$	0.001 8	1	0.001 8	5.780 0	0.047 2 *
$x_1x_2$	0.000 2	1	0.000 2	0.722 5	0.423 4
$x_1x_3$	0.000 2	1	0.000 2	0.722 5	0.423 4
$x_2x_3$	0.000 6	1	0.000 6	2.010 0	0.199 5
$x_1^2$	0.004 4	1	0.004 4	14.060 0	0.007 2 **
$x_2^2$	0.000 0	1	0.000 0	0.068 4	0.801 1
$x_3^2$	0.001 3	1	0.001 3	4.020 0	0.084 9
残缺	0.002 2	7	0.000 3	—	—
失拟项	0.001 9	3	0.000 6	9.05	0.059 6
纯误差	0.000 3	4	0.000 1	—	—
总和	0.011 1	16	—	—	—

2.4 槲皮素最佳提取工艺的建立

以  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  中任意 1 个变量固定,其余 2 个变量对  $y$  值作响应面图(图 2)。根据曲面图分析原理<sup>[23]</sup>,可以看出  $x_1$  和  $x_3$  对  $y$  值的交互作用不显著,

$x_1$  和  $x_2$ ,  $x_2$  和  $x_3$  对  $y$  值的交互作用明显,根据回归模型和曲面分析,得到槲皮素的最佳提取工艺为:加 25 倍 59.92% 体积分数乙醇,60 ℃ 下回流提取时间 3.4 h,提取 2 次,预测值  $y=0.33\text{ mg/g}$ 。

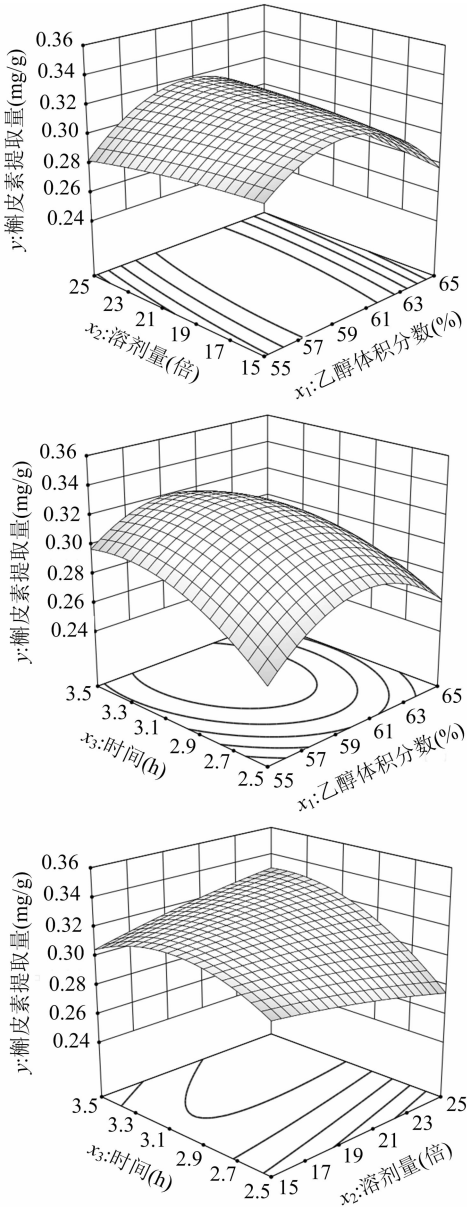


图2  $y$  值与  $x_1$ 、 $x_2$  和  $x_3$  的响应曲面

2.5 最佳提取工艺的验证

取杠板归适量,加 25 倍 59.92% 乙醇浸泡 24 h,60 ℃ 下回流提取 3.4 h,提取 2 次,按此工艺参数进行 3 次平行试验,得到槲皮素平均提取量为 0.34 mg/g,由表 7 可知,槲皮素提取量与预测值相近,说明建立的提取工艺具有良好的可信度。

2.6 杠板归提取物和槲皮素的抑菌活性

由表 8 可知,杠板归提取物和槲皮素对 3 株细

表 7 验证试验结果

试验号	槲皮素提取量 (mg/g)	平均值	预测值
1	0.34	—	—
2	0.33	0.34	0.33
3	0.35	—	—

菌均有抑制作用。提取物对 3 株细菌的 MIC 分别为 3.12、6.24、6.31 g/L,MBC 分别为 12.52、24.08、25.41 g/L,槲皮素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 7.11、3.16 g/L,MBC 分别为 100.18、50.56 g/L,与杠板归提取物的杀菌活性相比,槲皮素单体的杀菌效果不如提取物。槲皮素对沙门氏菌的 MIC 和 MBC 均为 3.27 g/L,说明沙门氏菌对槲皮素敏感,槲皮素对沙门氏菌的杀菌效果明显优于杠板归提取物。

表 8 杠板归提取物和槲皮素的抑菌和杀菌效果

菌株编号	杠板归提取物(g/L)		槲皮素(g/L)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
ATCC® 2599	3.12	12.52	7.11	100.18
ATCC® 13076	6.24	24.08	3.27	3.27
ATCC® 6538	6.31	25.41	3.16	50.56

3 结论与讨论

通过 PBD 和 BBD 试验设计优化杠板归中槲皮素的提取工艺,并进行抑菌活性检验,得到最佳提取工艺为:加 25 倍 59.92% 乙醇浸泡 24 h,60 ℃ 下回流提取时间 3.4 h,提取 2 次。提取物和槲皮素单体对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均有良好的抑菌效果。

在中药有效成分提取中需考虑到多个单因素试验以及试验次数较多的正交设计,工作费时费力且具有盲目性,因此本试验引用 PBD 设计。PBD 是一种近饱和的 2 水平筛选试验设计方法,通过比较各因子 2 水平的差异与整体的差异来确定因子的显著性,能用最少的试验次数快速有效地筛选出显著影响因子<sup>[24]</sup>。BBD 具有结果直观、预测性好的优点,试验预测值能更好地考察参数合理性和试验设计的准确性<sup>[25]</sup>。本研究通过验证试验,其验证结果大于预测值,说明 PBD 联合 BBD 设计在中药提取中具有良好的可行性。

本试验在筛选提取因素时药材浸泡 24 h 后槲皮素提取率有所提高,温度对槲皮素提取的影响不明

显,温度越高越不利于安全生产,且造成资源浪费,因此在响应面设计中不考虑加热温度的影响。同时,在提取过程发现提取 2 次可使有效成分完全浸出,故每个平行试验均提取 2 次。通过检测发现,本研究中供试药材槲皮素的含量仅为 0.32 mg/g,贵州地区杠板归药材槲皮素的含量 0.017~0.495 mg/g<sup>[26]</sup>,说明供试药材的有效成分含量合理。在槲皮素的提取报告中多采用甲醇-酸作为提取液,出于安全考虑,本试验只采用乙醇作为提取液,且结果与甲醇-酸相差不大。杠板归槲皮素的提取优化未有报道,沙苳以艾蒿为原料,得出槲皮素提取需加 16 倍甲醇<sup>[27]</sup>,与之相比,本研究只加 25 倍 59.92% 乙醇,更节约成本。

在抑菌活性研究中,槲皮素对沙门氏菌的 MIC 和 MBC 未超过 3.30 g/L,但高于滕楠报道的槲皮素对沙门氏菌的最低抑菌浓度 2.17 g/L<sup>[28]</sup>。槲皮素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 7.11、3.16 g/L,MBC 分别为 100.18、50.56 g/L,与秦晓蓉等的报道<sup>[13]</sup>相符。杠板归提取物对大肠杆菌的抑菌活性最好,MIC 和 MBC 分别为 3.12、12.52 g/L,对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌 MIC 和 MBC 均未超过 3.50、26.00 g/L。黄学彬等研究得出,75% 乙醇、乙酸乙酯和正丁醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、枯草芽孢杆菌等具有良好的抑菌效果<sup>[12]</sup>,说明杠板归具有良好的药用价值,值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [2] 赵超,陈华国,龚小见,等. 杠板归的化学成分研究(Ⅱ) [J]. 中草药,2010,41(3):365-367.
- [3] 马青云,黄圣卓,李红芳,等. 杠板归中化学成分生防活性研究 [J]. 湖北农业科学,2013,52(21):5245-5247.
- [4] 成焕波,刘新桥,陈科力. 杠板归乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中药材,2012,35(7):1088-1090.
- [5] Sun X, Zimmermann M L, Campagne J M, et al. New sucrose phenylpropanoid esters from *Polygonum perfoliatum* [J]. Journal of Natural Products,2000,63(8):1094-1097.
- [6] 李红芳,马青云,刘玉清,等. 杠板归的化学成分 [J]. 应用与环境生物学报,2009,15(5):615-620.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:二部[S]. 北京:中国农业出版社,2016.9:242-243.
- [8] Wang K W, Zhu J R, Shen L Q. A new lignan with anti-tumour activity from *Polygonum perfoliatum* L. [J]. Natural Product Research,2013,27(6):568-573.
- [9] 黄鹤飞,张长城,袁丁,等. 杠板归抗炎及抑菌活性部位研究 [J]. 安徽医药,2008,12(7):595-596.
- [10] 邢煜君,王海燕,王俊霞,等. 杠板归抗氧化作用及抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):189-191.
- [11] 张长城,黄鹤飞,周志勇,等. 杠板归提取物抗单纯疱疹病毒-I 型的药理作用研究 [J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2835-2836.
- [12] 黄学彬,江丽嫦,王淑云,等. 药用植物杠板归抗菌活性研究 [J]. 现代医药卫生,2013,29(20):3041-3042,3044.
- [13] 秦晓蓉,张铭金,高绪娜,等. 槲皮素抗菌活性的研究 [J]. 化学与生物工程,2009,26(4):55-57,78.
- [14] 刘刚. 微生态制剂治疗猪大肠杆菌病 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(12):83-84.
- [15] 张召兴,李蕴玉,贾青辉,等. 中草药在防治鸡大肠杆菌病中的应用研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(4):168-170.
- [16] 王璇,王娉,葛毅强,等. 食品中金黄色葡萄球菌致病性研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报,2017,33(6):553-558.
- [17] 颜卫,赵莎莎,丁丽军,等. 江苏地区沙门氏菌流行现状调查及耐药性分析 [J]. 江苏农业科学,2019,47(2):157-159.
- [18] Rubbenstroth D, Ryll M, Hotzel H, et al. Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2013,63(1):280-287.
- [19] 张亚楠,徐景峨,蒲龄,等. 中药石苦秦散及其有效成分对水禽源细菌的体外抑菌效果 [J]. 河南农业科学,2020,49(1):128-136.
- [20] Yu B, Chen X, Jiang Ling Ling, et al. Acute and subchronic toxicity and the evaluation of safety pharmacology of Chinese herbal compound preparation "Shikuqin" [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences,2018,31[6(Special)]:2855-2862.
- [21] 唐远江,尚以顺,周思旋,等. 光枝勾儿茶的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(3):164-167.
- [22] 唐远江,刘镜,余波,等. 运用 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken-效应面法优化地榆没食子酸的提取工艺 [J]. 贵州农业科学,2019,47(4):131-135.
- [23] 唐远江,尚以顺,周思旋,等. 光枝勾儿茶主要成分提取工艺的优化 [J]. 广东农业科学,2017,44(6):114-119.
- [24] 胡道德,顾磊,姚慧娟,等. 中药提取及优化的研究进展 [J]. 医药导报,2009,28(1):80-83.
- [25] 刘伟,孙维峰,吴新荣. 响应面法在优化中药提取工艺中的应用 [J]. 中华中医药学刊,2014,32(8):1960-1962.
- [26] 许乾丽,鲍家科,茅向军,等. HPLC 测定杠板归中槲皮素的含量 [J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2105-2107.
- [27] 沙苳,陈静,丁洁,等. 正交试验法优化甲醇提取艾蒿中槲皮素工艺条件 [J]. 湖北农业科学,2017,56(16):3133-3135,3139.
- [28] 滕楠. 槲皮素抑菌作用的体内和体外研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2015.