诃子清幽方提取工艺优化及体外抗幽门螺杆菌活性研究

王延华[1]，冯　中[1,2,3]*，姚美村[3]，时晓燕[2]，张　华[1]*

（1. 山东中医药大学药学院，山东济南 250355；2. 鲁南制药集团股份有限公司，山东省药物国际化工程实验室，山东临沂 273400；3. 中山大学药学院（深圳），广东深圳 518107）

摘要：在证明诃子清幽方的主要成分没食子酸和鞣花酸具有抗幽门螺杆菌活性的基础上，以加水量、提取时间、提取次数为影响因素，没食子酸和鞣花酸含量以及提取率为评价指标，采用正交试验优选诃子清幽方的提取工艺，并考察水提物对幽门螺杆菌的体外抑制活性。结果显示，诃子清幽方的优化提取工艺为：加水量 10 倍，提取时间 1.5 h，提取次数 2 次。在该条件下，诃子清幽方水提物在体外对幽门螺杆菌生长有显著的抑制作用且呈现浓度依赖性，MIC 为 80 ～ 160 μg/mL。

关键词：诃子清幽方；提取工艺；正交试验；幽门螺杆菌；体外抗菌活性

中图分类号：R283.6；R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2024)0540-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.04.015

Optimization of the Extraction Process and *in vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Hezi Qingyou* Formula

WANG Yanhua[1], FENG Zhong[1,2,3]*, YAO Meicun[3], SHI Xiaoyan[2], ZHANG Hua[1]*

(*1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355; 2. International Pharmaceutical Engineering Lab. in Shandong Province, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400; 3. School of Pharmaceutical Sciences* (*Shenzhen*), *Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107*)

ABSTRACT: In this study, based on the observation of the activity of both gallic acid and ellagic acid against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) *in vitro*, an orthogonal test was used to optimize the extraction process of *Hezi Qingyou* formula, with the adding amount of water, extraction time and extraction times as influencing factors, content of gallic acid and ellagic acid and extraction rate as evaluation indexes. And the *in vitro* inhibitory activity of the aqueous extracts against *H. pylori* was investigated. The results showed that the optimized extraction process of *Hezi Qingyou* formula was as follows: adding 10 times amount of water, extraction 1.5 h per time and 2 times of extraction. Under these conditions, the aqueous extracts of *Hezi Qingyou* formula showed significant *in vitro* inhibition of *H. pylori* growth in a concentration-dependent manner, with the MIC of 80 − 160 μg/mL.

Key Words: *Hezi Qingyou* formula; extraction process; orthogonal test; *Helicobacter pylori*; *in vitro* antimicrobial

诃子清幽方是广东省清远市中医院脾胃科的临床经验方，由五指毛桃、诃子、丁香 3 味中药组成。其中，五指毛桃补气健脾，诃子开胃降气，丁香助阳降气，三药合方共奏健脾补气、理胃降气之功效。为更好地开发诃子清幽方，本研究根据原食品药品监督管理总局关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理公告（2018 年第 19 号）的要求，开展了对幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，*H. pylori*）的体外抗菌活性研究，并在此基础上优化诃子清幽

收稿日期：2023-11-24

基金项目：山东省重大科技创新工程项目（2020CXGCO10506）

作者简介：王延华（1998—），男，硕士研究生，主要从事中药新剂型与制造新技术研究。

通信作者：冯　中（1983—），男，正高级工程师，硕士生导师，从事新药开发和工程技术研究。

E-mail：fengzhong22@163.com

张　华（1967—），女，教授，硕士生导师，从事中药新剂型与新技术研究。

E-mail：zhongyiyao77@126.com

方的提取工艺。

H. Pylori 是一种寄生于人体胃部的革兰阴性菌，感染后可引起胃黏膜损害并诱发相关疾病，如慢性胃炎、胃及十二指肠溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤甚至胃癌等[1]。目前，*H. Pylori* 感染的清除治疗主要是依赖以抗菌药（如克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、左氧氟沙星等）为主的标准三联疗法和铋剂四联疗法[2—3]。而抗菌药长期应用会增强耐药性、疗效逐渐降低，还可能破坏肠道菌群的平衡，引起消化道恶心、呕吐、腹泻及腹痛等症状[4—5]。因此，开发可替代抗菌药的 *H. Pylori* 感染治疗方法成为研究热点之一。

诃子清幽方已被用于脾虚湿热型的 *H. Pylori* 感染者，并被验证具有良好的疗效，且不良反应少、价格低廉，具有良好的临床推广价值。本课题组曾尝试将诃子清幽方进行水提取、醇提取、水提醇沉，结果显示 3 种提取物的体外抗菌效果并无差别。随后，对五指毛桃、诃子、丁香单味药材进行提取，结果显示诃子、丁香的抗菌效果明显优于五指毛桃。诃子和丁香中含量较高的主要成分为没食子酸没食子酸（gallic acid，**1**）和鞣花酸（ellagic acid，**2**）[6—9]。因此，本研究考察了 **1** 和 **2** 的体外抗菌活性，并建立了诃子清幽方中主要成分 **1** 和 **2** 的含量测定方法，以二者含量作为指标进一步优化水提工艺，以期为制剂开发和临床应用提供科学数据参考。

1 仪器与试药

UltiMate3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；N-1300 型旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）；XS204 型十万分之一天平、MSA6.6S-OCE-DM 型百万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；APP-S2EL-E0G-X 型 SP 冻干机（美国 SP Advantage Pro 公司）；WD-9405F 型脱色摇床（北京六一生物科技有限公司）；Densi CHEK Plus 型电子比浊仪（美国梅里埃公司）；BSC-13042II2 型生物安全柜（日本 AIRTECH 公司）；BMG-CLARIOSTAR 型酶标仪（德国 BMG LABTECH 公司）；CB170 型三气培养箱（德国 BINDER 公司）；Z216MK 型冷冻离心机（德国 HERMLE 公司）。

五指毛桃（批号 201201）、诃子（批号 210901）、丁香（批号 210701）均购自广东君元沉香山中药饮片有限公司，经广州中医药大学附属清远市中医院主任中药师朱卫星进行质量检查，符合 ChP 规定；**1**（含量 99%，批号 I2222788）、**2**（含量 96%，批号 G2220742）均购于阿拉丁化学试剂公司；克拉霉素（**3**，上海麦克林生化科技有限公司，批号 16S42）；哥伦比亚琼脂（批号 3119650）、脑心浸出液肉汤（批号 3213851）均购自英国 Oxoid 公司；胎牛血清（内蒙古金源康生物工程股份有限公司，批号 12A343）；PBS（浙江吉诺赛百尔生物科技有限公司，批号 22031501）；无菌脱纤维羊血（广州鸿泉生物科技有限公司，批号 220623）；乙腈和三氟乙酸均为色谱级。

H. Pylori 标准菌株 ATCC43504、ATCC700392 来自美国典型培养物保藏中心（ATCC）；临床菌株 ICDC111001 由广州中医药大学黄萍教授赠予，临床菌株 QYZ-001、QYZ-003 和 QYZ-004 由广东省清远市中医院赠予。

2 方法与结果

2.1 1 和 2 的体外抗菌试验

MIC 采用肉汤微量稀释法检测[10]。

称取 **1** 约 2.82 mg，加入脑心浸出液肉汤 2 mL，超声溶解，离心（13 680×*g*）3 min，用 0.22 μm 滤膜过滤，得到 1 393.6 μg/mL 的 **1** 母液。按二倍稀释法配制 696.8、348.4、174.2、87.10、43.55 μg/mL 等浓度梯度 **1** 肉汤。称取 **2** 约 2.58 mg，同法配制 1 237.76 μg/mL 的 **2** 母液。按二倍稀释法配制 309.44、154.72、77.36、38.68、19.34、9.67 μg/mL 等浓度梯度 **2** 肉汤。

分别取上述含药肉汤，每孔 50 μL，加至 96 孔板中。用润湿的无菌棉签刮取培养 48 h 的 *H. Pylori*（ATCC43504），置含 20% 胎牛血清的脑心浸出液肉汤中，以 1×10^6 CFU/mL 的密度接种于 96 孔板，每孔 50 μL。将 96 孔板置 37 ℃、10% CO_2、5% O_2 和 85% N_2 的三气培养箱中，在摇床转速 150 r/min 下孵育 72 h。孵育后以肉眼观察，以无浑浊孔的最低菌浓度为 MIC。用 **3** 作为阳性对照，并设置阴性对照孔（只含有药物、不接种菌株）、生长对照孔（不含任何药物、只接种菌株），每组样品重复 3 次。结果表明，**1**、**2** 和 **3** 在体外抗 ATCC43504 菌株的 MIC 分别为 87.10、19.34 和 0.02 μg/mL（*n*=3），提

示 **1** 和 **2** 均具有一定的抗 *H. Pylori* 活性，并推测其是诃子和丁香的主要抗菌活性成分。故后续采用 **1** 和 **2** 的含量为指标，优化诃子清幽方的提取工艺。

2.2　诃子清幽方的提取工艺

称取诃子清幽方处方药材（广东省清远市中医院提供，日用量 30 g），粉碎，置 1 000 mL 圆底烧瓶中，加一定倍量水，静置一段时间；置水浴中回流一定时间，过滤，收集滤液。滤渣重新加水提取，滤液合并后收集至圆底蒸发仪样品瓶中，减压浓缩。浓缩物进行冻干处理（2 Pa、－5 ℃，17 h；1.5 Pa、0 ℃，2 h；1 Pa、25 ℃，12 h；0 Pa，25 ℃，2 h），冻干结束即得水提物。

2.3　**1** 和 **2** 的含量测定

2.3.1　溶液的配制

供试品溶液：精密称取水提物 20 mg 于 100 mL 量瓶中，加水适量，超声辅助溶解，加水定容，摇匀，得供试品溶液。

对照品溶液：精密称取 **1** 5 mg、**2** 2 mg 于 100 mL 量瓶中，加水适量，超声辅助溶解，用水定容，摇匀，配制成对照品溶液。

2.3.2　色谱条件

色谱柱 Acclaim C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；*流动相* A 为 0.1%三氟乙酸水，B 为乙腈，梯度洗脱（0—40 min，A 97%—70%；40—41 min，A 70%—97%；41—50 min，A 97%）；*检测波长* 270 nm；*流速* 1.0 mL/min；*柱温* 25 ℃；*进样量* 90 μL。

2.3.3　方法学验证试验

该方法的专属性（图 1）、系统适用性、重复性、稳定性、精密度、准确度均符合要求。以质量浓度（*c*）为横坐标、峰面积（*y*）为纵坐标，进行线性回归，结果如表 1 所示。

2.4　提取工艺优化及验证

根据前期单因素试验结果，以提取次数（*A*）、加水量（*B*）、提取时间（*C*）为考察因素，**1** 和 **2** 含量及提取率为评价指标，采用正交试验优化提取工艺。因素水平表如表 2 所示。按下式计算提取率和综合评分（*Y*）。正交试验结果如表 3 所示。

提取率（%）= 冻干后的粉末质量 / 药材质量 ×100%

Y=(**1** 含量 /**1** 最大含量）×40+(**2** 含量 /**2** 最大含量）×40+（提取率 / 最大提取率）×20

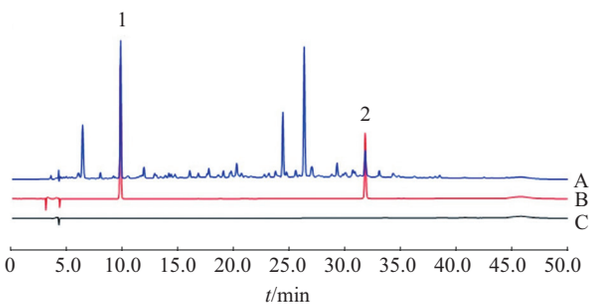
极差分析结果显示，各因素的影响顺序为提取次数 > 提取时间 > 加水量，最优组合为 $A_2B_3C_3$，即提取 2 次，加 12 倍量水，每次 2.0 h。方差分析显示，提取次数对结果有显著性影响（$P<0.05$），加水量、提取时间对结果无显著性影响（$P>0.05$）。为节约时间和能耗并综合考虑以上试验结果，最终确定优化提取工艺为 $A_2B_2C_2$，即提取 2 次，加 10 倍量水，每次 1.5 h。

按优化工艺，项“**2.2**”下方法平行提取 3 批，进行工艺验证。结果如表 4 所示，可见该提取工艺稳定可行。

2.5　诃子清幽方的体外抗菌试验

2.5.1　MIC 检测

称取水提物约 10.24 mg，加入脑心浸出液肉汤 2 mL，超声溶解，离心（13 680×*g*）3 min，经



A—供试品溶液；B—对照品溶液；C—空白溶液。1—**1**；2—**2**。

图 1　典型 HPLC 色谱图

Fig.1　Typical HPLC Chromatograms

表 1　线性试验结果

Tab.1　Results of Linearity Test

化合物	回归方程	R^2	线性范围 /（μg·mL^{-1}）
1	y=292.9c－23.49	1.000 0	1.00 ～ 20.18
2	y=390.9c+10.17	1.000 0	0.22 ～ 2.12

表 2　正交试验因素与水平

Tab.2　Factors and Levels for the Orthogonal Test

水平	因素		
	A/ 次	*B*/ 倍	*C*/h
1	1	8	1.0
2	2	10	1.5
3	3	12	2.0

表 3 正交试验设计与结果 [1)]

Tab.3 Design and Results of the Orthogonal Test

试验号	影响因素				评价指标 [1)]			
	A	B	C	D	**1** 含量 /(mg·g^{-1})	**2** 含量 /(mg·g^{-1})	提取率 /%	综合得分
1	3	2	3	1	26.57 (34.15)	5.70 (34.44)	22.36 (20.00)	88.59
2	3	3	1	2	26.23 (33.71)	5.37 (32.45)	21.17 (18.94)	85.10
3	2	1	3	2	31.12 (40.00)	6.62 (40.00)	20.89 (18.69)	98.69
4	2	3	2	1	30.75 (39.52)	6.15 (37.16)	21.75 (19.45)	96.13
5	2	2	1	3	30.81 (39.60)	6.44 (38.91)	17.56 (15.71)	94.22
6	1	3	3	3	25.97 (33.38)	5.36 (33.60)	18.07 (16.16)	83.14
7	1	1	1	1	24.50 (31.49)	5.13 (31.00)	14.61 (13.07)	75.56
8	3	1	2	3	27.04 (34.76)	5.75 (34.74)	18.69 (16.72)	86.22
9	1	2	2	2	26.47 (34.02)	5.59 (33.78)	14.81 (13.25)	81.05

注：[1)] 括号内数字为该评价指标得分。

0.22 μm 滤膜过滤，得到 5 120 μg/mL 的水提物母液。按二倍稀释法配制 1 280、640、320、160、80 μg/mL 等浓度梯度的水提物肉汤。

分别取上述含药肉汤，每孔 50 μL，加至 96 孔板中，采用“**2.1**”项下方法检测 MIC。结果如表 5 所示。诃子清幽方的水提物对 *H. Pylori* 的不同菌株均具有一定的抗菌活性，MIC 为 80 ～ 160 μg/mL。

2.5.2 时间 - 抑菌曲线

参考文献[11]，取“**2.5.1**”项水提物母液配制 160、80、40 μg/mL 的含药肉汤，以及不含药肉汤作为生长对照组。调节菌悬液浊度为 1×10^6 CFU/mL，按照菌悬液和含药 / 不含药肉汤体积比为 1 ∶ 1 取样并混合，每孔 2 mL，接种于 6 孔板，置 37 ℃、10% CO_2、5% O_2 和 85% N_2 的三气培养箱中孵育，在摇床转速为 150 r/min 条件下培养。分别在 0、8、24、32、36、48、50、52、56、72 h 时取样 100 μL，用酶标仪测量 OD_{600}，每组样品重复 3 次。结果如图 2 所示，80 μg/mL（半数 MIC）的水提物对 ATCC43504 菌株已有显著抑制作用，抑菌效果呈现浓度依赖性。

表 4 工艺验证结果

Tab.4 Process Validation Results

评价指标	批次			平均值	RSD%
	1	2	3		
1 含量 /(mg·g^{-1})	30.29	30.54	30.67	30.50	0.63
2 含量 /(mg·g^{-1})	6.29	6.37	6.50	6.39	1.66
提取率 /%	21.33	21.39	21.55	21.42	0.53

表 5 水提物对 *H. Pylori* 不同菌株的 MIC 结果（*n*=3）

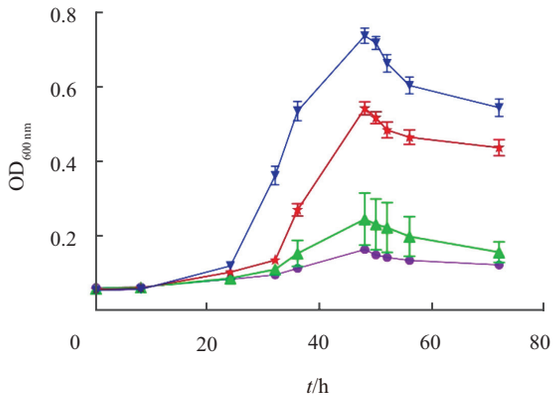
Tab.5 MIC Results of Aqueous Extracts against Different *S*trains of *H. Pylori*（*n*=3）

菌株	药物敏感性	MIC/(μg·mL^{-1})	
		水提物	**3**
ATCC43504	耐药（甲硝唑）	160	0.016
ATCC700392	敏感	160	0.008
ICDC11101	耐药（甲硝唑、左氧氟沙星）	160	<0.5
QYZ001	耐药（甲硝唑、左氧氟沙星）	160	<0.02
QYZ003	耐药（**3**、甲硝唑、左氧氟沙星）	80	—
QYZ004	耐药（**3**、甲硝唑、左氧氟沙星、阿莫西林）	160	—

3 总结与讨论

诃子清幽方作为临床经验方，显示出较好的降低感染者胃内 *H. Pylori* 载量以及大幅消除或缓解临床症状的作用。本研究验证了其主要成分 **1** 和 **2** 的抑菌活性，并以 **1** 和 **2** 含量为指标，在前期研究基础上，进一步优化了水提取工艺。最终优化工艺为：加 10 倍量水，提取 2 次，每次 1.5 h。随后检测了优化工艺条件下所得水提物对 *H. Pylori* 的抗菌活性。结果显示，该水提物对 *H. Pylori* 具有较好的体外抑制效果且呈现浓度依赖性。本研究为诃子清幽方的后续制剂开发以及临床应用奠定的试验基础。

然而，本研究也存在一些不足之处。例如，提取率仍有待进一步提高；只在体外验证了诃子清幽方的 *H. Pylori* 效果，后续仍需开展动物试验，并测定经诃子清幽方治疗后 *H. Pylori* 在细胞形态、炎症因子、基因表达方面的变化，从而进一步评价诃子清幽方对 *H. Pylori* 的抑菌能力。



▼—对照组；★—40 μg/mL；▲—80 μg/mL；●—160 μg/mL。

图 2　水提物对 ATCC43504 的时间－抑菌曲线（*n*=3）

Fig.2　Time-inhibition Curves of Aqueous Extracts against ATCC43504 Strains (*n*=3)

参考文献：

[1] DE ASSUMPÇÃO P P, ARAÚJO T M T, DE ASSUMPÇÃO P B, *et al*. Suicide journey of *H*. *pylori* through gastric carcinogenesis: the role of non-*H*. *pylori* microbiome and potential consequences for clinical practice [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, **38**(9): 1591-1597.

[2] 黄　辉. 拮抗幽门螺杆菌乳酸菌的筛选及其发酵雪莲果研究 [D]. 南昌 : 南昌大学硕士学位论文 , 2023.

[3] HOWDEN C W, SHELDON K L, ALMENOFF J S, *et al*. Pitfalls of physician-directed treatment of *Helicobacter pylori*: results from two phase 3 clinical trials and real-world prescribing data [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, **67**(9): 4382-4386.

[4] GEORGOPOULOS S, PAPASTERGIOU V. An update on current and advancing pharmacotherapy options for the treatment of *H*. *pylori* infection [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, **22**(6): 729-741.

[5] ZOU Y Z, QIAN X, LIU X Q, *et al*. The effect of antibiotic resistance on *Helicobacter pylori* eradication efficacy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Helicobacter*, 2020, **25**(4): e12714.

[6] 刘　君，董秋梅，郝　华，等. 诃子水提物对胶原诱导性关节炎模型大鼠肠道免疫机制研究 [J]. 中华中医药学刊 , 2020, **38**(10): 35-39.

[7] 赵云雁，卢　洋，陶诚天，等. 藏药三果汤的质量控制研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中药与临床 , 2023, **14**(3): 88-93.

[8] 郝　季，鞠成国，张　强，等. 诃子砂烫炮制工艺及砂烫诃子中鞣花酸提取工艺研究 [J]. 药学研究 , 2023, **42**(4): 247-250.

[9] KIM J H, SEO C S, KIM S S, *et al*. Simultaneous determination of gallic acid, ellagic acid, and eugenol in syzygium aromaticum and verification of chemical antagonistic effect by the combination with curcuma aromatica using regression analysis [J]. *J Anal Methods Chem*, 2013, **2013**: 375294.

[10] PENG C, SANG S Y, SHEN X, *et al*. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Syzygium aromaticum* and the preliminary mechanism of action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, **288**: 114995.

[11] OU L, LIU H R, SHI X Y, *et al*. *Terminalia chebula* Retz. aqueous extract inhibits the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response by regulating the inflammasome signaling and ER-stress pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, **320**: 117428.

（上接第 518 页）

[12] 魏庚辉 , 黄湘川 , 宁兆伦. 8- 氨基辛酸的合成方法 : 中国 , 115557846A [P]. 2023-01-03.

[13] 邝秋艳. 6- 羟基 -8- 氯辛酸乙酯的合成工艺研究 [D]. 郑州 : 郑州大学硕士学位论文 , 2018.

[14] 陈　义 , 刘　裕 , 陈　强. 一种褪黑素的化学合成方法 : 中国 , 113968809A [P]. 2022-01-25.

[15] Takagi S, Hayashi K. Studies on the synthesis of amino acids by the schmidt reaction Ⅱ. New synthetic method for ω-amino acids and syntheses of DL-2,8-diaminooctanoic acid and DL-2,9-diaminononanoic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1959, **7**: 99-102.