

亳芍总生物碱提取及抑菌活性的研究

陈乃东^{1,2,3*}, 朱旺生¹, 杨小东¹

¹皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012; ²皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 六安 237012; ³安徽医科大学药学院, 合肥 230032

摘要: 为了探讨亳芍总生物碱提取条件及其抑菌活性, 在前期研究基础上, 通过单因素和正交实验对亳芍总生物碱的提取条件进行了研究。采用滤纸片法对亳芍总生物碱提取物对大肠杆菌、金色葡萄球菌酵母菌及黑曲霉菌的体外抑菌活性进行初步测定。结果表明, 亳芍总生物碱最佳提取条件为: 乙醇浓度为 60%, 提取时间为 3 h, 提取温度为 60 °C, 料液比为 1:20。此条件下, 测得亳芍总生物碱的含量为 0.58%, 提取的总生物碱对大肠杆菌、金色葡萄球菌及酵母菌、黑曲霉菌均有抑制作用, 但抑菌效果不同, 抑菌作用顺序为: 金色葡萄球菌 > 酵母菌 > 黑曲霉菌 > 大肠杆菌。

关键词: 亳芍; 生物碱; 抑菌活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.014

Extraction and Antibacterial Activity of Total Alkaloids From Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*

CHEN Nai-dong^{1,2,3*}, ZHU Wang-sheng¹, YANG Xiao-dong¹

¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Anhui Lu'an 237012, China;

² West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine, West Anhui University, Anhui Lu'an 237012, China; ³ School of Pharmacy, Anhui Medical University, Anhui Hefei 230032, China

Abstract: In order to explore the optimal extraction conditions and the antibacterial activity of total alkaloids from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*, single factor experiments followed by orthogonal tests were applied based on our pre-view study, and then preliminary *in vitro* antibacterial activities were evaluated by disc diffusion assay. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: methanol concentration of 60%, extraction time of 3 h, extraction temperature of 60 °C, and the ratio of solid-liquid of 1:20. In addition, the total alkaloid extract showed inhibitory activities against all the 4 investigated bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* with the following sequence: *S. aureus* > *S. cerevisiae* > *A. niger* > *E. coli*.

Key words: Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*; alkaloids; antibacterial activity

亳芍(Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*), 即亳白芍, 主产安徽省亳州地区, 为安徽道地药材之一, 是芍药科植物芍药(*Paeonia lactiflora*)或其变种毛果芍药(*Paeonia trichocarpa*)栽培品的根, 夏秋季采挖其根部, 去净泥土和支根, 沸水浸或略煮至受热均匀, 再经晒干等处理后即炮制成中药亳芍, 具有抗炎、免疫调节、抗病毒、抗氧化、抗惊厥、护肝等作用, 对胃肠道疾病和心血管疾病也有一定的疗效^[1-3]。

植物化学研究表明, 白芍主要含有单萜^[4]、倍半萜及三萜^[5]、单宁^[6]、挥发油^[7]、黄酮^[8]、多酚类^[9]、多糖^[10]等活性成分。

在我们的前期研究中发现, 亳芍中含有微量生物碱^[11]。本文在前期研究的基础上, 以乌头碱为标准品, 采用紫外分光光度法测定生物碱的含量, 对亳芍总生物碱的最佳提取工艺条件及其抑菌活性进行研究, 为后续的亳芍生物碱深度药理学研究和开发利用奠定基础。

1 材料、仪器和试剂

1.1 材料

实验材料亳芍购于安徽省亳州市, 品种经皖西

收稿日期: 2014-01-06 接受日期: 2014-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(81274021); 中国博士后基金面上项目(2014M551791); 安徽省人事厅博士后研究项目; 安徽高校省级科学研究重点项目(KJ2012A277); 六安市委定向委托皖西学院市级研究重点项目(2011LWA001)

* 通讯作者 E-mail: 2004cnd@163.com

学院陈乃东博士鉴定为亳芍(*Radix Paeoniae Alba*)。

1.2 仪器

GJ14-DGF3006 型电热恒温干燥箱(金坛市荣华仪器制造有限公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市国华电器有限公司),RE-52D 型旋转蒸发器(上海浦沪仪器厂),FA-1004 型电子天平(上海精科天平厂),超净工作台(苏州净化设备有限公司),灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.3 试剂

氨水、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、浓盐酸、牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、硫酸镁、葡萄糖、硫酸二氢钾、淀粉等均为国产分析纯。

标准品乌头碱购自成都吉欧特生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ (HPLC 检测)。

1.4 供试菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),大肠杆菌(*Escherichia coli*),酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)由植物细胞工程安徽省工程技术研究中心内生真菌研究室汪学军副教授提供。

2 实验方法

2.1 亳芍总生物碱的提取

2.1.1 总生物碱提取方法

称取 100g 干燥至恒重的亳芍粉末,分别在不同条件下(乙醇浓度、料液比、提取液盐酸、提取温度)进行回流提取,过滤,滤液减压浓缩至干获总生物碱粗提物。将亳芍生物碱粗提物以 5%(V/V)盐酸捏溶,等体积二氯甲烷萃取三次除杂,酸水相中缓慢滴加氨水至溶液 pH = 8.5 ~ 9.5(精密 pH 试纸测定),等体积氯仿萃取三次,减压回收氯仿,得亳芍总生物碱。

2.1.2 总生物碱含量测定方法

亳芍总生物碱的含量测定参照陈美川等^[12,13]方法改进而来,操作步骤如下:

2.1.2.1 标准对照品溶液的配制

精密称取乌头碱对照品 5 mg 置 50 mL 容量瓶中,加 0.01 mol/L 盐酸溶液使溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为标准溶液,备用。

2.1.2.2 醋酸-醋酸钠缓冲液及溴甲酚绿溶液的配制

取 0.2 mol/L 醋酸溶液 250 mL,用 0.20 mol/L

醋酸钠溶液调节 pH 至 3.1 10 mL,备用。取溴甲酚绿 50 mg,加 0.50 mol/L 氢氧化钠液 1.6 mL 研磨使溶解,加水至 100 mL,用三氯甲烷提取 3 次,每次 30 mL,弃去三氯甲烷液,备用。

2.1.2.3 标准曲线测定方法

精密量取乌头碱标准溶液 0.00、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mL 分别置分液漏斗中,各依次加入 0.01 mol/L 盐酸溶液 2.00、1.75、1.50、1.25、1.00、0.50、0.00 mL,各精密加醋酸-醋酸钠缓冲液 10 mL、溴甲酚绿液 2 mL、三氯甲烷 10 mL,振摇 3 min,静置,分取三氯甲烷液,于 412 nm 处测定吸光度值(A)。然后以吸光度为纵坐标(y),标准溶液浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,求得回归方程为: $y = 0.410x - 0.009$ ($R^2 = 0.9940$)。

2.1.2.4 亳芍总生物碱的含量测定

0.01 mol/L 盐酸溶液配制 0.1 mg/mL 总生物碱提取物溶液,按测定标准曲线相同方法测定亳芍生物碱的含量。

2.1.3 亳芍生物碱提取条件的优化

2.1.3.1 单因素实验

从温度、乙醇浓度、料液比、提取时间四个方面探讨影响亳芍总生物碱提取率的因素。其中,温度考察范围为:40、50、60、70、80 °C;乙醇浓度考察范围:30%、50%、70%、90%、100%;料液比考察范围:1:5、1:10、1:20、1:30、1:40;提取时间考察范围:1、2、3、4、5 h。提取次数均为一次。当考察其中一个因素时,其它因素选择五个水平中的中位数,例如,考察温度影响时,另三个条件分别选择:70%乙醇浓度、料液比 1:20、提取时间 3 h。

2.1.3.2 正交实验

根据单因素实验结果,选择合适的因素水平,进行 4 因素 3 水平正交实验。

2.2 抑菌活性的测定

培养大肠杆菌与金黄色葡萄球菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,培养酵母菌、黑曲霉菌采用 PDA 培养基。

2.2.1 样品配制

精密配制 2.5、5.0、10.0、15.0 mg/mL 亳芍总生物碱乙酸乙酯溶液各 5 mL,密封,备用。以 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和克霉唑乙酸乙酯溶液为阳性对照、乙酸乙酯为阴性对照。

2.2.2 菌悬液的制备

供试菌种斜面培养基活化后,取适量用生理盐

水稀释,制成菌悬液备用。

2.2.3 抑菌活性测定——滤纸片法

在无菌操作台上将灭菌后的固体培养基,每皿精确加入 0.5 mL 菌液,涂布棒涂布均匀。将直径 8 mm 的滤纸圆片灭菌后在不同浓度生物碱提取液中浸泡 2 h 后取出,贴于平板上,以无菌水作为对照。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌于 37 °C 恒温培养 24 h,黑曲霉菌和酵母于 28 °C 恒温培养 24 h。上述实验每组设 3 个重复,测定滤纸片的抑菌圈直径大小,记录实验结果。

3 实验结果

3.1 亳芍总生物碱提取工艺单因素试验结果

单因素实验结果如图 1 所示。液料比 1:20,提取时间为 3 h,提取温度为 60 °C 条件时,分别以 30%、50%、70%、90%、100% 浓度的乙醇进行回流提取,随乙醇浓度的增加测得的生物碱含量也升高(图 1A),表明总生物碱的提取率随乙醇浓度的增高而增加,当浓度超过 70% 时,提取率下降,可能是亳芍中水溶性总生物碱在高浓度醇中溶解度下降所

致,故选择 50%、70%、90% 为继续优化提取条件的乙醇浓度。

当提取时间为 3 h、提取温度为 60 °C、乙醇浓度为 70%,考察料液比对总生物碱提取的影响,实验结果见图 1B。实验测定的生物碱含量(提取率)随料液比的增加而增加,当料液比超过 1:20 时,生物碱得率增加缓慢。但料液比越小,耗费的试剂越多,后处理工作量增大,综合考虑,选择料液比 1:10~1:30,作为进一步优化提取条件的料液比考察范围。

温度对总生物碱提取的影响如图 1C 所示,采用 70% 乙醇、料液比 1:20 提取 3 h 时,随着温度的升高,总生物碱提取率增加,当温度达 60 °C 时,提取率最高,然后随着温度的升高生物碱的提取率下降。故实验选择 50、60、70 °C 作为进一步优化提取条件的温度范围。

提取时间对总生物碱提取的影响见图 4,随提取时间的升高,总生物碱提取率增加,而时间为 3 h 时,随着时间推移,提取率增加缓慢,故选 2、3、4 h 为作为进一步优化提取条件的的时间范围。

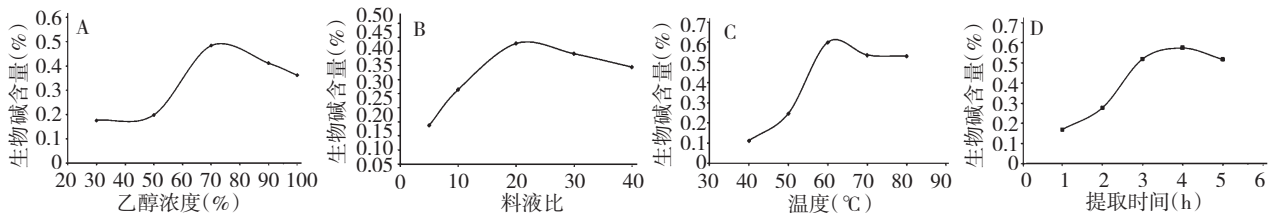


图 1 乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取温度(C)及提取时间(D)对亳芍总生物碱提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration (A), solid-liquid ratio (B), extraction temperature (C) and extraction time (D) on the extraction yield of total alkaloids from Bozhou Peony *P. lactiflora*

3.2 提取工艺优化

通过单因素实验,确定了每个因素的三个水平(表 1),以 $L_9(4^3)$ 正交实验设计对亳芍总生物碱提取工艺进行优化(表 2)。

由表 2 可知影响亳芍生物碱提取因素中,对生物碱提取率影响由大到小依次为:提取温度(D) >

提取时间(C) > 乙醇浓度(A) > 料液比(B),提取亳芍总生物碱的最佳提取工艺条件为 $A_1B_2C_2D_2$,即乙醇浓度为 60%,料液比为 1:20,提取时间为 3 h,提取温度为 60 °C,在此条件下,测得亳芍总生物碱含量为 0.58%。

表 1 正交因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiments

水平 Level	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 料液比 Ratio of solid-liquid	C 提取时间 Extraction time (h)	D 提取温度 Extraction temperature (°C)
1	60	1:10	2	50
2	70	1:20	3	60
3	80	1:30	4	70

表2 正交实验与结果
Table 2 Results of orthogonal experiments

实验号 No.	A	B	C	D	生物碱含量 Total alkaloids content (%)
1	1	1	1	1	0.153
2	1	2	2	2	0.578
3	1	3	3	3	0.371
4	2	1	2	3	0.243
5	2	2	3	1	0.218
6	2	3	1	2	0.223
7	3	1	3	2	0.329
8	3	2	1	3	0.197
9	3	3	2	1	0.177
k1	1.102	0.725	0.573	0.548	
k2	0.684	0.993	0.999	1.130	
k3	0.703	0.771	0.917	0.811	
R	0.418	0.269	0.425	0.582	

3.3 不同浓度的亳芍总生物碱抑菌效果

不同浓度的亳芍总生物碱抑菌活性如表3所示,亳芍总生物碱对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金色葡萄球菌和酵母菌均表现出抑菌活性(图2),且生物碱提取液浓度与抑菌圈大小具有量效关系,抑菌圈随生物碱提取液浓度增大而扩大,对金黄色葡萄球菌、黑曲霉抑菌效果尤为显著。

4 结论

亳芍生物碱的最佳提取工艺为:60%乙醇,提取温度为60℃,提取时间为3h,料液比为1:20。亳芍总生物碱提取物对大肠杆菌、酵母菌、黑曲霉菌及金色葡萄球菌均表现出一定的体外抑菌活性,抑菌作用由大到小依次为:金色葡萄球菌>黑曲霉菌>

表3 亳芍生物碱的体外抑菌活性

Table 3 Antibacterial activity of different concentrations of total alkaloids from Bozhou Peony *P. lactiflora*

浓度 Concentration of total alkaloids (mg/mL)	抑菌圈直径 Bacteriostatic diameters (mm)			
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	黑曲霉 <i>A. nigers</i>	酵母菌 <i>S. cerevisiae</i>
阴性对照(乙酸乙酯) Negative control (ethyl acetate)	8.2	8.5	8.3	8.2
2.5	12.5 ± 0.29 *	17.17 ± 0.44 *	16.67 ± 0.73 *	15.0 ± 0.29 *
5.0	13.33 ± 0.44	20.83 ± 0.67	18.0 ± 0.76	16.33 ± 0.44
10.0	13.83 ± 0.73	23.33 ± 0.60	19.33 ± 0.60	17.25 ± 0.75
15.0	16.67 ± 0.44 *	25.50 ± 0.76 *	20.67 ± 0.60 *	18.67 ± 0.33 *
阳性对照青霉素(2.5 mg/mL) Positive control penicillin (2.5 mg/mL)	21.00 ± 0.76	29.50 ± 0.29	17.0 ± 0.87	17.5 ± 0.58
阳性对照克霉唑(2.5 mg/mL) Positive control clotrimazole (2.5 mg/mL)	14.67 ± 1.01	18.0 ± 0.76	19.28 ± 0.65	24.24 ± 0.82

注:表中所有的数据采用均值±标准差的形式表示,且标准差后面的*代表经过Dunnnett's法分析,所得到的不同处理组的抑菌率之间的差异显著性($P \leq 0.05$)。

Note: All data were expressed by mean ± SD and "*" indicated value of this dosage was significance of difference from that of other dosages ($P \leq 0.05$), according to Dunnnett's analysis.

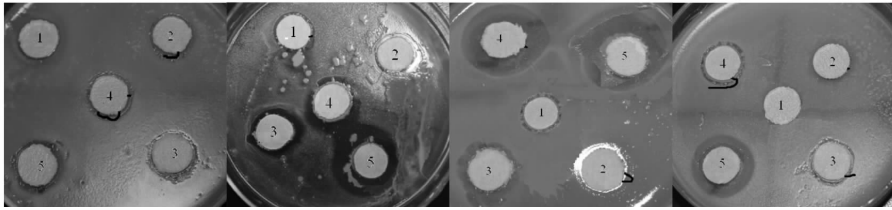


图2 亳芍总生物碱提取物的抑菌效果

Fig. 2 Antibacterial effects of total alkaloids from Bozhou Peony *P. lactiflora*

注:上述四个图从左到右依次为大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、黑曲霉(*A. nigers*)和酵母菌(*S. cerevisiae*);1,2,3,4,5表示总生物碱浓度依次为0,2.5,5.0,10.0,15.0 mg/mL

Note: From left to right were *E. coli*, *S. aureus*, *A. nigers* and *S. cerevisiae*, respectively. The Arabic numbers 1,2,3,4,5 in each figure presented the concentrations of the total alkaloids were 0,2.5,5.0,10.0 and 15.0 mg/mL, respectively.

酵母菌 > 大肠杆菌 本研究结果可为中药亳芍质量控制、药理学研究及资源开发提供参考依据。

参考文献

- Lee B, Shin YW, Bae EA, et al. Antiallergic effect of the root of *Paeonia lactiflora* and its constituents paeoniflorin and paeonol. *Arch Pharm Res*, 2008, 31:445-450.
- Lee SC, Kwon YS, Son KH, et al. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28:775-783.
- Jia N, Shu QY, Wang LS, et al. Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars. *Sci Hortic*, 2008, 117:167-173.
- Wang HB, Gu WF, Chu WJ, et al. Monoterpene glucosides from *Paeonia lactiflora*. *J Nat Prod*, 2009, 72:1321-1324.
- Kim N, Park KR, Park IS, et al. Application of novel HPLC method to the analysis of regional and seasonal variation of the active compounds in *Paeonia lactiflora*. *Food Chem*, 2006, 96:496-502.
- Ikuta A, Kamiya K, Satake T, et al. Triterpenoids from callus tissue cultures of *Paeonia species*. *Phytochem*, 1995, 38:1203-1207.

- Kamiya K, Yoshioka K, Saiki Y, et al. Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochem*, 1997, 44:141-144.
- Tanaka T, Fukumori M, Ochi T, et al. Paenoninins A-E, New dimeric and monomeric ellagitannins from the fruits of *Paeonia lactiflora*. *J Nat Prod*, 2003, 66:759-763.
- Lee SC, Kwon YS, Son KH, et al. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28:775-783.
- Tomoda M, Matsumoto K, Shimizu N, et al. An acidic polysaccharide with immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17:1161-1164.
- Chen ND(陈乃东), Zhou F(周飞). The primary research of the extracting and assaying of the alkaloids from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*. *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2013, 10(20):49-50.
- Chen MC(陈美川). Determination of total content of aconitine Tongxuekang capsule by acid dye colorimetry. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2012, 22:106-107.
- Xu HY(许怀勇), Li HC(李含春). Study on the determination method of rib vigorously to alcohol content of Aconitine. *China Mod Med* (中国现代医药), 2012, 19:70.

(上接第 939 页)

- Ma HS(马华升), et al. 千层塔组织培养中外植体消毒灭菌研究初报. *Hangzhou Agric Sci Tech* (杭州农业科技), 2008, 3:15-18.
- Yang XF(杨雪飞), et al. Studies on tissue culture and sterilization method of *Huperzia serrata*. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学), 2008, 36:4947-4948.
- Li G(李贵), et al. Sterilization of explants and elimination of endophytes in *Huperzia serrata*. *J Jishou Univ* (吉首大学学报), 2009, 30:100-103.
- Ma XJ(马小军), et al. Research review of rare source plant *Huperzia serrata* (Qian Ceng Ta). *Lishizhen Med Mater Med*

Res (时珍国医国药), 2009, 20:2858-2860.

- Yuan DX(袁带秀), Entomack B. Advances in studies on chemical constituents of *Huperzia serrata* and their pharmacological effects. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2011, 30(3):1-13.
- Chen XH(陈献红), et al. 石杉碱甲联合天智颗粒治疗血管性痴呆的疗效观察. *Clin Med* (临床医学), 2009, 29(7):57-58.
- Huang BR(黄宝荣). 石杉碱甲片和尼莫地平联合治疗脑血管性痴呆临床观察. *Pharm Res* (药物研究), 2012, 54:21-23.