

## 喜树叶中生物碱成分提取工艺优化及抗菌抗氧化活性研究

尚潇潇, 朱琳, 罗孝菁, 饶毅, 唐祥, 张程瑞, 蒲祥\*

四川农业大学理学院, 雅安 625014

**摘要:** 运用响应面法优化喜树叶中总生物碱提取工艺并考察总生物碱提取物的抗菌及抗氧化活性。本文在单因素试验基础上, 选定超声提取时间为 40 min, 并进一步选取料液比、超声功率、甲醇比例为自变量, 以总生物碱提取率为响应值, 利用 Box-Behnken 中心组合设计 3 因素 3 水平试验, 确定最佳提取工艺条件为: 超声时间 40 min, 甲醇:甲酸:水 = 17.5:1:1.5, 料液比 1:22 g/mL, 超声功率 240 W。在此条件下, 生物碱的得率为  $1.67 \pm 0.08$  mg/g。抗菌结果表明喜树叶总生物碱提取物(LAE)对 *S. aureus*、*E. coli* 和 *P. aeruginosa* MIC 值分别为 4.38, 8.75, 8.75  $\mu\text{g/mL}$ 。LAE 的总抗氧化能力较好, 其 FRAP 值为  $0.16 \pm 0.01$  mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 对 DPPH 和 ABTS 自由基清除半抑制浓度分别为 4  $\mu\text{g/mL}$  和 3  $\mu\text{g/mL}$ 。本研究为喜树次生代谢产物的进一步开发利用提供了参考依据。

**关键词:** 喜树叶; 生物碱; 响应面分析法; 抗菌活性; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2; R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.019

## Extraction Condition Optimization for Total Alkaloids from Leaves of *Camptotheca acuminata* and Its Antibacterial and Antioxidation Activity

SHANG Xiao-xiao, ZHU Lin, LUO Xiao-jing, RAO Yi, TANG Xiang, ZHANG Cheng-ru, PU Xiang\*

College of Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China

**Abstract:** Response surface methodology was applied to optimize the extraction condition for total alkaloids from the leaves of *Camptotheca acuminata*, and investigating their antibacterial and antioxidant activities. Preliminary single factor experiments show that solid-liquid ratio, ultrasonic power and methanol concentration notably altered the extraction efficiency, thus a Box-Behnken second-order polynomial model involving three factors at three levels was developed to investigate the favourable alkaloids extraction condition, while ultrasonic time was fixed as 40 min. The optimal conditions were determined as followings: methanol concentration (methanol: formic acid: water = 17.5:1:1.5), solid-liquid ratio (1:22 g/mL), ultrasonic power (240 W). Under these conditions, the extraction yield of total alkaloids is  $1.67 \pm 0.08$  mg/g. Leaf alkaloid extract (LAE) displays antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, with MIC value 4.38, 8.75, 8.75  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. LAE displays significant antioxidant activity in ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the IC<sub>50</sub> value for ABTS and DPPH scavenging tests is 4  $\mu\text{g/mL}$  and 3  $\mu\text{g/mL}$ . These results proved that the optimized extraction technology was reliable and provides a reference for further development and utilization of the metabolite resources of *Camptotheca acuminata* Decne.

**Key words:** *Camptotheca acuminata*; alkaloids; response surface methodology; antibacterial activity; antioxidant activity

喜树 (*Camptotheca acuminata*), 为我国特有二级野生保护植物, 主要分布于中国长江流域及西南各省<sup>[1]</sup>。1966年由 Wall 等首次从树皮中分离获得喜树碱 (Camptothecin)<sup>[2]</sup>, 其衍生物伊立替康、拓扑替康相继被开发用于多种实体瘤如结肠癌、卵巢癌、

乳腺癌、非小细胞肺癌、恶性淋巴瘤等的临床治疗<sup>[3]</sup>, 已成为抗肿瘤药物市场上的主要品种之一, 具有较大市场销售额。喜树因全株含有喜树碱及喜树碱类似物而受到持续关注, 现已成为市场上喜树碱及其衍生物产品获取的主要植物资源之一<sup>[3]</sup>。此外, 喜树富含多种代谢产物, 研究人员先后从喜树的叶、果实、根、树皮中发现了一百余种化合物, 其中包括喜树碱在内的喹啉类生物碱以及吲哚类生物碱四十余种<sup>[4-7]</sup>, 然而与日俱增的市场需求导致喜树资

收稿日期: 2018-04-15 接受日期: 2018-09-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (21708028); 四川省教育厅 (17ZJA0301); 大学生创新训练项目 (201610626071)

\* 通信作者 Tel: 86-835-2882422; E-mail: puxiang@sicau.edu.cn

源遭到破坏。

要实现喜树资源的充分利用和探明代谢产物随时间的变化规律,均需要对喜树进行代谢产物轮廓分析。以甲基橙为显色剂,杨磊等<sup>[8]</sup>构建了喜树中总生物碱的萃取光度法。余响华等<sup>[9]</sup>应用乙醇浸提法优化喜树果中生物碱提取工艺。Montoro 等<sup>[10]</sup>以 70% 乙醇作溶剂对温室培养喜树叶进行代谢指纹分析,并从中鉴别了 24 种成分。在代谢组学分析中,提取溶剂和提取方法的选择尤为重要。喜树叶中代谢产物丰富,目前未见叶中总生物碱提取工艺优化及抗菌抗氧化活性报道。由此我们以叶为研究对象,采用超声冷提技术与响应面分析法结合<sup>[11]</sup>,对喜树叶中的总生物碱成分进行提取工艺优化及抗菌、抗氧化活性测试,为进一步从喜树叶中发掘活性生物碱奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

喜树叶(树体外围新梢,枝顶端 1~6 位叶)取自四川农业大学雅安校区,树龄:大于十年,采集时间:2017 年 4 月,经四川农业大学杨瑞武教授鉴定为喜树鲜叶(*Camptotheca acuminata* leaf)。喜树碱对照品(上海阿拉丁试剂有限公司,中国)、2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS,  $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ )、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ )、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,  $C_{18}H_{12}N_6$ )、丁基羟基茴香醚(BHA,  $C_{11}H_{16}O_2$ )、抗坏血酸(Vc,  $C_6H_8O_6$ )均购自上海阿拉丁试剂有限公司;色谱纯甲醇和乙腈(TEDIA, 美国);无水乙醇、甲醇、甲酸、三氯甲烷、甲基橙、石油醚、二甲亚砜均为分析纯,购自成都科龙化工试剂厂;0.22  $\mu\text{m}$  和 0.45  $\mu\text{m}$  针头式过滤器(天津津腾实验设备有限公司,中国);无菌注射器(上海聚民生物科技有限公司,中国);硫酸卡那霉素(生工生物工程(上海)股份有限公司,中国);大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和枯草芽孢杆菌由四川农业大学生命科学院提供。

### 1.2 仪器与设备

HPLC(Agilent, 美国);Specord200Plus 紫外可见分光光度计(Analytik Jena, 德国);BT124S 电子天平(Sartorius, 德国);SB-5200 DTD 台式超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,中国);TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂,中国);DHG-

9101 型电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司,中国);PHS-3C 型酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司,中国);IMS-50 型制冰机(常熟市雪科电器有限公司,中国);高压蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司,中国);SW-CJ-2FD 超净工作台(上海博讯医疗设备,中国);ZWY-240 恒温培养振荡器(上海智城,中国);移液枪(大龙兴创实验仪器有限公司,中国)。

## 2 实验方法

### 2.1 样品的前处理与提取

将新采集的喜树叶鲜样置于恒温干燥箱 25  $^{\circ}\text{C}$  烘至恒重,粉碎过筛,即为喜树叶干样。干样用石油醚浸泡脱色,烘干后样品袋封装-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。喜树叶样品粉末 0.50 g,加入适量提取溶剂后,超声冷提(0  $^{\circ}\text{C}$ ),提取液 4 000 rpm 离心 10 min,上清液转入样品瓶,并用提取溶剂定容至 5 mL 备用,得样品液。

### 2.2 溶液配置

对照品溶液 I:称取喜树碱对照品 3.0 mg 于 5 mL 容量瓶中,用适量 DMSO 溶解后乙醇定容,摇匀,配成 0.6 mg/mL 母液备用。柠檬酸-磷酸盐缓冲溶液(pH 5)与 1.5 mM 甲基橙缓冲混合溶液的配制参照杨磊等<sup>[8]</sup>。

### 2.3 喜树叶中总生物碱含量测定

总生物碱含量测定采用甲基橙显色法<sup>[8]</sup>,以对照品浓度 X 为横坐标、吸光度 Y 为纵坐标线性拟合,得回归方程  $Y = 3.7119X + 0.0361$  ( $R^2 = 0.9925$ )。总生物碱含量(mg/g) = 样品液中总生物碱浓度(mg/mL)  $\times$  样品液体积/喜树叶干样质量(g)。

### 2.4 喜树碱含量测定

对照品溶液 II:将喜树碱对照品母液 I 稀释十倍,即得浓度为 60  $\mu\text{g/mL}$  喜树碱对照品溶液 II。喜树碱含量测定使用 Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱,色谱条件:色谱柱(InertSustain  $C_{18}$ , 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$  分离,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 1.0 mL/min, G7129A 自动进样器进样。流动相组成 A:水 + 0.1% 甲酸, B:甲醇;梯度洗脱程序:0~12 min, 5%~50% (B), 12~30 min, 50%~80% (B), 30~39 min, 80%~98% (B), 39~45 min, 98%~98% (B);检测波长:254 nm, 373 nm。自动进样器进样,喜树碱进样量分别为 60、300、600、3000、6000 ng,以喜树碱进样量 X 为横坐标,色谱峰积分面积 Y 为纵坐标

绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 3.73861X + 70.08071$  ( $R^2 = 0.9997$ )。

## 2.5 单因素实验

以喜树叶生物碱含量为指标,考察提取溶剂(甲醇:甲酸:水(甲醇比例) = 12:1:7、15:1:4、18:1:1;甲醇:氯仿 = 4:1、2:1、1:1、1:2、1:4;乙腈:水 = 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,固定料液比 1:10,提取时间 30 min,超声功率 255 W)、提取时间(10、20、30、40、50 min,固定料液比 1:10,提取溶剂甲醇:甲酸:水 = 15:1:4,超声功率 255 W)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25,固定提取时间 30 min,超声功率 255 W,提取溶剂甲醇:甲酸:水 = 15:1:4)、超声

功率(120、165、210、255、297 W,固定提取时间 30 min,料液比 1:10,提取溶剂甲醇:甲酸:水 = 15:1:4)以及甲醇比例(6:1:13、9:1:10、12:1:7、15:1:4、18:1:1,固定提取时间 30 min,超声功率 255 W,料液比 1:10)5 个因素对总生物碱含量的影响。

## 2.6 响应面优化实验

根据单因素实验结果,选取料液比、超声功率、甲醇比例为自变量,以总生物碱提取率为响应值,利用 Box-Behnken 中心组合设计 3 因素 3 水平试验(见表 1)。用 Design Expert 8.0 进行数据分析,最后通过模型验证得出总生物碱超声冷提最优条件。

表 1 响应面分析因素及水平  
Table 1 Factors and levels of RSM analysis

水平 Level	因素 Factor		
	料液比 Solid to liquid ratio (g/mL)	超声功率 Ultrasonic power (W)	甲醇比例 Methanol ratio
-1	1:15	210	12:1:7
0	1:20	255	15:1:4
1	1:25	297	18:1:1

## 2.7 抑菌活性测试

参照药品微生物测试方法<sup>[12]</sup>,用二倍稀释法将样品配制成一定浓度梯度 1.0 mL 样品,选取硫酸卡那霉素作为阳性对照,M17.5F1W1.5 溶液为阴性对照,每组平行测定 3 次。

## 2.8 抗氧化活性测定

### 2.8.1 总抗氧化能力的测定(FRAP 法)

参照 Benzie 建立的方法,并稍作修改<sup>[13]</sup>。以 M17.5F1W1.5 溶液为空白对照,以 BHA 和 Vc 作为阳性对照,每组平行测定 3 次。以 0.2 ~ 1.6 mmol/L 的  $FeSO_4$  的标准溶液测试并绘制标准曲线。样品的总抗氧化能力以达到同样吸光度所需的  $FeSO_4$  的量表示<sup>[14]</sup>。

### 2.8.2 DPPH 自由基清除活性

参照 Brand-Williams 建立的方法,并稍作修改<sup>[14]</sup>。以 M17.5F1W1.5 溶液为空白对照,BHA 和 Vc 作为阳性对照,每组平行测定 3 次。清除率(RSA)计算公式如下:

$$DPPHRSA(\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

式中: $A_0$ —M17.5F1W1.5 溶液代替样品测得的

吸光度; $A_1$ —样品、BHA 或 Vc 的吸光度

### 2.8.3 ABTS 自由基清除活性

参照 Re 建立的方法,并稍作修改<sup>[15]</sup>。以 BHA 和 Vc 作为阳性对照,每组平行测定 3 次。清除率(RSA)计算公式如下:

$$ABTSRSA(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: $A_0$ —M17.5F1W1.5 溶液代替样品测得的吸光度; $A_1$ —样品、BHA 或 Vc 的吸光度

## 2.9 数据分析

所有试验重复三次,实验数据用 SPSS 17.0 进行统计分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素试验结果

#### 3.1.1 提取溶剂考察

以甲基橙法评估三种不同溶剂体系提取总生物碱收率,结果如图 1,MC 体系收率最高,且随溶剂比例变化影响显著,MC 比例为 1:1 时(v/v),总生物碱收率最高可达  $1.84 \pm 0.11$  mg/g,但存在有色物质干扰;MFW 体系收率较为稳定,保持在  $0.47 \pm 0.27$  mg/g 水平;AW 体系溶剂比例显著影响总生物碱收

率,AW 比例为 3:1 (v/v) 时收率最高  $0.50 \pm 0.01$  mg/g。随后对 M1C1、M15F1W4、A3W1 三种溶剂提取样品进行 HPLC 对比分析,373 nm 波长检出色谱峰数 M15F1W4(30 个) > A3W1(25 个) > M1C1(17 个),色谱峰强度 M15F1W4 > A3W1 > M1C1,喜树碱提取量 M15F1W4 > A3W1 > M1C1,喜树碱色谱峰面积占比 A3W1 (9.99%) > M1C1 (8.48%) > M15F1W4(7.28%)。由此可知,M15F1W4 体系提取总生物碱种类更为丰富,故后续实验选用 MFW 作为提取溶剂。

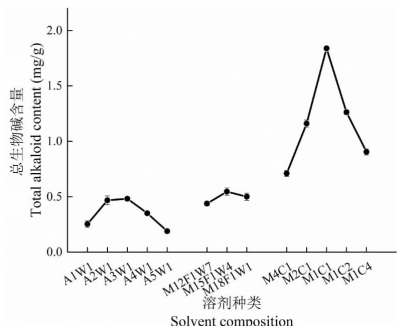


图1 不同提取溶剂对总生物碱提取率的影响

Fig.1 The yield of total alkaloids extracted with different extraction solvents

### 3.1.2 料液比考察

实验结果如图 2A 所示,总生物碱提取率随溶剂用量增加逐渐增大,影响显著,料液比达 1:20 时,

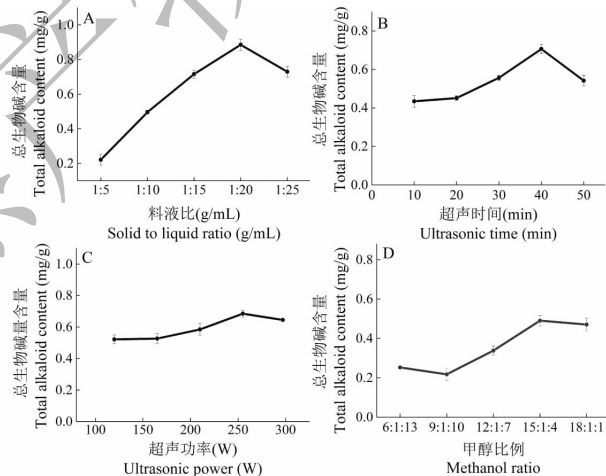


图2 料液比(A)、超声时间(B)、超声功率(C)、甲醇比例(D)对总生物碱提取收率的影响

Fig.2 Effects of solid to liquid ratio(A),ultrasonic time(B),ultrasonic power(C),methanol ratio(D) on the yield of total alkaloids

## 3.2 响应面优化结果及分析

### 3.2.1 响应面实验设计及结果

以单因素试验为基础,根据二次回归组合试验

提取率最高可达  $0.88 \pm 0.03$  mg/g,但继续增加至 1:25 时,总生物碱提取率略微下降。因此选择 1:15、1:20、1:25 进行响应面分析。

### 3.1.3 超声时间考察

如图 2B,总生物碱提取率随超声时间增长逐渐升高,10 ~ 40 min 时,总生物碱提取率由  $0.43 \pm 0.03$  mg/g 升至  $0.71 \pm 0.02$  mg/g,但超声时间至 20 min 时,仪器开始产热,增长至 50 min 时,超声产热严重,可能会破坏部分生物碱结构,因此后续试验超声时间设定为 40 min,并结合使用冰浴持续控温。

### 3.1.4 超声功率考察

结果如图 2C,超声功率在一定程度上影响总生物碱收率,总生物碱收率随超声功率升高而增高,升至 255 W 后达到最高值  $0.68 \pm 0.02$  mg/g,继续增加超声功率,总生物碱收率不再继续增加,可能样品中生物碱已基本溶出,因此选择 210、255、297 W 进行响应面分析。

### 3.1.5 甲醇比例考察

结果如图 2D,MFW 溶剂体系里甲醇比例对总生物碱收率存在影响,甲醇比例由 30% 升至 75% 时,生物碱收率逐渐上升,继续升高甲醇比例,生物碱收率略微下降,可能跟叶中生物碱极性有关,甲醇比例为 75% (M15F1W4) 时,总生物碱收率为  $0.49 \pm 0.03$  mg/g,因此,选择甲醇比例为 60% (12:1:7),75% (15:1:4),90% (18:1:1) 进行响应面分析。

设计原理,以喜树总生物碱含量为响应值,设计料液比(A)、超声功率(B)、甲醇比例(C)三个因素进行响应面试验(见表 2),试验结果进行多元线性回归

拟合,得到喜树叶总生物碱提取量对料液比(A)、超声功率(B)、甲醇比例(C)的二次多项回归方程: $Y = 1.62 - 0.091A + 0.020B + 0.28C + 0.15AB - 0.12AC - 0.067BC - 0.34A^2 - 0.17B^2 - 0.19C^2$ 。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

试验编号 No.	A:料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	B:超声功率 Ultrasonic power (W)	C:甲醇比例 Methanol ratio	总生物碱含量 Extraction yield (mg/g)
1	0	0	0	1.5927
2	0	-1	-1	0.9536
3	0	1	-1	1.0504
4	-1	-1	0	1.2866
5	0	0	0	1.6081
6	-1	0	1	1.5973
7	0	0	0	1.6388
8	0	0	0	1.6597
9	-1	0	-1	0.7695
10	1	0	-1	0.8100
11	1	1	0	1.2423
12	0	-1	1	1.6048
13	1	0	1	1.1495
14	-1	1	0	1.0957
15	0	1	1	1.4346
16	1	-1	0	0.8201
17	0	0	0	1.6063

### 3.2.2 回归模型方差分析与显著性检验

回归模型方差分析使用 Design-Expert 8.0, 以确定三种因素对喜树叶总生物碱提取率的影响程度和检验回归方程有效性(见表3)。一次项A、C, 二次项 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ , 交互项AB、AC、BC对喜树叶总生物碱提取率的影响显著, 各因素与总生物碱提取率呈较明显的二次抛物线关系, 表明回归方程拟合性较好, 同时表明各交互因素在响应值(总生物碱含量)存

在最大值。分析方程方差可知, 由总模型  $P < 0.0001$  可知本实验所选取的二次多项式模型具有高度的显著性; 失拟项为  $0.0504 > 0.05$ , 表明失拟项不显著, 相关系数  $R^2 = 0.9897$ , 模型拟合度较好, 此模型可在一定范围内用于分析和预测超声辅助提取喜树叶中总生物碱的效果。各因素影响大小顺序为: 甲醇比例(C) > 超声功率(A) > 料液比(B)。

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方和 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1.70	9	0.19	74.58	< 0.0001	**
A	0.066	1	0.066	26.09	0.0014	*
B	3.114E-003	1	3.114E-003	1.23	0.3042	-
C	0.61	1	0.61	239.39	< 0.0001	**
AB	0.094	1	0.094	37.09	0.0005	**
AC	0.060	1	0.060	23.52	0.0019	*

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方和 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
BC	0.018	1	0.018	7.04	0.0328	*
A <sup>2</sup>	0.50	1	0.50	197.42	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	45.43	0.0003	**
C <sup>2</sup>	0.16	1	0.16	63.15	< 0.0001	**
残差 Residual	0.018	7	2.533E-003	-	-	-
失拟项 Lack of Fit	0.015	3	4.913E-003	6.56	0.0504	-
纯误差 Pure Error	2.996E-003	4	7.491E-004	-	-	-
总体 Cor Total	1.72	16	-	-	-	-

注: \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.001$ )。

Note: \* represented significant difference ( $P < 0.05$ ), \*\* represented extremely significant difference ( $P < 0.001$ ).

### 3.2.3 交互作用分析

图 3A-B 显示了超声功率与料液比对喜树中总生物碱提取量的交互作用,等高线呈椭圆形,且交互曲面陡峭,说明交互作用显著,响应值随着超声功率和料液比的改变先上升,后略微下降,存在最大值。图 3A-C 显示了甲醇比例与超声功率对喜树中总生

物碱提取量的交互作用,等高线呈椭圆形,甲醇比例与超声功率之间的交互作用较为显著。图 3B-C 显示了甲醇比例与料液比对喜树中总生物碱提取量的交互作用,等高线椭圆形,故甲醇比例与料液比之间的交互作用较为显著。交互作用分析结果与方差分析结果一致。

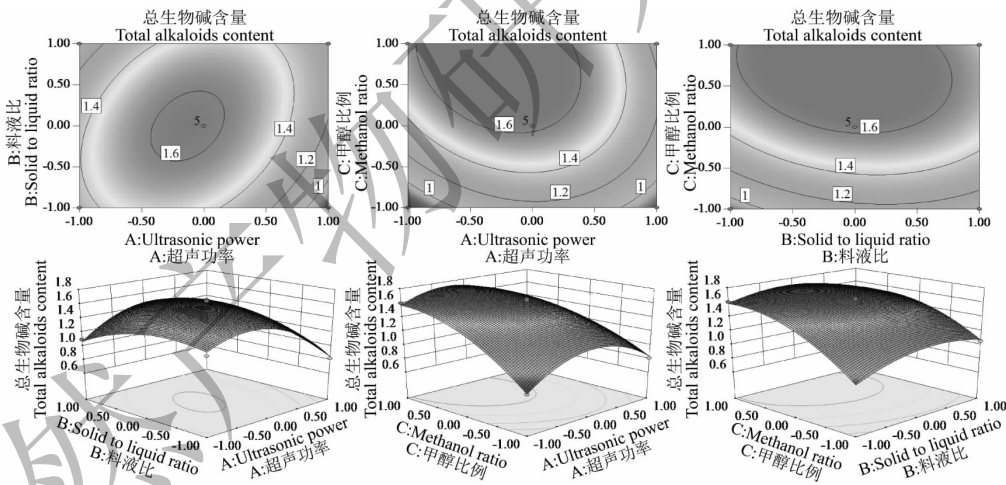


图 3 各交互作用对总生物碱影响的响应曲面 (A-B、A-C、B-C)

Fig. 3 Response surface plots showing the interactive effects of different factors on the yield of total alkaloids (A-B、A-C、B-C)

### 3.2.4 验证试验

由 Design Expert 8.0 软件分析,得出喜树叶中总生物碱提取的理论最优条件为:超声功率为 239.25 W,甲醇:甲酸:水为 17.64:1:1.36,料液比为 1:22.3 g/mL。考虑到可操作性,将试验条件修正为:超声功率 240 W,甲醇:甲酸:水为 17.5:1:1.5,料液比为 1:22 g/mL,所得提取总生物碱的平均含量为  $1.67 \pm 0.08$  mg/g ( $n = 5$ ),与预测值 1.75 mg/g 接近,相

对误差 4.57%,表明优选的工艺条件稳定可行。

### 3.3 抑菌活性

抑菌活性测试表明,使用最优条件提取制备的喜树叶总生物碱提取物 (LAE) 对 *S. aureus*、*E. coli* 和 *P. aeruginosa* 具有抑菌效果, MIC 值分别为 4.38、8.75、8.75  $\mu\text{g/mL}$ ,对 *B. subtilis* 无明显抑制效果,阴性对照 MFW 溶剂无抑菌活性,阳性对照卡那霉素抑菌活性强,具体结果见表 4。

表4 总生物碱提取物对四种菌的最小抑制浓度(MIC),  $n=3$ Table 4 MIC of leaf total alkaloid extract( $\mu\text{g/mL}$ ),  $n=3$ 

样品 Samples	最小抑制浓度 MIC( $\mu\text{g/mL}$ )			
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>
卡那霉素 Kanamycin	0.5	0.5	1	0.5
M17.5F1W1.5	-	-	-	-
总生物碱提取物 LAE	4.38	8.75	-	8.75

### 3.4 抗氧化活性测试

抗氧化活性测试结果见表5。LAE的质量浓度为0.01 mg/mL时,其FRAP值为 $5.062 \pm 0.223$  mM,而质量浓度为0.01 mg/mL的BHA和Vc总抗氧化能力相近,其FRAP值分别为 $0.16 \pm 0.01$

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.16 \pm 0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。LAE、BHA、Vc对DPPH和ABTS自由基清除能力以半抑制浓度 $\text{IC}_{50}$ 表示,BHA与Vc对DPPH和ABTS自由基的清除能力基本相当,而LAE对两种自由基的清除能力比BHA和Vc强。

表5 总生物碱提取物抗氧化活性测试( $\mu\text{g/mL}$ ),  $n=3$ Table 5 Antioxidant capability of the LAE( $\mu\text{g/mL}$ ),  $n=3$ 

抗氧化活性 Antioxidant activity	FRAP值 Equivalent mM $\text{FeSO}_4$	DPPH ( $\text{IC}_{50}$ , mg/mL)	ABTS ( $\text{IC}_{50}$ , mg/mL)
LAE	$5.062 \pm 0.22$	$0.004 \pm 0.001$	$0.003 \pm 0.001$
BHA	$0.163 \pm 0.01$	$0.653 \pm 0.063$	$0.234 \pm 0.015$
Vc	$0.160 \pm 0.01$	$0.449 \pm 0.047$	$0.308 \pm 0.037$

## 4 结论

自从喜树中发现喜树碱以来,人们长期致力于从喜树中发掘新的喜树碱类抗肿瘤活性成分,而忽视了对喜树中其它生物碱类成分的开发与利用。本文以喜树叶为对象首次开展超声波冷提总生物碱,通过响应面法优化提取工艺,确定最佳提取工艺为超声功率240 W,甲醇:甲酸:水为17.5:1:1.5,料液比1:22 g/mL,总生物碱的提取率为 $1.67 \pm 0.08$  mg/g。该法简便易行,实用性较高,用途较广。低温提取确保了提取样品中代谢产物结构的完整性,响应面优化确保了提取样品中生物碱类成分的多样性。抗菌测试结果表明LAE具有较好的抑菌活性,对*S. aureus*、*E. coli*和*P. aeruginosa*三种菌株的MIC值分别为4.38、8.75、8.75  $\mu\text{g/mL}$ 。同时,LAE呈现优于BHA和Vc的抗氧化活性,其FRAP值为 $0.16 \pm 0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对DPPH和ABTS自由基清除半抑制浓度分别为4  $\mu\text{g/mL}$ 和3  $\mu\text{g/mL}$ 。本研究为喜树叶中总生物碱的进一步开发利用奠定了基础。

### 参考文献

- 1 Wu ZY(吴征镒), Raven PH. Flora of China(中国植物志) [M]. Beijing: Science Press and MBG Press, 2005, 14: 206-

- 221.
- 2 Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, 88: 3887-3890.
- 3 Lorence A, Nessler CL. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2735-2749.
- 4 Lin LZ, Cordell GA. Quinoline alkaloids from *Camptotheca acuminata* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1295-1297.
- 5 Lin LZ, Shen JH, He X, et al. Indole alkaloids from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1988, 6: 257-261.
- 6 Yamazaki Y, Urano A, Sudo H, et al. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 461-470.
- 7 Radin S, Maria ML, Sujana P, et al. Metabolite diversity in alkaloid biosynthesis: A multi-lane (diastereomer) highway for camptothecin synthesis in *Camptotheca acuminata* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28: 1926-1944.
- 8 Yang L(杨磊), Li JH(李佳慧), Zhao CJ(赵春建), et al. Extraction-photometric determination of total alkaloids in *Camptotheca acuminata* with methyl orange as color reagent [J]. *Phys Test Chem Anal; Part B(理化检验: 化学分册)*, 2009, 45: 428-430.