

离体快繁扯根菜总黄酮提取及抗菌活性研究

曹桦¹, 康超勇¹, 杨军^{1,2}

(1. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637002; 2. 西华师范大学珍稀动植物研究所, 四川 南充 637002)

摘要:采用 $L_9(3^4)$ 正交实验方法、考察提取法与水浴提取法中乙醇浓度(A), 作用时间(B), 温度/功率(C), 料液比(D) 4个因素对总黄酮提取量的影响, 筛选最佳提取工艺; 以此优化工艺分析不同种类及浓度的激素对再生苗总黄酮含量的影响, 分析提取物的不同菌体的抑制效果。结果表明超声波提取法优于水浴法, 最佳参数: 固液比为1:10, 在80%的乙醇中按50%的功率处理30min; 源于添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kt 的MS培养基再生的扯根菜中的总黄酮含量最大, 为3.28%; 提取物对金黄色葡萄球菌具有最大的抑制效果。添加激素的提取物对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌效果具有促进作用。

关键词: 扯根菜; 总黄酮; 超声波提取; 抗菌活性

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A

扯根菜(*Penthorum sedoides* Pursh) 俗名赶黄草, 为虎耳草科(*Saxifragaceae*) 扯根菜属植物^[1]。其作为苗族传统中药之一, 有保肝退黄, 清热利尿的功效^[1,2]。以扯根菜和金钱草为主要成分的肝苏颗粒, 对乙型肝炎及急性病毒性肝炎等均有显著的疗效^[3], 同时对肝损伤有明显的保护作用^[4]。扯根菜的化学成分含有多种黄酮类成分^[5], 具有降低心肌耗氧量、软化血管、降低血糖血脂和清除人体中自由基等功效^[6]。本文在比较水浴提取和超声波提取2种不同方法基础上, 提取离体克隆的扯根菜幼苗中黄酮类化合物, 分析不同激素及浓度对黄酮含量的影响, 并分析了黄酮对不同菌种的抑制效果。

1 仪器与材料

1.1 材料

取扯根菜的茎节段, 灭菌后接种在含有不同浓度的BA和Kt的MS培养基中进行芽的增殖培养, 1个月后, 切取嫩芽分别置于含有 0.5 mg/L IAA 的MS生根培养基中生根, 培养1个月后取出放在 $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的烘箱中烘干, 提取实验在2d内完成。

1.2 培养基^[8]

营养培养基, MH琼脂培养基; MH肉汤培养基。

1.3 供试菌种

金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、铜绿假单胞菌。供试菌种均由南充市中心医院细菌室提供。

供试菌种经传代纯培养后, 取接种于(MH)肉汤培养基中, 37°C 培养6h, 经血细胞计数板计数后, 再用MH肉汤稀释至含菌量为 10^5 CFU/mL 的菌悬液。

1.4 药品及仪器

芦丁标准品(批号F20050512, 购于国药集团化学试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯。

GBCIV/VIS-916紫外可见分光光度计(澳大利亚); 电子天平; 恒温水浴锅(BS-65); 超声波清洗器(昆山)等。

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 四川省青年科技基金资助项目(05ZQ026-017); 四川省重点学科建设项目(SZD0420)

通讯作者: 曹桦(1981-), 女, 四川江油人, 西华师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事植物组织培养和次生代谢产物活性研究。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[10]

取恒重的芦丁 10mg,用 80% 乙醇定容至 50mL(浓度 0.2g/L),吸取 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.6,2.0,分别加入 5% NaNO₂ 0.4mL,摇匀静置 6 min,加入 10% AlNO₃ 0.4mL,摇匀静置 6 min,再加入 4% NaOH 4.0mL,用 80% 的乙醇定容至 10mL,摇匀静置 15 min,在 500 nm 处测吸光度 A 值.测定结果进行回归分析,得回归方程为:

$$A = 17.513C + 0.0041, \quad r = 0.9955.$$

2.2 总黄酮的提取及含量测定^[11,12]

2.2.1 实验条件

精密称取源于相同浓度、相同培养时间的组培苗干粉 2.0g,放入索氏提取器中,用 10 倍于材料的石油醚回流两次,每次 2h,弃提取液,残渣挥干溶剂后,分别用水浴提取法和超声波提取法(表 1,表 2),按标准曲线法测定其中总黄酮的含量,实验结果见表 3,表 4.

表 1 水浴提取工艺的因素水平

Tab. 1 Factors and levels of BWE

	A 乙醇浓度 (%)	B 作用时间 (h)	C 温度	D 料液比
1	50	1	室温	1:20
2	80	2	60	1:30
3	95	3	80	1:50

表 2 超声波提取法工艺因素水平

Tab. 2 Factors and levels of UWE

	A 乙醇浓度 (%)	B 超声时间 (min)	C 功率(%)	D 料液比
1	50	10	50	1:8
2	80	20	70	1:10
3	95	30	90	1:12

表 3 水浴提取各工艺组方案及结果

Tab. 3 the BWE results of L₉(3⁴) orthogonal test

实验号	A	B	C	D	黄酮总量(%)	平均黄酮含量(%)
1	1	1	1	1	2.944 05	
2	1	2	2	2	2.327 15	
3	1	3	3	3	2.776 32	
4	2	1	2	3	1.921 99	
5	2	2	3	1	2.587 26	2.281 369
6	2	3	1	2	2.758 36	
7	3	1	3	2	2.197 35	
8	3	2	1	3	1.157 15	
9	3	3	2	1	1.862 33	
k ₁	2.682 507	2.354 463	2.286 52	2.464 667		
k ₂	2.422 657	2.023 973	2.037 157	2.080 887		
k ₃	1.738 943	2.465 67	2.520 43	1.951 82		
K	0.683 713	0.441 697	0.483 273	1.512 847		

2.2.2 不同激素来源的扯根菜中总黄酮含量

按超声波提取正交因素水平组合 A₂B₃C₁D₂(见表 4),对在含有 0.5mg/L IAA 的 MS 生根培养基中生长 1 个月左右的扯根菜总黄酮进行提取,测定的结果见表 5.

表 4 超声波提取各工艺组方案及结果
Tab. 4 the UWE results of L9(3⁴) orthogonal test

实验号	A	B	C	D	黄酮总量(%)	平均黄酮含量(%)
1	1	1	1	1	2.867 95	
2	1	2	2	2	2.529 76	
3	1	3	3	3	2.695 81	
4	2	1	2	3	2.631 44	
5	2	2	3	1	2.342 89	2.740 793
6	2	3	1	2	3.302 71	
7	3	1	3	2	2.879 31	
8	3	2	1	3	2.689 34	
9	3	3	2	1	2.687 93	
k ₁	2.711 17	2.792 9	2.9583 333	2.632 923		
k ₂	2.759 01	2.534	2.629 71	2.917 26		
k ₃	2.752 19	2.895 48	2.639 337	2.672 197		
K	0.047 84	0.258 9	0.323 623	0.245 063		

2.3 抗菌能力的测定^[13,14]

采用纸片琼脂扩散法. 取 10 μ L 培养 6h 的菌液(10⁵CFU/mL)分别均匀涂布于 MH 琼脂平板表面,稍干后取浸有药液的圆滤片(直径 6mm,每片吸取药液 10 μ L)贴于 MH 琼脂平板表面,于 37℃ 倒置培养,培养 12h 后观察并测量抑菌圈直径,每种不同来源的药物抑菌实验重复 3 次,抑菌结果为 3 次实验平均值(表 5).

表 5 不同激素来源的扯根菜总黄酮的抑菌结果

Tab. 5 Results of different total flavones' antibacterial activity

激素(mg/L)	对照				BA				Kt			
		0.1	0.5	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0	2.0			
黄酮含量(%)	2.88	2.23	2.87	2.27	2.22	2.09	3.28	2.65	2.55			
金黄色葡萄球菌(cm)	0.91	1.18	0.79	1.21	0.94	1.12	0.76	1.18	0.99			
铜绿假单胞菌(cm)	0	0.7	0	0	0.92	0.94	0	0	0			

3 讨 论

通过比较超声波和水浴 2 种提取工艺提取的总黄酮含量(表 3 与表 4),发现超声波的提取效率明显高于水浴,并且超声波法总的提取时间和消耗的总溶剂量都少于水浴法. 在通过比较正交设计的超声波法中的各种参数,可以得出提取扯根菜总黄酮的最佳工艺参数是:2.0g 的扯根菜干粉中按 1:10 的比例加入 80% 的乙醇,然后在超声波提取器中按 50% 的功率处理 30min. 从表 4 的实验结果中还可看出:A,B,C,D 4 种因素对总黄酮的提取的影响程度不同,依次是 C>D>B>A. 这与汪洪武等对扯根菜黄酮提取的方法所得结果有所不同^[9]. 这可能是由于所用的材料的差别,汪洪武使用的是直接采摘的野生型材料. 由此可见,不同的生长条件对扯根菜自身合成的黄酮的含量有很大的影响.

在最佳提取工艺下对源于不同激素及浓度水平的离体培养的扯根菜中总黄酮进行提取并测定. 结果表明总黄酮的含量有明显的差异,但都随着激素浓度的升高而增加,在激素浓度为 0.5mg/L 时达到最大值,随后总黄酮含量又逐渐降低. 与对照(2.88%)相比,扯根菜中总黄酮含量在当添加了 0.5mg/L 的 Kt 时达到最大值 3.28%.

从扯根菜中提取的黄酮对不同的菌种抑制效果有所不同. 和对照相比,当培养基中添加 0.5mg/L 的细胞分裂素后,扯根菜的总黄酮对金黄色葡萄球菌的抑制作用具有不同程度的降低,但其余浓度的激素添加入培养基后对金黄色葡萄球菌均有不同作用的增强,抑菌圈在培养基中添加了 1.0mg/L BA 后达到最大(1.21 cm). 对铜绿假单胞菌的抑制作用在添加激素后有不同程度的增强,当培养基中添加 0.1mg/L 的 Kt 对铜绿假单胞菌的抑菌效果最好,抑菌圈为 1.12cm.

本实验证明了从不同培养条件下提取的扯根菜的总黄酮的含量不同,对细菌的抑制效果也大相径庭. 为进一步从离体培养的扯根菜中分离并提纯不同的抗菌物质奠定了基础.

参考文献:

- [1] 潘锦堂,中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1992. 2.
- [2] 四川中药协作编写组. 四川中药志[M]. 成都:四川人民出版社,1980. 116.
- [3] 赵建勤,杨 明,赵连三,等. 扯根菜及其系统提取抗乙型肝炎病毒体外实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2002,12(1): 26.
- [4] 冯 浩,王智民,董歌扬,等. 赶黄草化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(4):260.
- [5] 陈光莫,袁 艺,艾克惠,等. 新药肝苏化学成分研究[J]. 中成药,1998,20(11):40.
- [6] 唐传核. 植物生物活性物质[J]. 北京:化学工业出版社,2005,172.
- [7] 张 睿,徐雅琴,时 阳. 黄酮类化合物提取工艺的研究[J]. 东北农业大学学报. 2002(3):123-124.
- [8] 陈天寿. 微生物培养基的制造和应用[M]. 北京:中国农业出版社,1995. 89.
- [9] 汪洪武,任启生,宋新荣,等. 赶黄草中黄酮提取方法的研究[J]. 中国药理学杂志,2002,37(7):551.
- [10] 张 妍,李厚伟,孙建平,等. 山楂果总黄酮的提取分离及体外抗肿瘤活性[J]. 中草药,2004,35(7):787.
- [11] 张春玲,杨 华. 金银花中总黄酮的提取[J]. 美国际创伤杂志,2005,4(2):51.
- [12] 唐纯翼,丁 文,高中松. 栎树不同部位总黄酮的提取及含量测定[J]. 中国农学通报,2005,21(5):159.
- [13] 张存莉,朱 玮,王冬梅,等. 黑刺莼根提取物的抑菌活性研究[J]. 西北植物学报,2005,25(12):2529.
- [14] 王岳峰,余延春,杨国军,等. 大叶桉黄酮类化合物的分析及抑菌活性的研究[J]. 中医药学刊,2004,22(11):2135.

Extraction of Total Flavon from Micropropagated Plants of *Penthorum Chinese* and Its Antibacterial Activities

CAO Hua¹, KANG Cao-yong¹, YANG Jun^{1,2}

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, China;

2. Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: The total flavones were isolated comparatively with ultrasonic wave extraction (UWE) and boiling water extraction (BWE). The L₉ (3⁴) orthogonal test was carried out to test 4 influential factors: concentration of ethanol (A), extracted time (B), temperature or power (C) and ratio of solid to liquid (D). And we have analyzed the effect of different type and content of phytohormone on the content of total flavones and investigated flavones' antibacterial activity. The results are that the UWE is more suitable for the total flavon extraction, and the optimization extracting technique conditions are proportion of solid to liquid in 1:10, 80% ethanol and the 50% ultrasonic treatment 30min. Under the best condition, the most total content of flavon (3.28%) is extracted from the micropropagated plants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L Kt. And the flavones show more against *Staphylococcus aureus*, and the addition of phytohormone gives rise to the antibacterial activities of flavones against *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The experiment will facilitate the extract and purification of the antibacterial activation of flavones from in vitro *Penthorum Chinese* pursh.

Key words: *Penthorum Chinese* Pursh; total flavon; ultrasonic wave extraction (UWE); antibacterial activity