

景炳年,王 伟,刘雨晴,等.牛心朴子草总生物碱超声提取工艺及抑菌活性研究[J].江苏农业科学,2021,49(15):163-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.031

牛心朴子草总生物碱超声提取工艺及抑菌活性研究

景炳年,王 伟,刘雨晴,谢晓阳,周 雍,宁二娟,张华南,陈 飞,魏 磊

(河南省纳普生物技术有限公司/河南省植物天然产物开发工程技术研究中心,河南郑州 450002)

摘要:采用响应面法优化牛心朴子草总生物碱(TACKI)超声提取工艺,并研究其抑菌活性。以 TACKI 得率为研究指标,在单因素试验的基础上,选取乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间 4 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计和响应面法分析,研究 TACKI 的最佳提取工艺条件;并分别采用倍比稀释和生长速率法研究 TACKI 对 10 种常见致病细菌和 9 种植物病原真菌菌丝生长的抑制活性。结果表明,TACKI 最佳提取工艺条件为 26 倍量 72% 乙醇,53 ℃ 超声提取 57 min,TACKI 平均得率为 0.492 8%,与模型预测值(0.493 1%)一致性好。TACKI 可强烈抑制化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的生长,其最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)均在 12.5 mg/mL 以下;在供试质量浓度 100 mg/L 时,TACKI 对玉米弯孢病菌、苹果轮纹病菌、水稻稻瘟病菌和烟草赤星病菌菌丝生长均表现出较强的抑制作用,抑制率均在 85% 以上。优化得到的提取工艺稳定、简单、TACKI 得率高,且 TACKI 具有较强的广谱抗菌作用。

关键词:牛心朴子草;生物碱;超声提取;抑菌作用;植物病原菌

中图分类号:R284 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)15-0163-08

牛心朴子草(*Cynanchum komarovii* Al. Iljinski),别称老瓜头,为萝藦科鹅绒藤属有毒植物,主要分布于陕西、宁夏、甘肃、青海等我国北部的荒漠草原上,资源较丰富^[1]。民间和藏医用牛心朴子草镇痛、杀虫、退烧、止泻、治疗胆囊炎等^[2-3],现代研究表明,牛心朴子提取物具有杀虫^[4-8]、抗菌^[9-10]、抗植物病毒^[11-13]、抗肿瘤^[14]、抗氧化^[15]、除草^[16]、镇痛抗炎^[17-19]、止咳、祛痰及平喘^[20]、增强免疫力^[21]等多种生物活性,开发潜力巨大。

牛心朴子草所含化学成分种类繁多,主要包括:C₂₁-甾体糖苷、生物碱、萜类、黄酮醇类、多糖等^[22-28]。目前,对牛心朴子草化学成分的研究主要

集中在 C₂₁-甾体糖苷、生物碱。研究表明,牛心朴子草总生物碱(TACKI)与牛心朴子草广泛而显著的生物活性息息相关^[31-52],TACKI 主要为 7-脱甲氧基娃儿藤碱(7-demethoxylophorine,DEM)、(13aR,14R)-14-羟基-7-脱甲氧基娃儿藤碱、(13aR,14R)-14-羟基-7-脱甲基娃儿藤碱氮氧化物、氧化脱氧娃儿藤次碱、去羟娃儿藤宁、娃儿藤宁、N-氧化-7-脱甲氧基娃儿藤碱、娃儿藤碱、6-羟基-2,3-二甲氧基菲骈吡啶里西啶等^[52],这些生物碱结构主要为菲骈吡啶里西啶类生物碱^[53]。

TACKI 在牛心朴子草中的含量较低^[53],因此 TACKI 提取工艺研究就成为牛心朴子草开发利用的关键。万清玉等以正交试验建立了甲醇超声提取牛心朴子草中 7-脱甲氧基娃儿藤碱的最佳提取工艺^[54];郭金玲等研究了不同提取剂及其操作条件对总生物碱提取率的影响^[55];米海莉等考察了提取溶剂浓度和提取方法对 TACKI 提取量影响以及絮凝剂对总生物碱精制条件^[56];李玉美等研究了大孔

收稿日期:2020-11-20

基金项目:河南省科学院基本科研项目(编号:200613027)。

作者简介:景炳年(1980—),男,甘肃武威人,博士,助理研究员,主要从事天然产物功能活性研究及农业绿色防控体系构建等。

E-mail:stop328@163.com。

通信作者:魏 磊,博士,助理研究员,主要从事植物化学及分子生物学。E-mail:yhweilei2@163.com。

[22]温慧萍,肖建中,雷伟敏,等. HPLC 结合响应面法优化柳叶蜡梅总黄酮提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 浙江农业学报, 2018,30(2):298-306.

[23]郭孝成,王 伟,戴 毅,等. 柳叶蜡梅不同部位提取物总多酚含量及体外抗氧化、抑菌特性比较研究[J]. 黄山学院学报,

2018,20(5):66-70.

[24]张健健,陆天飞,董 彪,等. 柳叶蜡梅提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 肝脏,2014,19(2):112-114.

[25]陈 斐. 柳叶蜡梅提取物抑制 HeLa 细胞生长及诱导细胞凋亡的研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.

吸附树脂吸附和分离 TACKI 的方法和条件^[57]; 这些研究多限于对 TACKI 的分离精制工艺或 7-脱甲氧基娃儿藤碱等特定成分的提取, 对 TACKI 提取的研究也主要集中在提取溶剂、提取方法或单个参数的研究上, 但目前尚未见利用响应面法优化 TACKI 提取工艺, 并研究其抑菌活性的报道。本研究拟采用响应曲面方法(response surface methodology, RSM) 对牛心朴子草中 TACKI 提取工艺参数进行优化, 以确定最佳提取工艺; 并对所提取的 TACKI 进行常见致病细菌和植物病原真菌抑制活性研究, 以期为该植物资源的充分、合理开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛心朴子草于 2018 年 10 月采自内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗, 晒干粉碎后备用; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) ATCC 19615、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 13311、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) ATCC 49619、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 700603, 7 株试验菌株冻干菌种购自南京便诊生物科技有限公司; 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*)、烟草赤星病菌[*Alternaria alternata* (Fries) Keissler]、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae* Cav.)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola* Nose)、白菜黑斑病菌(*Alternaria raphani* Groves)、玉米弯孢病菌[*Curvularia lunata* (Walk) Boed]、南瓜枯萎病菌(*Fusarium bulbigenum*)、马铃薯干腐病菌[*Fusarium solani* (Mart.)]、棉花枯萎病菌(*Cotton Fusarium Wilt*) 12 种供试菌株, 由河南省科学院天然产物重点实验室提供; 胰蛋白胨(上海宝录生物科技有限公司)、牛肉浸膏(北京双旋微生物培养基制品厂)、微量 MIC 测定板(美国 Corning 公司)、琼脂粉(青岛海博生物)、无水乙醇、盐酸、氯仿、无水 Na₂SO₄ (均为北京化工厂生产), 以上试剂均为分析纯。

KQ-500E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)、YJ-VS-2 型超净工作台(无锡一净净化设备有限公司)、ME-204 型电子天平(美国

Mettler 公司)、EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司)、TU-1810 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、SYQ-DSX-280B 型手提式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)、DHP-9082 型电热恒温培养箱(上海红华仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 牛心朴子草粗粉的制备 将晒干的牛心朴子草放入 50 ℃ 恒温干燥箱内 24 h, 粉碎过 40 目筛得到牛心朴子草粗粉, 备用。

1.2.2 TACKI 的提取工艺^[46] 精确称取牛心朴子草 10 g 于 100 mL 锥形瓶中, 加溶剂超声辅助提取, 重复 3 次, 合并滤液浓缩, 获得乙醇浸膏。取乙醇浸膏, 按质体比 1:1 溶解于 2% 盐酸水溶液中, 将不溶物滤出, 再用乙酸乙酯(3 倍盐酸体积)萃取 3 次后, 采用氨水将水相调至 pH 值为 9~10, 再用氯仿(3 倍盐酸体积)萃取, 萃取至碘化铋钾反应成阴性, 合并萃取液再经无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压回收溶剂后, 于 50 ℃ 的干燥至恒质量, 即得 TACKI。单因素试验和响应面试验中 TACKI 的提取均按照此工艺方法进行。并按照下式计算各处理总生物碱的得率:

$$\text{总生物碱得率} = \frac{m_0}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_0 为 TACKI 的质量; m_1 牛心朴子草粗粉的质量。

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 不同乙醇浓度对总生物碱得率的影响 以料液比 1 g:20 mL 比例分别加入 40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液, 在 50 ℃ 下超声提取 30 min, 考察乙醇浓度对 TACKI 得率的影响。

1.2.3.2 不同料液比对总生物碱得率的影响 分别以 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g:mL) 料液比加入 70% 乙醇溶液, 在 50 ℃ 下超声提取 30 min, 考察料液比对 TACKI 得率的影响。

1.2.3.3 不同超声温度对总生物碱得率的影响 以料液比 1 g:20 mL 比例加入 70% 乙醇溶液, 分别在 20、30、40、50、60、70 ℃ 温度下提取 30 min, 考察提取温度对 TACKI 得率的影响。

1.2.3.4 不同超声时间对总生物碱得率的影响 以料液比 1 g:20 mL 比例加入 70% 乙醇溶液, 在 50 ℃ 温度下分别提取 20、30、40、50、60 min, 考察超声时间对 TACKI 得率影响。

1.2.4 响应面试验 在上述单因素试验的基础上,以总生物碱得率(Y)为响应值,利用 Design - Expert 8.0.6 统计分析软件,设计 4 因素 3 水平共 29 个点进行试验,各因素设计水平见表 1。

表 1 响应曲面试验因素水平

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----------|---------------|-----------|-------------|
| | A:乙醇浓度(%) | B:料液比(g : mL) | C:超声温度(℃) | D:超声时间(min) |
| -1 | 60 | 1 : 20 | 40 | 40 |
| 0 | 70 | 1 : 25 | 50 | 50 |
| 1 | 80 | 1 : 30 | 60 | 60 |

1.2.5 TACKI 对细菌抑制活性测定 采用倍比稀释法^[58]测定 TACKI 的最小抑菌浓度(MIC)。将 TACKI 配制成 200 mg/mL 初始溶液,采用 0.22 μ m 滤膜过滤,为样品原液,再将样品原液倍比稀释成 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78 mg/mL 8 个浓度。将母液及稀释药液依次加入 MIC 板中,每孔 0.1 mL;再分别加入已稀释好的各种菌液,每孔 0.1 mL,并设置阳性对照(加入 0.1 mL 菌液和 0.1 mL 液体培养基)和阴性对照(只加液体培养基)。将制备好的 MIC 板放入 37℃ 恒温箱中培养 24 h,观察生长情况,以完全没有细菌生长的 TACKI 最小浓度为其最小抑菌浓度(MIC)。将无细菌生长的各孔样品分别涂布于固体培养基上,37℃ 继续培养 24 h,观察结果,以仍不长菌的最低浓度为 TACKI 的 MBC。

1.2.6 TACKI 对植物病原真菌菌丝抑制活性测定

采用生长速率法测定 TACKI 对供试植物病原真菌菌丝生长的抑制活性。将 TACKI 配制成初始质量浓度为 1 000 mg/L 的溶液,采用 0.22 μ m 滤膜过滤,即为样品母液。在无菌条件下取 1 mL 母液于 10 mL 刻度试管内,对照组加入 1 mL 无菌水,再倒入融化的 PDA 培养基定容至 10 mL(即平板内 TACKI 浓度为 100 mg/L),摇匀后趁热倒入培养皿内。选取处于同一生长势的菌落圈,采用打孔器(直径 4 mm)制得菌饼,倒置于上述已制备好的平皿上,菌丝面朝下接入平板,每皿 1 个菌饼,每个处理重复 3 次,28℃ 恒温倒置培养 72 h。采用交叉法测量菌落直径,按公式(2)和公式(3)计算抑制率。

$$\text{菌落直径(mm)} = \text{测量直径(mm)} - 4.0; \quad (2)$$

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%.$$

(3)

上述所有试验于 2020 年 4 月至 10 月在河南省科学院天然产物重点实验室完成。

1.3 数据处理

运用 Origin 7.5 软件绘制单因素试验数据趋势曲线图,采用 Design - Expert 8.0.6 软件进行响应曲面试验设计与分析,所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同乙醇浓度对 TACKI 得率的影响 由图 1 可知,乙醇浓度对 TACKI 得率影响比较大,总生物碱得率随乙醇浓度的升高而逐渐增加,乙醇浓度达 70% 后逐渐平稳,且乙醇浓度为 70% 时,总生物碱得率最高,说明 TACKI 在 70% 左右乙醇中溶解度最大,当乙醇浓度在 70% 以上时,会有一些醇溶性杂质、色素及亲脂性强的成分溶出,影响 TACKI 的提取。故选取 70% 乙醇为生物碱最佳提取浓度。

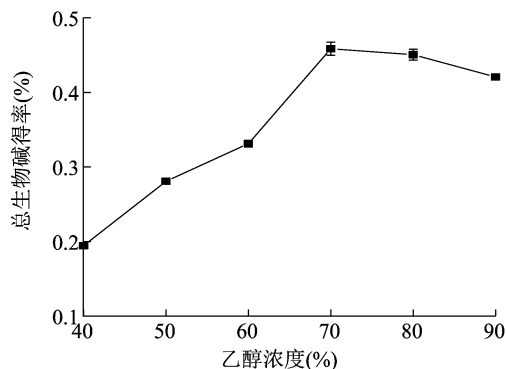


图 1 乙醇浓度对总生物碱得率的影响

2.1.2 不同料液比对 TACKI 的影响 由图 2 可知,料液比对 TACKI 得率的影响也比较大,TACKI 的提取效果随料液比的增加而增大,且增幅较为明显,主要是因为在一定范围内溶剂用量的增加,有助于生物碱的浸出。当液料比为 1 g : 25 mL 时,TACKI 得率最高,继续增大料液比时,生物碱提取量略有下降,这可能是由于 TACKI 的溶出在液料比 1 g : 25 mL 时已达到饱和状态,因此液比以 1 g : 25 mL 为宜。

2.1.3 不同超声温度对 TACKI 得率的影响 由图 3 可知,TACKI 提取效果随温度呈先显著增加后略有降低的趋势,50℃ 时提取效果最好。这是因为温度升高降低了液体黏度,加快了分子的运动速度,导致总生物碱类物质快速溶出,但随着温度继续升高,部分热稳定性小的生物碱也会随之分解,同时也会增加杂质的溶出,进而影响 TACKI 的得率,所

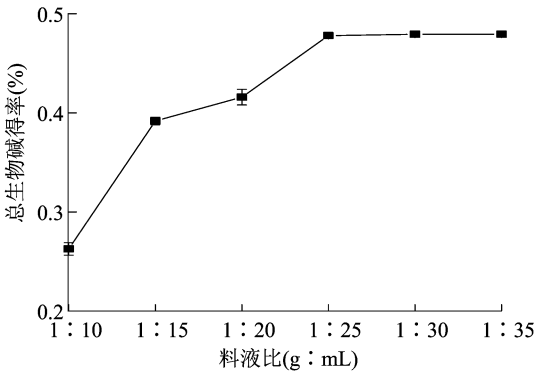


图2 料液比对总生物碱得率的影响

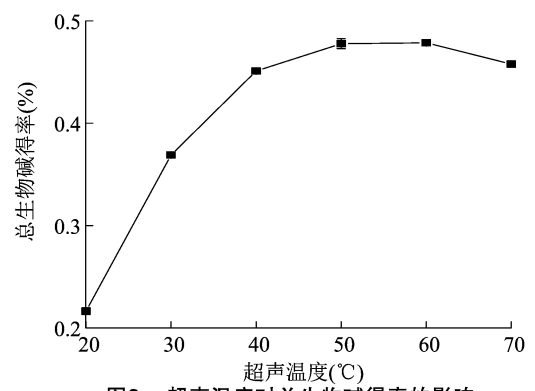


图3 超声温度对总生物碱得率的影响

以选超声温度在 50 ℃ 为宜。

2.1.4 不同超声时间对 TACKI 得率的影响 由图 4 可知,50 min 时,TACKI 得率达到最高,此后逐渐降低。说明在提取约 50 min 时,牛心朴子草粗粉与提取溶剂充分接触,总生物碱已充分溶出;继续增加提取时间,可能会导致部分生物碱的分解和加大杂质的溶出量,从而降低了生物碱的提取率,故生物碱的最宜提取时间为 50 min。

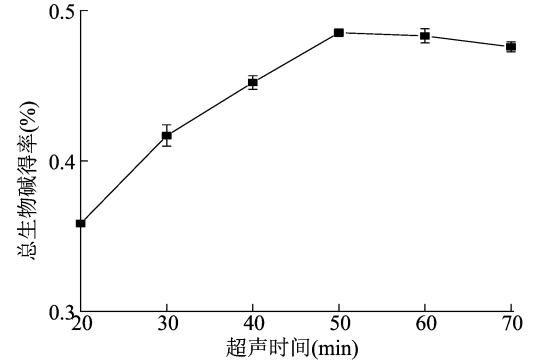


图4 超声时间对总生物碱得率的影响

2.2 响应曲面法优 TACKI 的提取工艺

2.2.1 响应面试验设计与结果 根据 Box - Behnken 中心组合设计原理,本试验共进行 29 个点的响应面试验,响应面试验设计和试验结果见表 2。

表 2 响应面试验设计方案和试验结果

| 编号 | A:乙醇浓度 | B:料液比 | C:超声温度 | D:超声时间 | 总生物碱得率(%) |
|----|--------|-------|--------|--------|-----------|
| 1 | 0 | -1 | -1 | 0 | 0.391 6 |
| 2 | 1 | 0 | 0 | -1 | 0.386 3 |
| 3 | 0 | 0 | -1 | 1 | 0.466 0 |
| 4 | 0 | -1 | 1 | 0 | 0.387 8 |
| 5 | -1 | 0 | 0 | -1 | 0.369 4 |
| 6 | 0 | -1 | 0 | -1 | 0.376 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.489 2 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0.445 3 |
| 9 | -1 | 1 | 0 | 0 | 0.342 2 |
| 10 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0.393 1 |
| 11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0.462 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.490 2 |
| 13 | -1 | -1 | 0 | 0 | 0.329 6 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.470 0 |
| 15 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.466 8 |
| 16 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0.377 0 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.403 0 |
| 18 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0.440 8 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.489 9 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.464 2 |
| 21 | -1 | 0 | 0 | 1 | 0.388 8 |
| 22 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0.439 5 |
| 23 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0.403 2 |
| 24 | 0 | 1 | -1 | 0 | 0.406 5 |
| 25 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0.330 9 |
| 26 | 0 | 1 | 0 | -1 | 0.388 8 |
| 27 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0.446 8 |
| 28 | 0 | 0 | -1 | -1 | 0.420 9 |
| 29 | 1 | 0 | -1 | 0 | 0.429 7 |

2.2.2 模型的建立及其显著性检验 采用 Design - Expert 8.0.6 软件得到 TACKI 得率(Y)与各因素之间的二次多项回归模型为: $Y = 0.48 + 0.02A + 0.019B + 7.408 \times 10^{-3}C + 0.02D + 0.015AB + 2.5 \times 10^{-4}AC + 8.45 \times 10^{-3}AD + 9.525 \times 10^{-3}BC + 0.012BD - 5.9 \times 10^{-3}CD - 0.065A^2 - 0.061B^2 - 0.01C^2 - 0.018D^2$ 。

由表 3 可知,该回归模型极显著($P < 0.000 1$);失拟项不显著($P = 0.787 1 > 0.05$),表明该模型拟合程度良好;模型的相关系数 $R^2 = 0.975 3$,说明总生物碱得率的变化有 97.53% 来自于所选试验因素,因此该模型与实际试验模拟合度较好;校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.950 6$,表明生物碱得率 95.06% 的

变异分布在方程中。

回归方程各项方差表明,一次项 A 、 B 、 D 极显著 ($P < 0.01$), C 显著 ($P < 0.05$);二次项 A^2 、 B^2 、 D^2 极显著 ($P < 0.01$), C^2 显著 ($P < 0.05$);交互项中仅 BD 达到显著水平,综合各项方差分析结果可知,各

具体试验因子对 TACKI 得率的影响不是简单的线性关系。试验因素系数的 F 值越大则表明该因素对响应值的影响越大,因此影响 TACKI 得率由大到小的因素为 $D > A > B > C$,即超声时间 > 乙醇浓度 > 料液比 > 超声温度。

表 3 二次回归模型的方差分析结果

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方和 | F 值 | P 值 | 显著水平 |
|-------|------------------------|-----|------------------------|------------------------|----------|------|
| 模型 | 0.061 | 14 | 4.323×10^{-3} | 39.48 | <0.000 1 | ** |
| A | 4.645×10^{-3} | 1 | 4.645×10^{-3} | 42.42 | <0.000 1 | ** |
| B | 4.189×10^{-3} | 1 | 4.189×10^{-3} | 38.25 | <0.000 1 | ** |
| C | 6.586×10^{-4} | 1 | 6.586×10^{-4} | 6.01 | 0.027 9 | * |
| D | 4.784×10^{-3} | 1 | 4.784×10^{-3} | 43.69 | <0.000 1 | ** |
| AB | 8.851×10^{-4} | 1 | 8.851×10^{-4} | 8.08 | 0.013 0 | * |
| AC | 2.500×10^{-7} | 1 | 2.500×10^{-7} | 2.283×10^{-3} | 0.962 6 | |
| AD | 2.856×10^{-4} | 1 | 2.856×10^{-4} | 2.61 | 0.128 6 | |
| BC | 3.629×10^{-4} | 1 | 3.629×10^{-4} | 3.31 | 0.090 1 | |
| BD | 5.29×10^{-4} | 1 | 5.29×10^{-4} | 4.83 | 0.045 3 | * |
| CD | 1.329×10^{-4} | 1 | 1.329×10^{-4} | 1.27 | 0.278 4 | |
| A^2 | 0.027 | 1 | 0.027 | 247.54 | <0.000 1 | ** |
| B^2 | 0.024 | 1 | 0.024 | 223.19 | <0.000 1 | ** |
| C^2 | 6.677×10^{-4} | 1 | 6.677×10^{-4} | 6.1 | 0.027 0 | * |
| D^2 | 2.000×10^{-3} | 1 | 2.000×10^{-3} | 18.26 | 0.000 8 | ** |
| 残差 | 1.533×10^{-3} | 14 | 1.095×10^{-4} | — | — | — |
| 失拟项 | 8.992×10^{-4} | 10 | 8.992×10^{-5} | 0.57 | 0.787 1 | — |
| 净误差 | 6.339×10^{-4} | 4 | 1.585×10^{-4} | — | — | — |
| 校正项 | 0.062 | 28 | — | — | — | — |

注: * 表示显著水平 ($P < 0.05$), ** 表示极显著水平 ($P < 0.01$); $R^2 = 0.975\ 3$; $R^2_{Adj} = 0.950\ 6$; $Pred\ R^2 = 0.900\ 6$; Adeq Precision = 19.866。

2.2.3 响应面交互作用分析 由图 5 可知,各响应面图均为开口向下的凸形曲面,说明响应值均存在极大值,即在本试验所设计的因素水平范围之内可以获得 TACKI 最优提取参数。根据回归模型分析可知,TACKI 超声辅助提取的最优提取工艺为:乙醇浓度 72.3%、料液比 1 g : 26.3 mL、超声温度 53 ℃、超声时间 56.6 min,此条件下,TACKI 得率的理论预测值为 0.493 1%。结合生产实际,将各因素进行调整为乙醇浓度 72%、料液比 1 g : 26 mL、超声温度 53 ℃、超声时间 57 min,在此条件下重复试验 3 次,实际测得的 TACKI 平均得率为 0.492 8%,与预测值基本吻合,表明本试验利用响应曲面法优化得到的数学模型可靠,具有良好的预测性,由该模型优化得出的工艺参数准确可靠,具有实际应用价值。

2.3 抑菌试验结果

2.3.1 对致病细菌抑制活性测定结果 由表 4 可

知,TACKI 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、和化脓性链球菌抑制作用最强,最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 均在 12.5 mg/mL 以下。但对肺炎克雷伯氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和都柏林沙门氏菌在供试浓度下无抑制作用。

2.3.2 对植物病原真菌菌丝抑制活性测定结果 由表 5 可知,在供试质量浓度 100 mg/L 时,TACKI 对 9 种农业植物病原真菌菌丝生长均有一定的抑制作用,抑制率均在 62% 以上,其中对玉米弯孢病菌、苹果轮纹病菌、水稻稻瘟病菌和烟草赤星病菌菌丝生长均表现出较强的抑制作用,抑制率均在 85% 以上。

3 讨论与结论

本试验在单因素试验基础上,采用响应面分析法确定了 TACKI 超声辅助的最优提取工艺为乙醇浓度 72%、料液比 1 g : 26 mL、超声温度 53 ℃、超

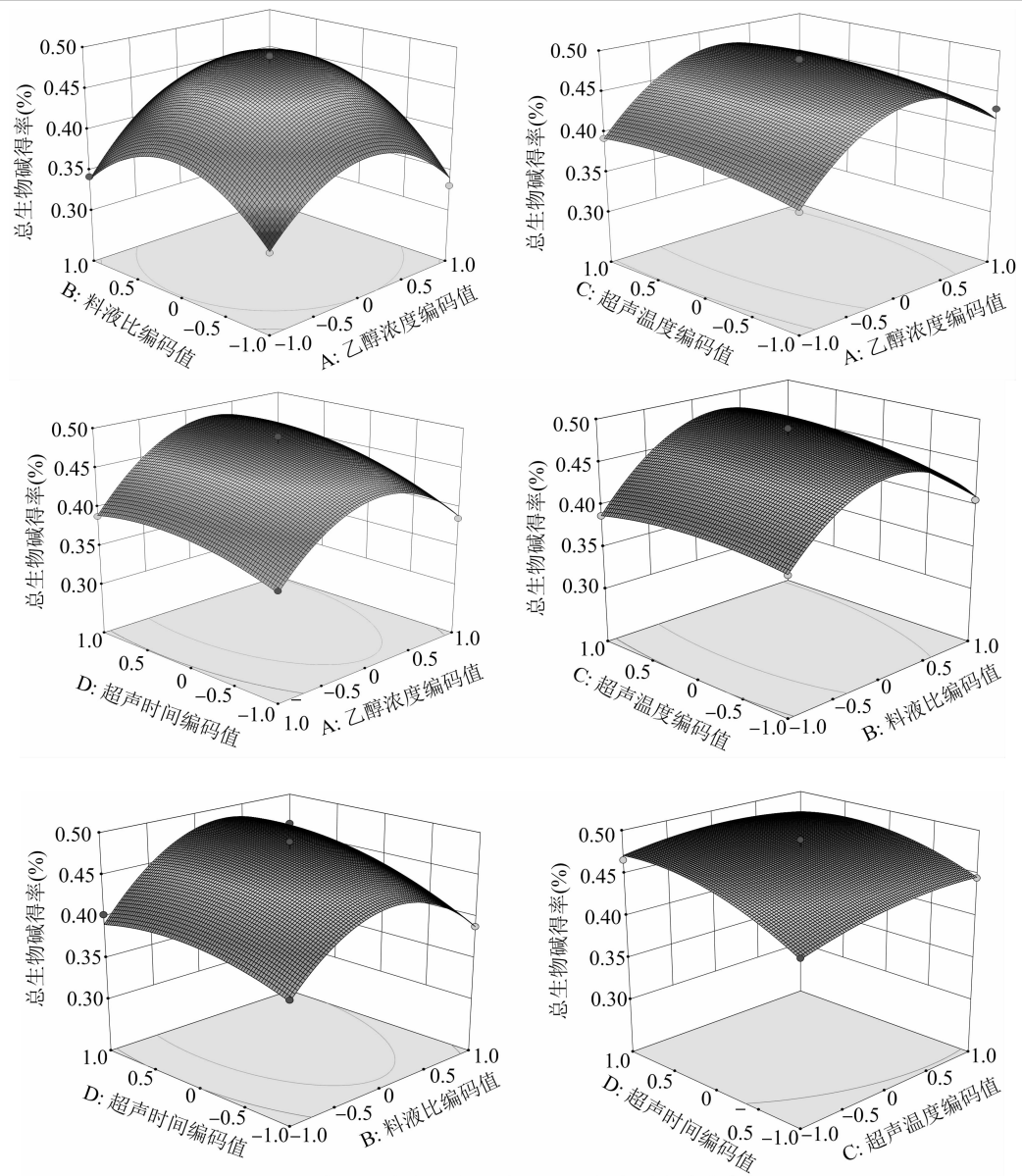


图5 各两因素交互作用对 TACKI 得率影响的响应面图

表 4 TACKI 对 10 种常见致病菌抑制效果

| 菌种名称 | 革兰氏染色 | MIC (mg/mL) | MBC (mg/mL) |
|---|-------|-------------|-------------|
| 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i> .) | - | 6.25 | 6.25 |
| 金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) | + | 6.25 | 6.25 |
| 铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) | - | 6.25 | 12.5 |
| 化脓性链球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>) | + | 12.5 | 12.5 |
| 肺炎链球菌(<i>Streptococcus pneumoniae</i>) | + | 50 | 100 |
| 肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>) | - | >100 | >100 |
| 粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>) | + | 50 | 50 |
| 鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>) | - | >100 | >100 |
| 嗜麦芽窄食单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>) | - | 25 | 50 |
| 都柏林沙门氏菌(<i>Salmonella dublin</i>) | - | >100 | >100 |

注：“+”表示革兰氏染色阳性，“-”表示革兰氏染色阴性；“>100”表示在此浓度下无观察值。

表 5 TACKI 对 9 种植物病原真菌菌丝抑制效果

| 植物病原菌名称 | 菌落直径 (mm) | 抑制率 (%) |
|---|-----------|---------|
| 马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i> (Mart.) | 3.10 | 62.57 |
| 白菜黑斑病菌 <i>Alternaria raphani</i> Groves | 2.20 | 72.37 |
| 玉米弯孢病菌 <i>Curvularia lunata</i> (Walk) Boed | 1.25 | 91.97 |
| 水稻稻瘟病菌 <i>Pyricularia grisea</i> | 2.05 | 85.10 |
| 南瓜枯萎病菌 <i>Fusarium bulbigenum</i> | 2.45 | 66.43 |
| 棉花枯萎病菌 <i>Cotton Fusarium Wilt</i> | 2.30 | 72.77 |
| 苹果轮纹病菌 <i>Physalospora piricola</i> Nose | 1.00 | 100.00 |
| 烟草赤星病菌 <i>Alter aria alternate</i> (Fries) Keissler | 2.15 | 98.10 |
| 小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i> | 2.79 | 76.33 |

声时间 57 min,在此优化条件下,TACKI 平均得率为 0.492 8%,与模型预测值(0.493 1%)一致性良好,

说明此优化工艺稳定可行,可为 TACKI 工业化生产提供指导。生物碱是牛心朴子草的主要活性成分,但其在牛心朴子草全株中的含量较低,因此 TACKI 提取分离就成为牛朴心子草开发利用的关键。国内外学者已在 TACKI 提取分离方面做了大量研究工作,但在 TACKI 得率方面的差异很大,目前文献报道的 TACKI 最高达 3.83%^[52],最低 0.096%^[59],导致 TACKI 得率差异较大的原因主要在于以下几点:(1)提取工艺参数(如溶剂、方法、时间、次数及提取仪器的功率等)的不同导致 TACKI 得率的差异,目前文献报道的 TACKI 提取溶剂有不同浓度的乙醇^[54]、甲醇^[60]、不同 pH 值的工业乙醇及不同盐酸浓度的酸水^[55],提取方法包括超声^[46]、微波^[53]、热回流、渗漉、温浸、煎煮等^[56],其中应用最多的溶剂为乙醇、方法为超声波辅助提取;(2)不同的分离富集过程导致 TACKI 得率的差异,TACKI 分离富集主要采用溶剂萃取^[50]、大孔吸附树脂吸附分离^[57]、絮凝剂絮凝^[56]等方法,每种方法中具体参数的差异也会导致 TACKI 得率的差异;(3)检测方法的不同导致 TACKI 得率的差异,目前文献报道的 TACKI 的检测方法主要有重量法^[46]、酸碱滴定法^[56]、紫外分光光度法^[55]及 GC-MS 分析法^[59],这些检测方法在检测 TACKI 含量方面的精密度、准确度等尚未进行研究。此外,牛心朴子草产地、采摘季节、提取部位及粉碎粒度也会对 TACKI 得率造成一定的影响。

TACKI 显示出了较强的广谱抗菌作用,对多种致病细菌,如金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌等^[9],多种农业植物病原真菌,如烟草赤星、马铃薯干腐、小麦根腐、玉米大斑、番茄灰霉、稻瘟病及尖孢镰刀菌等^[10,31]病原菌均具有较好的抑制作用。本研究也表明 TACKI 提取物具有广谱的抑菌活性,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和化脓性链球菌最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)均在 12.5 mg/mL 以下;在供试质量浓度 100 mg/L 时,对玉米弯孢病菌、苹果轮纹病菌、水稻稻瘟病菌和烟草赤星病菌菌丝生长均表现出较强的抑制作用,抑制率均在 85% 以上。因此,TACKI 的杀菌活性值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 蒋英,李秉滔. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1978.
- [2] 张维库,吴文君. 牛心朴子化学成分及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(3):273-276.
- [3] 张永康,李生虎,李勇. 牛心朴子生物碱对家兔乳房炎治疗试

- 验[J]. 中兽医医药杂志,2016,35(1):49-51.
- [4] 剡根姣,杨敏丽,李建涛. 牛心朴子提取物对小菜蛾的生物活性研究[J]. 中国农学通报,2012,28(9):205-208.
- [5] 剡根姣,杨敏丽,李建涛. 牛心朴子与苦豆子两种提取物复配对小菜蛾幼虫的联合毒力作用[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(7):969-971,975.
- [6] 杨曼. 牛心朴子、珍珠柴等 3 种植物的粗提取物对美国白蛾的生物活性研究[D]. 天津:天津师范大学,2012:36-37.
- [7] 刘晨,黄攀攀,李敏,等. 牛心朴子提取物对地红蜡毒杀活性的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2013,33(4):56-59.
- [8] 剡根姣,鲁静,贺晓莹,等. 牛心朴子与苦豆子生物碱复配物微乳剂的制备[J]. 皮革与化工,2015,32(2):29-33.
- [9] 汪仁莉,张珠明,何生虎. 牛心朴子体外抑菌作用的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15233-15235.
- [10] 郭成瑾,沈瑞清,杨晋,等. 牛心朴子提取物抑菌效果研究[J]. 北方园艺,2012(6):175-177.
- [11] 姚宇澄,杨焯,高俊,等. 牛心朴子草抗植物病毒组分的生物活性研究[J]. 内蒙古工业大学学报(自然科学版),2002,21(1):1-4.
- [12] 周德海,宋玉川,王玉军,等. 牛心朴子草对烟草病毒病的防效试验[J]. 山东农业科学,2007(6):76-78.
- [13] 高俊,胡俊,郭金玲,等. 牛心朴子草抗植物病毒成分的提取与应用[J]. 内蒙古石油化工,2006,32(5):1-3.
- [14] 刘涛,苏秀兰,李敬福,等. 牛心朴子多糖的提取、分离及其抗 S₁₈₀ 肉瘤效应初步观察[J]. 内蒙古医学院学报,2003(1):13-16.
- [15] 杨琤琤,陈亚寒,杨文博,等. 老瓜头生物总碱的体外抗氧化活性研究[J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(11):1229-1232.
- [16] 毕凌霄,廖蓉苏. 瑞香狼毒及牛心朴子水浸液化感作用的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(6):3294-3297.
- [17] 王建霖,吴秀丽,万清玉,等. 大鼠大脑皮层细胞膜色谱法筛选老瓜头镇痛活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(7):996-1000,1028.
- [18] 陈靖,卢杰,刘悦,等. 荒漠植物老瓜头全草镇痛抗炎活性部位研究[J]. 药物评价研究,2013,36(5):355-358.
- [19] 徐小龙,卢杰,余建强,等. 醋制老瓜头镇痛抗炎活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):221-225.
- [20] 吕燕萍,梁资富,宋京都,等. 老瓜头的止咳、祛痰及平喘作用[J]. 中药材,1997(2):88-90.
- [21] 张珠明,汪仁莉,何生虎. 牛心朴子生物碱对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(32):15717-15719,15832.
- [22] 方圣鼎,张瑞,陈嫵,等. 老瓜头中的化学成分[J]. 植物学报,1989,31(12):934-938.
- [23] 张瑞,方圣鼎,陈嫵,等. 老瓜头中的化学成分(续)[J]. 植物学报,1991,33(11):870-875.
- [24] 高俊,姚宇澄,于学舜,等. 牛心朴子草化学成分的研究(II)[J]. 中草药,2000,31(6):417-417.
- [25] 姚宇澄,安天英,高俊,等. 菲并呋喃里西啉生物碱的分离与化学结构鉴定[J]. 内蒙古工业大学学报,2001,20(4):241-

- 244.
- [26] 王利勤, 许 兴, 沈月毛, 等. 牛心朴子须根的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 1-5.
- [27] 赵宝玉, 邓珊丹, 哈斯巴图, 等. 牛心朴子挥发油成分分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(2): 22-24.
- [28] Wang L Q, Shen Y M, Xu X, et al. Five new C21 steroidal glycosides from *Cynanchum komarovii* Al. Ilj[J]. Steroids, 2004, 69(5): 319-324.
- [29] An T, Huang R Q, Yang Z, et al. Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco Mosaic virus[J]. Phytochemistry, 2001, 58(8): 1267-1269.
- [30] 张永康, 何生虎, 李勇. 牛心朴子生物碱的镇痛抗炎作用试验[J]. 动物医学进展, 2006, 27(11): 99-100.
- [31] 张曦燕, 米海莉, 曹有龙, 等. 牛心朴子总生物碱对稻瘟病和灰霉病菌的抑制作用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(1): 252-254.
- [32] 黄治强, 刘玉秀, 范志金, 等. 牛心朴子草中生物碱的抑制植物病毒活性研究[J]. 精细化工中间体, 2007(3): 20-24.
- [33] 郑 萍, 戴贵东, 杨卫东. 老瓜头生物总碱对气囊滑膜炎大鼠的抗炎和抗氧化作用[J]. 宁夏医学院学报, 2007, 29(2): 115-117.
- [34] 汪清民, 姚宇澄, 黄润秋, 等. 牛心朴子草抑制植物病毒活性成分安托芬的室内和田间活性测定[J]. 农药, 2007, 46(6): 425-427.
- [35] 张珠明, 何生虎. 牛心朴子生物碱对奶牛乳房炎病原菌的体外抑菌试验[J]. 现代农业科技, 2009(17): 306-306, 308.
- [36] 杨文莉, 杨卫东. 老瓜头生物总碱对佐剂性关节炎大鼠血清中细胞因子及 NO 的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 574-575, 578.
- [37] 陈 虎, 肖 旭, 王基云, 等. 老瓜头总生物碱对角叉菜胶诱导的大鼠胸膜炎的抑制作用[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(2): 183-185, 封2.
- [38] 陈 虎. 老瓜头总生物碱对角叉菜胶诱导大鼠胸膜炎抑制作用及其作用机制的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2010: 34.
- [39] 王开亮, 吴 萌, 刘智慧, 等. 菲并吡啶里西啉生物碱及其盐衍生物的生物活性研究[J]. 农药学报, 2010, 12(4): 507-510.
- [40] Min H Y, Chung H J, Kim E H, et al. Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor - α (TNF - α) - induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80(9): 1356-1364.
- [41] Gibson D M, Krasnoff S B, Biazio J, et al. Phytotoxicity of antofine from invasive Swallow - Worts[J]. Journal of Chemical Ecology, 2011, 37(8): 871-879.
- [42] Sun H, Blanford S, Guo Y, et al. Toxicity and influences of the alkaloids from *Cynanchum komarovii* AL. Iljinski (Asclepiadaceae) on growth and cuticle components of *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae) larvae[J]. Natural Product Research, 2012, 26(10): 903-912.
- [43] Kim E H, Min H Y, Chung H J, et al. Anti - proliferative activity and suppression of P - glycoprotein by (—) - antofine, a natural phenanthroindolizidine alkaloid, in paclitaxel - resistant human lung cancer cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(3/4): 1060-1065.
- [44] Gao S, Zhang R, Yu Z, et al. Antofine analogues can inhibit tobacco Mosaic virus assembly through small - molecule - RNA interactions[J]. Chembiochem, 2012, 13(11): 1622-1627.
- [45] 杨敏丽, 李建涛, 剡根姣. 牛心朴子总生物碱与化学农药复配剂对小菜蛾的联合毒力作用[J]. 农药, 2012, 51(4): 307-309.
- [46] 郭宏霞. 牛心朴子生物碱中杀虫成分的分离鉴定及杀虫性研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2013: 39.
- [47] Wu D M C Y, Of Cancer Activity Anti - breast. (—) - antofine carried with liposomes[J]. Zhong yao cai, 2013, 36(9): 1511-1514.
- [48] 杨琤琤, 陈亚寒, 杨文博, 等. 老瓜头生物总碱对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 COX - 2 酶活性、mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(9): 1081-1085.
- [49] Jang E J, Kim H K, Jeong H, et al. Anti - adipogenic activity of the naturally occurring phenanthroindolizidine alkaloid antofine via direct suppression of PPAR γ expression [J]. Chemistry & Biodiversity, 2014, 11(6): 962-969.
- [50] 刘宇肖. 牛心朴子生物碱的提取精制及其对尖孢镰刀菌的抑制活性初探[D]. 银川: 北方民族大学, 2017.
- [51] 杨琤琤, 于 鑫, 杨卫东. 老瓜头生物总碱抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖及促凋亡作用的研究[J]. 解放军药科学报, 2018, 34(1): 19-22.
- [52] 王瑞洲. 民族药老瓜头总生物碱的镇痛活性研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2019: 47-48.
- [53] 万清玉. 老瓜头效毒成分 7 - 脱甲氧基娃儿藤碱富集及醋制降毒机制初步研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2015: 47-48.
- [54] 万清玉, 高晓娟, 吴秀丽, 等. 正交设计优化老瓜头活性成分 7 - 脱甲氧基娃儿藤碱提取工艺研究[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1303-1305.
- [55] 郭金玲, 高 俊, 高 智, 等. 牛心朴子草中总生物碱的提取研究[J]. 内蒙古工业大学学报(自然科学版), 2004, 23(3): 171-174.
- [56] 米海莉, 张曦燕, 李越鲲, 等. 牛心朴子总生物碱提取及精制方法研究初报[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 464-467.
- [57] 李玉美, 高 俊. 大孔树脂吸附和分离牛心朴子草中生物碱的研究(续)[J]. 内蒙古石油化工, 2007(11): 162-164.
- [58] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - 10th ed [S]. Wayne, PA, USA, 2015.
- [59] 赵宝玉, 哈斯巴图, 达能太, 等. 牛心朴子生物碱的 GC - MS 分析[J]. 动物医学进展, 2002, 23(4): 63-65.
- [60] 张维库. 牛心朴子化学成分及生物活性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.