

垂盆草总黄酮的酶法提取及其抑菌活性

公衍玲, 黄山, 于慧荣 (青岛科技大学化工学院药学系, 山东 青岛 266042)

[摘要] 目的 研究垂盆草总黄酮的酶法提取工艺及其抑菌作用。方法 用酶解和煎煮相结合的方法,以总黄酮得率为指标,通过正交实验优选出最佳提取工艺,用平板打孔法考察垂盆草总黄酮的抑菌作用。结果 垂盆草总黄酮的最佳酶解工艺条件是酶解温度 50,酶解 pH 6.0,酶用量 0.6%,酶解时间 1.5 h,其中酶解温度是显著影响因素。总黄酮得率可达 3.471%。垂盆草总黄酮提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和产气杆菌都有不同程度的抑菌作用,对四联球菌作用不明显。结论 该实验得到的垂盆草总黄酮的提取工艺合理可行,提取率高,提取得到的总黄酮具有一定的抑菌作用。

[关键词] 垂盆草;总黄酮;酶法提取;抑菌作用

[中图分类号] R284.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2010)02-0114-03

Enzymatic extraction and antibacterial activity of total flavonoids from *Sedum samentosum*

GONG Yan-ling, HUANG Shan, YU Hui-rong (Pharmaceutical Department, College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the technology of total flavonoids in *Sedum samentosum* extracted by enzymatic method and its antibacterial activity. **Methods** Total flavonoids in *Sedum samentosum* was extracted by the method that enzymatic hydrolysis combined with water decocting. The extraction technology was optimized by orthogonal design with the content of total flavonoids yield. The antibacterial activity of total flavonoids was determined by stiletto method. The results revealed that the optimum technology was to be hydrolyzed for 1.5 h by 0.6% enzyme at 50 in pH 6.0. The significant factor was the temperature of enzymatic hydrolysis. The yield of total flavonoids was 3.471%. Total flavonoids of *Sedum samentosum* was bacteriostasis on *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus gasoformans*. The bacteriostasis on *Bacillus aerogenes* was not obvious. The extraction technology obtained in this experiment are reasonable and feasible with high extraction rate, and the total flavonoids has some antibacterial activity.

[Key words] *Sedum samentosum*; total flavonoids; enzymatic extraction; antibacterial activity

垂盆草收载于《中国药典》2005年版一部,为景天科多年生草本植物垂盆草 *Sedum samentosum* Bunge 的新鲜或干燥的全草,我国大部分地区均有分布。该药味甘、淡、性凉,具有清热解毒、利尿消肿、排脓生肌之功效,临床可用于湿热黄疸,小便不利,痈肿疮疡^[1]。药理学研究发现,垂盆草具有免疫抑制,保护肝细胞,降低血清谷丙转氨酶,抗菌等作用^[2~4]。近年来国内外学者已从垂盆草中分到了多种化学成分,包括垂盆草苷,黄酮类成分,生物碱类成分,三萜类成分等^[5~7],其中关于黄酮类成分的研究较深入,但提取工艺的研究报道相对较少,酶法提取尚未见报道。本研究采用酶辅助提取的方法提取垂盆草中的总黄酮成分,并对其体外抑菌活性进行检测,以期垂盆草总黄酮的提取提供一种更为有效的方法。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 垂盆草中药饮片(亳州徐重道中药饮片厂),芦丁(中国药品生物制品检定所),纤维素酶(夏盛实业集团有限公司),大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联球菌、产气杆菌(中国药品生物制品检定所),其它试剂均为市售分析纯。

UV762紫外/可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),DHS-25型 pH计(上海精科雷磁)。SW-CJ-1F型单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),人工气候箱(宁波江南仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 垂盆草总黄酮的水提法与酶法提取

1.2.1.1 水提法 准确称取垂盆草 20 g各 3份,置电热套上煮沸提取 2 h,过滤,浓缩至 1 g/ml

1.2.1.2 酶法提取 准确称取垂盆草 20 g各 3份,浸泡 30 min,同时 0.08 g复合酶用 40 温水活化 5~10 min,调节温度到 50, pH 值到 4.0,缓缓

加入酶液并轻轻搅拌,恒温酶解 2 h。酶解完后,在电热套上微沸提取 2 h,过滤,浓缩至 1 g/ml

1.2.2 总黄酮含量测定

1.2.2.1 芦丁标准曲线的制备 精密量取芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,分别置于 25 ml 容量瓶中,各加 30%乙醇 5 ml,再各精密加入 5% NaNO₂ 溶液 0.7 ml,摇匀,放置 6 min,然后再各精密加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.7 ml,摇匀,放置 6 min,最后再各精密加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 10 ml,分别用 30%乙醇稀释至 25 ml,摇匀,放置 15 min后,置比色皿中于 510 nm 处测吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。得回归方程 $y = 12.388x - 0.0247$, $R^2 = 0.9985$ 。

1.2.2.2 垂盆草中总黄酮的测定 取 1.2.1 项下的滤液 0.1 ml,按照 1.2.2.1 项下的方法测吸光度,计算总黄酮的质量,并计算总黄酮得率(总黄酮得率 = 提取液中总黄酮质量 / 侧柏叶质量 × 100%)。

1.2.3 垂盆草总黄酮酶法提取的工艺优化 根据预实验结果,本研究设计考察酶解温度、酶解 pH 值、酶用量、酶解时间 4 个因素,每个因素设 3 个水平,采用 L₉(3⁴) 正交表安排实验,以确定垂盆草总黄酮的最佳提取工艺条件。

1.2.4 垂盆草总黄酮的体外抑菌活性的检测 参考文献方法^[8],以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联球菌、产气杆菌为实验菌株,用平板打孔法测量垂盆草总黄酮的抑菌圈大小。

2 结果与讨论

2.1 垂盆草总黄酮的水提法与酶法提取的比较 结果见表 1。

表 1 垂盆草总黄酮水提法与酶法提取的比较

提取方法	总黄酮得率 (%)		平均得率 (%)		RSD (%)
水提法	1.965	2.086	1.894	1.982	9.708
酶法提取	2.872	2.852	3.064	2.923	11.705

从表 1 可以看出,酶法提取明显比单纯的水提法总黄酮的得率要高。植物药的有效成分往往被包裹在细胞壁内,提取时细胞壁造成传质阻力,使提取效果受到很大的限制。传统的水提法受细胞壁主要成分纤维素的阻碍,往往提取效率较低。酶技术是近年来用于天然植物有效成分提取的生物工程技术,选用适当的酶可使细胞壁疏松、破裂,比较温和地将植物组织分解,减小传质阻力,加速有效成分的释放,从而提高其提取率。

2.2 垂盆草总黄酮酶法提取的工艺优化 正交试

验结果见表 2,正交试验方差分析结果见表 3。

表 2 正交试验直观分析表

实验号	酶解温度 A (°C)	pH B	酶用量 C (%)	酶解时间 D (h)	总黄酮得率 (%)
1	1(40)	1(4.0)	1(0.2)	1(1.5)	2.8250
2	1(40)	2(5.0)	2(0.4)	2(2.0)	2.7625
3	1(40)	3(6.0)	3(0.6)	3(2.5)	2.9125
4	2(50)	1(4.0)	2(0.4)	3(2.5)	3.2550
5	2(50)	2(5.0)	3(0.6)	1(1.5)	3.3750
6	2(50)	3(6.0)	1(0.2)	2(2.0)	3.1500
7	3(60)	1(4.0)	3(0.6)	2(2.0)	2.7875
8	3(60)	2(5.0)	1(0.2)	3(2.5)	2.5000
9	3(60)	3(6.0)	2(0.4)	1(1.5)	2.8750
均值 1	2.833	2.956	2.825	3.025	
均值 2	3.260	2.87	2.964	2.900	
均值 3	2.721	2.979	3.025	2.889	
极差	0.539	0.100	0.200	0.136	

表 3 正交试验的方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值
酶解温度	0.485	2	30.313 ¹⁾	19.000
pH	0.016	2	1.000	19.000
酶用量	0.063	2	3.938	19.000
酶解时间	0.034	2	2.125	19.000
误差	0.02	2		

¹⁾酶解温度 F 值 > F 临界值,对提取率有显著性。

由表 2 可以看出,各因素对总黄酮提取效果影响的顺序依次为酶解温度 > 酶用量 > 酶解时间 > 酶解 pH 值,且酶解条件为酶解温度 50 °C,酶解 pH 6.0,酶用量 0.6% (酶用量占药材量的质量分数),酶解时间 1.5 h 时,总黄酮的提取率最高。从表 3 可以看出,各因素中只有酶解温度的 F 值大于 F 临界值,所以,酶解温度对提取率的影响具有显著性,而其它因素都不具有显著性。

2.3 验证试验 以酶解温度 50 °C,酶解 pH 6.0,酶用量 0.6% (酶用量占药材量的质量分数),酶解时间 1.5 h 为酶解条件,酶法提取垂盆草中总黄酮,重复 3 组,试验结果见表 4。

表 4 验证试验结果

组号	总黄酮得率 (%)	平均得率 (%)
1	3.263	
2	3.750	3.471
3	3.400	

由表 4 可知,总黄酮得率平均值为 3.471%,说明试验结果真实可信。

2.4 垂盆草总黄酮的体外抑菌活性 垂盆草总黄酮提取液对 5 种细菌的抑菌圈直径见表 5。

(下转第 153 页)

氟罗沙星注射液与注射用夫西地酸钠存在配伍禁忌

孙立光 (解放军第 425医院,海南 三亚 572000)

[关键词] 氟罗沙星注射液;注射用夫西地酸钠;配伍禁忌

[中图分类号] R969.2 [文献标志码] D [文章编号] 1006-0111(2010)02-0153-01

目前,临床上使用的药物比较多,很多药物的不良反应、配伍禁忌等信息在药品说明书及相关报道资料中介绍相对欠缺。笔者临床应用过程中发现,氟罗沙星注射液与注射用夫西地酸钠出现配伍反应,现报道如下。

1 临床资料

患者,男,33岁,因支气管炎、肺部感染,在我院就诊,医生应用消炎、抗感染等对症治疗。在静脉滴注完氟罗沙星注射液后,为患者继续静滴用生理盐水稀释后的注射用夫西地酸钠溶液时,发现输液管内出现白色混浊,即将输液管针头拔出并重新更换输液管后,继续静脉滴注稀释后的注射用夫西地酸钠溶液,静滴后患者无不适。

实验将仅用无菌缓冲液稀释后的注射用夫西地酸钠 5 ml 直接用注射器注入氟罗沙星注射液瓶内混合,发现混合液立即出现乳白色絮状物,且絮状物浓度较高,放置 24 h 后,絮状物不溶解。

2 讨论

本次使用的药品氟罗沙星注射液(规格:100 ml : 0.2 g),注射用夫西地酸钠(0.125 g)及其缓冲液 10 ml,均经卫生药检合格,两种药物的使用说明书都未介绍两者存在配伍禁忌,但通过门诊患者静滴及实验,证明此两种药物存在配伍禁忌。因此建议临床使用该两种药物时应间隔给药,或中间用生理盐水冲管,以免发生用药不良反应,提高用药安全性。

[收稿日期] 2009-06-23

[修回日期] 2009-07-14

(上接第 115 页)

表 5 垂盆草总黄酮的体外抑菌活性 (抑菌圈直径 /mm)

加药量 (μl)	大肠杆菌	枯草杆菌	产气杆菌	金葡萄菌	四联球菌
50	9.5	9	8.25	10	-
100	12.25	9.33	9.25	11	-
150	13.75	11	9	13	-
200	14.25	12.20	9	15	-

从表 5 可以看出,垂盆草总黄酮在体外对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌都有较强的抑制作用,并且随着用量的增加,抑菌作用加强;垂盆草总黄酮对产气杆菌的抑制作用相对较弱,且没有明显的剂量依赖关系;对四联球菌没有明显的抑菌作用。

3 结论

本研究首次采用纤维素酶酶解预处理与水提法相结合的提取工艺提取垂盆草总黄酮,获得了较高的提取率,为垂盆草总黄酮的提取提供了一种新的方法。通过正交试验发现,各因素对总黄酮提取效果影响的顺序依次为酶解温度 > 酶用量 > 酶解时间

> 酶解 pH 值,其中酶解温度为显著影响因素。优选得到的最佳提取工艺为酶解温度 50,酶解 pH 6.0,酶用量 0.6% (酶用量占药材量的质量分数),酶解时间 1.5 h,总黄酮得率高达 3.471%。提取获得垂盆草总黄酮还具有较好的体外抑菌活性。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2005 版 [S]. 一部. 2005: 148.
- [2] 潘金火,何满堂,罗兰,等. 垂盆草不同提取部位保肝降酶试验 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 888.
- [3] Kang TH, Pae HO, Yoo JC, et al. Antiproliferative effects of alkaloids from *Sedum samentosum* on murine and human hepatoma cell lines [J]. Ethnopharmacology, 2000, (70): 177.
- [4] 孙卫东,胡海涛,钱山青,等. 垂盆草提取液对小鼠免疫和抗氧化功能的研究 [J]. 中外医疗, 2008, 27(31): 19.
- [5] 魏大明,阎玉凝,关昕璐,等. 垂盆草的化学成分研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(4): 59.
- [6] 蒋新龙,蒋益花. 垂盆草总黄酮的提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(18): 4745.
- [7] Hyuncheol OH, Kang DG, Kwon JW, et al. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum samentosum* [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(12): 2035.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 259.

[收稿日期] 2009-06-29

[修回日期] 2009-09-11

[作者简介] 孙立光 (1979-),男,大专. Tel: 13876765084, E-mail: aguangsanya@qq.com.