

# 白骨壤叶中生物碱的提取及抗氧化活性研究

夏远涛, 韦莹华, 高雅廷, 孙会杰, 唐玉, 方笛, 覃丹娜, 周桂\*

(广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西高校微生物与植物资源利用重点实验室, 广西南宁 530006)

**摘要** [目的]确定白骨壤叶中生物碱的提取工艺和初步鉴定该物质的活性。[方法]以生物碱的提取率为评价指标, 采用正交试验法, 优选超声提取白骨壤中生物碱的工艺, 考察乙醇体积分数、超声提取时间、超声提取温度和溶液 pH 对提取工艺的影响。采用硫酸亚铁-水杨酸法、DPPH 反应法比较体外清除自由基作用, 测定白骨壤叶中总生物碱的抗氧化活性。[结果]影响白骨壤叶中生物碱提取率的主要因素是提取溶液 pH, 最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 70%、提取时间 20 min、提取温度 70 °C、提取溶液 pH=3。优选之后的提取工艺最佳得率为 14.12%, 方便快捷可行、稳定性好。清除自由基的强弱为 DPPH 自由基大于羟基自由基。[结论]该研究为生物碱的应用提供理论依据。

**关键词** 白骨壤叶; 生物碱; 提取工艺; 正交试验; 抗氧化活性

**中图分类号** R 284.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)17-0006-03

## Study on Extraction and Antioxidant Activity of Alkaloids from Leaves of *Avicennia marina*

XIA Yuan-tao, WEI Ying-hua, GAO Ya-ting et al (School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Nanning, Guangxi 530006)

**Abstract** [Objective] The research aimed to determine the extraction process of alkaloids in the leaves of *Avicennia marina* and the preliminary identification of the activity of the substance. [Method] Taking the extraction rate of alkaloids as the evaluation index, orthogonal experiment was used to optimize the ultrasonic extraction of alkaloids from *Avicennia marina*. The effects of ethanol volume fraction, ultrasonic extraction time, ultrasonic extraction temperature and solution pH on extraction process were investigated. The antioxidant activity of total alkaloids in *Avicennia marina* was determined by the method of ferrous sulfate-salicylic acid oxidation, DPPH reaction *in vitro*. [Result] The main factor affecting the extraction rate of alkaloids in *Avicennia marina* leaves was the pH of the extraction solution. The optimal extraction conditions were ethanol concentration 70%, extraction time 20 min, extraction temperature 70 °C, extraction solution pH = 3. The optimum extraction rate after optimization was 14.12%, which was convenient, feasible and stable. The order of scavenging free radicals was DPPH radical > hydroxyl radical. [Conclusion] The study provides a theoretical basis for the application of alkaloids.

**Key words** *Avicennia marina* leaves; Alkaloids; Extraction process; Orthogonal test; Antioxidant activity

白骨壤(*Avicennia marina*)又名海榄雌, 是马鞭草科红树植物, 生长于高盐度的海岸潮间带<sup>[1]</sup>, 具有红树先锋树种称号。作为广西北部湾的民间传统药食同源植物, 白骨壤具有抗癌、收敛止血、敛肺止咳、涩肠止泻等功效<sup>[2]</sup>, 常用于医治脓肿、出血、腹泻、蛇虫咬伤、溃疡、疟疾等疾病。此外, 白骨壤在沿海地区被俗称为榄钱, 用作海鲜烹饪的配菜, 具有降火解暑功效的“车螺榄钱汤”是热带沿海一带居民美味爽口的佳肴之一。在海南等地区, 海桑和水耶的果实可以直接生吃, 也可加工制作成饮料或调味品等<sup>[3]</sup>。目前只见对白骨壤果实中生物碱的研究<sup>[4]</sup>和果实中抗氧化活性成分研究的报道<sup>[5]</sup>, 但有关白骨壤叶中生物碱的研究及其抗氧化活性方面的研究鲜见报道。笔者以白骨壤叶为材料, 对其中生物碱成分提取, 采用正交试验法进行提取工艺优化, 通过研究筛选出最佳提取工艺条件, 并通过 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子这 3 个指标的测定结果与分析来探究白骨壤叶中生物碱的抗氧化活性, 为红树植物的药用价值研究提供理论依据, 也为天然抗氧化剂的应用研究提供来源和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂。**白骨壤叶采自广西北海红树林生态自然保护区, 并于广西高校微生物与植物资源利用重点实验室-20 °C 冰箱冻存。

**1.1.2 试剂。**苦参碱、DPPH、水杨酸、过氧化氢、邻苯三酚、硫酸亚铁、乙醇、甲醇、NaOH、葡聚糖凝胶 LH-20(Sephadex-LH-20)、盐酸、石油醚、氢溴酸、钼硫酸、浓硫酸、浓硝酸、碘化汞钾、碘-碘化钾, 均为分析纯。

**1.1.3 仪器。**DHG-914 电热恒温鼓风干燥箱; SS230-A 多功能搅拌机; UV-1201 紫外可见分光光度计; AL104 电子天平; JYT-2 架盘药物天平; GM-0.33H 隔膜真空泵; Fs-450 型超声仪器; CW-2000 型超声-微波协同萃取仪; 真空干燥器。

### 1.2 方法

**1.2.1 总生物碱含量的测定。**

**1.2.1.1 苦参碱标准曲线的绘制。**按照文献[6]的方法于波长 410 nm 处测定吸光度, 以吸光度(A)为纵坐标、标准品浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $A = 0.0861C - 0.0303$  ( $R^2 = 0.9995$ )。

**1.2.1.2 白骨壤叶中总生物碱含量测定。**取白骨壤叶粉末 1 g, 同“1.2.1.1”标准曲线绘制方法测定吸光度, 用体积分数 60% 乙醇做参比。白骨壤叶中总生物碱提取率 =  $[(C \times N) / W \times 10^6] \times V_0 \times 100\%$ , 式中, C 为样液浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $V_0$  为样液定容后的体积(mL); N 为稀释倍数; W 为称取样品白骨壤叶粉质量(g)。

**基金项目** 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118047, 2014GXNSFAA118076); 广西高校科学技术研究重点项目(2D2014041); 广西科学研究与技术开发项目(14125008-1-2); 2016 年广西大学生创新创业训练计划项目(201610608098)。

**作者简介** 夏远涛(1992—), 男, 湖北麻城人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学。\* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事生物化学研究。

**收稿日期** 2017-12-29

**1.2.2 白骨壤叶中总生物碱提取单因素试验。**提取工艺流程参照文献[7-9],并做部分改动,准确称取白骨壤叶粉末 1 g,加入一定体积分数的乙醇提取剂,超声功率为 250 W 进行提取,过滤后得生物碱粗提物溶液,用石油醚除色素再次萃取,测定吸光度,计算提取率。

**1.2.2.1 乙醇体积分数的选择。**采用体积分数 50%、60%、70%、80%、90%乙醇溶液 40 mL 作为溶剂,在上述基本提取工艺条件下进行试验。

**1.2.2.2 超声提取时间的选择。**超声提取时间分别为 10、15、20、25、30 min,在上述基本提取工艺条件下进行试验。

**1.2.2.3 超声提取温度的选择。**温度 55、60、65、70、75 °C,在上述基本提取工艺条件下进行试验。

**1.2.2.4 溶液 pH 的选择。**在溶液 pH 分别为 1、2、3、4、5(用浓氯化氢调节)的条件下进行超声提取,在上述基本提取工艺条件下进行试验。

**1.2.3 白骨壤叶中总生物碱提取正交试验。**根据白骨壤叶中总生物碱提取单因素所确定的试验范围,从中挑出对白骨壤叶中总生物碱提取得率影响大的因素,采用  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验设计,确定提取的最佳工艺条件,每个试验重复 3 次。

**1.2.4 提取物的颜色反应。**

**1.2.4.1 碘化铋钾试验。**准确吸取 0.5 mL 乙醇提取液,向其中加入 2 滴改良碘化铋钾试剂。

**1.2.4.2 碘化汞钾试验。**准确吸取 0.5 mL 乙醇提取液,向其中加入 2 滴碘化汞钾试剂。

**1.2.4.3 碘-碘化钾试验。**准确吸取 0.5 mL 乙醇提取液,向其中加入 2 滴碘-碘化钾试剂。

**1.2.5 白骨壤叶中总生物碱抗氧化活性试验。**

**1.2.5.1 总生物碱清除 DPPH 自由基的能力测定。**将白骨壤叶中总生物碱粗提物用超纯水稀释到浓度为 10、20、30、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,冷藏备用,设空白组(DPPH 无水乙醇溶液+2 mL 超纯水)、试样组(DPPH 无水乙醇溶液+2 mL 不同质量浓度试样溶液)和参比组(无水乙醇溶液+2 mL 不同质量浓度试样溶液),加样后暗处放置 60 min,在波长 517 nm 处测定吸光度,  $V_c$  为阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为空白组吸光度,  $A_x$  为试样组吸光度,  $A_{x_0}$  为参比组吸光度。

**1.2.5.2 总生物碱清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )的能力测定<sup>[10]</sup>。**将白骨壤叶中总生物碱粗提物用超纯水稀释到浓度为 10、20、30、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,冷藏备用,采用硫酸亚铁-水杨酸法进行测定。对羟基自由基的清除率( $E$ )按下式计算:

$$E = [A_0 - (A_m - A_n)] / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为空白对照液的吸光度,  $A_m$  为加入生物碱后的吸光度,  $A_n$  为不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  时生物碱的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

**2.1.1 乙醇浓度的选择。**由图 1 可知,随着乙醇体积分数

的增大,生物碱的提取效果增强,乙醇体积分数达到 60% 时,生物碱的提取率为 3.89%,乙醇体积分数大于 60% 时,提取率趋于稳定,但随着乙醇体积分数的继续增大,生物碱的提取率反而下降。考虑到提取效率,因此选定乙醇体积分数 60%、70%、80% 作为正交试验的 3 个水平。

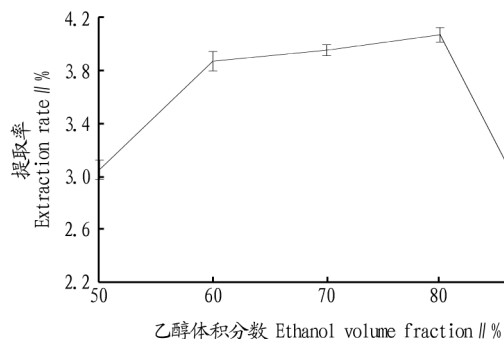


图 1 乙醇体积分数对生物碱提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol volume fraction on the extraction rate of alkaloids from *Aricennia marina*

**2.1.2 超声提取时间的选择。**由图 2 可知,在 10~20 min 时,随着提取时间的增大,提取率增高,在 20 min 时达到最大,最大提取率为 13.74%;但 20 min 之后,提取时间越长,生物碱提取率下降。考虑到可能是由于白骨壤叶中生物碱含有对热不稳定的成分,在长时间加热过程中会被破坏或分解,因此选定提取时间 10、15、20 min 作为正交试验的 3 个水平。

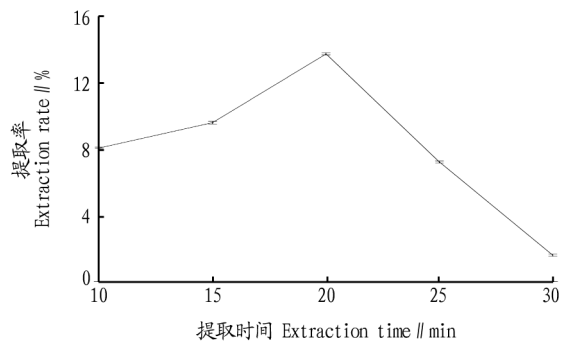


图 2 超声提取时间对生物碱提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on the extraction rate of alkaloids from *Aricennia marina*

**2.1.3 超声提取温度的选择。**由图 3 可知,随着提取温度的升高,生物碱的提取率不断升高,在温度为 70 °C 时,达到最大,最大提取率为 14.74%;在 70 °C 之后,随着温度的继续升高,提取率呈下降趋势。因此提取温度控制在 70 °C 左右较为适宜,选取 65、70、75 °C 作为正交试验的 3 个水平。

**2.1.4 溶液 pH 的选择。**由图 4 可知,在 pH 为 1~2 时,随着酸性的变弱,生物碱提取率降低;在 pH 为 2~3 时,随着酸性的变弱,提取率又再次升高,并在 pH=3 时达到最大;而后随着酸性的变弱,提取率不断降低。考虑到可能是由于白骨壤叶中生物碱含有与酸发生作用的成分,在 pH=3 时生物碱较为稳定,因此选定溶液 pH 1、2、3 作为正交试验的 3 个水平。

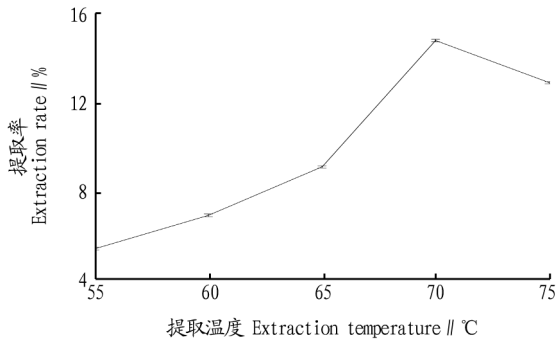


图3 超声提取温度对生物碱提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on the extraction rate of alkaloids from *Aricennia marina*

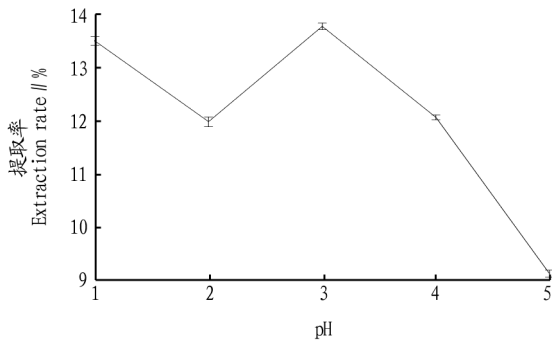


图4 溶液 pH 对生物碱提取率的影响

Fig. 4 Effect of pH on the extraction efficiency of alkaloids from *Aricennia marina*

**2.2 正交试验** 采用  $L_9(3^4)$  正交表(表1),乙醇体积分数(A)、超声提取时间(B)、超声提取温度(C)、溶液 pH(D)作为4个考察因素,选取3个水平进行正交试验<sup>[7]</sup>。

表1  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels for  $L_9(3^4)$  orthogonal array design

水平 Level	因素 Factor			
	A(乙醇体 积分数 Ethanol concentration) %	B(提取时 间 Extraction time)//min	C(提取温 度 Extraction temperature) °C	D(溶液 pH Solution pH)
1	60	10	65	1
2	70	15	70	2
3	80	20	75	3

由表2可知,  $R_D > R_C > R_B > R_A$ , 4个因素对白骨壤中生物碱提取率的影响从大到小依次为溶液 pH(D)、提取温度(C)、提取时间(B)、乙醇体积分数(A),最优组合  $A_2B_3C_2D_3$ , 即乙醇体积分数为70%、提取时间为20 min、提取温度70°C、提取溶液 pH=3。

**2.3 验证试验** 按最优组合  $A_2B_3C_2D_3$  条件进行3次平行试验,发现白骨壤叶中生物碱提取率平均值为14.12%,高于表2中每一项试验结果,故  $A_2B_3C_2D_3$  为最优提取工艺。

**2.4 颜色反应试验** 碘化铋钾试验立刻出现砖红色的沉淀;碘化汞钾试验立刻出现浅黄色沉淀;碘-碘化钾试验立刻出现棕色沉淀。3种颜色反应表明提取的物质含有生物碱类化合物。

表2 正交设计试验及结果

Table 2 Orthogonal array design and results

试验号 Test number	因素 Factor				提取率 Extraction rate / %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	7.96
2	1	2	2	2	11.58
3	1	3	3	3	12.06
4	2	1	2	3	13.85
5	2	2	3	1	10.03
6	2	3	1	2	12.36
7	3	1	3	2	9.24
8	3	2	1	3	11.26
9	3	3	2	1	12.31
$k_1$	10.53	10.35	10.53	10.10	
$k_2$	12.08	10.96	12.58	11.06	
$k_3$	10.94	12.24	10.44	12.39	
R	1.55	1.89	2.14	2.29	

## 2.5 白骨壤叶中总生物碱抗氧化活性试验

**2.5.1 清除 DPPH 试验。**由图5可知,在一定范围内,白骨壤叶中总生物碱提取物和  $V_c$  对 DPPH 自由基清除率均逐渐增强,说明白骨壤叶中总生物碱和  $V_c$  对 DPPH 自由基的清除能力存在着一定的量效关系。在相同质量浓度下,白骨壤叶中总生物碱提取物对 DPPH 自由基具有较好的清除作用,白骨壤叶中总生物碱清除效果显示略低于  $V_c$  对 DPPH 自由基的清除能力。

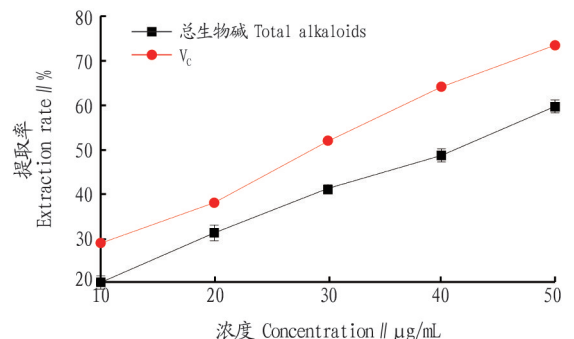


图5 总生物碱和  $V_c$  对 DPPH 的清除作用

Fig. 5 Total alkaloids and  $V_c$  scavenging effect on DPPH

**2.5.2 清除羟基自由基试验。**由图6可知,在一定范围内,白骨壤叶中总生物碱提取物对羟基自由基清除率均逐渐增强,但随着浓度的逐渐增大,清除效果趋于平缓,说明白骨壤叶中总生物碱和  $V_c$  对羟基自由基的清除能力存在着一定的量效关系。在相同质量浓度下,总生物碱的清除效果明显高于  $V_c$ 。

## 3 结论

该试验采用正交试验法优选得出白骨壤叶中生物碱最佳提取工艺条件:乙醇体积分数为70%、提取时间为20 min、提取温度70°C、提取溶液 pH=3,在此工艺条件下,得到白骨壤叶中生物碱提取率为14.12%。利用超声波提取方法,可以极大地缩短提取时间,且能达到较高的提取效率。因此,

(下转第13页)

清单,完成批量程序化数据归类(图 11)。

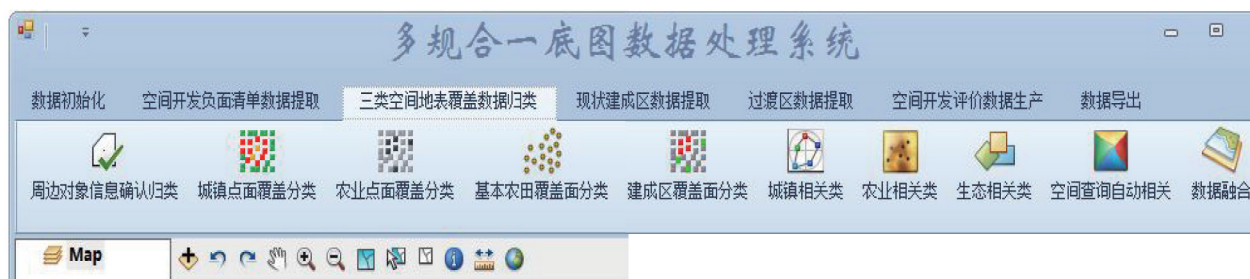


图 11 三类空间地表覆盖数据归类

Fig. 11 Three types of space surface coverage data classification

## 5 结论

在分析“十三五”市县经济社会发展规划改革的指导意见后,结合各规划部门的指导思想下,依托于“多规合一”理论,以国情普查成果数据和基础测绘数据及相关部门相关数据作为数据基础,研究底图数据的数据结构和应用需求,以 ArcGIS Engine + Microsoft Visual Studio 作为开发平台,研究了一套为空间规划服务的数据处理系统,构建了“多规合一”的底图数据,为制定发展战略与规划、合理调配资源、优化空间开发格局等提供了一定的理论支持,也为规划管理者提供了数据参考。

## 参考文献

[1] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 关于“十三五”市县经济社会发展规划改革的指导意见:发改规划[2014]2477号[A]. 2014-11-

01.

- [2] 桂德竹,王硕,张成成. “多规合一”空间规划底图编制方法[J]. 测绘与空间地理信息, 2016, 39(8): 20-23.
- [3] 杨玲. 基于空间管制的“多规合一”控制线系统初探:关于县(市)域城乡全覆盖的空间管制分区的再思考[J]. 城市发展规划, 2016, 23(2): 8-15.
- [4] 林坚,陈霄,魏筱. 我国空间规划协调问题探讨:空间规划的国际经验借鉴与启示[J]. 现代城市研究, 2011(12): 15-21.
- [5] 国家发展改革委,国土资源部,环境保护部,住房和城乡建设部. 关于开展市县“多规合一”试点工作的通知[A/OL]. (2014-08-26) [2018-01-20]. [http://www.ndrc.gov.cn/zcfb/zcfbtz/201412/t20141205\\_651312.html](http://www.ndrc.gov.cn/zcfb/zcfbtz/201412/t20141205_651312.html).
- [6] 王唯山,魏立军. 厦门市“多规合一”实践的探索与思考[J]. 规划师, 2015, 31(2): 46-51.
- [7] 祁向前,乔辉,马福义,等. 基于 ArcGIS Engine 的地理国情普查成果管理信息系统实现[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(21): 235-236.
- [8] 祁向前. 地理国情普查成果管理信息系统设计:以内蒙古满洲里市成果为例[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(2): 335-336.

(上接第 8 页)

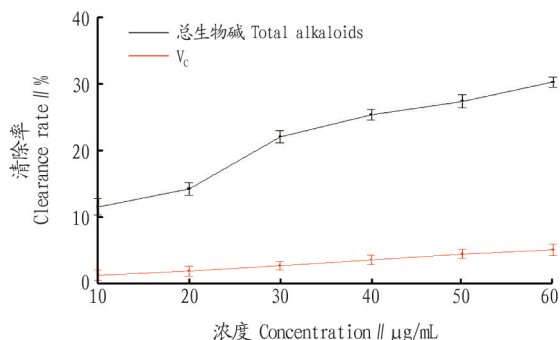


图 6 总生物碱对羟基自由基的清除作用

Fig. 6 Scavenging effect of total alkaloids on hydroxyl radicals

超声波提取法是一种较为理想的提取方法,具有省时、高效、节能的优点。同时,该试验结果显示,白骨壤叶中生物碱对 DPPH 自由基和羟基自由基也都具有很好的清除作用。因此,白骨壤叶中生物碱是一种很好的天然抗氧化活性物质,进一步完善了白骨壤作为一种中草药的药用价值,也为白骨

壤研发成为抗氧化和降血压等功能性食品和药品提供理论基础。

## 参考文献

- [1] 石莉. 中国红树林的分布状况、生长环境及其环境适应性[J]. 海洋环境保护, 2002(4): 14-18.
- [2] 贾睿,郭跃伟,侯惠欣. 中国红树林植物白骨壤化学成分的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(1): 16-19.
- [3] 莫竹承. 红树植物的药用和食用[J]. 海洋信息, 1998(8): 12-13.
- [4] 高程海,张荣灿,许铭本,等. 红树白骨壤果实中生物碱类化学成分研究[J]. 广西科学院学报, 2014(2): 104-106.
- [5] 易湘西,谢文佩,颜栋美,等. 白骨壤果实中抗氧化活性成分研究[J]. 广西科学院学报, 2014(4): 253-256.
- [6] 王锐,张泽俊,陈光全,等. 紫外分光光度法测定狼牙刺花中生物碱含量[J]. 广东化工, 2015, 42(6): 166-167.
- [7] 张晓燕,赵雪松,何茂秋,等. 金石斛总生物碱的提取条件优化[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(6): 131-134.
- [8] 张吉祥,欧来良. 正交试验法优化超声提取枣核总黄酮[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 18-21.
- [9] FLAMINI G, THOURI A, AREM A E, et al. A comparison study of the nutritional, mineral and volatile compositions of three dry forms of ginger rhizomes, and antioxidant properties of their ethanolic and aqueous extracts [J]. Journal of coastal life medicine, 2017, 5(2): 70-76.
- [10] 张福平,汤艳姬,刘晓珍,等. 黄皮叶黄酮类化合物的抗氧化性研究[J]. 南方农业学报, 2013, 44(8): 1343-1346.

## 科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过 20 字。英文与中文应相吻合。英文题名词首字母大写,连词及冠词除外。