

## 超声下白凤菜总黄酮的优化提取及其体外抑菌活性研究<sup>①</sup>

林燕燕, 罗秀针, 曹林枝, 王元亨

(漳州卫生职业学院基础医学部, 福建 漳州 363000 E-mail: 21728476@qq.com)

**摘要:** **目的** 优化白凤菜总黄酮的提取工艺, 并研究白凤菜总黄酮的体外抑菌活性。 **方法** 以 70% 乙醇溶液浸提, 再用 200 W 超声波辅助, 通过 L9(3<sup>3</sup>) 正交试验研究白凤菜总黄酮的最佳提取工艺。采用纸片琼脂扩散法和二倍稀释法观察白凤菜总黄酮对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷白杆菌和铜绿假单胞菌的抑制作用。 **结果** 总黄酮提取的最佳工艺条件为: 预浸泡时间 12 h、超声温度 70 °C、超声时间 30 min。此工艺下白凤菜干粉总黄酮的含量为 30.952 mg/g。白凤菜总黄酮对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷白杆菌、铜绿假单胞菌均有一定抑菌作用; 对表皮葡萄球菌和肺炎克雷白杆菌的最低抑菌浓度均为 0.84 mg/ml, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度均为 0.42 mg/ml。 **结论** 白凤菜总黄酮含量高, 且具有广谱的抗菌作用, 值得进一步研究。

**关键词:** 超声波; 白凤菜; 总黄酮; 提取工艺; 抑菌活性; 最低抑菌浓度

**中图分类号:** R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)02-0090-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.02.002

## Optimization the extraction of total flavonoids from *Gynura formosana* Kitam guided by ultrasound and research on its antibacterial activity *in vitro*

Lin Yanyan, Luo Xiuzhen, Cao Linzhi, Wang Yuanheng

(Faculty of Basic Medical Sciences, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, Fujian, China E-mail: 21728476@qq.com)

**Abstract:** **Objective** To optimize the extraction process of total flavonoids from *Gynura formosana* Kitam and research on the bacteriostasis of total flavonoids *in vitro*. **Methods** The optimal extraction process for total flavonoids from *Gynura formosana* Kitam by L9(3<sup>3</sup>) orthogonal experiment was performed using 70% ethanol as solvent assisted by 200 W ultrasound. The antimicrobial activity of total flavonoids of *Gynura* against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated using paper-disc agar-diffusion method and double dilution method.

**Results** The optimal conditions of extraction process were pre-soaking time for 12 hours, ultrasonic temperature at 70 °C, ultrasonic time for 30 minutes. Under these optimal conditions, the content of total flavonoids extracted from dry powder of *Gynura formosana* Kitam reached to 30.952 mg/g. The bacteriostasis results showed that the total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam had certain bacteriostasis on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of total flavonoids was 0.84 mg/ml against *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella pneumoniae*, and the MIC of total flavonoids was 0.42mg/ml against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusion** *Gynura formosana* Kitam contains abundant total flavonoids and has broad-spectrum antibacterial activity, which is worthy of further study.

**Key words:** ultrasound; *Gynura formosana* Kitam; total flavonoid; extraction process; antimicrobial activity; minimal inhibitory concentration

① 基金项目:福建省教育厅科技 B 类(JB14209)

白凤菜(*Gynura formosana* Kitam)又名肝炎菜、台湾土三七等,是一种台湾特产的菊科千里光族菊三七属,多年生草本保健蔬菜。白凤菜生性强健,对栽培土质要求不高,喜高温环境,适宜在20~30℃环境生长,多见生长在低山和平原<sup>[1]</sup>。白凤菜定植40d后可采收,此后每20d可采收1次。每次采收时,在茎基部留2~3节,白凤菜可持续采收3~5年<sup>[2]</sup>,为研究提供可靠稳定的原材料。白凤菜具有药用和食用价值,全草可入药,该属植物多含生物碱,黄酮,挥发性萜类活性成分<sup>[3]</sup>;其中黄酮类物质具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、防治糖尿病、保护心血管和消化道等活性<sup>[3-5]</sup>。本研究通过正交实验确定超声波辅助提取白凤菜中总黄酮的最佳工艺条件;对提取的总黄酮产物进行体外抑菌实验,以期为该资源的利用和开发提供参考。

## 1 材料与仪器

1.1 试药 白凤菜(台湾引进种植),芦丁标准品(ID:5HLV-QAMN,中国食品药品检定研究所),四环素(C021,30 μg/片,杭州滨和微生物试剂有限公司),庆大霉素(C017,10 μg/片,杭州滨和微生物试剂有限公司),营养肉汤、营养琼脂和营养琼脂平板(北京陆桥技术有限公司),所用化学试剂均为分析纯。

1.2 菌种 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、肺炎克雷白杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)来自漳州市医院分离的致病菌株;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)来自广东环凯标准菌株。

1.3 仪器 FA2204N 万分一电子天平(上海菁海仪器有限公司)、HY-04B 高速粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司)、电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、KQ5200E 超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)、TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、R系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)、752N 紫外可见分光光度计(上海精科)、HH.B11.360-BS-II 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)、SW-CJ-1B 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

## 2 试验方法

2.1 芦丁标准曲线绘制<sup>[6]</sup> 称取12.5 mg 芦丁标准品于25 ml 容量瓶中,用60%乙醇溶解并定容作为标准溶液。精确吸取芦丁标准液0 ml、0.4 ml、0.8 ml、1.2 ml、1.6 ml、2.0 ml 分别置于6支具塞10 ml 试管中,各加入60%乙醇2.0 ml、1.6 ml、1.2 ml、0.8 ml、0.4 ml、0 ml。每管加5%亚硝酸钠溶液0.5 ml 摇匀后放置6 min。然后每管加10%硝酸铝溶液0.5 ml,

摇匀后放置6 min。再加4%氢氧化钠溶液4.0 ml,加60%乙醇定容,摇匀后静置15 min。在510 nm 处测各管的吸光度。用芦丁标准液0 ml 管作为空白管,芦丁含量的浓度作为横坐标,相应浓度下的吸光值为纵坐标,做标准曲线。

2.2 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验设计 在单因素实验的基础上<sup>[6]</sup>,筛选三个因素:预浸泡时间、超声温度、超声时间进行L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验,获得白凤菜总黄酮粗液,根据上述“2.1”中的显色方法即亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法使粗液显色,测定吸光值,计算白凤菜总黄酮含量;确定白凤菜总黄酮的最佳提取工艺条件。

2.3 白凤菜总黄酮的提取及其含量的测定 将采集的白凤菜茎和叶清洗,并于105℃烘干;粉碎成白凤菜干粉备用。设置提取的超声功率为200 W,酒精浓度为70%,料液比为1 g:30 ml<sup>[6]</sup>;再根据正交实验结果设置预浸泡时间、超声温度、超声时间;获得白凤菜总黄酮粗液。趁热抽滤,收集提取液;提取液转入大孔树脂柱,用70%乙醇溶液洗脱,将洗脱液旋转蒸发浓缩,获得白凤菜总黄酮浸膏。所得浸膏用双蒸水溶解,将溶解液经0.45 μm、0.22 μm 的滤膜依次过滤,最终获得白凤菜总黄酮样液。根据2.1中的亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法使样液显色,测定吸光值,计算样液白凤菜总黄酮含量。

## 2.4 抑菌试验

2.4.1 白凤菜总黄酮抑菌活性的测定<sup>[7-9]</sup> 将新华滤纸制成直径6 mm 的纸片,高压灭菌后烘干。然后将滤纸片放置于白凤菜总黄酮溶液(浓度为1 mg/ml)中浸泡过夜备用。用涂布法将各种菌液(菌液浓度为1.5×10<sup>7</sup> CFU/ml)接种在琼脂培养基上,夹取浸泡于白凤菜总黄酮溶液中的滤纸片放入培养皿,同时放入阳性对照的药敏纸片、空白滤纸片。各纸片的中心距离大于25 mm,纸片距平板内边缘距离大于15 mm。放好滤纸片后将培养皿置于37℃培养16 h,测量抑菌圈直径。其中空白对照为无菌蒸馏水,阳性对照为四环素药敏片用于抑制金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌生长;庆大霉素药敏片用于抑制大肠杆菌、肺炎克雷白杆菌和铜绿假单胞菌生长。

## 2.4.2 白凤菜总黄酮最低抑菌浓度(MIC)的测定<sup>[7-9]</sup>

白凤菜总黄酮的样液应用二倍稀释法配成各种浓度。配制2倍浓度的液体培养基灭菌备用。针对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度的测定:取6支试管均加入2 ml 液体培养基,分别加2 ml 各种浓度样液。在各管中均加入0.1 ml 菌液(0.5 麦氏比浊度,100倍稀释)混匀,将其置于37℃培养24 h,观察并记录澄清不长菌的样液最高稀释度即为最低抑菌浓度。重复此方法测定白凤菜总黄酮针对表皮葡萄球菌、大肠杆菌、肺

炎克雷白杆菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度。

### 3 结果分析

3.1 白凤菜标准曲线 以芦丁含量的浓度为横坐标,相应浓度下的吸光值为纵坐标,做标准曲线;得回归方程为:  $Y = 10.93X - 0.0203$ ; 相关系数  $R^2 = 0.9981$ 。

3.2 白凤菜总黄酮提取工艺优化结果 以白凤菜干粉为材料,在单因素试验的基础上,根据文献设置提取的超声功率为 200 W,酒精浓度为 70%,料液比为 1 g : 30 ml<sup>[6]</sup>;再根据正交试验的原理,以预浸泡时间、超声温度、超声时间三因素进行 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验(见表 1);对白凤菜总黄酮提取工艺进行优化。

表 1 白凤菜总黄酮提取 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验的工艺设计

水平	因子		
	A: 预浸泡时间(h)	B: 超声温度(℃)	C: 超声时间(min)
1	0	50	10
2	0.5	60	20
3	12	70	30

由表 2 可知,三因素对白凤菜总黄酮提取率的影响程度由大到小分别是:预浸泡时间 > 超声温度 > 超声时间。极差分析结果表明,在超声波条件下提取白凤菜总黄酮的最佳工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>(预浸泡时间 12 h、超声温度 70℃、超声时间 30 min);此条件下总黄酮的含量为 30.952 mg/g。该数值高于正交试验的最高值,说明通过 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验获得的最佳提取工艺条件可信。由表 3 可知三因素的偏差平方和误差是 3.600;从显著性结果看浸泡时间的改变对实验结果有一定的影响。

表 2 白凤菜总黄酮提取工艺 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验结果

试验号	因子			总黄酮含量(mg/g)
	A	B	C	
1	1	1	1	21.336
2	1	2	2	24.416
3	1	3	3	25.676
4	2	1	2	22.092
5	2	2	3	26.460
6	2	3	1	25.452
7	3	1	3	30.828
8	3	2	1	28.252
9	3	3	2	30.296
K <sub>1</sub>	23.809	24.752	25.013	
K <sub>2</sub>	24.668	26.376	25.601	
K <sub>3</sub>	29.792	27.141	27.654	
R	5.983	2.389	2.053	

注:K 值代表每因素各水平的平均值;R 代表极差

表 3 正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	62.785	2.000	31.392	17.155	0.055
B	8.932	2.000	4.466	2.441	0.291
C	11.539	2.000	5.769	3.153	0.241
误差	3.660	2.000	1.830		

### 3.3 白凤菜总黄酮抑菌试验结果

3.3.1 白凤菜总黄酮抑菌活性的测定 使用优化的方法提取白凤菜总黄酮,经加工制备白凤菜总黄酮浸膏,浸膏经灭菌双蒸水溶解,再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌。采用纸片琼脂扩散法考察白凤菜总黄酮对几种微生物(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷白杆菌、铜绿假单胞菌)的抑菌效果。抑菌实验结果(见表 4)表明:在白凤菜总黄酮浓度为 1 mg/ml 时对表皮葡萄球菌的抑菌效果最差,对铜绿假单胞菌有一定的抑制作用,对金色葡萄球菌、大肠杆菌和肺炎克雷白杆菌有相对较强的抑制作用。

表 4 白凤菜总黄酮的抑菌作用

菌种	抑菌环直径/mm		
	浓度 1 mg/ml	阳性对照	空白
金黄色葡萄球菌	12.24±0.43	25.2	0
表皮葡萄球菌	7.73±0.45	15.0	0
大肠杆菌	12.60±0.73	30.1	0
肺炎克雷白杆菌	12.87±0.36	36.0	0
铜绿假单胞菌	11.92±0.54	26.5	0

注:体外抑菌定性结果的判定标准:抑菌圈直径(d)≥20 mm 为极敏;15≤d≤19 mm 为高敏;10≤d≤14 mm 为中敏;d<10 mm 为低敏;无抑菌圈为耐药<sup>[10]</sup>

3.3.2 白凤菜总黄酮最低抑菌浓度的测定结果 记录了白凤菜总黄酮对几种微生物(金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷白杆菌、铜绿假单胞菌)的最低抑菌浓度的实验过程,结果表明:白凤菜总黄酮对表皮葡萄球菌和肺炎克雷白杆菌的最低抑菌浓度均为 0.84 mg/ml,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度均为 0.42 mg/ml(见表 5)。

## 4 结论

黄酮的提取方法有热水提取法、醇提取法、碱提酸沉法、超声提取法、微波提取法、大孔吸附树脂提取法、酶提取和超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法等<sup>[11]</sup>。综合分析各种方法的优缺点及白凤菜总黄酮应用为抗菌剂的质量要求,最终考虑采用超声下乙醇提取白凤菜总黄酮<sup>[1]</sup>。乙醇能有效地溶解中草药中的黄酮成分,且用量比水提用量少,时间短。乙醇毒性小,使将来提取物的开发

表5 白凤菜总黄酮的最低抑菌浓度

菌种	白凤菜总黄酮的浓度(mg/ml)				
	1.68	0.84	0.42	0.21	0.105
金黄色葡萄球菌	—	—	—	++	++
表皮葡萄球菌	—	—	±	++	++
大肠杆菌	—	—	—	+	++
肺炎克雷白杆菌	—	—	±	++	++
铜绿假单胞菌	—	—	—	+	++

注：“—”表示无菌生长，“+”表示有菌生长，“±”表示有少量菌生长

利用更便利。超声提取法与回流法、索氏提取法相比操作简单,时间短,产率高。

在文献单因素实验的基础上<sup>[6]</sup>,设置提取的超声功率为200 W,酒精浓度为70%,料液比为1 g:30 ml;采用正交实验方法确定其它因素的最佳工艺条件为:预浸泡时间12 h、超声温度70℃、超声时间30 min。在此条件下,白凤菜干粉总黄酮含量为30.952 mg/g。

抑菌实验中选用了革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌;其中表皮葡萄球菌、肺炎克雷白杆菌和铜绿假单胞菌是医院分离的致病菌株;金黄色葡萄球菌和大肠杆菌是标准菌株。葡萄球菌是最常见的化脓性球菌,是医院交叉感染的重要来源;一些特殊血清型的大肠杆菌对人和动物有致病性;肺炎克雷白杆菌能很快适应宿主环境而长期生存,对各种抗生素易产生耐药性;铜绿假单胞菌存在于正常人的皮肤、呼吸道和肠道等组织,为条件致病菌,引起的很多感染发生在衰弱或免疫受损的住院病人,对化学药物的抵抗力比一般革兰氏阴性菌强。总黄酮具有广谱的抗菌作用,能够抑制革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的生长<sup>[8]</sup>。本实验结果表明,白凤菜总黄酮浓度高于0.84 mg/ml对以上菌种均有抑制作用;特别是对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑制作用较强。实验中的白凤菜总黄酮是多成分物质,应针对性分离和浓缩有效抑菌成分,再进行抑菌效果和抑菌机制的研究<sup>[12-13]</sup>。面对当今耐药菌株的不断增加,将促使人们加大对天然产物抑菌

成分研究与开发的投入。

#### 参考文献:

- [1] 林燕燕,张文华,黄仲庆. 探讨白凤菜总黄酮应用于天然防腐剂的可行性[J]. 中外食品工业,2014(总280):70-71,74.
- [2] 孙雅玲,任金华. 白凤菜保护地栽培管理[J]. 特种经济动植物,2014(6):44-45.
- [3] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2003:173-216.
- [4] 林瑶,谭冰,韦文荣,等. 不同提取法对广金钱草总黄酮抗氧化活性的影响研究[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(4):364-367.
- [5] 黄凯玲,肖刚,黄建红,等. 香附化学成分及药理作用研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(3):491-492.
- [6] 冯冬林,刘美琴. 白凤菜总黄酮提取工艺研究[J]. 福建农业科技,2013(11):70-72.
- [7] 曲中堂,项昭保,赵志强. 橄榄总黄酮抑菌作用研究[J]. 中国酿造,2010(4):62-64.
- [8] 王记莲. 超声强化提取红菊苣总黄酮及其抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):251-253.
- [9] 曹桦,康超勇,杨军. 离体快繁扯根菜总黄酮提取及抗菌活性研究[J]. 西华师范大学学报(自然科学版),2007,28(4):274-277.
- [10] 李兵,何翠薇,陈青青,等. 广西木薯叶总黄酮提取工艺及抗菌性研究[J]. 湖北农业科学,2014,53(23):5816-5819.
- [11] 王鑫. 黄酮类化合物提取方法的应用[J]. 天津药学,2007,19(5):61-66.
- [12] Mahmoudi S, Khali M, Benkhaled A, et al. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties[J]. Asian Pac J Trop Biomed,2016, 6(3): 239-245.
- [13] Olufemi BE, Olusegun OV, et al. Antibacterial properties of ethanolic extract of *Ficus carica* on microorganisms isolated from pepper *Capsicum frutescens*[J]. Web-Pub J Sci Res, 2013,1(1): 7-15.

收稿日期:2017-02-22;修回日期:2017-03-24