

超声波辅助提取柚树叶黄酮及其 抗氧化、抑菌能力研究

Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of flavonoids from
pomelo leaves and its antioxidant and antibacterial capabilities

丘苑新 张泽雄 何 娣 蔡健常 柳建良

QIU Yuan-xin ZHANG Ze-xiong HE Di CAI Jian-chang LIU Jian-liang

(仲恺农业工程学院现代农业工程创新研究院, 广东 广州 510225)

(Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of
Agricultural and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

摘要:以柚树叶为研究对象,通过超声波辅助提取柚树叶总黄酮,并对其抗氧化及抑菌能力进行探究。结果表明,柚树叶黄酮的最佳提取条件为乙醇体积分数 80%,超声时间 50 min,料液比($m_{\text{柚树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)1 : 25 (g/mL),此条件下黄酮提取量为 11.746 mg/g。抗氧化试验表明,经初步提取的柚树叶黄酮提取液总还原力约是同等质量浓度抗坏血酸的 1.25 倍。此外,柚树叶黄酮对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑制效果为金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌 > 鼠伤寒沙门氏菌,最低抑菌质量浓度 (MIC) 为 0.074 mg/mL。综上,柚树叶黄酮类化合物具有较好的抗氧化和抑菌能力。

关键词:柚树叶;总黄酮;超声波辅助提取;抗氧化;抑菌

Abstract: Taking pomelo leaves as the research object, the total flavonoids of pomelo leaves were extracted with the aid of ultrasound, and its antioxidant and antibacterial abilities were explored. The results showed that the optimal extraction conditions for flavonoids from pomelo leaves were ethanol volume fraction 80%, ultrasonic time 50 min, solid-liquid ratio 1 : 25 (g/mL), and the flavonoid content under these conditions was 11.746 mg/g. The antioxidant test results showed that the total reducing power of the preliminary extraction of pomelo leaf flavonoids was about 1.25 times that of the same mass concentration of ascorbic acid. In addition, the inhibitory effect of pomelo leaf flavonoids on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and

Staphylococcus aureus was *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Salmonella typhimurium*, and the minimum inhibitory volume fraction (MIC) was 0.074 mg/mL. In conclusion, the flavonoids of pomelo leaves have good antioxidant and antibacterial abilities.

Keywords: pomelo leaves; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; anti-oxidation; antibacterial

柚子 [*Citrus maxima* (Burm) Merr.] 属于芸香科柑橘属,有着“天然水果罐头”之美誉^[1],其气味芬芳,口感酸甜,具有极高的营养及药用价值^[2]。柚树叶富含精油、黄酮等物质,其中黄酮类化合物具有抑制多种细菌、真菌、病原体等致病微生物的作用,还具有抗肿瘤的作用,被广泛应用于临床上^[3-4]。此外,黄酮类化合物还能与其他药物、维生素等复配发挥协同作用,显著提高其生物活性^[5]。常见的黄酮提取方法有超声波辅助提取法^[6]、超临界提取法^[7]、有机溶剂提取法^[8]、微波辅助提取法^[9]及碱提酸沉法^[10]。超声辅助提取法是一种高效、环保的提取技术,常用于提取热不稳定性的成分^[11],周旋等^[12]通过超声辅助法提取女贞子总黄酮并进行抗氧化活性研究;Luis 等^[13]采用超声辅助提取藤黄总黄酮并将其提取率提高了 3 倍以上。目前,有关柚树叶的研究主要集中在精油的提取方面,如郭刚军等^[14]运用超临界萃取柚树叶精油并进行 GC-MS 分析;黄桂平等^[15]采用微波辐射法提取柚树叶精油,其得率达 1.03%;Tan 等^[16]通过微波辅助水解法提取柚树叶精油,并采用响应面法进行工艺优化。而关于柚树叶黄酮的报道较少,如周梦春等^[17]仅对柚树叶黄酮含量进行了测定,但并未进行提取工艺优化与抗氧化、抑菌性能研究。研究拟以柚树叶为原料,通过超声辅助法提取总黄酮,优化其工艺条件,并对提取

基金项目:广东省重点领域研究计划项目(编号:2019B020238008);广东省农业科技特派员项目(编号:GT2018071822)

作者简介:丘苑新(1980—),男,仲恺农业工程学院副教授,博士。
E-mail: 65518987@qq.com

收稿日期:2021-01-20

物的抗氧化和抑菌能力进行探索,以期为更全面地开发利用桉树叶黄酮提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜桉树叶:采自广东梅州市;

芦丁标准品、铁氰化钾、磷酸盐缓冲液(pH 6.82):分析纯,上海源叶生物技术有限公司;

无水乙醇、石油醚、氯化铝、氯化铁:分析纯,广州化学试剂厂;

三氯乙酸:分析纯,天津市百世化工有限公司;

亚硝酸钠:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

抗坏血酸:分析纯,广东光华科技股份有限公司;

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌:仲恺农业工程学院微生物实验室;

超声波清洗机:YL-040S型,深圳市聚众发商贸有限公司;

旋转蒸发器:RV10型,武汉集思仪器设备有限公司;

生化培养箱:SPX-150型,上海悦丰仪器仪表有限公司;

低速离心机:SC-3610型,安徽中科中佳科学仪器有限公司;

分光光度计:UV-1800PC型,太原衡天力科贸有限公司;

高压灭菌锅:YXQ-LS-50SII型,上海博讯实业有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 桉树叶总黄酮提取工艺流程

桉树叶清洗→65℃烘干至恒重→粉碎→取2.0g样品用乙醇浸提总黄酮(40℃、功率240W)→减压抽滤→离心(5000 r/min、10 min)→测定上清液吸光度(510 nm)→石油醚脱脂、脱色→旋转蒸发(50℃)→冷冻干燥

1.2.2 芦丁标准曲线的绘制 根据文献[18]并修改:精确称取2.5 mg芦丁标准品溶于25 mL体积分数为90%乙醇溶液中,制得0.1 mg/mL的芦丁储备液。分别吸取芦丁储备液0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL于10 mL容量瓶中,加入0.3 mL质量分数为5%的NaNO₂溶液摇匀并静置6 min;加入0.3 mL质量分数为5%的Al(NO₃)₃溶液摇匀并静置6 min;加入4.0 mL浓度为1 mol/L的NaOH溶液并用体积分数为30%乙醇溶液定容,摇匀,静置15 min。以未加芦丁标准液的反应溶液作为参比溶液,测定510 nm处吸光度;以芦丁质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得 $y = 15.160x + 0.006$, $R^2 = 0.9998$ 。

1.2.3 桉树叶总黄酮提取量的测定 精确吸取1 mL桉树叶提取液,按式(1)计算总黄酮提取量。

$$g = \frac{c \times n}{m}, \quad (1)$$

式中:

g ——总黄酮提取量,mg/g;

c ——总黄酮质量浓度,mg/mL;

n ——稀释倍数;

m ——桉树叶干粉质量,g。

1.2.4 单因素试验

(1) 乙醇体积分数:固定提取时间40 min、料液比($m_{\text{桉树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)1:20(g/mL),探究乙醇体积分数(50%,60%,70%,80%,90%)对总黄酮提取量的影响。

(2) 提取时间:固定乙醇体积分数60%、料液比($m_{\text{桉树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)1:20(g/mL),探究提取时间(20,30,40,50,60 min)对总黄酮提取量的影响。

(3) 料液比:固定乙醇体积分数60%、提取时间40 min,探究料液比[1:10,1:15,1:20,1:25,1:30(g/mL)]对总黄酮提取量的影响。

1.2.5 正交试验 在单因素试验基础上,选取提取时间、乙醇体积分数和料液比为因素进行正交试验设计,以确定桉树叶黄酮的最佳提取工艺。

1.2.6 抗氧化能力

(1) 样品制备:取最优提取工艺下的提取液,加入25 mL石油醚重复萃取3次,以除掉色素与脂溶性物质,旋转蒸发以除掉乙醇和石油醚,冷冻干燥得黄酮类化合物干粉。用体积分数为30%乙醇溶解提纯后的黄酮类化合物干粉,配制成黄酮类化合物质量浓度为0.147 mg/mL的溶液,同时配制总黄酮质量浓度为0.147 mg/mL未除杂的提取液与0.147 mg/mL的抗坏血酸溶液作为对照。

(2) 总还原力测定:根据文献[19]并修改。分别吸取样品液0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL于15 mL离心管中,用蒸馏水将各离心管液体补足至1 mL,复配溶液中黄酮质量浓度依次为0.000,0.029,0.059,0.088,0.118,0.147 mg/mL,依次加入0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.82)2.5 mL,摇匀,加入质量分数为1%的K₃[Fe(CN)₆]溶液2.5 mL,摇匀,50℃水浴20 min,加入体积分数为10%的CCl₃COOH溶液2.5 mL,3000 r/min离心10 min。分别取离心后上清液2.5 mL于10 mL试管中,加入质量分数为0.1%的FeCl₃溶液0.5 mL,定容至10 mL,摇匀,静置15 min。以未加样品液的反应溶液作为参比溶液,测定700 nm处吸光度。

1.2.7 抑菌能力

(1) 桉树叶提取液的制备:取除色脱脂后的黄酮类化合物干粉,用体积分数为30%乙醇溶解,配成黄酮类化合物质量浓度为0.147 mg/mL,同时配制总黄酮质量浓度为0.147 mg/mL的未除杂提取液作为对照。

(2) 菌悬液制备:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒

沙门氏菌经两次活化,菌液用生理盐水稀释,于血球计数板计数,选取菌液浓度为 $(1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6)$ CFU/mL,接种时,将菌液浓度稀释至 10^6 CFU/mL。

(3) 抑菌圈测定:采用牛津杯法^[20]。以体积分数 30%乙醇为空白对照,青霉素为阳性对照。

(4) 最低抑菌浓度:采用二倍稀释法^[21],将柚树叶黄酮类化合物提取液用体积分数 30%乙醇稀释为原液的 100.0%,50.0%,25.0%,12.5% 4 个浓度,观察各提取液浓度下的培养皿是否出现抑菌圈。

1.3 数据处理

运用 SPSS 25.0、Origin 9.5 软件进行数据处理及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对柚树叶黄酮提取量的影响 由图 1 可知,柚树叶总黄酮提取量随乙醇体积分数的增加呈先升高后降低趋势,最高达到 10.24 mg/g。当乙醇体积分数为 50%~80%时,柚树叶总黄酮提取量逐渐升高,可能是随着乙醇体积分数的增加,醇溶性黄酮类化合物加速溶解^[22]。继续增大乙醇体积分数,总黄酮提取量减小,说明乙醇体积分数较大时,溶剂的极性降低,大量的脂溶性和醇溶性成分溶出,黄酮类化合物溶解度降低,从而导致总黄酮提取量减小^[23]。因此,提取柚树叶总黄酮的乙醇体积分数以 80%为宜。

2.1.2 提取时间对柚树叶黄酮提取量的影响 由图 2 可知,总黄酮提取量随提取时间的延长先增加后减少。当提取时间为 20~50 min 时,柚树叶细胞壁逐渐被破坏,黄酮类物质在超声波作用下不断溶出并在 50 min 时全部溶出,故总黄酮提取量逐渐增加^[24];若继续延长提取时间,长时间的超声会使黄酮结构发生破坏或者发生降解使提取率下降^[25]。因此,提取柚树叶总黄酮的提取时间以 50 min 为宜。

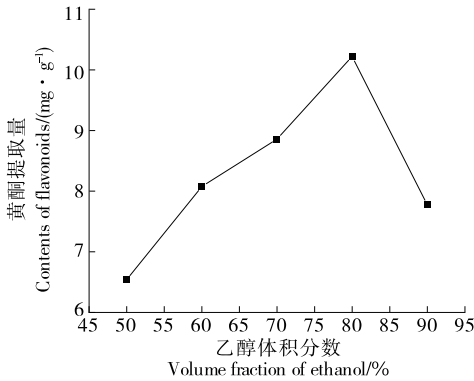


图 1 乙醇体积分数对黄酮提取量的影响
Figure 1 Effect of ethanol concentration on flavonoids extraction

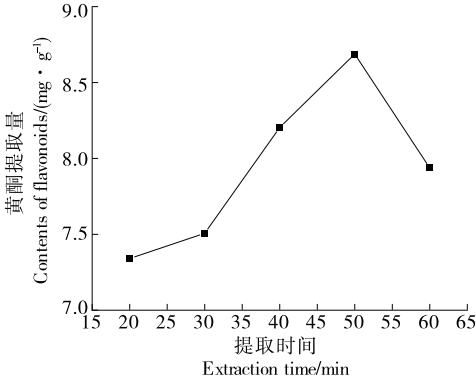


图 2 提取时间对黄酮提取量的影响
Figure 2 Effect of extraction time on flavonoids extraction

2.1.3 料液比对柚树叶黄酮提取量的影响 由图 3 可知,随着料液比的增加,总黄酮提取量不断升高。随着溶剂的增加,柚树叶粉末与溶液更加充分接触,黄酮析出速率加快,黄酮提取量逐渐升高;当料液比($m_{\text{柚树叶}} : V_{\text{乙醇}}$) $< 1 : 20$ (g/mL)时,黄酮提取量显著提高;当料液比($m_{\text{柚树叶}} : V_{\text{乙醇}}$) $> 1 : 20$ (g/mL)时,黄酮提取量不仅增加缓慢,而且会大大增加提取成本^[26]。因此,最佳的料液比($m_{\text{柚树叶}} : V_{\text{乙醇}}$)为 1 : 20 (g/mL)。

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,选取乙醇体积分数、提取时间和料液比为因素,总黄酮提取量为响应值进行三因素三水平正交试验设计。因素水平见表 1,正交试验设计与结果见表 2。

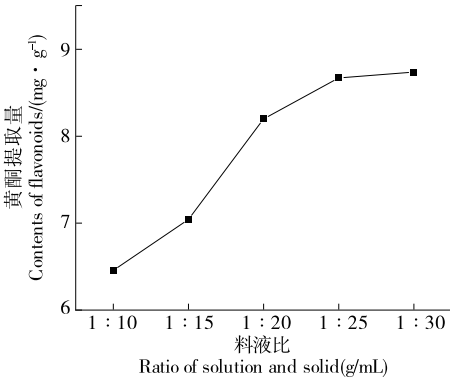


图 3 料液比对黄酮提取量的影响
Figure 3 Effect of solid-liquid ratio on flavonoids extraction

表 1 因素水平表

Table 1 Factors levels table

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/min	C 料液比(g/mL)
1	70	40	1 : 20
2	75	50	1 : 25
3	80	60	1 : 30

由表 2 可知,柚树叶总黄酮提取量的主次因素为乙醇体积分数>提取时间>料液比,最佳提取条件为 $A_3B_3C_2$,即乙醇体积分数 80%、提取时间 50 min、料液比($m_{\text{柚树叶}}:V_{\text{乙醇}}$)1:25 (g/mL)。最佳提取条件下进行 3 次平行试验,测得总黄酮提取量平均值为 11.746 mg/g,高于正交试验中的任一结果,符合最优条件,表明正交试验得出的最佳工艺结果具有可靠性。

2.3 抗氧化能力

由图 4 可知,随着样品液质量浓度的升高,其总还原能力逐渐增强,证明该抗氧化活性的样品与其添加量有良好的量效关系。未除杂的提取液总还原力约是初步除杂样品液的 50%,当样品质量浓度>0.088 mg/mL 时,抗

氧化活性随样品质量浓度的增加逐渐趋于平缓,可能是未除杂的提取液中含有色素及脂类的干扰,降低了其抗氧化活性。而除去色素与脂类的样品液,其总还原力略高于抗坏血酸,约是同等质量浓度抗坏血酸的 1.25 倍。初步除杂后的提取液在高浓度时依然能保持较好的还原能力,若进一步提纯柚树叶黄酮类化合物,其抗氧化能力将会更强。

2.4 抑菌能力

由表 3 可知,柚树叶黄酮类化合物提取液在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌的培养基中均出现了抑菌圈,其对 3 种菌有一定的生长抑制作用。未经除杂的提取液抑菌效果较差,金黄色葡萄球菌表现为中度敏感、大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌表现为低度敏感,但有抑菌圈出现,说明仍有一定抑菌效果。而除掉色素和脂类物质的提取液抑菌效果较好,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出高度敏感,鼠伤寒沙门氏菌表现出中度敏感。3 种细菌对于同等质量浓度的青霉素均表现出高度敏感,

表 2 柚树叶总黄酮提取正交试验设计与结果
Table 2 Results of orthogonal experiment on extraction of total flavonoids from pomelo leaves

试验号	A	B	C	总黄酮提取量/ (mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	8.402
2	1	2	2	9.320
3	1	3	3	9.450
4	2	1	2	10.173
5	2	2	3	10.371
6	2	3	1	10.008
7	3	1	3	11.258
8	3	2	1	11.647
9	3	3	2	11.714
k_1	9.057	9.944	10.019	
k_2	10.184	10.446	10.402	
k_3	11.540	10.391	10.360	
极差 R	2.483	0.502	0.383	

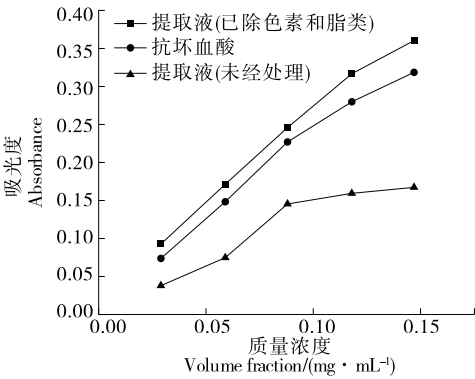


图 4 总还原力测定结果
Figure 4 Measurement result of total reducing power

表 3 柚树叶黄酮类化合物的抑菌效果
Table 3 Antibacterial effect of flavonoids from pomelo leaves

菌株	样品稀释 体积分数/%	抑菌圈直径/mm			
		提取液(未经处理)	提取液(除色素和脂类)	乙醇对照	青霉素
大肠杆菌	100.0	8	16	—	25
	50.0	5	11	—	19
	25.0	—	6	—	12
	12.5	—	—	—	9
金黄色葡萄球菌	100.0	11	19	—	23
	50.0	7	12	—	17
	25.0	5	8	—	12
	12.5	—	5	—	9
鼠伤寒沙门氏菌	100.0	6	12	—	18
	50.0	—	9	—	12
	25.0	—	—	—	10
	12.5	—	—	—	6

在总体抑菌活性上:青霉素>提取液(除色素和脂类)>提取液(未经处理)>体积分数 30%乙醇;桉树叶黄酮提取液的最低抑菌质量浓度(MIC)为 0.074 mg/mL。

3 结论

试验表明,通过正交试验优化的桉树叶总黄酮最佳工艺条件为:乙醇体积分数 80%,超声时间 50 min,料液比($m_{\text{桉树叶}}:V_{\text{乙醇}}$)为 1:25 (g/mL),此条件下总黄酮提取量为 11.746 mg/g。桉树叶总黄酮提取液的质量浓度越大,其总还原力越强,经除去色素、脂类的桉树叶总黄酮提取液的总还原力高于未经处理的提取液和抗坏血酸,是抗坏血酸的 1.25 倍。总黄酮提取液的抑菌效果与其质量浓度呈正相关,其对金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌具有不同程度的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,最低抑菌质量浓度为 0.074 mg/mL。综上,桉树叶总黄酮具有良好的抗氧化和抑菌能力,后续将对其他方面的性质进行进一步研究。

参考文献

- [1] 胡安阳,吕建秋,杜冰.不同干燥方式对柚子皮粉加工特性及功能成分含量的影响[J].食品工业科技,2021,42(5):170-176.
- [2] 牛睿,白鹭.柚子皮多糖提取工艺研究[J].大众标准化,2020(17):143-144.
- [3] LEI Xiu-bing, YANG Yang. Vitexin and an HMG-Co A reductase inhibitor prevent the risks of atherosclerosis in high-fat atherogenic diet fed rats[J]. Journal of King Saud University-Science, 2020, 32(3): 2 088-2 095.
- [4] YANG Shu-fang, ZHANG Hai-sheng, YANG Xing-bin, et al. Evaluation of antioxidative and antitumor activities of extracted flavonoids from Pink Lady apples in human colon and breast cancer cell lines[J]. Food & Function, 2015, 6(12): 3 789-3 798.
- [5] 杨硕,徐元庆,邢媛媛,等.植物源黄酮类化合物对动物免疫和抗氧化功能影响的研究进展[J].动物营养学报,2019,31(7): 2 958-2 964.
- [6] HAO Cui, CHEN Li-zong, DONG Hong-jing, et al. Extraction of flavonoids from scutellariae radix using ultrasound-assisted deep eutectic solvents and evaluation of their anti-inflammatory activities[J]. ACS Omega, 2020, 36(5): 23 140-23 147.
- [7] 张杰,程伟,李娜,等.苦荞营养成分及其黄酮类物质提取工艺研究[J].酿酒,2019,46(5):12-16.
- [8] 何薇,严成,熊雪媛,等.超高压提取核桃分心木总黄酮工艺及动力学模型研究[J].食品工业科技,2017,38(21):186-191.
- [9] 陈义勇,张德谨.乌饭树叶黄酮超声-微波辅助提取工艺的优化[J].食品与机械,2016,32(1):148-153.
- [10] 谭佐祥,孙培松.碱提酸沉法提取水飞蓟中黄酮类物质的研究[J].牡丹江大学学报,2017,26(10):167-170.
- [11] 杜丽娟,苏秀芳,冼金明.蟛蜞菊总黄酮的超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化能力的研究[J].食品研究与开发,2020,41(21):103-108.

- [12] 周旋,许明祥,蔡文卓,等.女贞子总黄酮超声辅助提取工艺及体外抗氧化活性研究[J].食品与机械,2019,35(3):182-188.
- [13] LUIS Carrillo-hormaza, LUISA Duque, EDISON Osorio, et al. High-intensity ultrasound-assisted extraction of Garcinia madruno biflavonoids: Mechanism, kinetics, and productivity [J]. Biochemical Engineering Journal, 2020, 161(9): 107676.
- [14] 郭刚军,李海泉,徐荣,等.超临界 CO₂萃取柚子叶、花精油的 GC-MS 分析[J].食品与发酵工业,2013,39(3):192-195.
- [15] 黄桂萍,王青豪,钟平.桉树叶中提取香精油的新方法——微波辐射法的研究[J].江西林业科技,2007(1):34-35,41.
- [16] TAN Phat-dao, THIEN Hien-tran, DUY Trinh-nguyen, et al. Application of response surface methodology for the optimization of essential oils from pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) leaves using microwave-assisted hydrodistillation method[J]. Asian Journal of Chemistry, 2019, 31(8): 1 639-1 642.
- [17] 周梦春,苏智先,胡进耀,等.三种柚叶悬浮培养愈伤组织黄酮类有效成分的比较研究[J].绵阳师范学院学报,2009,28(2):51-55.
- [18] 李利华.正交实验法优选丁香总黄酮的超声波辅助提取工艺[J].中国调味品,2018,43(5):164-167.
- [19] 王海茹,王雪飞,姚晶.黄柏花粉多糖除蛋白方法比较及其对抗氧化功能的影响[J].食品科技,2015,40(5):224-228.
- [20] CHENG Liu-jun, LIU Qiong-qiong, LEI Yu-feng, et al. The synthesis and characterization of carboxybetaine functionalized polysiloxanes for the preparation of anti-fouling surfaces [J]. RSC Adv, 2014, 97(4): 54 372-54 381.
- [21] 潘立卫,罗泽萍,陈俏燕.臭牡丹叶化学成分及提取物抑菌作用研究[J].大众科技,2018,20(10):18-20.
- [22] 朱新鹏,陈芳,秦绒,等.拐枣总黄酮超声波辅助提取工艺优化[J].包装与食品机械,2020,38(3):22-27.
- [23] 许建本,苏秀芳,莫耀芳.超声波辅助法提取假苹婆树叶总黄酮及其清除羟自由基能力[J].食品工业科技,2018,39(23):199-202,209.
- [24] 许建本,苏秀芳,黄妹胶.黄花草总黄酮超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2020,36(2):176-181.
- [25] 陈婷,徐文斌,洪怡蓝,等.响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(18):52-57.
- [26] 沙玉欢,习俞,朱增芳,等.超声波辅助碱液提取核桃分心木黄酮及其抗氧化活性的研究[J].农产品加工,2020(18):25-31.