

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90079

细叶黄皮根总黄酮提取工艺优化及抑菌活性研究

Study on optimization of extraction technology and antibacterial activity
of total flavonoids from the root of *Clausena anisum-olens*

许丹妮 苏秀芳 黄丽娟

XU Dan-ni SU Xiu-fang HUANG Li-juan

(广西民族师范学院化学与生物工程学院, 广西 崇左 532200)

(College of Chemical and Biological Engineering, Guangxi Normal University
for Nationalities, Chongzuo, Guangxi 532200, China)

摘要:目的:优化细叶黄皮根总黄酮的提取工艺,并测定不同产地细叶黄皮根总黄酮得率及其抑菌作用。方法:以细叶黄皮根为原料,采用超声波法提取总黄酮物质,通过单因素与正交试验,进行各产地细叶黄皮根总黄酮的提取及抑菌试验。结果:提取细叶黄皮根总黄酮最佳工艺为:温度 70 ℃,超声功率 50 W,乙醇体积分数 90%,料液比 1:16 (g/mL),提取时间 40 min,此条件下细叶黄皮根总黄酮得率为 3.361%;崇左市区细叶黄皮根总黄酮得率最高达 4.781%;细叶黄皮根总黄酮对绿脓杆菌、金色葡萄球菌、枯草杆菌、杀螟杆菌及大肠杆菌均有抑制作用,而且作用较强。结论:采用超声波法提取细叶黄皮根总黄酮较为适宜,不同产地细叶黄皮根总黄酮的得率差异较大,其总黄酮具有广谱的抑菌活性。

关键词:细叶黄皮;总黄酮;超声辅助法;工艺优化;抑菌作用

Abstract: Objective: This study aimed to optimize the optimal extraction process of total flavonoids from the root of *Clausena anisum-olens* and determine the yield and antibacterial effect of total flavonoids from different producing areas. **Methods:** The total flavonoids were extracted by ultrasonic method from the roots of *C. anisum-olens*. Through single factor and orthogonal test, the effect of ultrasonic assisted extraction conditions on the extraction rate of total flavonoids from the root of *C. anisum-olens* was investigated, and the extraction and antibacterial test of total fla-

vonoids from various producing areas were carried out. **Results:** The optimum extraction process of total flavonoids from *C. anisum-olens* was as follows: temperature 70 ℃, ultrasonic power 50 W, ethanol concentration 90%, solid-liquid ratio 1:16 (g/mL), extraction time 40 min. Under the control of these conditions, the extraction rate of total flavonoids was 3.361%, and the yield of total flavonoids in the root bark of *C. anisum-olens* in Chongzuo city was the highest, up to 4.781%; the total flavonoids of *C. anisum-olens* had strong inhibitory effects on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, borer killing bacteria and *Escherichia coli*, indicating that it had broad-spectrum antibacterial activity. **Conclusion:** Ultrasonic method was suitable for the extraction of flavonoids from the root of *C. anisum-olens*. The yield of flavonoids from different producing areas varied greatly, and the total flavonoids had broad spectrum antibacterial activity.

Keywords: *Clausena anisum-olens*; total flavonoids; ultrasonic assisted method; process optimization; bacteriostasis

细叶黄皮 [*Clausena anisum-olens* (Blanco.) Merr] 为芸香科黄皮属植物。据报道,细叶黄皮植物含有香豆素^[1]、黄酮类^[2]、挥发性成分^[3]等,其中黄酮类成分含量较高。苏秀芳等^[4-5]分别从细叶黄皮果仁、叶提取总黄酮,并测定其清除羟自由基活性,表明总黄酮具有较强的清除羟自由基的能力。另外,苏秀芳等^[6]研究发现,细叶黄皮茎皮乙醇提取物具有广谱的抑菌活性。

为进一步考察细叶黄皮其他部位总黄酮含量,以及不同产地细叶黄皮总黄酮含量及抑菌情况,研究拟优化细叶黄皮根总黄酮的超声辅助提取工艺,并对广西崇左市不同地区细叶黄皮根提取物的抑菌活性进行测定,以期细叶黄皮资源的开发提供参考。

基金项目:崇左市科技计划项目(编号:崇科 FA2020021);广西民族师范学院服务地方经济社会发展专项项目(编号:2019FW002)

作者简介:许丹妮,女,广西民族师范学院副教授,硕士。

通信作者:苏秀芳(1971—),女,广西民族师范学院教授,硕士。
E-mail:541252161@qq.com

收稿日期:2021-10-09

1 材料与方法

1.1 仪器

紫外可见分光光度计:UV-1601 型,北京瑞利分析仪器有限公司;

超声波清洗器:SG2200HPT 型,上海冠特超声仪器有限公司;

立式电热压力蒸汽灭菌器:LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂;

隔水式恒温培养箱:GNP-9270 型,上海精寄宏实验设备有限公司。

1.2 材料

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*):广东微生物研究所;

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、杀螟杆菌(*Bacillus cereus*):广西大学农学院;

芦丁:生化试剂,上海晶纯试剂有限公司;

琼脂粉、牛肉膏、蛋白胨:广东环凯微生物有限公司。

1.3 样品

细叶黄皮于 2020 年 5 月采摘于崇左市郊区、扶绥县东门镇、宁明县亭亮乡、龙州县响水镇、天等县东平乡、大新县雷平镇,经该院植物分类学黄秋婵教授鉴定为 *Clausena anisum-olens*。取各产地细叶黄皮根烘干,粉碎,过 60 目筛备用。

1.4 方法

1.4.1 标准品溶液的制备 准确称取芦丁标准品 12.50 mg,用 60%乙醇溶解并定容,配制成本芦丁标准液 0.250 0 g/L。

1.4.2 测定波长的选择 取 1 mL 芦丁标准品溶液,用 5% NaNO_2 水溶液 0.4 mL 溶解,放置 6 min,再用 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液 0.4 mL 溶解,放置 6 min,最后用 4% NaOH 水溶液 4.0 mL 溶解并定容,室温放置 15 min 后,用 400~600 nm 范围扫描最大吸收波长,结果在 510 nm 处有最大吸收峰,以 510 nm 作为测定波长。

1.4.3 标准曲线的绘制 取 5 只比色管,分别准确吸取 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25 mL 芦丁标准品溶液,其他步骤同 1.4.2,以试剂空白为对照,测定样品的吸光度。以芦丁质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A = 9.4857\rho - 0.0031$, $R^2 = 0.9996$,在考察范围内呈良好的线性关系。

1.4.4 单因素试验 以细叶黄皮根总黄酮得率为考察指标,大新县雷平镇细叶黄皮根为原料通过超声辅助提取法探讨不同提取条件对总黄酮得率的影响。

(1) 温度对总黄酮得率的影响:称取物料 1.000 g,加 60%乙醇 20 mL,设定功率 50 W,超声提取 20 min,滤纸过滤,定容至 50 mL,准确吸取 1 mL 样品按 1.4.3 处理,测定吸光度后计算总黄酮得率。探讨温度为 30,40,50,

60,70,80 °C 对细叶黄皮根总黄酮得率的影响。

(2) 超声功率对总黄酮得率的影响:称取物料 1.000 g,加 60%乙醇 20 mL,分别设定超声功率 40,50,60,70,80 W,超声提取 20 min,过滤,定容,准确吸取 1 mL 样品按 1.4.3 处理,测定吸光度后计算总黄酮得率。

(3) 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响:称取物料 1.000 g,温度 70 °C,功率 60 W,设定乙醇体积分数为 40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,分别量取 20 mL,提取 20 min,过滤,定容,准确吸取 1 mL 样品按 1.4.3 处理,测定吸光度后计算总黄酮得率。

(4) 液料比对总黄酮得率的影响:称取物料 1.000 g,设定温度 70 °C,功率 60 W,乙醇体积分数 90%,改变液料比 1:8,1:12,1:16,1:20,1:24,1:28 (g/mL),提取 20 min,过滤,定容,准确吸取 1 mL 样品按 1.4.3 处理,测定吸光度后计算总黄酮提取率。

(5) 提取时间对总黄酮得率的影响:称取物料 1.000 g,设定温度 70 °C,功率 60 W,乙醇体积分数 90%,液料比 1:24 (g/mL),改变提取时间为 20,30,40,50,60,70 min,过滤,定容,准确吸取 1 mL 样品按 1.4.3 处理,测定吸光度后计算总黄酮得率。

1.4.5 正交试验 根据单因素试验结果,选取 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验设计,优化提取工艺并进行重复性验证实验,以最佳工艺条件测定不同产地细叶黄皮根总黄酮得率。

1.4.6 抑菌试验

(1) 抑菌受试液的制备:分别取崇左市 6 个不同产地的细叶黄皮根总黄酮,配制成一定浓度受试液。

(2) 菌液的制备:用供试菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,在约 37 °C 摇床活化 18 h,用 10 倍稀释法稀释菌悬液并进行活菌计数,使最佳菌悬液浓度约为 10^6 CFU/mL。

(3) 倾注平板法测定抑菌效果:根据文献[7]修改如下,用移液枪吸取受试液各 2 mL,分别放于直径约 9 cm 的无菌空培养皿内,加入预先融化冷却好的琼脂培养基,混匀;移取配置好的菌液 100 μL ,放入相应的培养皿中,均匀涂布,于 37~39 °C 恒温培养,24 h 后观察结果,量出抑菌圈。

1.5 数据分析

试验数据均为 3 个平行样的均值,采用 Excel 2010 处理数据、绘图并进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 温度对细叶黄皮根总黄酮得率的影响 由图 1 可知,细叶黄皮根总黄酮得率在 30~60 °C 时呈平缓上升趋势,温度为 70 °C 时总黄酮得率最大,随后出现下降,推测随着温度的增加,分子运动速率增加,加速了黄酮类成分

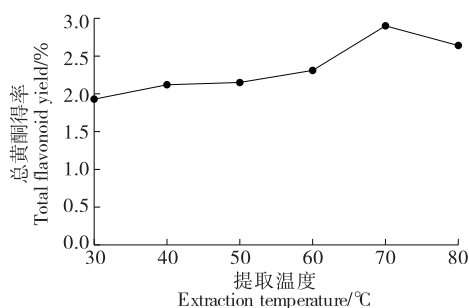


图 1 温度对总黄酮得率的影响

Figure 1 Effect of temperature on extraction rate of total flavonoids

向细胞外的溶出^[8]。因此最佳提取温度为 70 ℃。

2.1.2 超声功率对细叶黄皮根总黄酮得率的影响 由图 2 可知,在超声功率为 50 W 时细叶黄皮根总黄酮得率达到最大值,而后逐渐下降,可能是由于受到“空化作用”^[9]的影响,某些黄酮类物质结构受到破坏,因而影响总黄酮得率。因此最佳提取功率为 50 W。

2.1.3 乙醇体积分数对细叶黄皮根总黄酮得率的影响

由图 3 可知,细叶黄皮根总黄酮得率随乙醇体积分数的增加呈先升高后降低的趋势,当乙醇体积分数为 90% 时得率最高,达 3.1%。这可能是随着乙醇体积分数的增加,有其他杂质溶出并与乙醇—水分子结合,导致总

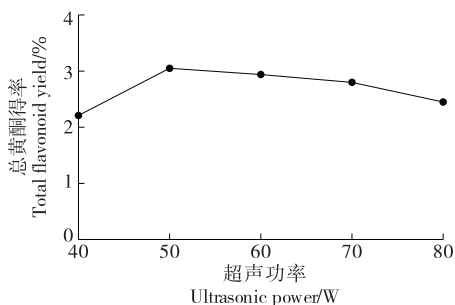


图 2 超声功率对总黄酮得率的影响

Figure 2 Effect of different ultrasonic power on the extraction rate of total flavonoids

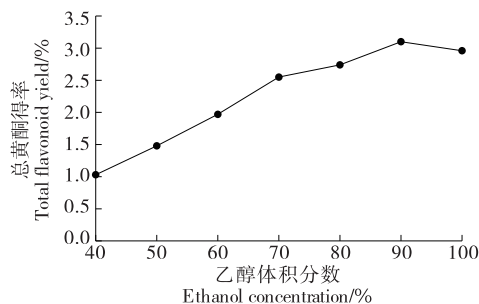


图 3 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Figure 3 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids

黄酮得率降低^[10]。因此最佳提取的乙醇体积分数为 90%。

2.1.4 料液比对细叶黄皮根总黄酮得率的影响 由图 4 可知,细叶黄皮根总黄酮得率在料液比为 1:24 (g/mL) 时达到最大值 3.12%,推测溶剂量增加,在超声作用下料液之间混合较充分,同时使植物细胞破裂,溶剂迅速进入细胞内,促使黄酮类化合物不断溶出,直至达到饱和。因此最佳提取的料液比为 1:24 (g/mL)。

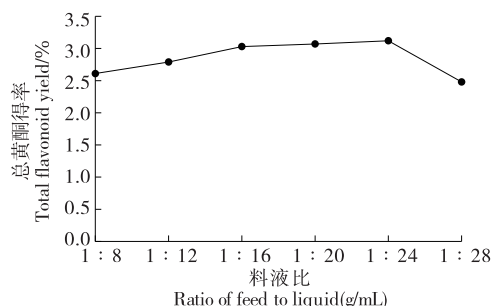


图 4 料液比对总黄酮得率的影响

Figure 4 Effect of liquid material ratio on extraction rate of total flavonoids

2.1.5 提取时间对细叶黄皮根总黄酮得率的影响 由图 5 可知,细叶黄皮根总黄酮得率随提取时间的增加先增加后降低并趋于平缓,当提取时间为 40 min 时得率达到最大值,为 3.17%。推测在合适的提取时间范围,超声波能促进总黄酮类成分的溶出,而随提取时间的延长,总黄酮类成分溶出完全,同时有可能溶出的黄酮类化合物反而被超声所破坏,导致总黄酮得率下降^[11]。因此最佳提取时间为 40 min。

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验因素 正交试验因素水平设计见表 1,试验结果与极差分析见表 2,方差分析结果见表 3。

由表 2 和表 3 可知,细叶黄皮根总黄酮得率的主次影响因素为料液比>超声功率>提取时间>乙醇体积分数(C>B>D>A),其中料液比、超声功率对总黄酮得率

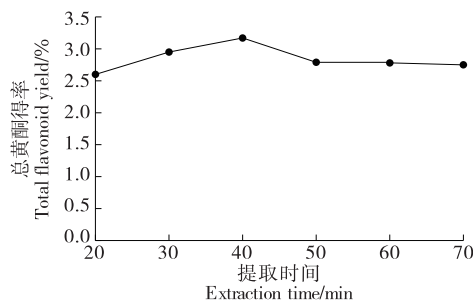


图 5 提取时间对总黄酮得率的影响

Figure 5 Effect of extraction time on extraction rate of total flavonoids

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Level table of orthogonal test factors

水平	A 乙醇体 积分数/%	B 超声 功率/W	C 料液比 (g/mL)	D 提取 时间/min
1	80	50	1 : 16	30
2	90	60	1 : 20	40
3	100	70	1 : 24	50

表 2 试验结果与极差分析
Table 2 Test result and range analysis

实验号	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	1	1	1	1	2.938
2	1	2	2	2	2.763
3	1	3	3	3	2.558
4	2	1	2	3	2.230
5	2	2	3	1	2.959
6	2	3	1	2	3.274
7	3	1	3	2	2.537
8	3	2	1	3	3.295
9	3	3	2	1	2.500
k_1	2.753	2.568	3.169	2.799	
k_2	2.821	3.005	2.498	2.858	
k_3	2.777	2.777	2.685	2.694	
R	0.068	0.437	0.671	0.164	

表 3 方差分析结果[†]
Table 3 The results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	0.007 1	2	0.003 6	1.000 0	
B	0.286 8	2	0.143 4	40.127 2	*
C	0.719 9	2	0.360 0	100.722 5	**
D	0.041 1	2	0.020 5	5.747 8	

[†] * 表示影响显著($P<0.05$); ** 表示影响极显著($P<0.01$)。

具有显著性影响;最佳提取工艺条件为 $A_2B_2C_1D_2$,即乙醇体积分数 90%,超声功率 50 W,料液比 1 : 16 (g/mL),提取时间 40 min。

2.2.2 验证实验 准确称取 3 份试样,按最佳提取工艺条件提取,总黄酮得率分别为 3.346%,3.380%,3.356%,平均值为 3.361%,表明此工艺重复性好,具有可行性。

2.3 不同产地细叶黄皮根提取物得率比较

称取各个产地的细叶黄皮根 1.000 g,按最佳提取工艺提取,结果见表 4。由表 4 可知,崇左市区细叶黄皮根皮提取总黄酮得率最高,其次是大新县雷平镇。

2.4 不同产地细叶黄皮根提取物抑菌活性比较

取不同产地细叶黄皮根提取物,低温回收溶剂后,低温烘干后加入二甲亚砜(经试验表明其对供试菌无抑制作用),配成质量浓度 100 mg/mL,为受试液,进行抑菌试验,结果见表 5。

表 4 不同产地总黄酮的得率
Table 4 Content of the total flavonoids in
defferent areas

产地	部位	总黄酮得率/%
崇左市区	根皮	4.781
大新县雷平镇	根	3.361
扶绥县东门镇	根皮	1.861
龙州县响水镇	根	0.918
宁明县亭亮乡	根	0.865
天等县东平乡	根	0.965

表 5 不同产地细叶黄皮总黄酮抑菌圈直径
Table 5 Diameter of inhibition zone of total flavonoids in
Clausena anisum-olens from different producing
areas mm

产地	绿脓 杆菌	金色葡 萄球菌	枯草 杆菌	杀螟 杆菌	大肠 杆菌
崇左市区	14.0	13.5	13.3	12.0	13.0
大新县雷平镇	13.2	12.8	12.0	13.0	13.5
扶绥县东门镇	12.2	11.3	11.8	10.9	11.4
龙州县响水镇	11.0	10.5	11.5	10.0	10.0
宁明县亭亮乡	11.5	9.0	11.0	10.5	9.5
天等县东平乡	11.0	8.8	10.0	9.5	9.2

由表 5 可知:不同产地细叶黄皮根提取物对 5 种菌均有一定的抑制作用,不同产地提取物的抑菌效果不同,但同一产地的提取物对 5 种菌的抑制效果差异不明显。整体分析 6 个产地中崇左市区、大新县雷平镇细叶黄皮根提取物抑菌作用相对较强,次之为龙州县响水镇,天等县东平乡、宁明细叶黄皮提取物抑菌效果相对较弱。其原因可能是不同产地细叶黄皮根提取物的总黄酮含量不同,影响了其对 5 种试验菌的抑制作用。

3 结论

通过超声辅助提取细叶黄皮根总黄酮得率为 3.361%,不同产地细叶黄皮根总黄酮提取得率有差异,崇左市区细叶黄皮根皮总黄酮得率达 4.781%,其次是大新县雷平镇总黄酮得率为 3.361%,超声波辅助提取法简便、省时,适合用于细叶黄皮根总黄酮的提取,推测不同产地,不同土壤、不同气候环境对细叶黄皮根总黄酮得率有一定的影响,而不同产地细叶黄皮根或根皮总黄酮对

杆菌类(绿脓、枯草、杀螟、大肠)及金色葡萄球菌均有抑制作用,抑菌广谱,且不同产地抑菌效果不同。综合分析,细叶黄皮利用价值高,应对各产地相同部位的有效成分及生物活性等进一步深入研究,筛选出最佳的产地并进行大量种植,使其在食品行业中发挥更广的作用。

参考文献

- [1] 汪云松, 沈月毛, 何红平. 河口细叶黄皮化学成分研究[J]. 有机化学, 2003, 23(增刊): 144.
WANG Yun-song, SHEN Yue-mao, HE Hong-ping. Study on chemical constituents of estuarine *Clausena anisum-olens* leaves[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2003, 23(Suppl): 144.
- [2] WANG Y S, HUANG R, LI N Z, et al. Coumarins from *Clausen-olens* Merr[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(7): 100143-1-2.
- [3] 苏秀芳, 梁振益. 山黄皮茎根挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用法分析[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1 540-1 542.
SU Xiu-fang, LIANG Zhen-yi. Analysis of chemical constituents of volatile oil from stems and roots of *Clausena anisumolens* (Blanco) Merr by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(6): 1 540-1 542.
- [4] 苏秀芳, 甘海妹, 黄智想. 微波辅助法提取细叶黄皮果仁总黄酮及其清除羟自由基活性的测定[J]. 精细化工, 2010, 27(12): 44-47.
SU Xiu-fang, GAN Hai-mei, HUANG Zhi-xiang. Microwave assisted extraction of total flavonoids from *Clausena anisum-olens* and determination of its hydroxyl radical scavenging activity[J]. Fine Chemicals, 2010, 27(12): 44-47.
- [5] 苏秀芳, 郭青, 甘海妹, 等. 超声波辅助法提取细叶黄皮叶总黄酮及其清除羟自由基活性的测定[J]. 化学世界, 2011, 52(7): 420-422, 431.
SU Xiu-fang, GUO Qing, GAN Hai-mei, et al. Ultrasonic assisted extraction technology and hydroxy radical scavenging activity of total flavonoids from the leaves of *Clausena anisum-olens* [J]. Chemical World, 2011, 52(7): 420-422, 431.
- [6] 苏秀芳, 韦良兴, 黄丽娟, 等. 细叶黄皮树茎皮乙醇提取物、挥发油的抑菌作用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(13): 2 668-2 670.
SU Xiu-fang, WEI Liang-xing, HUANG Li-juan, et al. Antimicrobial activity of ethanol extracts and volatile oil from the bark of *Clausena anisum-olens* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 50(13): 2 668-2 670.
- [7] 苏秀芳, 黄丽娟, 冯佩珍. 细叶黄皮果仁挥发油成分及抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 30-32.
SU Xiu-fang, HUANG Li-juan, FENG Pei-zhen. Chemical composition analysis and antimicrobial activity of volatile oil from the nuts of *Clausena anisum-olens* [J]. Food Science, 2011, 32(3): 30-32.
- [8] 田春莲, 蒋凤开. 茜草总黄酮提取工艺研究[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 60-63.
TIAN Chun-lian, JIANG Feng-kai. Optimization of extraction process for total flavonoids from madder root [J]. Food Science, 2011, 32(24): 60-63.
- [9] 杜丽娟, 苏秀芳, 黄成银. 余甘子叶总黄酮的超声波法提取工艺优化及其抗氧化能力研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 185-189, 193.
DU Li-juan, SU Xiu-fang, HUANG Cheng-yin. Optimization of ultrasonic extraction technology of flavonoids from leaves of *Phyllanthus emblica* and its antioxidant capacity [J]. Food & Machinery, 2020, 36(3): 185-189, 193.
- [10] 吴树国, 陈果. 猪毛菜中黄酮提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(13): 2 815-2 817.
WU Shu-guo, CHEN Guo. Optimization of extraction technology of Flavonoids from *Salsola collina* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 51(13): 2 815-2 817.
- [11] 逯家辉, 姜鑫, 李昊龙, 等. 应用响应面法优化超声波法提取甘草中总黄酮的工艺[J]. 吉林大学学报(工学版), 2008, 38(增刊): 293-298.
YUN Jia-hui, JIANG Xin, LI Hao-long, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of general flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis* using the response surface method [J]. Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition), 2008, 38 (Suppl): 293-298.

(上接第 105 页)

- [28] 曹忠, 李文锋, 彭与煜, 等. 基于低功耗蓝牙传输的电位型嵌入式无线传感监测系统的研制[J]. 分析化学, 2019, 47(2): 229-236.
CAO Zhong, LI Wen-feng, PENG Yu-yu, et al. Design and fabrication of embedded wireless monitoring system based on bluetooth low energy transmission for potentiometric sensors [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(2): 229-236.
- [29] YI H C, GE L, LISAK G. Highly reproducible solid contact ion selective electrodes: Emerging opportunities for potentiometry: A review[J]. Analytica Chimica Acta, 2021(282): 338304.
- [30] JIANG T, YIN B, LIU X, et al. Porous carbon-based robust, durable, and flexible electrochemical device for K^+ detection in sweat[J]. Analyst, 2022, 147(6): 1 144-1 151.

- [31] ZHANG Z, PAPAUTSKY I. Miniature ion-selective electrodes with mesoporous carbon black as solid contact[J]. Electroanalysis, 2021, 33(10): 2 143-2 151.
- [32] 全国烟草标准化技术委员会. 卷烟纸中钾、钠、钙、镁的测定火焰原子吸收光谱法: YC/T 274—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-5.
National Technical Committee for Tobacco Standardization. Determination of potassium, sodium, calcium, magnesium in cigarette paper with flame atomic absorption spectrometry: YC/T 274—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 1-5.