

草木犀香豆素的提取工艺及抑菌活性研究

丛建民, 陈凤清*, 野俊双, 丁淑旺, 王 婷, 王 平, 孙春玲*

白城师范学院, 白城 137000

摘要: 本研究提取草木犀中四种主要香豆素类物质。以草木犀为原料, 从颗粒大小、料液比、提取剂(乙醇)浓度、温度、时间方面进行超声提取单因素实验和正交实验, 确定最佳的提取工艺。并对所提取的香豆素进行了细菌抑菌实验。实验结果显示单因素与正交实验优化提取工艺后, 提取粗品中补骨脂素为 721.92 mg/kg, 香豆素为 425.88 mg/kg, 欧前胡素为 165.73 mg/kg, 异欧前胡素为 182.49 mg/kg。在 5% NaHCO₃ 和 1% NaOH 最佳浓度下提纯, 得到补骨脂素为 613.63 mg/kg, 香豆素为 362.00 mg/kg, 欧前胡素为 140.87 mg/kg, 异欧前胡素为 155.12 mg/kg。香豆素 10 倍和 50 倍稀释液对细菌有抑制作用。

关键词: 草木犀; 香豆素; 提取工艺; 抑菌

中图分类号: R931.4

文献标识码: A

Extraction and Antibacterial Activity of Coumarin from *Melilotus officinalis*

CONG Jian-min, CHEN Feng-qing*, YE Jun-shuang, DING Shu-wang, WANG Ting, WANG Ping, SUN Chun-ling*

Baicheng Normal University, Jilin Baicheng, 137000, China

Abstract: In this study, four coumarins were extracted from *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. The optimal extraction conditions were established through the optimization of particle size of *M. officinalis*, ratio of material to liquid, ethanol concentration, extraction temperature and extraction time by single factor and orthogonal experiments. In addition, the antibacterial activity of the coumarin extract was investigated. Using the optimized extraction conditions, 721.92 mg of psoralen, 425.88 mg of coumarin, 165.73 mg of imepratorin and 182.49 mg of isoimperatorin were extracted from per kilogram of crude *M. officinalis*. The crude extract was applied for further purification. Finally, 613.63 mg of psoralen, 362.00 mg of coumarin, 140.87 mg of imepratorin and 155.12 mg of isoimperatorin were obtained from per kilogram of crude *M. officinalis*. The 10-fold and 50-fold diluted coumarin solution showed inhibitory effect on bacteria.

Key words: *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall; coumarin; extraction technology; antibacterial

草木犀 [*Melilotus officinalis* (Linn.) Pall] 俗名叫野苜蓿, 为豆科 (*Leguminosae*) 木犀属 (*Melilotas* Mill), 一年生或多年生草本植物。在我国分布范围广, 松嫩平原地带生长很多。性味苦, 凉。其重要价值药用成分是香豆素 (Coumarin) 及其香豆素类化合物, 具有抗菌消炎、解热镇痛、减慢心率等作用, 用于脾脏病、绞肠痧、白喉、乳蛾等病症^[1]。由于草木犀具有多种用途和植株抗逆性强、产量高的特点, 被誉为“宝贝草”, 我国《藏药标准》和《上海市药材标准》有所记载。目前国内已有香豆素含量测定^[2]、香豆素纯化分离^[3]、香豆素抑菌^[4]、香豆素药用价值^[5]的相关报道。本实验对吉林省西部种植的草

木犀经单因素及正交实验优化香豆素提取工艺, 测定经最优提取工艺提取得到的补骨脂素、香豆素、欧前胡素、异欧前胡素的含量^[6], 并进行抑菌实验研究, 以期为草木犀的综合开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2010 年在白城师范学院实验田采取草木犀地上植株, 经白城师范学院初敬华教授鉴定为草木犀 (*Melilotus officinalis*)。室内阴干, 粉碎后, 筛选不同颗粒粉末备用。标品补骨脂素 (66-97-7)、香豆素 (91-64-5)、欧前胡素 (482-44-0)、异欧前胡素 (482-45-1) 购于上海源叶生物科技有限公司; 药敏片 (红霉素、复方新诺明、阿米卡星、氨苄青霉素、环丙沙星、氟哌酸、氯霉素等) 北京太平洋药业有限公司; 其他试剂为分析纯。

收稿日期: 2013-03-19 接受日期: 2013-11-05

基金项目: 吉林省科技支撑计划重点项目 (20100903); 吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目 (吉教科合字 2010-387); 吉林省科技厅重点科技攻关项目 (20130206027NY)

* 通讯作者 Tel: 86-436-3555045; E-mail: 807678724@qq.com

1.2 实验方法

1.2.1 香豆素标准曲线的制作

参照张海峰等^[4]方法,用无水乙醇溶解精密称取的香豆素标准品,配制成 10 mg/mL 的标准液,稀释 100 倍。取适量进行扫描波长、确定各标品紫外下最适宜波长。精密吸取上述对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL 分别置于 10 mL 棕色量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液,在适宜波长下,测定不同浓度标准液吸光值,制备浓度与吸光值标准曲线。

1.2.2 草木犀中香豆素的提取纯化工艺

草木犀茎叶除杂后粉碎成颗粒,用乙醇溶液超声浸提,回收醇提液,旋转回收乙醇,将浸膏水溶后得到粗提物,用乙酸乙酯萃取,NaHCO₃ 和 NaOH 溶液调整 pH,回收乙酸乙酯相,得到香豆素类内酯组分,挥发乙酸乙酯后得到干品,低温保存。

1.2.3 提取工艺单因素实验

1.2.3.1 提取剂浓度确定

分别称取颗粒为 0.5~0.63 mm 草木犀粉末 5 g,置于烧杯中。按料液比为 1:20(g/mL) 分别加入浓度为 65%、70%、75%、80%、85%、90% 乙醇,在 60℃ 水浴中超声提取 20 min 后,抽滤。提取两次后合并上清液,即为草木犀香豆素粗提物。将上清液定容 200 mL,用紫外分光光度计测定 A₂₉₀、A₂₉₅、A₃₀₀、A₃₀₅。样本做三个重复(下同)。

1.2.3.2 提取温度的确定

方法同上,结合 1.2.3.1 结果,在 55、60、65、70、75、80℃ 下,水浴超声提取。

1.2.3.3 提取时间的确定

方法同上,结合 1.2.3.2 结果,分别超声提取 15、20、25、30、35、40 min。

1.2.3.4 草木犀颗粒细度的确定

方法同上,结合 1.2.3.3 结果,称取颗粒孔径为 0.075~0.25、0.25~0.5、0.5~0.63、0.63~1、>1 mm 草木犀粉末,超声提取。

1.2.3.5 料液比的确定

方法同上,结合 1.2.3.4 结果,按照料液比(g/mL)为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 超声提取。

1.2.4 草木犀香豆素提取工艺正交实验

在单因素实验基础上,以乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间四因素对草木犀香豆素提取工艺进一步优化,以吸光值为指标,拟通过 L₉(3⁴) 正交

实验来确定最佳的提取条件。正交实验因素水平表见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A 乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	B 温度 Temperature (℃)	C 料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	D 时间 Time (min)
1	75	65	1:20	30
2	80	70	1:25	35
3	85	75	1:30	40

方法同单因素实验,超声提取香豆素液,定容 200 mL,取少量稀释 100 倍,用紫外分光光度计测定 A₂₉₀、A₂₉₅、A₃₀₀、A₃₀₅。

1.3 香豆素的抑菌实验

采用圆滤纸片法研究香豆素对细菌抑菌效果^[4]。细菌由本实验室从土壤中分离传代而来。将香豆素干品用 35% 乙醇分别做 10 倍、50 倍稀释,将滤纸片在样液中浸泡 20 min。菌种制作成菌悬液,涂平板。以药敏片为阳性对照,灭菌水、35% 乙醇阴性对照。培养 3~5 d 后观察、拍照,记录结果。

2 实验结果

2.1 标准曲线

扫描各标品溶液波长,在适宜波长下制作标准曲线,得各标品最大吸收波长及回归方程:

C(补骨脂素浓度) = 11.957A₂₉₀ - 0.5256 (μg/kg), r = 0.9968,说明 C 与 A₂₉₀ 线性关系良好;

C(香豆素浓度) = 24.297A₂₉₅ - 0.4318 (μg/kg), r = 0.9970,说明 C 与 A₂₉₅ 线性关系良好;

C(欧前胡素浓度) = 15.667A₃₀₀ - 0.0794 (μg/kg), r = 0.9989,说明 C 与 A₃₀₀ 线性关系良好;

C(异欧前胡素浓度) = 18.96A₃₀₅ - 0.1648 (μg/kg), r = 0.9996,说明 C 与 A₃₀₅ 线性关系良好。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇浓度对吸光值的影响

由图 1 可见,不同乙醇浓度对香豆素提取率影响不同,乙醇浓度为 90% 时,吸光值最大,对香豆素的提取率最高;相比之下 85% 乙醇对香豆素的提取量的影响与 90% 乙醇提取效率最接近。乙醇浓度越高,挥发性越大。综合考虑,选取 85% 乙醇为最佳提取浓度。

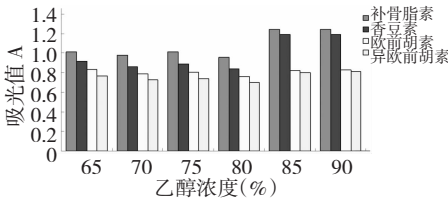


图1 不同乙醇浓度的对香豆素得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction yield of coumarin

2.2.2 提取温度对吸光值的影响

由图2可见,温度对香豆素得率有一定影响。在55~70℃之间,随着温度的升高,吸光值呈现升高,而在70~80℃之间,提取率呈现降低的趋势。在70℃时吸光值最大,香豆素的得率最高,故选取70℃为最佳提取温度。

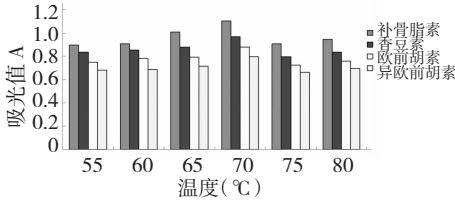


图2 提取温度对香豆素得率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on extraction yield of coumarin

2.2.3 提取时间对吸光值的影响

图3为不同提取时间对香豆素得率的影响。由图3可见,随着时间的延长得率逐渐增大。提取时

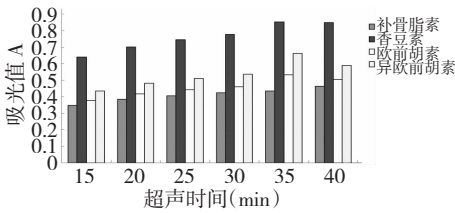


图3 不同提取时间对香豆素得率的影响

Fig. 3 Effect of time on extraction yield of coumarin

间为35、40 min时,得率最大,故确定35 min为香豆素的最佳提取时间。

2.2.4 颗粒细度对吸光值的影响

通过图4可明显看出,材料的不同颗粒细度对香豆素提取率有非常明显的影响。颗粒的越小,香豆素得率越高。颗粒大小为0.075~0.25 mm时提取率最大。颗粒太小不便于粉碎,且滤液中含有残渣杂质,颗粒太大,有效成分未能充分浸提出来。可见最佳提取颗粒细度为0.075~0.25 mm。

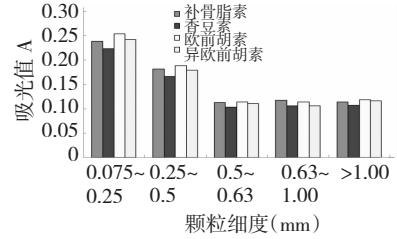


图4 不同颗粒细度的香豆素得率的影响

Fig. 4 Effect of particle size on extraction yield of coumarin

2.2.5 料液比对吸光值的影响

通过图5可以看出,料液比对香豆素提取率有一定程度的影响。料液比为1:25和1:35时,吸光值都很高,香豆素得率很大,综合考虑,确定1:25为最佳料液比。

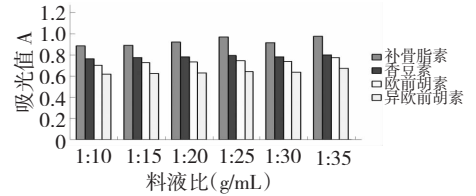


图5 不同料液比对香豆素得率的影响

Fig. 5 Effect of liquid ratio on extraction yield of coumarin

2.3 正交实验分析

通过正交实验,补骨脂素、香豆素、欧前胡素、异欧前胡素得率如表2。

表2 正交实验结果

Table 2 The result of orthogonal test

实验号 No.	因素和水平 Factor and level				补骨脂素 Psoralen λ(290 nm)	香豆素 Cumarin λ(295 nm)	欧前胡素 Imperatorin λ(300 nm)	异欧前胡素 Isoimperatorin λ(305 nm)
	A	B	C	D				
	1	1	1	1				
2	1	2	2	2	0.260	0.245	0.224	0.214
3	1	3	3	3	0.299	0.273	0.250	0.236

4	2	1	2	3	0.296	0.259	0.241	0.231
5	2	2	3	1	0.251	0.229	0.216	0.203
6	2	3	1	2	0.284	0.246	0.233	0.216
7	3	1	3	2	0.265	0.233	0.217	0.206
8	3	2	1	3	0.246	0.228	0.215	0.202
9	3	3	2	1	0.308	0.279	0.260	0.245

2.3.1 补骨脂素的正交实验结果主次关系、方差分析

结合正交实验结果,对补骨脂素主次关系进行分析,结果如表3所示。

表3 补骨脂素提取结果分析

Table 3 Analysis of extraction conditions using extraction yield of psoralen as index

因素 Factor	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	时间 Time (min)
K1	0.268	0.269	0.259	0.268
K2	0.277	0.253	0.288	0.270
K3	0.273	0.297	0.272	0.280
R	0.009	0.036	0.029	0.012

对补骨脂素的结果进行方差分析,结果如表4所示。

表4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance

误差来源 Origin	平方和 SS	自由度 f	均方 Mean square	F 值 F Value	显著性 Significance
A	0.000122	2	6.10E-05	0.454094	不显著
B	0.002998	2	0.001499	11.15964	不显著
C	0.001325	2	0.000662	4.930521	不显著
误差 Error	0.000269	2	0.000134		

通过正交分析得出,影响补骨脂素提取的各因素间对提取率差异不显著。主次因素为温度 > 料液比 > 超声时间 > 乙醇浓度。提取补骨脂素的最佳工艺参数为温度 75°C ,料液比为 1:25,超声时间为 40

min,乙醇浓度为 80%。

2.3.2 香豆素的正交实验结果主次关系、方差分析

结合正交实验结果,对香豆素主次关系进行分析,结果如表5所示。

表5 香豆素提取结果分析

Table 5 Analysis of extraction conditions using extraction yield of coumarin as index

因素 Factor	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	时间 Time (min)
K1	0.245	0.237	0.231	0.242
K2	0.259	0.234	0.261	0.241
K3	0.254	0.266	0.245	0.253
R	0.014	0.032	0.030	0.012

香豆素的正交实验结果方差分析,结果如表6所示。

表 6 方差分析结果
Table 6 Analysis of variance

误差来源 Origin	平方和 SS	自由度 f	均方 Mean square	F 值 F Value	显著 Significance
A	6.22E-06	2	3.11E-06	0.022801	不显著
B	0.001558	2	0.000779	5.710098	不显著
C	0.001382	2	0.000691	5.062704	不显著
误差 Error	0.000273	2	0.000136		

通过正交分析影响香豆素提取的各因素间对提取率差异不显著。分析得出影响提取率主次因素为温度 > 料液比 > 超声时间 > 乙醇浓度。提取香豆素的

时间为 40 min, 乙醇浓度为 80%。

2.3.3 欧前胡素的正交实验结果主次关系、方差分析

通过分析得出影响欧前胡素提取主次因素为温

表 7 欧前胡素提取结果分析

Table 7 Analysis of extraction conditions using extraction yield of imperatorin as index

因素 Factor	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	温度 Temperature (°C)	料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	时间 Time (min)
K1	0.226	0.221	0.217	0.227
K2	0.238	0.218	0.242	0.225
K3	0.236	0.248	0.228	0.235
R	0.012	0.030	0.025	0.010

表 8 方差分析结果
Table 8 Analysis of variance

误差来源 Origin	平方和 SS	自由度 f	均方 Mean square	F 值 F value	显著 Significance
A	3.82E-05	2	1.91E-05	0.198157	不显著
B	0.001302	2	0.000651	6.747696	不显著
C	0.000895	2	0.000447	4.639401	不显著
误差 Error	0.000193	2	9.64E-05		

度 > 料液比 > 超声时间 > 乙醇浓度。提取香豆素的
最佳工艺参数为温度 75 °C, 料液比为 1:25, 超声时
间为 40 min, 乙醇浓度为 80%。

2.3.4 异欧前胡素的正交实验结果主次关系、方差分析

表 9 异欧前胡素提取结果分析

Table 9 Analysis of extraction conditions using extraction yield of isoimperatorin as index

因素 Factor	乙醇浓度 Alcohol concentration (%)	温度 Temperature (°C)	料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	时间 Time (min)
K1	0.215	0.211	0.205	0.215
K2	0.227	0.206	0.230	0.212
K3	0.223	0.232	0.215	0.223
R	0.012	0.026	0.025	0.011

表 10 方差分析结果
Table 10 Analysis of variance

误差来源 Origin	平方和 SS	自由度 f	均方 Mean square	F 值 F Value	显著性 Significance
A	8.22E-06	2	4.11E-06	0.04162	不显著
B	0.00102	2	0.00051	5.160855	不显著
C	0.000974	2	0.000487	4.928009	不显著
误差 Error	0.000198	2	9.88E-05		

通过分析得出影响异欧前胡素提取主次因素为温度 > 料液比 > 乙醇浓度 > 超声时间。提取香豆素的最佳工艺参数为温度 75 ℃, 料液比为 1:25, 超声时间为 40 min, 乙醇浓度为 80%。

2.3.5 因素效应及验证实验

正交实验分析温度、料液比对提取效果影响较大, 而乙醇、超声时间同比下影响较小。与单因素最优结果有差异, 说明正交实验中各因子间有交互作用。综合考虑, 提取香豆素在温度 75 ℃, 料液比为 1:25, 超声时间为 40 min, 乙醇浓度为 80% 下, 补骨脂素、香豆素、欧前胡素、异欧前胡素均有较好的提取效果。

验证性实验在上述最优条件下, 补骨脂素为 721.92 mg/kg, 香豆素为 425.88 mg/kg, 欧前胡素为 165.73 mg/kg, 异欧前胡素为 182.49 mg/kg。

2.4 草木犀香豆素提纯

草木犀经浸提后得到粗提溶液, 采用乙酸乙酯进行萃取纯化, 进行香豆素分离。最终确定 NaHCO₃ 浓度 5% 和 NaOH 浓度 1% 下, 提纯效率最佳。得到香豆素类内酯成分后, 挥发乙酸乙酯得到干品, 用 35% 乙醇溶解, 低温保存。提纯后补骨脂素含量为 613.63 mg/kg, 香豆素为 362.00 mg/kg, 欧前胡素为 140.87 mg/kg, 异欧前胡素为 155.12 mg/kg。

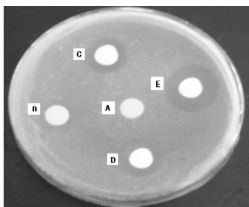


图 6 草木犀香豆素提取液抑制细菌作用

Fig. 6 Antibacterial activity of *M. officinalis* extract

A. 无菌水; B. 35% 乙醇; C. 10 倍稀释总香豆素提取液; D. 50 倍稀释总香豆素提取液; E. 药敏片

A. sterile water; B. 35% ethanol; C. 10 times diluted *M. officinalis* extract; D. 50 times diluted *M. officinalis* extract; E. positive control

2.5 抑菌效果

由图 6 可见, 阴性对照组无抑菌效果, 阳性对照抑菌效果明显最高, 总香豆素 10 倍稀释液的抑菌效果高于 50 倍稀释液抑菌效果, 10 倍稀释液抑菌效果低于阳性对照组。说明香豆素具有抑制这些菌种生长繁殖的活性。

3 结论

3.1 草木犀香豆素的单因素提取工艺

通过单因子实验可以看出, 不同乙醇浓度、料液比、温度、超声提取时间、颗粒细度对香豆素得率的影响不同。乙醇浓度为 85%、温度为 70 ℃、超声提取时间为 35 min、颗粒细度为 0.075 ~ 0.25 mm、料液比为 1:25 时, 单因素提取工艺为最佳。

3.2 正交实验提取香豆素

结合单因素实验, 正交实验优化提取香豆素工艺。结果温度 75 ℃, 料液比为 1:25, 超声时间为 40 min, 乙醇浓度为 80% 为优化工艺。在此条件下, 补骨脂素、香豆素、欧前胡素、异欧前胡素均有较好的提取效果。补骨脂素含量约为 721.92 mg/kg, 香豆素含量约为 425.88 mg/kg, 欧前胡素含量约为 165.73 mg/kg, 异欧前胡素含量约为 182.49 mg/kg。

3.3 草木犀香豆素提纯

草木犀经浸提后, 采用乙酸乙酯萃取法, 并进行香豆素分离。确定 NaHCO₃ 浓度 5% 和 NaOH 浓度为 1% 时, 纯化最佳。得到香豆素类内酯成分后, 挥发掉乙酸乙酯后得到干品, 用 35% 乙醇溶解, 低温保存。补骨脂素为 613.63 mg/kg, 香豆素为 362.00 mg/kg, 欧前胡素为 140.87 mg/kg, 异欧前胡素为 155.12 mg/kg。

3.4 草木犀香豆素抑菌实验

利用滤纸片法进行了香豆素抑菌实验。香豆素 10 倍稀释液和 50 倍稀释液对土壤细菌有抑制作用, 低浓度香豆素液抑菌效果高于高浓度。

(下转第 596 页)