

# 半边莲总黄酮提取工艺及抑菌活性的研究

蒋琼凤<sup>1\*</sup>, 温拥军<sup>2</sup>, 袁志辉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>湖南科技学院, 永州 425199; <sup>2</sup>湖南化工职业技术学院, 株州 412004

**摘要:**研究了乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间对半边莲中总黄酮提取率的影响, 并通过正交实验优化了半边莲中总黄酮的提取工艺条件, 结果表明: 当乙醇浓度 60%, 料液比为 1:40 (g/mL), 提取温度 60 °C, 提取时间 2.5 h, 从半边莲中提取总黄酮的得率为 1.69%。考察了半边莲总黄酮提取物对几种常见微生物的抑菌作用, 结果表明半边莲总黄酮提取物具有一定的抑菌活性, 对革兰氏阴性菌的抑制作用大于革兰氏阳性菌, 低浓度下对青霉菌和酵母菌抑制效果不明显。

**关键词:**半边莲; 总黄酮; 提取; 抑菌活性

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.022

## Study on the Extraction Process and Antibacterial Activity of Total Flavonoids from *Lobelia chinensis*

JIANG Qiong-feng<sup>1\*</sup>, WEN Yong-jun<sup>2</sup>, YUAN Zhi-hui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China;

<sup>2</sup>Hunan Chemical Industry Vocational Technology College, Zhuzhou 412004, China

**Abstract:** Four factors, namely ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction duration were optimized for the extraction of total flavonoids from *Lobelia chinensis* through orthogonal design. The results showed that under the condition of ethanol concentration of 60%, solid-liquid ratio of 1:40 (g/mL), extraction temperature of 60 °C and extraction duration of 2.5 h, the highest yield of total flavonoids was obtained (1.69%). The antimicrobial activities of flavonoids were studied by plate count and disk diffusion method. The results showed that flavonoids had certain antimicrobial activities, its inhibitory effect on gram negative bacteria was better than gram positive bacteria, and had little inhibitory effect on *Penicillium* and yeast with low concentration.

**Key words:** *Lobelia chinensis*; total flavonoids; extraction; antibacterial activity

半边莲 (*Lobelia chinensis* Lour) 为桔梗科半边莲的干燥全草, 为中国药典收录的常用中药, 含生物碱、黄酮甙、皂甙、氨基酸<sup>[1,2]</sup>等多种活性成分, 既可内服又可外用, 疗效较好, 具有显著的抗肿瘤、抗氧化、镇痛消炎等药理作用<sup>[3-5]</sup>, 是一类值得大力开发的植物。目前有关半边莲的药效研究主要集中在半边莲生物碱上, 对黄酮的研究鲜有报道。黄酮类化合物具有清除自由基、抗衰老、抗癌、抗病毒、抗菌消炎等<sup>[6,7]</sup>多种生物活性, 由于合成食品添加剂的毒副作用, 从植物当中提取黄酮作为天然抑菌剂或防腐剂越来越受到人们的青睐<sup>[8]</sup>。本研究对半边莲中总黄酮进行提取, 并优化其工艺条件, 同时考

察半边莲黄酮提取物对常见细菌、真菌的抑制作用, 旨在为开发半边莲天然食品保鲜剂提供理论依据, 也为拓宽医疗病种提供一定参考思路, 使半边莲更广泛地应用于临床。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

半边莲 (湖南永州中草药材市场采购), 洗净后干燥至水分含量在 0.5% 以下, 粉碎过 40 目筛备用。芦丁标准品 (中国药品生物制品检验所); 硝酸铝、亚硝酸钠、95% 乙醇、氢氧化钠、磷酸氢二钾、硫酸镁 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )、氯化钾、硫酸亚铁、蔗糖等均均为分析纯。供试菌株: 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、青霉菌、酵母菌等均由湖南科技学院微生物实验室提供。

752 型紫外可见分光光度计 (上海菁华科技仪

收稿日期: 2014-01-02 接受日期: 2014-05-13

基金项目: 湖南省高校科技创新团队支持计划 (2012-318); 湖南省重点学科建设项目 (2011-76)

\* 通讯作者 E-mail: jiangxinyi477@sohu.com

器有限公司), AY220 型电子分析天平(岛津国际贸易公司), WD800GL 型微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司), 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司), 自动型手提式灭菌锅 YXQ-LS-18SI(上海博迅实业有限公司), 恒温光照培养箱 MJX-250B-Z(上海博迅实业有限公司), 超净工作台 ZHJH-1109(上海制成分析仪器制造有限公司)等。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 半边莲总黄酮的提取

精密称取半边莲粉末 0.500 g 于烧杯中, 加入一定量一定浓度的乙醇, 在一定水浴温度下提取一

定时间, 提取液经旋转蒸发器干燥、浓缩至膏状, 得总黄酮粗提物。单因素实验分别考察不同乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间对半边莲总黄酮得率的影响, 在单因素实验基础上, 选取乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间中影响较大的三个水平进行  $L_9(3^4)$  正交实验设计, 见表 1。

### 1.2.2 标准曲线的绘制

精密称取芦丁标准品 0.020 g, 用 70% 乙醇溶解于 100 mL 的容量瓶中, 定容配制成 0.20 mg/mL 芦丁标准溶液。精确吸取标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 10 mL 的容量瓶中, 加入

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A 提取温度 Extraction temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	B 提取时间 Extraction duration (h)	C 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	D 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)
1	50	2	40	50
2	60	2.5	50	60
3	70	3	60	70

0.5 mL 5% 的亚硝酸钠和 0.5 mL、10% 的硝酸铝分别静置 6 min, 再加入 2 mL 1 mol/L 的氢氧化钠溶液并用 70% 乙醇定容, 静置 15 min, 以 70% 乙醇液作空白溶液, 用 752 型分光光度计在 510 nm 处测定吸光度值<sup>[9]</sup>。然后以芦丁浓度  $C$  (mg/mL) 为横坐标, 吸光度值  $A$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为  $y = 10.3x - 0.002$ ,  $R^2 = 0.9989$ 。

### 1.2.3 样品液总黄酮的测定

精密吸取样品液于 25 mL 的容量瓶中, 按标准曲线法在 510 nm 处测定吸光度, 并以下式计算总黄酮提取率(%):

$$\text{总黄酮提取率}\% = \left( \frac{C \times V}{M} \times N \times 10^{-3} \right) \times 100\%$$

式中:  $C$  为总黄酮质量浓度 (mg/mL);  $V$  为半边莲总黄酮提取液的体积 (mL);  $N$  为稀释的倍数;  $M$  为半边莲样品质量 (g)。

### 1.2.4 半边莲黄酮的抑菌作用

#### 1.2.4.1 总黄酮提取物的制备

称取半边莲粉末, 以料液比 1:50, 加入 70% 乙醇, 在 60  $^{\circ}\text{C}$  下提取 2.5 h, 经旋转蒸发器干燥、浓缩至膏状, 得总黄酮粗提物, 密封, 于 0~4  $^{\circ}\text{C}$  保存。使用前准确称取膏状物样品用 0.85% 生理盐水配制成 1 g/mL 和 0.1 g/mL 样品溶液, 置于紫外灯下照

射 1 h 灭菌后备用。

#### 1.2.4.2 菌悬液的制备

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基, 真菌采用察氏培养基。将供试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌、酵母菌分别移接入相对应的培养基上培养, 细菌 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 真菌 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h。取活化好的菌种斜面, 分别溶于 50 mL 无菌生理盐水中, 充分振荡摇匀, 平板计数法制成含菌数  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL 的菌悬液, 并稀释至  $1.0 \times 10^3$  cfu/mL, 留存备用。

#### 1.2.4.3 抑菌活性的测定

将直径 90 mm 培养皿上的培养基分为 3 个区, 用移液器吸取 0.1 mL 的菌悬液, 涂布均匀后, 每个区分别用 8 mm 的打孔器打孔, 其中 2 孔为平行, 1 孔无菌生理盐水为对照, 每孔加入 0.2 mL 的半边莲黄酮提取液。细菌置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内培养 1 d 后, 测定抑菌圈直径大小; 青霉菌及酵母菌于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d 后测定抑菌圈直径。

#### 1.2.4.4 半边莲总黄酮的最低抑菌浓度 (MIC) 测定

取 0.1 g/mL 的半边莲总黄酮样品液, 采用二倍稀释法<sup>[10]</sup> 稀释为: 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0 mg/mL 并加入到培养基中, 将浓度为 1.0

$\times 10^3$  cfu/mL 菌悬液接种到各试管内,细菌置于 37 °C 恒温培养箱内培养 1 d 后,霉菌及酵母菌于 30 °C 培养 3~5 d,观察结果。以完全无菌生长的最高稀释度为半边莲总黄酮对该菌的最低抑菌浓度(MIC)。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

在提取时间 2 h、料液比 1:40、水浴温度 60 °C 条件下,分别用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇进行提取,考察乙醇浓度对总黄酮提取率的影响,结果见图 1(A)。

由图 1(A)可知,随着乙醇浓度的增大,总黄酮的提取率也增加,当乙醇浓度为 70% 时总黄酮提取率最大;乙醇浓度继续增大,总黄酮提取率反而减少。可能是由于乙醇浓度不同,相对杂质含量不同,其极性也不一样,在乙醇浓度为 70% 时,极性相似,使黄酮提取率最高。

#### 2.1.2 料液比对总黄酮提取率的影响

分别以 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 的料液比,在提取时间 2 h、乙醇浓度 70%、水浴温度 60 °C 下进行提取,考察料液比对总黄酮提取率的影响,结果见图 1(B)。

由图 1(B)可知,随着溶剂量的增加,总黄酮提

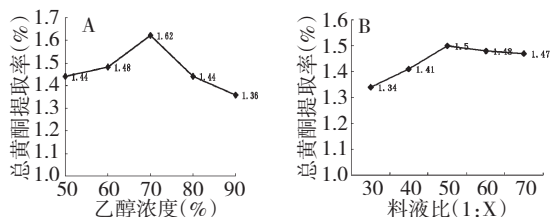


图 1 乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration (A), solid-liquid ratio (B), extraction temperature (C) and extraction duration (D) on the extraction yield of total flavonoids

### 2.2 正交实验优化提取工艺

按 1.2.1 中表 1 进行实验,结果见表 2。

由正交试验的极差分析可知,乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间对半边莲中总黄酮的提取率均有不同程度的影响,其中提取时间影响最大,料液比影响最小,各因素的影响顺序依次是: B > A > D > C, 即提取时间 > 提取温度 > 乙醇浓度 > 料液比。

综上所述分析可得半边莲中总黄酮的提取工艺

取率逐渐升高,到 50 倍量以后基本持平。由于料液比增加,会给后续处理工序增加困难,在保证提取效果的前提下,为节约成本,应尽量减少溶剂用量和降低蒸发浓缩负荷,故选用 1:40、1:50、1:60 进行正交实验。

#### 2.1.3 提取温度对总黄酮提取率的影响

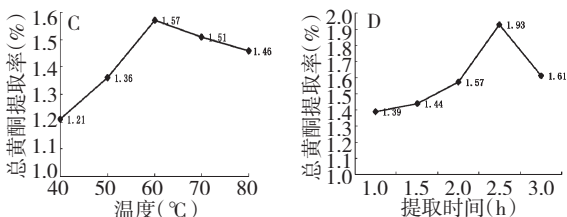
在料液比 1:40、乙醇浓度 70%,提取时间 2 h 条件下,分别以水浴温度 40、50、60、70、80 °C 下进行提取,考察水浴温度对总黄酮提取率的影响,结果见图 1(C)。

由图 1(C)可知,当温度低于 60 °C 时,总黄酮提取率随着温度的升高而增加,可能温度的升高,溶剂的粘度减小,分子运动速度加快,浸提液的扩散系数增加,促使浸提速度加快,提取率升高;温度高于 60 °C 时,黄酮提取率反而降低,可能温度的升高使黄酮化合物结构遭到破坏,故提取率降低。

#### 2.1.4 提取时间对总黄酮提取率的影响

在水浴温度 60 °C、料液比 1:40、乙醇浓度 70% 条件下进行提取,分别提取 1、1.5、2、2.5、3 h,考察提取时间对总黄酮提取率的影响,结果见图 1(D)。

由图 1(D)可知,随着提取时间的延长,总黄酮提取率先升高后下降。可能提取时间越长,总黄酮在乙醇溶液中充分溶解,提取率最高;但提取时间过长,会导致部分总黄酮的氧化分解,从而提取率降低。



最佳组合是:  $A_2B_2C_1D_2$ , 即提取温度 60 °C、提取时间 2.5 h、料液比为 1:40、乙醇浓度为 60%。采用上述最优工艺条件进行验证试验,最终得到半边莲中总黄酮提取率为 1.69%。

### 2.3 半边莲总黄酮提取物的抑菌效果

#### 2.3.1 抑菌活性

由表 3 可知,半边莲提取物溶液对 6 种供试菌均有一定的抑制作用,提取液浓度在 1.0 g/mL 时对

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 No.	A	B	C	D	提取率 Extraction yield(%)
1	1	1	1	1	1.37
2	1	2	2	2	1.63
3	1	3	3	3	1.25
4	2	1	2	3	1.57
5	2	2	3	1	1.69
6	2	3	1	2	1.55
7	3	1	3	2	1.51
8	3	2	1	3	1.74
9	3	3	2	1	1.34
k <sub>1</sub>	1.417	1.483	1.553	1.467	
k <sub>2</sub>	1.603	1.687	1.513	1.563	
k <sub>3</sub>	1.530	1.380	1.483	1.520	
R	0.186	0.307	0.07	0.096	

各菌的抑菌作用明显大于 0.1 g/mL;提取物对各供试菌的抑制效果不同,其强弱顺序为:大肠杆菌 > 变形杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 青霉菌 > 酵母菌。黄酮类化合物属于酚类衍生物,可以通

过破坏细胞壁以及细胞膜结构的完整性,导致微生物细胞释放胞内成分,引起膜的电子传递、ATP 活性等功能障碍<sup>[8]</sup>,从而抑制微生物的生长。

表3 半边莲总黄酮提取物对各供试菌的抑菌效果

Table 3 The bacteriostatic effect of total flavonoids from *L. chinensis* on the tested microbacteria

提取物浓度 Extract concentration	抑菌圈直径 Bacteriostatic diameter( mm)					
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	变形杆菌 <i>Proteus bacillus vulgaris</i>	金葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	青霉菌 <i>Penicillium</i>	酵母菌 <i>Yeasts</i>
1.0 g/mL	16.0	14.4	11.6	10.4	9.1	8.8
0.1 g/mL	14.1	12.6	10.3	9.2	-	-
无菌盐水 Sterile saline	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈出现。

Note:“-” indicates no inhibition zone.

### 2.3.2 半边莲总黄酮的最低抑菌浓度

由表4可知,半边莲黄酮提取物对各供试菌的抑制作用随着浓度的增大而增加;样品溶液为 100 mg/mL 和 50 mg/mL 时各供试菌株均不能生长,在 25 mg/mL 时枯草芽孢杆菌少量生长,在 12.5 mg/mL 时金黄色葡萄球菌少量生长,在 6.25 mg/mL 时大肠杆菌与变形杆菌均可生长,故半边莲总黄酮提取物对大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最低抑菌浓度分别为:12.5、12.5、25、50 mg/mL;提取物浓度为 100 mg/mL 时,对青霉菌和酵母菌抑制作用均不明显。

## 3 结论与讨论

本研究以总黄酮提取量为技术指标,采用热水辅助乙醇提取法,通过单因素和正交实验,得到了半边莲中总黄酮的最佳提取工艺条件为:以 60% 乙醇作为溶剂,料液比为 1:40(g/mL),水浴温度 60 ℃,水浴处理时间是 2.5 h。此条件下,总黄酮提取率为:1.69%。半边莲总黄酮提取物具有一定的抑菌活性,对大肠杆菌的抑制效果最好,其次为变形杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、青霉菌和酵母菌。在半边莲提取物溶液浓度为 100 mg/mL 或低

表4 半边莲总黄酮提取物对各供试菌的最低抑菌浓度

Table 4 The MIC of total flavonoids from *L. chinensis* on the tested microbateria

供试细菌 Strains tested	提取物浓度 Extract concentration (mg/mL)							
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	++	+++	+++
变形杆菌 <i>Proteus bacillus vulgaris</i>	-	-	-	-	+	++	+++	+++
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	++	++	+++	+++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
青霉菌 <i>Penicillium</i>	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
酵母菌 <i>Yeasts</i>	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

注:肉汤清亮透明表示无菌生长(-);肉汤少量浑浊表示有少量菌生长(+);肉汤有部分浑浊或沉淀表示有部分菌生长(++);肉汤有大部分浑浊或大量沉淀表示菌大量生长(+++).

Note:“-” indicates no bacteria growth;“+” indicates a few bacteria growth;“++” indicates some bacteria growth;“+++” indicates many bacteria growth.

于100 mg/mL时,对青霉菌和酵母菌抑制作用不明显。

研究中半边莲总黄酮提取物对大肠杆菌等革兰氏阴性菌的抑制效果大于其他两种革兰氏阳性菌,此结果与徐金龙等<sup>[11]</sup>人研究南酸枣黄酮提取物的抑菌活性结果有出入,可能是黄酮类化合物在半边莲中存在的形式与其不同,详尽原因还有待进一步研究。半边莲属植物品种繁多,分布广泛,我国共有20多种,资源相当丰富,且半边莲提取物对细菌、霉菌均有抑制作用,说明半边莲黄酮是值得大力推广的天然抑菌剂和保鲜剂。

#### 参考文献

- Zhou B(周斌), Cui XD(崔小弟), Cheng D(程丹), *et al.* Chemical and pharmacological research progress of *Lobelia chinensis*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2013, 36:679-681.
- Jiang YY(姜艳艳), Shi RB(石任兵), Liu B(刘斌), *et al.* Studies on chemical components of *Lobelia chinensis*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34:294-297.
- Chen JX(陈建新), Huang SH(黄深惠), Wang Y(王英), *et al.* Studies on the chemical constituents from *Lobelia chinensis*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2010, 33:1721-1724.
- Chen JX(陈建新). Studies on the bioactive constituents of *Lobelia chinensis*. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), PhD. 2010.

- Huang LD(黄礼德), Guo LQ(郭立强), Pan TQ(潘廷启), *et al.* Experimental study on anti-inflammatory and analgesic effects of different extracts from Chinese *Lobelia chinensis*. *Her Med* (医药导报), 2012, 31:982-985.
- Jiang YY(姜艳艳), Shi RB(石任兵), Liu B(刘斌), *et al.* Studies on the chemical constituents of flavones from *Lobelia chinensis*. *J Beijing Univ Chin Med* (北京中医药大学学报), 2009, 32:59-61.
- Wang F(王芳). Discussion on pharmacological action of Hawthorn leaves flavonoids. *J Zhejiang Coll Tradit Chin Med* (浙江中医药大学学报), 2010, 34:295-296.
- Ding CB(丁存宝), Liu HY(刘海燕), Li GQ(李桂秋), *et al.* Extraction and antibacterial properties of flavonoids of *Rosa chinensis* fruit. *Food Ind* (食品工业), 2012, 33:107-109.
- Jiang QF(蒋琼凤), Tang KH(唐克华). Study on the flavonoids extracting from *Mahonia bealei* (fort.) carr and the content determination. *J Hunan Univ Sci Eng* (湖南科技学院学报), 2005, 26:124-126.
- Li CL(李昌灵), Shen T(沈廷). Study on bacteriostasis of extract from *Solanum khasianum c. b. clarke*. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2009, 37:652-653.
- Xu JL(徐金龙), Li J(李倩), Wang ZJ(王召君), *et al.* Study on extraction and bacteriostatic activities of flavonoids from *Choerospondias axillaris* peel. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 34:251-254.