

文章编号:1001-6880(2017)8-1343-06

假臭草总黄酮超声波辅助提取工艺优化及抑菌活性

王伟¹,代光明²,李书明¹,陈雅婷¹,王奇志^{1*}¹福建华侨大学化工学院,厦门 361021; ²厦门深富华园艺有限公司,厦门 361009

摘要:假臭草(*Praxelis clematidea*)黄酮类化合物是一类重要的生物活性物质,其提取工艺的优化对其黄酮类物质的生产和研究具有重要的意义。本文以假臭草地上部分为材料,在乙醇浓度、料液比、超声功率、提取温度和提取时间5个单因素实验的基础上,采用响应面分析法对超声波辅助提取法进行优化,并研究提取的总黄酮在工艺前后对金黄葡萄球菌的抑菌活性变化。结果表明假臭草中总黄酮类物质的最佳提取条件为:提取温度60℃,提取时间8 min,乙醇浓度54%,液料比26 mL/g,超声功率165 W。在最佳提取条件下总黄酮的实际得率为2.385%,与预测值2.407%的相对误差为0.022%,优化结果可靠。本实验结果比前人采用溶剂提取法所得假臭草总黄酮的提取率高1.025%,提取时间缩短了2 h 22 min。同时,抑菌活性实验结果显示100 μL同浓度(1.7275 mg/mL)总黄酮的抑菌圈直径大小分别为优化前13.898 ± 0.44 mm,优化后13.946 ± 0.28 mm,P = 0.805 > 0.05,差异不显著。优化结果为假臭草的资源化利用提供了新的实验数据。

关键词:假臭草;总黄酮;超声波提取法;响应面分析法;抑菌活性

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.015

Optimization of Total Flavonoid Extraction from the Invasive Plant Species *Praxelis clematidea* (Asteraceae) and Its Antibacterial Activity

WANG Wei¹, DAI Guang-ming², LI Shu-ming¹, CHEN Ya-ting¹, WANG Qi-zhi^{1*}¹College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;²Xiamen Shen Fu Hua Horticulture Co., Ltd, Xiamen, 361009, China

Abstract: Flavones are important biologically active substances, thus methods to optimize total flavonoid extraction in particular plant species are of significant worth. Response surface methodology (RSM) was performed using five single factors (*i.e.*, ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power, extraction temperature and extraction time) to optimize experimental conditions for ultrasonic-assisted extraction (UAE) of total flavonoids from *Praxelis clematidea*, an invasive plant species. In addition, the bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* before and after optimization was compared. The result showed that the maximum yield of flavonoids was obtained under optimal extraction conditions of 8 min extraction time, 60℃ extraction temperature, 54% ethanol concentration, a 26 solid-liquid ratio, and 165 W of ultrasonic power. Under these conditions, the actual yield of total flavonoids was 2.385% (relative error, 0.022%; predicted value, 2.407%). This yield of flavonoids is 1.025% higher than that of previous studies, and the extraction time is shortened 2 hours and 22 minutes. And the antimicrobial difference was not significant (Before: 13.898 ± 0.44 mm, After: 13.946 ± 0.28 mm; P = 0.805 > 0.05) by 100 μL 1.7275 mg/mL total flavonoid extraction. These results indicated that RSM is a credible method for the optimization of total flavonoid extraction from *P. clematidea*.

Key words: *Praxelis clematidea*; total flavonoids; ultrasonic extraction; response surface methodology; antimicrobial activity

假臭草[*Praxelis clematidea*(Griseb.) R. M. King]

收稿日期:2017-03-10 接受日期:2017-06-16

基金项目:国家自然青年基金(31500162);福建省农业重点自然科学基金(2014N0026);泉州市校(院)地协同创新专项(重点)(2014Z101);厦门市企业合作项目(2015-3502-04-001831);华侨大学研究生科研创新能力培育计划(1611315022)

*通信作者 E-mail:wqz@hqu.edu.cn

et H. Rob.]原产于南美洲,现已被定为我国恶性入侵杂草,已经占领了广东、福建、澳门、香港、台湾和海南等沿海地区大部分荒坡、荒地、滩涂、林地及果园^[1-3]。该杂草对土壤肥力的吸收力强,能极大消耗土壤养分,对土壤可耕性的破坏极为严重,与林木争水争肥,严重影响林木生长。另外,它还能分泌一种

有毒且恶臭的物质,影响家畜觅食,不仅对其入侵地区的经济造成损失,而且对当地生态系统的生物多样性存在着巨大的潜在威胁^[4]。目前,对其防治是棘手的问题,但同时假臭草中含有特定的抑菌生物活性物质。因此,资源化利用是其防除的新思路。

黄酮类化合物广泛分布于植物界,具有多种多样的生物活性和药理功能,且毒性较低,备受重视,对于研究和开发利用意义重大^[5]。研究发现假臭草中也含有各种有活性的黄酮类物质,已有报道富含黄酮的假臭草氯仿和乙酸乙酯相提取物对老鼠胃具有保护作用^[6],乙醇提取物对细菌和真菌都具有抑制作用^[7],其中5,7,4'-三甲氧基黄酮可以抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的生长^[8]。另外,研究发现假臭草的中黄酮类物质还可以调节细菌的药物耐受性^[9]。由此可见假臭草黄酮类物质具有重大的应用潜力和研究价值。但由于其提取率较低,因此提取工艺对其黄酮类物质的研究非常重要,常见的提取方法有溶剂提取法、超声辅助提取法、超临界流体萃取法和酶解法等^[10],特别是其中的超声辅助提取法,因可以利用超声波的强振动、强空化效应、强搅拌作用以及能使物质质点产生高加速度,缩短天然产物有效成分进入溶剂的时间,有效避免高温对有效成分的破坏而受到广泛的应用^[11]。然而,目前仅见汤丽昌等^[12]报道了40%的甲醇溶液对假臭草总黄酮的提取情况,尚未见报道超声波辅助提取法应用于该植物黄酮类物质的提取。因此本文选择假臭草地上部分为实验材料,采用响应面优化超声波辅

助萃取法提高总黄酮的得率和缩短提取时间,并研究了提取的总黄酮在工艺前后对金黄葡萄球菌的抑菌活性变化,为假臭草植物资源化利用提供参考,变害为宝。

1 材料与方法

1.1 材料

假臭草地上部分采自福建省厦门市集美区坑内村,用自来水洗净并阴干3 d后剪段分批放入45 ℃烘箱烘干后磨粉,过40目筛,放入塑封带备用。假臭草由华侨大学王奇志博士鉴定,植物标本凭证代码为431127,存放于华侨大学标本室。供试菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制

精密称取适量标准品5,6,7,4'-四甲氧基黄酮,用氯仿溶解,并转移至容量瓶中,配制成浓度为0.01 mg/mL的标准溶液。然后精密吸取80、160、240、320、400、480 μL和560 μL的标准溶液于4 mL容量瓶中,用氯仿定容,摇匀,以氯仿作为空白对照。采用紫外分光光度法在315 nm处进行比色。以5,6,7,4'-四甲氧基黄酮的浓度(0.002~0.014 mg/mL)为X轴坐标,吸光度值为Y轴坐标绘制标准曲线。得线性方程为 $Y=57.393X+0.0065$,相关系数 $r=0.9988$,表明在此浓度范围内5,6,7,4'-四甲氧基黄酮浓度与吸光度值呈良好的线性关系。

1.2.2 响应面设计

为确定响应面实验条件,首先考察乙醇浓度、料液比、超声功率、提取温度和提取时间对总黄酮提取率的影响,进行单因素实验设计如表1。

表1 假臭草总黄酮提取工艺条件的单因素实验

Table 1 The single factor experiments of technological conditions of total flavonoids extraction

序号 No.	(A)乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	(B)料液比 Liquid/solid(mL/g)	(C)超声功率 Ultrasonic power (W)	(D)提取温度 Temperature (oC)	(E)提取时间 Time(min)
1	variable	1:20	100	20	5
2	50	variable	100	20	5
3	50	1:25	variable	20	5
4	50	1:25	150	variable	5
5	50	1:25	150	60	variable

然后在单因素实验结果的基础上,采用Box-Behnken设计(BBD模型)3因素3水平的组合实验,数据使用Design-expert 8.0.5软件进行处理。

1.2.3 最佳工艺条件验证实验

根据BBB模型预测假臭草总黄酮的最佳提取条件,并在预测的最佳提取条件下进行5次重复性

实验。比较总黄酮提取率实测值与预测值的相对误差。

1.2.4 抑菌活性检测

取优化前(单因素条件下提取率最低值条件:提取温度60℃,提取时间8 min,乙醇浓度40%,料液比25 mL/g,超声功率100 W)后(提取温度60℃,提取时间8 min,乙醇浓度54%,液料比26,超声功率165 W)同浓度(1.7275 mg/mL)同体积(100 μL)的假臭草提取物溶液,采用6 mm牛津杯法进行5组平行的抗金黄色葡萄球菌活性实验,测定抑菌圈大小。数据采用IBM SPSS Statistics 22进行处理。

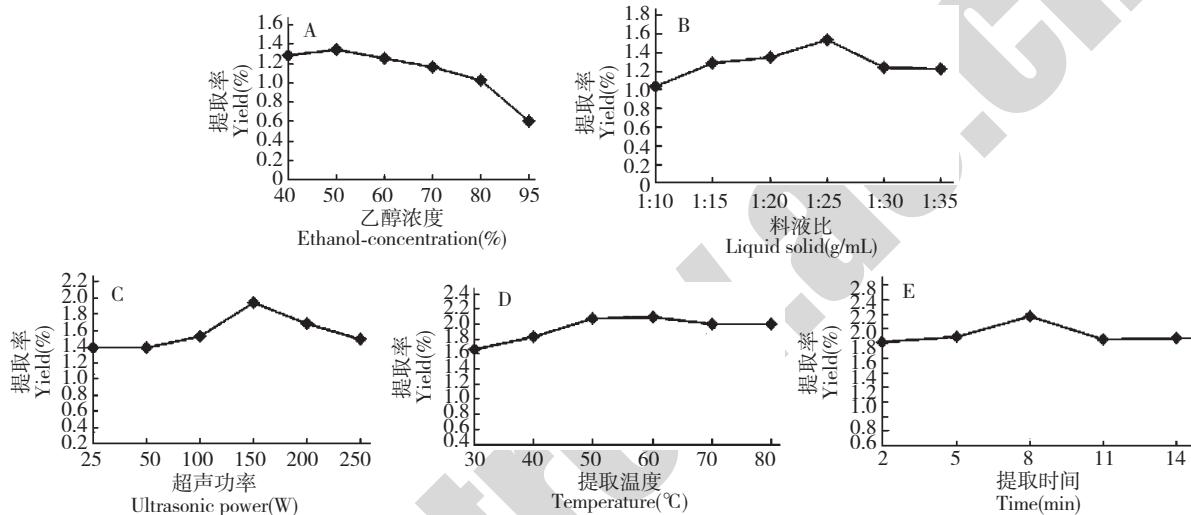


图1 乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声功率(C)、提取温度(D)及提取时间(E)对假臭草总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration (A), liquid/solid ratio (B), ultrasonic power (C), temperature (D) and time (E) on the extraction yield of total flavonoids from *P. clematidea*

2.2 响应面分析法优化实验结果

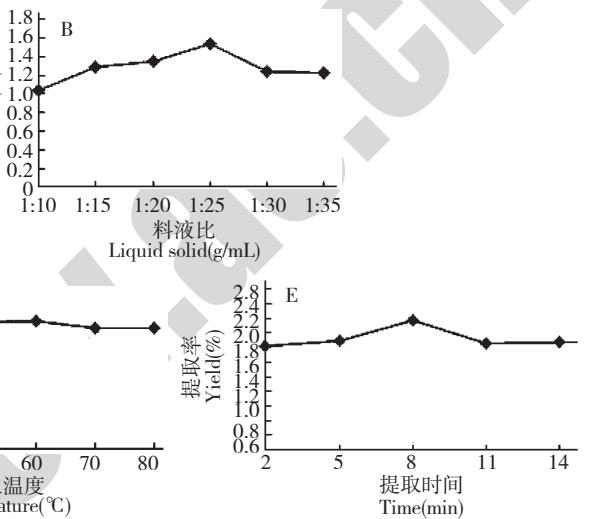
2.2.1 总黄酮提取因素水平设计及结果

根据单因素实验的结果,提取温度和提取时间增加时,黄酮提取率前后变化不大,且提取温度变化会导致溶剂不同程度的挥发,造成溶剂的耗损,温度过高也会破坏黄酮结构,改变其活性。因此,本次研究确定提取温度60℃,提取时间为8 min的条件下,采用Box-Behnken设计(BBD模型)如表2,响应

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

如图2A,当乙醇浓度为50%时,提取假臭草中总黄酮的效果最佳,提取率为1.35%;如图2B,当料液比为1:25时假臭草总黄酮提取效果最佳,提取率为1.53%;如图2C,超声功率为150 W时假臭草总黄酮提效果最佳,提取率为1.94%;如图2D,当提取温度为60℃时,假臭草总黄酮提取效果最佳,提取率为2.10%;如图2E,当提取时间为8 min时假臭草总黄酮提取效果最佳,提取率为2.37%。



面分析试验设计及结果如表3。

2.2.2 二次回归模型的建立与检验

利用Design-expert 8.0.5对表2所得数据进行多元回归拟合分析,求得影响因素的交互效应关联方程为:

$$Y = 2.38 + 0.088A + 0.005B + 0.100C + 0.020AB + 0.075AC + 0.075BC - 0.15A^2 - 0.066B^2 - 0.27C^2$$

表2 假臭草总黄酮提取工艺条件的 BBD 因素与水平

Table 2 The factors and levels of BBD of technological conditions of total flavonoids extraction

因素名称 Factor name	因素单位 Factor unit	因素代码 Factor code	编码水平 Factor level		
			-1	0	1
乙醇浓度 Ethanol concentration	%	A	40	50	60
液料比 Liquid/solid ratio	g/mL	B	20	25	30
超声功率 Ultrasonic power	W	C	100	150	200

表 3 响应面分析试验设计及结果

Table 3 Design and results of RSM

实验号 No.	A	B	C	Y (%)
1	0	0	0	2.38
2	1	0	1	2.21
3	0	0	0	2.35
4	-1	0	1	1.9
5	0	1	-1	1.89
6	0	0	0	2.4
7	-1	1	0	2.03
8	0	0	0	2.39
9	1	-1	0	2.26
10	0	-1	-1	1.98
11	-1	-1	0	2.11
12	0	1	1	2.25
13	1	0	-1	1.87
14	0	-1	1	2.04
15	1	1	0	2.26
16	-1	0	-1	1.86
17	0	0	0	2.36

式中 A、B 和 C 在设计中均经过量纲线性编码的处理,因此方程中各项系数的绝对值大小表明了该因素与响应值之间的关系大小即对相应值的改变程度,系数的正负代表改变的方向。为了检验得到

的方程的有效性,要对超声辅助提取假臭草总黄酮的数学模型进行方差分析,并且要对各个因素的偏回归系数做检验,结果如表 4 所示。

表 4 二次响应曲面回归方程的方差分析

Table 4 Variance analysis for the response surface regression model of technological conditions

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.64	9	0.071	67.24	< 0.0001	* * *
A-乙醇浓度 A-Ethanol concentration	0.061	1	0.061	58.18	0.0001	* * *
B-液料比 B-Liquid/solid	2.000E-004	1	2.000E-004	0.19	0.6761	
C-超声功率 C-Ultrasonic power	0.080	1	0.080	75.98	< 0.0001	* * *
AB	1.600E-003	1	1.600E-003	1.52	0.2575	
AC	0.022	1	0.022	21.37	0.0024	* *
BC	0.022	1	0.022	21.37	0.0024	* *
A^2	0.089	1	0.089	84.66	< 0.0001	* * *
B^2	0.018	1	0.018	17.16	0.0043	* *
C^2	0.31	1	0.31	292.62	< 0.0001	* * *
残差 Residual	7.370E-0.03	7	1.053E-003			
失拟项 Lack of fit	5.650E-003	3	1.883E-003	4.38	0.0938	
净误差 Net error	1.720E-003	4	4.300E-004			
总离差 Sum of deviations	0.64	16				

注: * * * 为差异极显著 ($P < 0.001$); * * 为差异高度显著 ($P < 0.01$); * 为差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * * * indicated extremely significant difference ($P < 0.001$); * * indicated very significant difference ($P < 0.01$); * indicated significant difference ($P < 0.05$)

根据表4,对试验模型可信度进行分析,得决定系数 $R^2=0.9886$,响应值的变化有98.86%来源于所选因素,表明该模型与实际实验拟合度较好。本实验Adeq Precision值反映的信号与噪音的比率为21.237(通常大于4),表明这个模型有足够的分辨力,能合适的反映实验结果。变异系数(C. V. 值为1.51%)低于10%,说明实验有良好的稳定性。因此该模型预测值可靠。由回归方程模型中因变量的方差结果可知:模型一次项A、B差异极显著,交互

项AC和BC差异高度显著。二次项A²和C²差异极其显著,B²差异高度显著,其它项不显著,说明各提取因素和总黄酮提取率之间不是简单的线性关系。并且通过对回归方程的系数值以及方差表分析可得,在响应值实验范围内各因素的主效应关系是:超声功率>乙醇浓度>料液比。回归方程失拟项($P=0.0938 > 0.05$)不显著,说明未知因素对实验的干扰很小。回归模型的 $P < 0.0001$,说明了该回归方程所描述各因素(自变量)与响应值之间存在

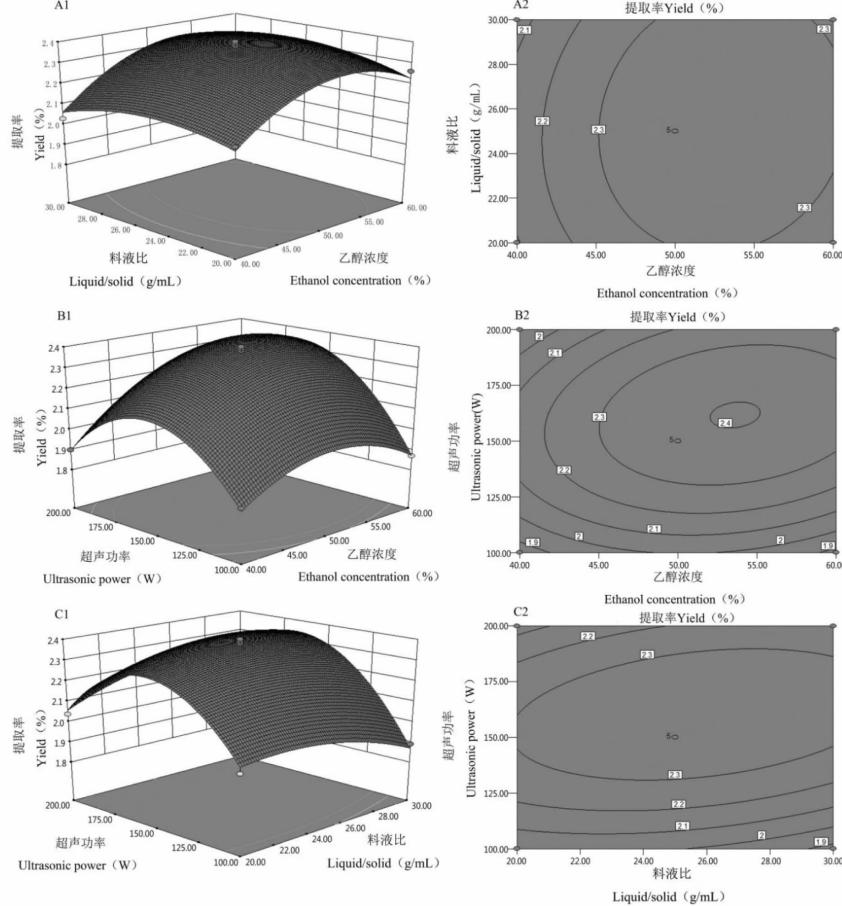


图2 各因素交互作用的响应面三维立体图和等高线图

Fig. 2 Response surface plots and contour plots showing the effects of cross-interactions among different factors on extraction rate of flavonoids from *P. clematidea*

极其显著的线性关系,即该实验方法可靠。

2.2.3 各因素间的交互影响

通过Design-expert 8.0.5分析得到响应曲面的三维立体图像和等高线图(图2)。

图2A1和A2中相应曲面较平缓,等高线形状趋于圆形,说明乙醇浓度和液料比的交互作用不显著。随着乙醇浓度和料液比的增大,总黄酮提取率先增加后降低,作用效果一致,这与回归模型AB项

为正值相吻合;但料液比变化对于黄酮提取率影响较小,曲面平缓,等高线排列疏松,乙醇浓度变化对于黄酮提取率影响较大,曲面更陡峭,等高线分布密集,与模型方程中各因素对应的系数大小一致。图2B1和B2中乙醇浓度和超声功率的交互作用曲面更加陡峭,等高线呈椭圆形,说明两者的交互作用显著。随着乙醇浓度和超声功率的增加,总黄酮提取率先上升后降低,作用效果一致,这与回归模型AC

项为正值相吻合。超声功率的变化对于总黄酮提取率的影响更为明显,曲面更加陡峭,等高线分布更加密集,与回归模型方程中各因素对应的系数大小一致。图2C1和C2响应曲面陡峭,等高线形状为椭圆形。超声功率和料液比对总黄酮提取率的作用一致,表现为先增加后减少;但超声功率对总黄酮的影响更为显著,曲面陡峭,等高线更密集,与回归模型方程中各因素对应的系数大小一致。

2.2.4 优化结果与验证

在提取温度为60℃,提取时间8 min的条件下

下,最佳提取工艺条件为:乙醇浓度54%,液料比26,超声功率165 W。在最佳提取条件下5次重复试验进行验证,总黄酮的实际得率为2.385%,与预测值2.407%的相对误差为0.022%<0.05%,实验结果可靠。

2.2.5 抑菌活性实验结果

如表5所示,优化前抑菌圈直径为13.898±0.44 mm,优化后抑菌圈直径为13.946±0.28 mm,优化前后抑菌圈直径差异不显著($P=0.805>0.05$)。因此优化前后提取物抑菌活性没有发生变化。

表5 优化前后金黄色葡萄球菌抑菌圈直径大小

Table 5 The diameter of the inhibition zone of *Staphylococcus aureus* before and after optimization

抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone	实验号 No.				
	1	2	3	4	5
D1 (mm)	14.09	13.45	14.56	13.62	13.77
D2 (mm)	13.98	13.90	14.39	13.83	13.63

注:D1为优化前抑菌圈直径大小,D2为优化后抑菌圈直径大小。

Note:D1 is the diameter of inhibition zone before optimization,D2 is the diameter of inhibition zone after optimization.

3 结论与展望

根据实验结果,在提取条件为提取温度60℃,提取时间8 min,乙醇浓度53.89%,液料比26.27,超声功率163.73 W时,实际得率为2.385%。此优化结果与汤丽昌等^[10]在溶剂提取法中利用正交试验设计所得结果(提取率1.36%,提取时间2.5 h)相比,不仅总黄酮提取率提高了1.025%,而且提取时间缩短了2 h 22 min。另外,抑菌活性试验表明该工艺优化对假臭草提取物抑制金黄色葡萄球菌活性没有影响。

超声波辅助提取法由于操作简单易行,提取时间短,在黄酮类物质的提取中应用广泛。但大多数植物体内黄酮类物质的含量十分有限,因此需要优化提取条件。常用的优化方法还有正交设计法,该方法试验次数少、操作简单,但准确率和提取率均低于响应面优化法。通过本次实验得到实验结果希望可以为假臭草黄酮类物质的提取提供参考。

尽管通过科学的分析对提取方法进行了优化,但其产量依然不高。这无疑为进一步研究应用黄酮类物质带来了困境。因此寻找高产黄酮类微生物已成为研究人员关注的焦点,目前寻找具有高产黄酮类的植物,从其中分离出可以高产黄酮类的微生物一如植物内生真菌,并通过发酵的方法达到大量生产黄酮类物质的目的是其中研究的重要方

向^[13-15]。因此,我们努力通过假臭草内生真菌发酵提取大量的黄酮类物质是进一步研究的内容。

致谢:感谢美国伊利诺伊州立大学植物生物系Stephen R. Downie教授对本文英文论文摘要的修改,同时也感谢华侨大学的黄志峰、吴斌和高建义同学帮助采集植物材料。

参考文献

- Wu SJ(吴世捷), Gao LX(高力行). The bad biodiversity: alien plant species in Hong Kong. *Biodiv Sci*(生物多样性), 2002, 10:109-118.
- Waterhouse BM. Know your enemy: recent records of potentially serious weeds in northern Australia, Papua New Guinea and Papua (Indonesia). *Telopea*, 2003, 10:477-485.
- Hsu TW, Peng CI, Wang CM, et al. *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae), A newly naturalized plant in Taiwan. *Taiwania*, 2006, 51:41-45.
- Li ZY(李振宇). Chinese Invasive Species(中国外来入侵种). Beijing: China Forestry Publishing House, 2002. 164-165.
- Fang CB(方从兵), Wan XC(宛晓春), Jiang CJ(江昌俊). Advances in biosynthesis of flavonoids (review). *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报), 2005, 32:94-100.
- Heloina SF, GabrielaLAM, Flavia B, et al. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae). *J Nat Med-Tokyo*, 2013, 67:480-491.