

常霞,景炳年,范毅,等.金银花总三萜提取工艺及其抗菌抗氧化活性[J].江苏农业科学,2019,47(16):198-202.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.045

金银花总三萜提取工艺及其抗菌抗氧化活性

常霞,景炳年,范毅,王伟,刘雨晴,李智宁,郭唯,魏磊

(河南省生物技术开发中心/河南省植物天然产物开发工程技术研究中心,河南郑州 450002)

摘要:以金银花为原料,乙醇为溶剂,考察超声辅助提取金银花总三萜的最佳工艺。在单因素(料液比、乙醇浓度、超声时间和超声温度)试验基础上,利用响应面法,研究各因素间相互作用及对三萜提取率的影响,获得最佳提取工艺为料液比 1 g : 30 mL、乙醇浓度 75%、超声时间 50 min、超声温度 45 ℃,验证试验结果显示,三萜提取率为 3.71%,与理论值接近;通过微量稀释法检测常见致病菌对金银花总三萜的敏感性,最小抑菌浓度范围在 3 ~ 24 mg/mL 之间,证明金银花三萜具有较强的抗菌作用;DPPH、ABTS 自由基清除试验 IC_{50} 分别为 26.1、18.8 mg/mL,说明金银花三萜具有一定的抗氧化活性。本研究为金银花三萜进一步的研究开发提供了科学依据。

关键词:金银花;总三萜;响应面;抗菌;抗氧化;提取工艺

中图分类号:R284 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)16-0178-05

金银花是忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾或初开的花,具有清热解毒、疏散风热之功效,多用于治疗痈肿疮疖、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症^[1],其药用成分主要包括挥发油、有机酸类、黄酮和三萜类化合物。三萜类化合物具有抗菌、抗病毒、抗癌、抗炎、降血脂、降低胆固醇、增加免疫力等多种药理功能^[2-5],且毒性较低,因此成为中外研究的热点之一^[6]。目前,从金银花中已分离出 30 多个三萜类化合物^[7],并有保肝和利胆的功效^[8],但针对金银花中三萜类化合物的总量、提取工艺及抗菌抗氧化活性等方面的研究未见报道。

提取是回收和纯化生物活性物质最初且重要的一步,多种因素会影响提取效率和产量^[9],因此优化提取工艺最大程度提取生物活性物质十分必要。超声波提取技术提取效率高、耗能低、不破坏活性成分^[10]。同时,响应面法可以对多种影响提取效率的因素及因素间相互作用进行有效性分析^[11]。近年来,响应面法结合超声辅助提取技术在优化黄酮^[12]、多糖^[13]等天然活性成分的提取工艺中得到广泛应用。本研究采用响应面法优化金银花总三萜的超声辅助提取工艺,并考察提取所得的金银花总三萜对人体常见致病菌的抑菌活性及抗氧化活性,旨在为金银花总三萜的进一步研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金银花产自河南省封丘县,由新乡博凯生物技术有限公司提供;7 种常见致病菌(大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄

球菌 ATCC 29213、化脓性链球菌 ATCC 19615、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311、肺炎链球菌 ATCC 49619、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯氏菌 ATCC 700603)均购自南京便诊生物科技有限公司;齐墩果酸标准品购自中国药品生物制品检定所;胰蛋白胍购自上海宝录生物科技有限公司;牛肉浸膏购自北京双旋微生物培养基制品厂;D-101 大孔吸附树脂购自天津市光复精细化工研究所;微量 MIC 测定板购自美国 Corning 公司;DPPH、ABTS 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;无水乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯,购自北京化工厂。

ME-204 型电子天平;wi93008 型麦氏比浊仪;DHP-9082 型电热恒温培养箱;SYQ-DSX-280B 手提式压力蒸汽灭菌锅;YJ-VS-2 型超净工作台;KQ-500E 型超声波清洗仪;TU-1810 型紫外分光光度计;XMTD-7000 型恒温水浴锅;Bio-rad iMark™ 型酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 金银花三萜提取工艺流程 金银花打粉后过 60 目筛,称定 1.00 g 于 100 mL 锥形瓶中,以一定料液比加入一定浓度的乙醇溶液,在一定温度下超声提取一定时间,重复 3 次,滤液合并后浓缩定容,取适量测定总三萜含量。

1.2.2 三萜含量测定方法

1.2.2.1 标准曲线的绘制 以齐墩果酸为标准品,采用香草醛-冰醋酸-高氯酸分光光度法测定总三萜含量。称定标准品 4.00 mg,甲醇定容至 10 mL 容量瓶中。准确移取该溶液 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL 分别加入 10 mL 容量瓶中,挥尽溶剂。加入 0.4 mL 新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸,摇匀后置于 60 ℃ 水浴中加热 30 min。取出冷却至室温,加冰醋酸定容至 10 mL 摇匀,在 550 nm 波长下测定吸光度。以齐墩果酸含量 x 为横坐标,吸光度 y 为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为: $y = 28.175x - 0.0073$, $r^2 = 0.9992$ 。说明齐墩果酸标准品在 0 ~ 0.02 mg/mL 范围内线性关系良好。

1.2.2.2 三萜含量测定 根据“1.2.2.1”项下回归方程,计

收稿日期:2018-05-14

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:182102310061);河南省科学院基本科研项目(编号 18JK16015)。

作者简介:常霞(1963—),女,山西陵川人,高级工程师,从事中药化学研究。Tel:(0371)65353099;E-mail:fangyansci@163.com。

通信作者:魏磊,博士,助理研究员,从事植物化学及分子生物学研究。Tel:(0371)65353099;E-mail:yhweilei2@163.com。

算提取液总三萜含量。提取率计算公式为:

三萜提取率 = 三萜质量浓度 × 提取液体积 × 稀释倍数 / 金银花质量 × 100%。

1.2.3 金银花提取单因素试验及响应面设计 选定料液比(A)、乙醇浓度(B)、超声时间(C)、超声温度(D)4个因素作单因素试验,在此基础上进行响应面设计,根据 Box - Behnken 试验设计原理,采用4因素3水平共29组试验对提取工艺进行优化分析,因素水平见表1,试验条件及结果见表2。

表1 金银花总三萜提取工艺因素水平

水平	A:料液比 (g : mL)	B:乙醇浓度 (%)	C:超声时间 (min)	D:超声温度 (℃)
-1	1 : 25	60	20	30
0	1 : 30	80	40	40
1	1 : 35	100	60	50

表2 金银花总三萜提取工艺响应面试验结果

试验号	A	B	C	D	三萜提取率 y (%)
1	0	-1	-1	0	3.040
2	0	0	0	0	3.656
3	-1	-1	0	0	2.630
4	0	0	-1	-1	3.247
5	1	-1	0	0	3.120
6	0	0	0	0	3.733
7	1	0	0	-1	3.021
8	1	0	-1	0	3.311
9	-1	0	0	-1	2.882
10	0	0	1	-1	3.421
11	0	-1	0	-1	3.123
12	0	0	0	0	3.740
13	0	0	1	1	3.568
14	1	0	0	1	3.380
15	0	-1	0	1	3.540
16	-1	0	1	0	3.051
17	1	0	1	0	3.429
18	-1	0	0	1	3.002
19	0	1	0	1	3.021
20	0	0	-1	1	3.574
21	0	1	1	0	3.146
22	0	0	0	0	3.739
23	0	1	-1	0	3.014
24	-1	0	-1	0	2.936
25	0	1	0	-1	2.930
26	1	1	0	0	2.689
27	0	0	0	0	3.597
28	0	-1	1	0	3.388
29	-1	1	0	0	2.600

1.2.4 金银花总三萜制备 D-101 大孔吸附树脂经乙醇和蒸馏水预处理后,湿法装柱,平衡后上样(金银花醇提物),然后用蒸馏水及30%、50%、70%、95%乙醇溶液依次洗脱,收集各项洗脱液,浓缩,冻干,以95%乙醇洗脱项制备金银花总三萜,并将其配制成浓度为96 mg/mL的母液。

1.2.5 抑菌活性测定

1.2.5.1 菌株复苏及菌悬液的制备 上述7种供试菌种复

苏后接种于固体培养基上,培养12~24 h。从平板上挑取单个菌落,混悬于液体培养基中,制成浓度为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL的菌悬液,备用。

1.2.5.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 用微量稀释法测定金银花总三萜的最小抑菌浓度。首先用0.22 μm滤膜过滤“1.2.4”节约液母液,用制备好的液体培养基依次倍比稀释成9个浓度后,加入微量MIC测定板中,每孔0.1 mL;再分别加入“1.2.5.1”节的各种菌液,每孔0.1 mL。设置阳性对照(加入0.1 mL菌液和0.1 mL液体培养基)和阴性对照(只加液体培养基)。测定板于37℃恒温箱中培养24 h观察结果,完全没有细菌生长时的最低浓度即为最小抑菌浓度。将无菌生长的各孔取样,分别涂布于无菌琼脂平板上,37℃培养24 h观察结果,以平板上无细菌生长的最低药物浓度为最小杀菌浓度。

1.2.6 抗氧化活性测定

1.2.6.1 DPPH 自由基清除率测定 参照 Blois 的方法^[14]测定,略有变动。取质量浓度分别为3、6、12、24、48、96 mg/mL样品溶液100 μL,加入0.2 mmol/L DPPH 溶液100 μL,充分混匀,避光静置30 min后,以甲醇为空白对照,抗坏血酸为阳性对照,于517 nm波长处测吸光度。每一样品平行测3次,取平均值。清除率公式表示为:

$$\text{DPPH 清除率} = (1 - D_1/D_2) \times 100\%。$$

式中: D_1 为样品或者阳性对照吸光度; D_2 为空白对照吸光度。

1.2.6.2 ABTS 自由基清除率测定 参照 Re 等的方法^[15]测定。在反应体系中,样品溶液质量浓度亦分别为3、6、12、24、48、96 mg/mL,体积100 μL,以甲醇为空白对照,抗坏血酸为阳性对照。每一样品平行测3次取平均值。

上述所有试验于2017年7—11月在河南省科学院天然产物重点实验室完成。

2 结果与分析

2.1 单因素对金银花三萜提取率的影响

2.1.1 料液比 设定乙醇浓度60%、超声时间50 min、温度50℃,考察不同料液比(1 g : 10 mL,1 g : 15 mL,1 g : 20 mL,1 g : 25 mL,1 g : 30 mL,1 g : 35 mL)对金银花三萜提取率的影响,结果见图1-A。随溶剂体积的增加,提取率逐渐增大,1 g : 30 mL达到最大,之后不再增加,因此选择较佳料液比为1 g : 30 mL。

2.1.2 乙醇浓度 设定料液比1 g : 30 mL、超声时间50 min、温度50℃,考察不同乙醇浓度(20%、40%、60%、80%、100%)对金银花三萜提取率的影响,结果见图1-B。随着乙醇浓度增加,提取率增大,80%达到最大;之后提取率不升反降,可能由于金银花三萜极性与80%乙醇相似,选择80%乙醇为最佳提取浓度。

2.1.3 超声时间 设定料液比1 g : 30 mL、乙醇浓度80%、温度50℃,考察不同超声时间(20、40、60、80、100 min)对金银花三萜提取率的影响,结果见图1-C。40 min时提取率陡然上升,此后逐渐下降,可能超声时间延长,使三萜化合物发生部分转化,故选择最佳提取时间为40 min。

2.1.4 超声温度 设定料液比1 g : 30 mL、乙醇浓度80%、

超声时间 40 min,考察不同超声温度(30、40、50、60、70 ℃)对金银花三萜提取率的影响,结果见图 1-D。40 ℃时提取率

最高,超过此温度提取率下降,可能温度升高会影响三萜稳定性,故选择 40 ℃为最佳提取温度。

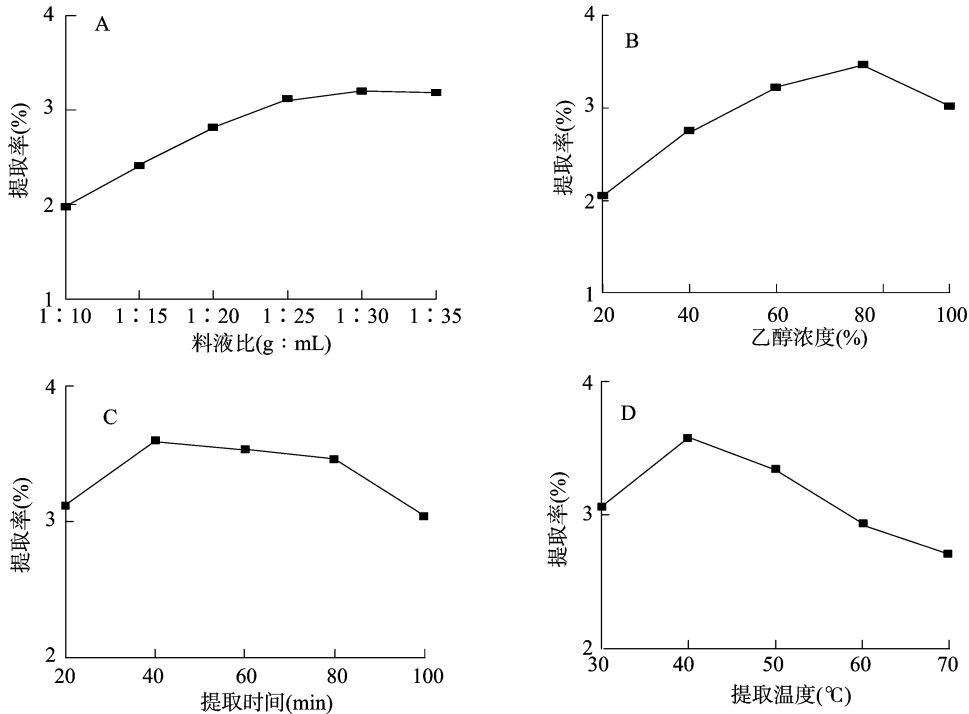


图1 料液比(A)、乙醇浓度(B)、超声时间(C)、超声温度(D)对三萜提取率的影响

2.2 响应面法优化金银花三萜提取工艺

2.2.1 不同因素对提取效果的影响 采用 Design - Expert 8.0.6 软件得到拟合模型:

$$y = 3.693\ 00 + 0.154\ 08A - 0.120\ 08B + 0.073\ 417C + 0.121\ 75D - 0.100\ 25AB + 7.500\ 00E - 004AC + 0.059\ 750AD - 0.054\ 000BC - 0.081\ 500BD - 0.045\ 000CD -$$

$$0.467\ 75A^2 - 0.444\ 00B^2 - 0.083\ 500C^2 - 0.135\ 50D^2.$$

对拟合模型进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可以看出,回归模型极显著($P < 0.000\ 1$),而误差项不显著,说明回归方程与实际情况吻合较好,试验误差小,因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

表 3 二次回归模型的方差分析结果

变异来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值	显著性
A	1	0.28	0.28	48.80	<0.000 1	**
B	1	0.17	0.17	29.64	<0.000 1	**
C	1	0.065	0.065	11.08	0.005 0	**
D	1	0.18	0.18	30.47	<0.000 1	**
AB	1	0.040	0.040	6.89	0.020 0	*
AC	1	2.250×10^{-6}	2.250^{-6}	3.854^{-4}	0.984 6	
AD	1	0.014	0.014	2.45	0.140 1	
BC	1	0.012	0.012	2.00	0.179 4	
BD	1	0.027	0.027	4.55	0.051 1	
CD	1	8.100^{-3}	8.100^{-3}	1.39	0.258 5	
A ²	1	1.42	1.42	243.10	<0.000 1	**
B ²	1	1.28	1.28	219.04	<0.000 1	**
C ²	1	0.045	0.045	7.75	0.014 7	*
D ²	1	0.12	0.12	20.40	0.000 5	**
模型	14	3.10	0.22	37.89	<0.000 1	**
残差	14	0.082	5.838^{-3}			
失拟项	10	0.065	6.522^{-3}	1.58	0.349 6	
净误差	4	0.017	4.128^{-3}			
校正项	28	3.18				

注: *、** 分别表示模型或考察因素有显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)影响。

决定系数 R^2 和调整决定系数 $\text{Adj } R^2$ 分别为 0.974 3 和 0.948 6, 说明该模型拟合度良好; 预测决定系数 $\text{Pred } R^2$ 为 0.873 7, 说明该模型预测性良好。方程中 A 、 B 、 C 、 D 、 A^2 、 B^2 、 D^2 对响应值影响极显著, 料液比 A 、乙醇浓度 B 、提取温度 D 对提取率影响最显著, 其次为超声时间 C 。 AB 交互作用显著, 说明不同提取条件与金银花总三萜提取率之间不是简单的线性关系。

2.2.2 各因素交互作用分析 图 2 是采用 Design - Expert 8.0.6 软件绘出的响应面及等高线图。等高线的形状反映交互效应的强弱, 圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形则表示两因素交互作用显著。从响应面等高线的分布规律和间

隔距离可以看出因素间交互作用的强弱和因素对响应值的影响程度^[16]。图 2 表明料液比与乙醇浓度之间交互作用最显著, 对金银花三萜的提取率影响最大。

2.2.3 最佳条件的确定及验证试验 用 Design - Expert 8.0.6 软件得出金银花总三萜提取最优条件为: 料液比 1 g : 31.1 mL, 乙醇浓度 75.4%, 超声时间 47.8 min, 超声温度 45 °C, 为适应试验操作调整为: 料液比 1 g : 30 mL, 乙醇浓度 75%, 超声时间 50 min, 超声温度 45 °C。此条件下进行 5 次验证试验, 平均提取率为 3.71%, 达到预测提取率 (3.77%) 的 98.4%, 说明应用响应面法优化了金银花总三萜的超声辅助提取工艺, 且金银花中三萜类物质含量较高。

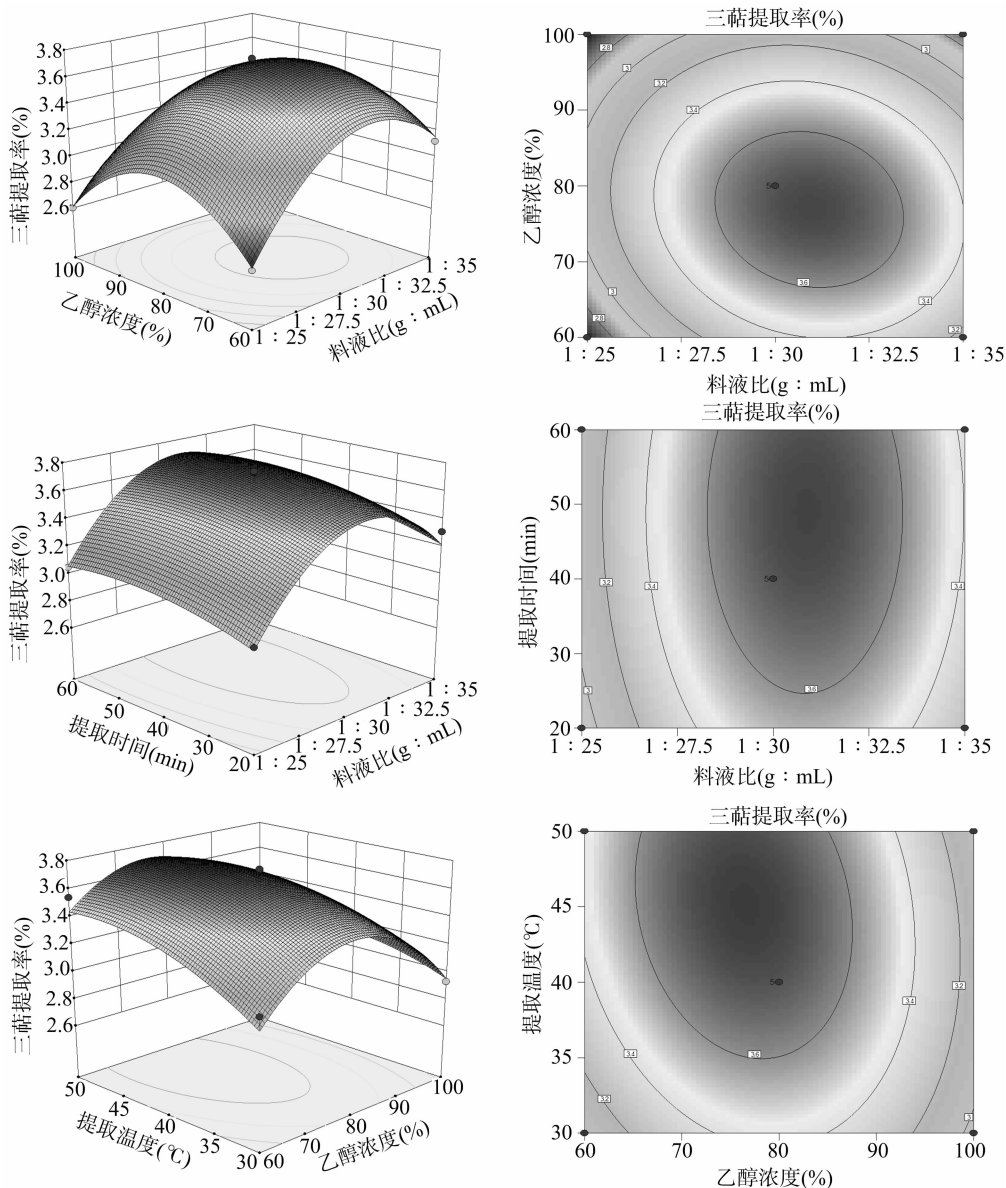


图2 因素AB(I)、AC(II)、BD(III)交互作用对金银花三萜提取率影响的响应面图和等值线

2.3 抑菌试验结果

金银花总三萜抑菌试验结果见表 4。对所选 7 种常见致病菌的最小抑菌浓度 (MIC) 范围在 3 ~ 24 mg/mL, 整体抑菌作用较强, 尤其是对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用最强。

2.4 抗氧化试验结果

DPPH 和 ABTS 自由基清除试验结果显示, 金银花总三萜系列溶液浓度分别为 3、6、12、24、48、96 mg/mL, 对应的 DPPH 清除率分别为 24.3%、36.8%、45.6%、49.7%、53.2%、55.8%, 对应的 ABTS 清除率分别为 27.5%、39.6%、48.3%、51.3%、

表 4 金银花三萜对 7 种常见致病菌 MIC 和 MBC 的测定结果

菌种名称	革兰氏染色	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
大肠杆菌(<i>Escherichia coli.</i>)	—	3	3
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	3	6
肺炎链球菌(<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	+	6	12
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	—	6	12
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	—	12	12
化脓性链球菌(<i>Streptococcus pyogenes</i>)	+	12	24
肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	—	24	24

注：“+”表示革兰氏染色阳性，“—”表示革兰氏染色阴性。

59.7%、62.8%，表明金银花总三萜具有一定的清除自由基的能力，清除率 50% 即 IC₅₀ 所对应浓度分别为 26.1 mg/mL 和 18.8 mg/mL，且清除能力随总三萜含量增加而增强，呈现出良好的剂量效应关系。

3 结论与讨论

中药功能活性成分复杂，其疗效多是由多成分、多靶点、多效应综合作用的结果，加之金银花总三萜含量、提取工艺及抗菌、抗氧化活性至今未见报道，因此，本试验选择总三萜作为金银花有效成分的提取指标。提取工艺的优劣能直接影响生药的利用率及后期加工的难易，提取工艺的研究是中药生产实现现代化的关键环节。

超声波提取法近年来迅速发展。超声波能增大物质分子运动频率和速度，增加溶剂穿透力，提高药物成分溶出速度和溶出数量，因此与常规方法比较，超声波法提取效果好、对有效成分破坏少^[17]。提取料液比、提取温度、提取溶剂、提取时间等是影响药物有效成分提取率的关键因素，要得到最佳提取工艺须要进行大量的试验研究，响应面法是优化提取工艺时常采用的方法。

本研究应用响应面法优化金银花总三萜的超声辅助提取工艺，确定的最佳提取工艺参数为：料液比 1 g：30 mL、乙醇浓度 75%、超声时间 50 min、超声温度 45 ℃，此条件下得到三萜提取率为 3.71%，与其他中药相比，金银花中总三萜含量较高，且表现出了较强的抗菌活性和一定的抗氧化活性，说明在产量及活性方面金银花三萜都具有进一步研究开发的价值；加之试验值与理论值大致相同，说明该工艺省时省力、科学性较强，具有较强的实际应用价值。本研究为进一步研究金银花三萜化合物、提高金银花资源综合开发利用提供试验依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:221.
[2] 常嵩华,程天印,董振生. 山莓叶三萜对大鼠免疫功能的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2012,38(1):83-85.
[3] 王艺玮,徐盛涛,徐进宜. 五环三萜羽扇豆烷型天然产物抗肿瘤活性研究进展[J]. 药学与临床研究,2017(4):336-342,347.

[4] 桂元,黄文,刘莹,等. 超临界 CO₂ 萃取茯苓皮中三萜类成分[J]. 食品科学,2012,33(2):110-114.
[5] 李 晔,朱忠敏,姚渭溪,等. 灵芝三萜类化合物的研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):165-171.
[6] Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, et al. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer[J]. Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library, 2011, 16: 980-996.
[7] 朱述英. 金银花化学成分的研究现状[J]. 价值工程,2011,30(29):284-285.
[8] 陈明光,刘 倩. 中药金银花的药用成分和药理作用[J]. 北方药学,2013,15(10):29-29.
[9] Sulaiman I S C, Basri M, Fard Masoumi H R, et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology[J]. Chemistry Central Journal, 2017, 11(1):54.
[10] 贾韶千,吴彩娥,李艳霞. 枸杞中黄酮类化合物的超声波强化提取[J]. 农业机械学报,2009,40(5):130-134.
[11] Bai X, Yue T, Yuan Y, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis[J]. Journal of Separation Science, 2010,33(23/24):3751-3758.
[12] 王 鹏,郭 丽,周凤超,等. 玉米皮类黄酮超声波提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):337-340.
[13] 刘钱薇,葛小东,张 钱,等. 山芝麻多糖的超声辅助提取工艺优化及对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 江苏农业科学, 2017,45(5):183-188.
[14] Blois M S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical[J]. Nature,1958,29(4617):1199-1200.
[15] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology & Medicine,1999,26(9/10):1231-1237.
[16] 曲昊杨,朱文学,刘 琛,等. 苹果渣果胶提取工艺优化及碱法降酯效果评价[J]. 食品科学,2014,35(14):87-92.
[17] 张振凌,冀春茹,李 军,等. 超声提取对当归流浸膏中化学成分的影响[J]. 中成药,1997(2):1-2.