

· 中药工业 ·

水辣蓼总黄酮的提取工艺及不同极性部位体外抑菌活性研究[△]

罗晓韵, 程轩轩*, 杨慧文, 温淑婷, 杨全*

(广东药科大学 中药学院 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的: 优化水辣蓼总黄酮的超声提取工艺, 比较不同极性萃取物对致病性大肠杆菌的体外抑菌效果。方法: 在单因素试验的基础上, 选取料液比、超声时间及乙醇浓度三因素进行 Box-Behnken 响应面设计。采用牛津杯法测定各萃取物的抑菌圈直径, 通过微量稀释法和平板法测定最低抑菌浓度(MIC)。结果: 水辣蓼总黄酮最优提取条件为料液比 1:38, 乙醇浓度 66%, 超声提取 3 次, 每次 37 min; 总黄酮质量分数为 $6.0847 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同极性的萃取物中, 乙酸乙酯部位抑菌活性最强, 抑菌圈直径 $(136.8 \pm 0.08) \text{ mm}$, 最低抑菌浓度(MIC) 为 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论: 优化的提取工艺稳定可行、操作简便; 水辣蓼的乙酸乙酯萃取物是其体外抑制致病性大肠杆菌的活性部位。

[关键词] 水辣蓼; 总黄酮; 响应面法; 致病性大肠杆菌; 抑菌活性

Study on Extraction Technology of Total Flavonoids from *Polygonum hydropiper* and Antimicrobial Susceptibility of Different Polarity Fractions

LUO Xiaoyun, CHENG Xuanxuan*, YANG Huiwen, WEN Shuting, YANG Quan*

(Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production & Development of Cantonese Medical Materials, College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction conditions of total flavonoids from *Polygonum hydropiper* L. and compare the antimicrobial susceptibility of different extracts on pathogenic *E. coli*. **Methods:** On the basis of single-factor tests, Box-Behnken Design was used to optimize extraction technology of total flavonoids from *P. hydropiper* with three factors of liquid-solid ratio, ethanol concentration and extraction time. The diameter of inhibition zone of different extracts was determined by cylinder plate method and minimal inhibitory concentration (MIC) was investigated by the broth dilution and plate method. **Results:** The optimal extraction conditions were as follows: ultrasonic extracting with 66% ethanol for three times, 37 min for each time, liquid-solid ratio of 38:1 (mL:g). Under the optimal condition, the content of total flavonoids was $6.0847 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Among the extracts with different polarities, ethyl acetate extract showed the strongest antibacterial activity, with the inhibition zone diameter of $136.8 \pm 0.08 \text{ mm}$, and MIC of $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion:** The optimum extraction process is stable, simple and feasible. The ethyl acetate extract could be considered as the antibacterial active site of *P. hydropiper*.

[Keywords] *Polygonum hydropiper* L.; total flavonoids; response surface methodology; enteropathogenic *E. coli*; antimicrobial susceptibility

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.6.020

大肠杆菌病是由病原性大肠杆菌所致的一种人类与动物共患的多型性传染病, 本菌能引起人类和动物的肠道及泌尿系统感染。其中畜禽的大肠杆菌性腹泻是养殖场中最常见的疾病, 常引起大批畜禽发育不良或死亡, 经济损失严重^[1-5]。因此防治畜禽

大肠杆菌性腹泻, 开发高效低毒和低耐药性药物是养殖业发展的重要课题之一。

兽医临床已证实, 蓼科植物水辣蓼 *Polygonum hydropiper* L. 具有祛湿止泻、散瘀止痛、杀虫等功能, 主治畜禽冷肠泄泻、寒痢等症^[6-7]。目前关于水

[△] [基金项目] 广东省公益研究与能力建设专项资金项目(2014A020208133)

* [通信作者] 程轩轩, 副教授, 研究方向: 中药有效成分与药理活性研究, E-mail: gdyxcxx@126.com; 杨全, 教授, 研究方向: 中药材规范化生产及道地药材质量研究, E-mail: yangquan7208@vip.163.com

辣蓼的基础研究较少,药效物质基础及药理作用机制尚不明确,质量控制标准缺乏,从而限制了辣蓼资源应用。预实验发现,水辣蓼主要成分为黄酮,本研究首先优化总黄酮提取工艺,并对不同极性部位提取物的体外抗致病性大肠杆菌活性进行评价,旨在确定其抑菌的有效部位,为充分利用水辣蓼资源及中兽药开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-500DE 数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);UV-1800 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);BCM-1000A 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);YXQ-LS-S II 高温高压灭菌锅(上海东亚压力容器制造有限公司)。

1.2 材料

致病性大肠杆菌 O₇₈ 购自广东省微生物菌种保藏中心;芦丁(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:J1430068,98.0%);硫酸卡那霉素(健阳生物科技有限公司);牛肉膏(北京奥博星生物技术有限公司);细菌学蛋白胨、技术琼脂粉(广东环凯微生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

水辣蓼采于湖南省衡阳市,经广东药科大学杨全教授鉴定为蓼科植物水辣蓼 *Polygonum hydropiper* L. 的干燥全草,标本保存于中药学院标本馆。

2 方法

2.1 水辣蓼总黄酮提取工艺优化

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取 1 g 水辣蓼干燥粉末(过 40 目筛),以适宜的料液比、乙醇浓度、超声时间及功率进行提取,合并滤液,浓缩,用提取溶剂定容至 10 mL,摇匀,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁 11.0 mg,用 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL,摇匀,备用。

2.1.3 标准曲线的制备 分别吸取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 对照品溶液,置于 10 mL 量瓶中,以 70% 乙醇定容。再分别精密移取 1 mL 上述溶液置于 10 mL 量瓶中,以亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色^[8],于 505 nm 处测定吸光度。以吸光度值为纵坐标、芦丁浓度(X , mg·mL⁻¹)为横坐标绘制标准曲线。

2.1.4 供试品总黄酮含量测定 精密量取 1 mL 供试品溶液置于 10 mL 量瓶,按 2.1.3 项下方法测定吸光度。根据标准曲线方程计算总黄酮含量。

2.1.5 单因素试验

2.1.5.1 提取次数对总黄酮得率的影响 精密称定 1 g 药材,按 1:30 料液比加入 80% 乙醇,400 W 功率超声提取 30 min,考察不同提取次数(1、2、3、4、5 次)对总黄酮含量影响。

2.1.5.2 料液比对总黄酮得率的影响 精密称定 1 g 药材,以 80% 乙醇为提取溶剂,400 W 功率超声提取 3 次,每次 30 min,考察不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对总黄酮含量影响。

2.1.5.3 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 精密称定 1 g 药材,按 1:30 料液比,400 W 功率超声提取 3 次,每次 30 min,考察乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)对总黄酮含量影响。

2.1.5.4 提取时间对总黄酮得率的影响 精密称定 1 g 药材,按 1:30 料液比加入 70% 乙醇,400 W 功率超声提取 3 次,考察提取时间(20、30、40、50、60 min)对总黄酮含量影响。

2.1.5.5 超声功率对总黄酮得率的影响 精密称定 1 g 药材,按 1:30 料液比加入 70% 乙醇,超声提取 3 次,每次 30 min,考察超声功率(300、350、400、450、500 W)对提取样品总黄酮含量影响。

2.1.6 响应面分析法优化提取工艺 在单因素试验基础上,根据 Design Expert 8.0 软件中的 Box-Behnken 设计原理^[8-10],选取料液比、乙醇浓度和超声时间进行三因素三水平响应面分析,因素水平设计见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

水平	因素		
	A 料液比	B 乙醇浓度(%)	C 提取时间/min
-1	1:20	60	20
0	1:30	70	30
1	1:40	80	40

2.2 抑菌实验

2.2.1 菌液的制备 致病性大肠杆菌 O₇₈ 菌株经复苏后以营养肉汤于摇床 150 r·min⁻¹ 37 ℃ 培养 24 h,以平板稀释法^[11]配制终浓度为 1.0 × 10⁷ CFU·mL⁻¹ 的菌悬液。

2.2.2 供试品药液的制备 水辣蓼不同浓度醇提液

的制备:按照优选的最佳工艺制备提取液回收溶剂,浓缩至药液浓度为1.00、1.25、1.50、2.00 g(生药)·mL⁻¹。

不同极性提取物的制备:将上述提取液,减压回收溶剂后,混悬于蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇萃取。各段萃取液分别回收溶剂、蒸干,得四段浸膏。分别精密称定标准上述浸膏各100 mg,以5‰CMC-Na溶液1 mL分散,121℃高压灭菌20 min,制得无菌样品。阳性对照药为卡那霉素(5‰CMC-Na溶解)。

2.2.3 抑菌实验 吸取100 μL菌悬液均匀涂布后,以牛津杯法测定药液抑菌活性,以5‰CMC-Na作为空白对照,37℃恒温培养24 h。观察抑菌情况,用游标卡尺测量抑菌圈直径(mm),重复3次。

2.2.4 不同极性萃取物中总黄酮含量与抑菌活性比较 分别精密吸取2.2.2项下不同极性部位的药液各1 mL,置于10 mL量瓶中,按2.1.3项下方法显色并测量吸光度,计算不同极性浸膏中总黄酮含量。

2.2.5 最低抑菌浓度(MIC)的测定 取2.2.2项下的乙酸乙酯萃取液,以肉汤稀释法^[11]测量最低抑菌浓度(MIC)。

3 结果与分析

3.1 标准曲线方程

以吸光度值为纵坐标、芦丁浓度(X , mg·mL⁻¹)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 1.215 2X - 0.012 4$, $r = 0.999 1$ 。

3.2 单因素考察

3.2.1 提取次数对总黄酮含量影响 总黄酮含量随着提取次数增加呈上升趋势,提取次数超过3时,总黄酮含量上升趋势减缓。考虑操作方便和时间成本,故确定提取3次为宜,见图1。

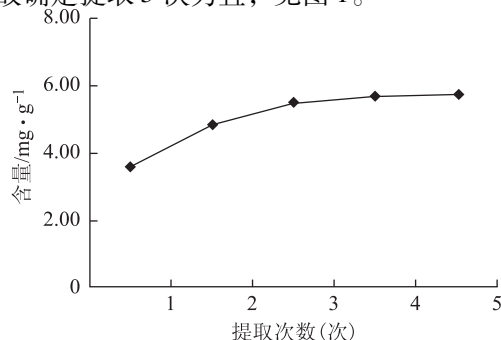


图1 提取次数对总黄酮含量的影响

3.2.2 料液比对总黄酮含量影响 随料液比的增加,总黄酮含量成先升后降,并于1:30处有最大值(6.20 mg·g⁻¹)。鉴于此,确定1:30为最优料液比,见图2。

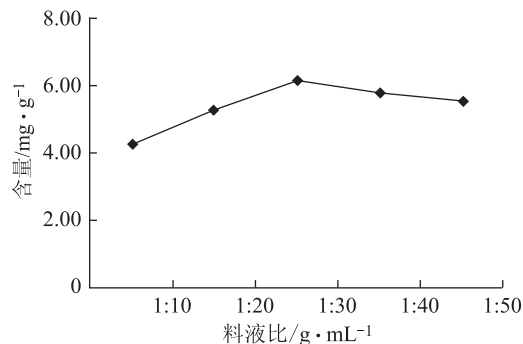


图2 料液比对总黄酮含量的影响

3.2.3 乙醇浓度对总黄酮含量影响 由图3可知,乙醇浓度为70%时总黄酮含量有极大值5.78 mg·g⁻¹。故选择70%为适宜醇浓度。

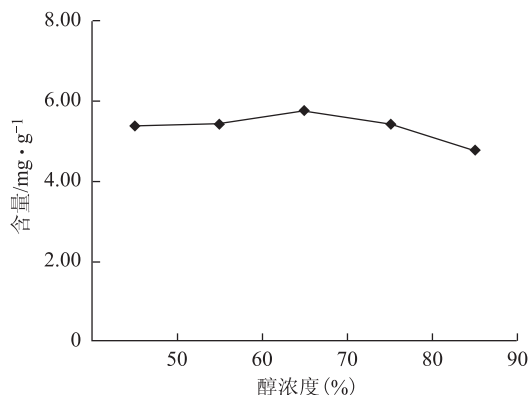


图3 醇浓度对总黄酮含量的影响

3.2.4 提取时间对总黄酮含量影响 由图4可知,当提取时间为30 min时,总黄酮含量有最大值(6.02 mg·g⁻¹)。在30 min后,随提取时间的延长,对提取率的提高几乎无影响,故确定30 min为最优提取时长。

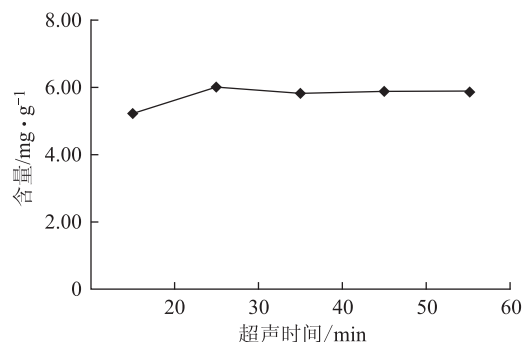


图4 提取时间对总黄酮含量的影响

3.2.5 超声功率对总黄酮含量影响 由图5可知,当超声功率为450 W时总黄酮含量有极大值($6.95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。故认为450 W为适宜超声功率。

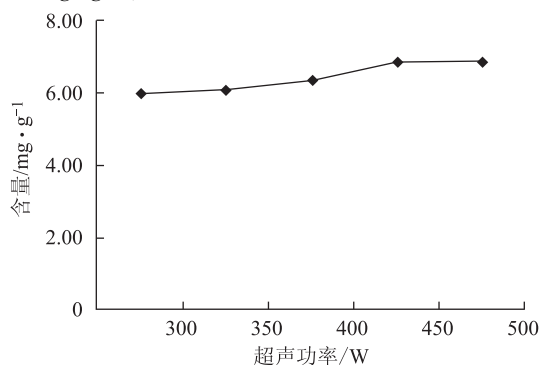


图5 超声功率对总黄酮含量的影响

3.3 提取工艺的响应曲面优化

提取工艺响应曲面优化实验结果见表2。根据实验结果建立总黄酮含量(Y)对料液比(A)、乙醇浓度(B)及提取时间(C)的二元多项回归模拟方程:
 $Y = 5.9672 + 0.3282A - 0.1447B + 0.4168C - 0.1787AB + 0.0566AC - 0.1173BC - 0.2239A^2 - 0.5581B^2 - 0.2489C^2$ 。

表2 响应面分析方案及实验结果

实验号	料液比	醇浓度(%)	超声时间/min	总黄酮含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	0	1	6.29
2	0	0	0	6.03
3	0	0	0	5.94
4	0	0	0	6.08
5	0	-1	-1	4.87
6	0	1	-1	4.72
7	-1	-1	0	4.73
8	0	0	0	5.86
9	1	-1	0	5.83
10	1	0	-1	5.26
11	-1	0	-1	4.80
12	0	0	0	5.92
13	1	1	0	5.28
14	0	1	1	5.22
15	-1	1	0	4.90
16	-1	0	1	5.62
17	0	-1	1	5.84

表3 回归模型方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	$Prob > F$	显著性
模型	4.559 0	9	0.506 6	41.573 6	<0.000 1	**
A	0.861 6	1	0.861 6	70.713 5	<0.000 1	**
B	0.167 5	1	0.167 5	13.747 4	0.007 6	**
C	1.390 0	1	1.399 0	114.076 8	<0.000 1	**
A × B	0.127 8	1	0.127 8	10.486 7	0.014 3	*
A × C	0.012 8	1	0.012 8	1.050 6	0.339 5	
B × C	0.055 0	1	0.055 0	4.515 1	0.071 2	
A ²	0.211 1	1	0.211 1	17.326 1	0.004 2	**
B ²	1.311 5	1	1.311 5	107.639 6	<0.000 1	**
C ²	0.260 8	1	0.260 8	21.402 4	0.002 4	*
残差	0.085 3	7	0.012 2			
失拟项	0.052 3	3	0.017 4	2.115 2	0.241 0	
净误差	0.033 0	4	0.008 2			
总离差	4.644 2	16				

由表3可知,二次方程模型的 $Prob > F < 0.000 1$,表明该二次方程模型极显著。失拟项 $P = 0.241 0 > 0.1$,不显著,说明模型不存在失拟因素,可以用回归方程模拟实验的真实点。回归模型的 $r = 0.981 6$ ($R_{Adj}^2 = 0.958 0$),表明实测值与预测值具有高度关联性。变异系数 $C.V. \% = 2.013 5\%$,说明模型的

置信度较高。根据 $Prob > F$ 值,A、B、C、A²、B²均为二次回归模型的极显著因素($P < 0.01$),AB和C²为模型的显著因素。其中料液比(A)和醇浓度(B)存在交互作用。此结论亦可以根据等高线密度和响应曲面陡度得到证实^[9-10]。

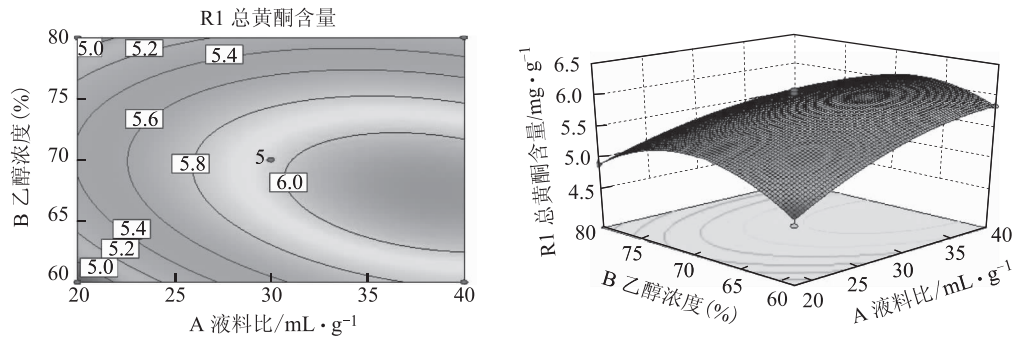


图 6 液料比与醇浓度对总黄酮含量的等高线图和响应面图

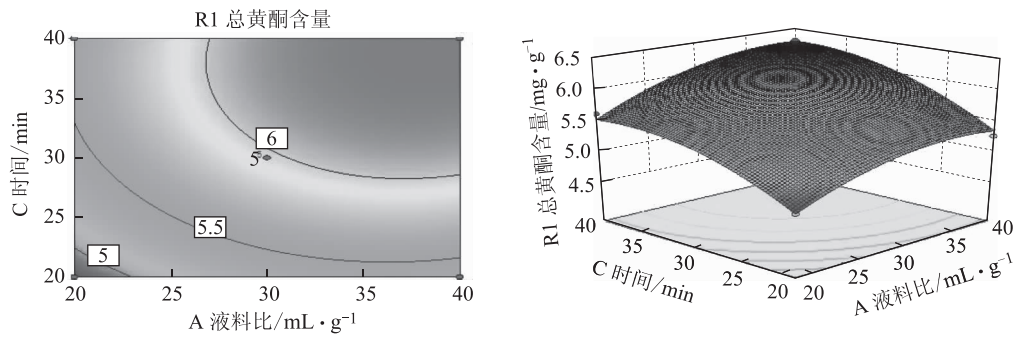


图 7 液料比与超声时间对总黄酮含量的等高线图和响应面图

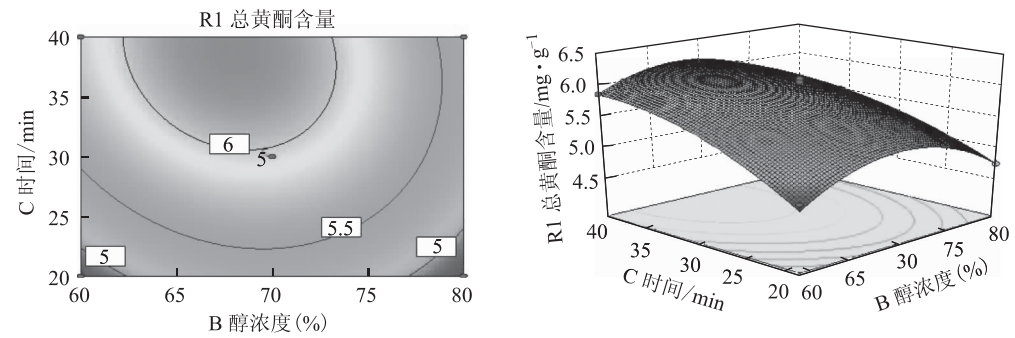


图 8 乙醇浓度与超声时间对总黄酮含量的等高线图和响应面图

由 Design-Expert8.0 软件得出, 总黄酮最优提取工艺: 料液比 1:38, 乙醇浓度 66%, 超声提取 3 次, 每次 37 min。在此条件下重复实验 5 次, 总黄酮含量为 6.084 7 mg·g⁻¹, 与模型预测值(6.349 4 mg·g⁻¹)接近。

3.4 抑菌实验结果

由表 4~5 可得, 水蓼提取物抑菌活性与药液浓度、总黄酮含量呈正相关, 不同极性萃取物中以乙酸乙酯段萃取物总黄酮含量最高及抑菌活性最强。以肉汤稀释法测定其最低抑菌浓度(MIC)为 25 mg·mL⁻¹。

表 4 不同浓度水辣蓼醇提液的抑菌圈

	空白组	卡那霉素	药液浓度/g·mL ⁻¹			
			1.00	1.25	1.50	2.00
抑菌圈直径/mm	—	141.91 ± 0.01	11.99 ± 0.04	13.14 ± 0.03	13.32 ± 0.07	13.71 ± 0.07

注: “—” 为无抑菌圈。下同。

表 5 水辣蓼不同极性萃取物的抑菌圈直径及总黄酮含量

	卡那霉素	石油醚层	乙酸乙酯层	正丁醇层	水层	空白对照
抑菌圈直径/mm	13.78 ± 0.10	—	13.68 ± 0.08	—	—	—
总黄酮含量/mg·g ⁻¹	—	5.093	23.646	8.128	3.607	—

表6 乙酸乙酯段提取液最低抑菌浓度测定

药液浓度/ mg·mL ⁻¹	100.00	50.00	25.00	12.50	6.25
+++ 生长情况	—	—	—	++	++

注：一无菌生长；+ 菌体较少；++ 菌体较多；+++ 菌体很多。

4 讨论

预实验发现，水辣蓼主要成分为黄酮类化合物。分别比较了药材的水提液、醇提液和粗多糖对致病性大肠杆菌 O₇₈ 的抑制效果。结果显示，醇提液的抑菌圈较为明显。同时还发现，上述样品中总黄酮含量与抑菌活性呈正相关。故本文对水辣蓼总黄酮的醇提工艺进行优化，并制备不同极性的萃取物，进行抑菌活性的比较。结果显示，乙酸乙酯萃取物为水辣蓼抑制致病性大肠杆菌的活性部位，最低抑菌浓度(MIC)为 25 mg·mL⁻¹。

鉴于超声波对固体样品提取效率较高，可避免高温对目标成分的破坏，具有提取时间短、提取温度低的优点。本研究采用响应面法优化水辣蓼总黄酮的超声提取工艺，并确定最佳工艺参数：料液比 1:38，醇浓度 66%，超声提取 3 次，每次 37 min。各因素对总黄酮得率的影响程度：提取时间(C) > 料液比(A) > 乙醇浓度(B)。最佳工艺条件下实测总黄酮提取量为 6.084 7 mg·g⁻¹，与理论值 6.349 4 mg·g⁻¹ 基本相符。回归分析与验证试验表明该工艺稳定可行。

水辣蓼作为一种常见易得的传统中草药，在中医及兽医临床应用历史悠久、疗效确切。本研究已

证实，水辣蓼对 O₇₈ 致病性大肠杆菌有较好的抑菌活性。未来还将对水辣蓼体内抑菌效果及作用机制进行深入研究。

参考文献

- [1] 李春花. 中药复方“连黄”抗大肠杆菌性腹泻作用的实验研究[D]. 吉林: 延边大学, 2008.
- [2] 付水广, 张水印. 引起哺乳仔猪死亡原因分析及防控措施[J]. 南昌高专学报, 2006, 21(1): 104-105.
- [3] 王国强, 刘云, 方世宇. 哺乳仔猪死亡原因及控制措施[J]. 养猪, 2004(6): 17-18.
- [4] 刘书亮, 陶勇, 王红宁, 等. 规模化猪场致病性大肠杆菌血清型鉴定[J]. 西南农业学报, 2000(S1): 74-77.
- [5] 夏伦斌, 左瑞华, 葛凯等. 规模化猪场致病性大肠杆菌的耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 183-184.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 第二部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [8] 刘春雨, 王集会. 发酵蜈蚣粉中总黄酮类含量测定的方法学研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 154-155.
- [9] 李亚娜, 林永成, 余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32(11): 28-32.
- [10] 阙森琳, 蒋玉蓉, 曹美丽, 等. 响应面法优化藜麦种子多酚提取工艺及其品种差异[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 7-12.
- [11] 沈关心. 微生物学与免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

(收稿日期 2017-01-20)