

DOI:10.16515/j.cnki.32-1722/n.2022.02.013

蒲公英总黄酮萃取工艺及其体外抗氧化性、抑菌性研究

朱庆莉¹, 王嘉翊², 贺 旺², 柴 靖², 江汉尧², 周 伟³

(1. 金陵科技学院理学院, 江苏 南京 211169; 2. 金陵科技学院动物科学与食品工程学院, 江苏 南京 211169; 3. 南京工业大学化工学院, 江苏 南京 210009)

摘 要:以蒲公英为原料、无水乙醇为携带剂,以总黄酮萃取率为指标,通过单因素试验和正交试验优化超临界 CO₂ 流体萃取工艺,初步探讨黄酮类萃取物的抗氧化性及抑菌性。试验结果表明:蒲公英中总黄酮的最佳萃取条件为压力 30 MPa、温度 40 °C、时间 80 min、乙醇流速 3.5 mL·min⁻¹,萃取率达 1.68%±0.02%;黄酮类萃取物对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)和羟基自由基(·OH)的清除效果与萃取物浓度呈正比关系;黄酮类萃取物对淀粉液化芽孢杆菌、大肠杆菌和黑曲霉均有抑制效果,对淀粉液化芽孢杆菌的抑制效果最好。

关键词:蒲公英;总黄酮;超临界 CO₂ 萃取;抗氧化性;抑菌性

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1672-755X(2022)02-0086-07

Study on the Extraction Process and Antioxidant Activity and Antibacterial Activity *in vitro* of Flavonoids from Dandelion

ZHU Qing-li¹, WANG Jia-yi¹, HE Wang¹, CHAI Jing¹, JIANG Han-yao¹, ZHOU Wei²

(1. Jinling Institute of Technology, Nanjing 211169, China; 2. Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

Abstract: In this paper, with dandelion as raw material, anhydrous ethanol as carrier, and the extraction rate of flavonoids as index, the supercritical CO₂ fluid extraction(SFE-CO₂) process was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment, and the antioxidant activity and antibacterial activity *in vitro* of flavonoids extract were discussed. Results showed that the optimum process conditions of extraction were as follows: the pressure of 30 MPa, temperature of 40 °C, time of 80 min, the flow rate of ethanol 3.5 mL·min⁻¹. Under such conditions, the extraction rate of flavonoids reached 1.68%±0.02%. The scavenging abilities of flavonoid extract on 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical(DPPH·) and hydroxyl radical(·OH) were positively correlated with the concentration of the flavonoids extract. The antibacterial effect of flavonoids extract was tested by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Escherichia coli* and *Aspergillus niger*. It was showed that flavonoids extract had more effective bacteriostasis on *B. amyloliquefaciens* than those of *E. coli* and *A. niger*.

Key words: dandelion; flavonoids; SFE-CO₂; antioxidant activity; antibacterial activity

蒲公英隶属菊科,是多年生草本植物,另有婆婆丁、黄花苗、黄花地丁、黄花三七等别名。它是一种历史悠久的中药,深受人们的喜爱。随着现代科学技术的不断进步,人们对蒲公英的药理作用和药效的认知

收稿日期:2022-03-21

基金项目:江苏省高等学校自然科学研究面上项目(20KJD530003);金陵科技学院孵化项目基金(jit-fhxm-201922);金陵科技学院科教融合项目(2021KJRH38);金陵科技学院“创客”虚拟班持续建设项目(2017009)

作者简介:朱庆莉(1985—),女,江苏盐城人,讲师,博士,主要从事生物质能源的开发与利用等研究。

也在不断深入,相关内容受到了国内外研究者的广泛关注^[1-4]。大量研究表明,蒲公英的主要成分有多糖类、黄酮类、生物碱类、酚酸类、甾醇类和色素类等。

黄酮类化合物(flavonoids)是指以2-苯基色原酮为母体,具有C₆-C₃-C₆结构(两个芳环A与B通过三碳链连接)的一类化合物,如图1所示。根据中央三碳链的氧化程度,及不同数目的羟基、甲氧基等官能团在基本骨架上的取代情况,天然黄酮类化合物约可分为黄酮类、黄酮醇等15种。它们广泛地存在于各种植物中,具有预防心血管疾病、抗菌、抗癌、抗氧化、增强机体免疫力等多种功效,因此受到人们广泛的关注与研究^[5-9]。

研究表明,黄酮类化合物的抗氧化活性^[10]和抑菌性^[11]与其结构中酚羟基的位置及数量有关。B环中羟基的存在可有效地提高黄酮类化合物的抗

氧化性。因为酚羟基与自由基结合时,可以提供活泼的氢,形成更加稳定的酚类自由基,从而结束自由基链的增长。黄酮类化合物的抑菌活性可能也与其结构中的羟基有关。羟基结构破坏了微生物的细胞膜结构,从而杀死微生物。

从植物体中提取黄酮类物质,最普遍的方法是溶剂回流或浸渍法,常用溶剂有水、有机溶剂(乙醇、甲醇等)、碱水等。这些方法虽然操作简单,但提取效率低、有效成分损失较大。超临界CO₂萃取法主要是利用超临界CO₂作为萃取剂,从待分离物中按照分子极性大小、沸点高低和分子量大小选择性地物质依次萃取出来。它具有操作条件温和($T_c=31.26\text{ }^\circ\text{C}$, $P_c=7.29\text{ MPa}$)、流程简单、提取速度快、无溶剂残留、产品纯度高等优点^[12-14]。

尽管已有文献报道了蒲公英中总黄酮的不同提取工艺及其体外抗氧化性、抑菌性,但有关以蒲公英为原料,采用超临界CO₂萃取工艺方面的研究相对较少。本试验以总黄酮萃取率为指标、乙醇为携带剂,采用单因素和正交试验,优化超临界CO₂萃取蒲公英中黄酮类物质的工艺,并测定黄酮类萃取物的体外抗氧化性和抑菌性,以期为进一步开发、利用蒲公英中的黄酮等生物质提供一定的参考依据。

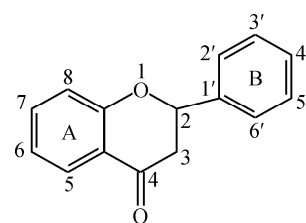


图1 黄酮类物质的骨架结构

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 研究对象

蒲公英全草,购自江苏盐城。

1.1.2 主要仪器

超临界流体设备 SFT-100XW,美国 SFT 公司;FA2004N 分析天平,上海民桥精密科学仪器有限公司;LD-1000 磨粉机,长沙市宏精机械设备有限公司;UV-2100 型紫外-可见分光光度计,北京金科利达电子科技有限公司;UP320HE 数控超声波清洗机,熊猫电子集团有限公司;生化培养箱 150A 型,江苏金坛亿通电子有限公司;恒温摇床 HY-2 型,上海亚荣生化仪器厂。

1.1.3 主要试剂

芦丁标准品,中国药品生物制品检定所;乙醇、氯化钠等其他试剂都为分析纯,市售;大肠杆菌、黑曲霉、淀粉液化芽孢杆菌,上海中科昆虫生物技术开发有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 超临界CO₂萃取总黄酮的单因素试验

取蒲公英全草,40℃真空干燥24h,粉碎后过50目筛,得蒲公英粉。准确称取蒲公英粉10g,置于超临界萃取釜中,以无水乙醇作为携带剂,调节萃取釜压力和温度至所需值。萃取一定时间后,收集萃取液,测定萃取液中总黄酮的含量;并且分别探索萃取压力为10、15、20、25、30、35、40MPa,萃取温度为20、30、40、50、60℃,乙醇流速为1、2、3、4、5mL·min⁻¹,萃取时间为40、60、80、100、120min时的总黄酮萃取率,初步确定萃取的工艺条件。

1.2.2 超临界 CO₂ 萃取总黄酮的正交试验

在单因素试验结果的基础上,以总黄酮萃取率为考察指标,对萃取压力、萃取温度、萃取时间和乙醇流速做了四因素三水平正交试验,以确定它们影响超临界 CO₂ 萃取效果的主次关系。根据单因素试验的结果,可以确定各因素的取值范围。试验设计如表 1 所示。

表 1 正交试验设计

水平	A 萃取压力/MPa	B 萃取温度/°C	C 萃取时间/min	D 乙醇流速/(mL·min ⁻¹)
1	25	35	70	2.5
2	30	40	80	3.0
3	35	45	90	3.5

1.2.3 黄酮类物质浓度的测定

以芦丁作为对照品,510 nm 处采用分光光度法测定黄酮类物质的含量。芦丁的标准曲线如图 2 所示,芦丁浓度 X 为横坐标,吸光度 Y 为纵坐标,回归方程为 $Y=12.4643X-0.02957$, $R^2=0.999$ 。

取一定体积的黄酮类萃取物,置于 25 mL 的容量瓶中,加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.75 mL,摇匀,放置 10 min 后加入 10% 硝酸铝溶液 0.75 mL,摇匀,放置 10 min,再加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 10 mL,用 30% 的乙醇溶液定容,测其在 510 nm 处的吸光度。

1.2.4 蒲公英中黄酮类物质萃取率的计算

$$\text{萃取率} = \frac{m}{M} \times 100\% = \frac{c \cdot V}{M} \times 100\%$$

式中: m —萃取物中黄酮类物质的质量,mg; c —萃取物中黄酮类物质的浓度,mg·mL⁻¹; V —萃取物的体积,mL; M —蒲公英干粉的质量,mg。

1.2.5 蒲公英黄酮类萃取物的纯化

将粗提液旋转蒸发至原体积的 1/10 左右,除去乙醇,得浓缩液。石油醚萃取浓缩液,除去叶绿素和脂类物质。加 3 倍体积的乙醇,放于冰箱 12 h,过滤除去多糖物质,得粗提纯液。

将预处理好的 AB-8 树脂放置层析柱中,上样流速为 2.0 mL·min⁻¹。以 4~5 BV 蒸馏水洗脱除杂后,用 4 BV 的 70% 乙醇解吸,解吸 pH 为 8.0。

$$\text{纯度} = \frac{m_1}{m_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中: m_1 —样品中黄酮类物质的质量,mg; $m_{\text{总}}$ —样品的总质量,mg。

1.2.6 蒲公英黄酮类萃取物抗氧化性的测定

1) ·OH 清除率的测定。取 0.75 mmol·L⁻¹ 邻二氮菲 1.0 mL、pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液 5.0 mL、蒸馏水 1.0 mL,混合均匀,加入 0.75 mmol·L⁻¹ 硫酸亚铁 1.0 mL、0.12% 双氧水 1.0 mL(新鲜配制),振荡混匀,记作 A_p;以 1.0 mL 蒸馏水代替双氧水,其余条件同 A_p 处理,记作 A_b;以 1.0 mL 不同浓度的萃取物代替双氧水,其余条件同 A_p 处理,记作 A_s。A_p、A_b、A_s 均在 37 °C 水浴锅中保温 1 h,离心 5 min (3 500 r·min⁻¹)。用蒸馏水调零,于 510 nm 处测定吸光度,以维生素 C 为参照。·OH 清除率的计算公式如下:

$$\cdot\text{OH 的清除率} = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100\%$$

2) DPPH·清除率的测定。向 1 mL 不同浓度的萃取物样品中加入 DPPH·溶液(0.2 mmol·L⁻¹ 乙醇溶液),避光反应 30 min,在 517 nm 处测定其吸光度 A₁。同时测定萃取物样品与乙醇混合后的吸光值 A₂,DPPH·溶液(0.2 mmol·L⁻¹ 乙醇溶液)的吸光值 A₀。按下式计算萃取物对 DPPH·的清除能力:

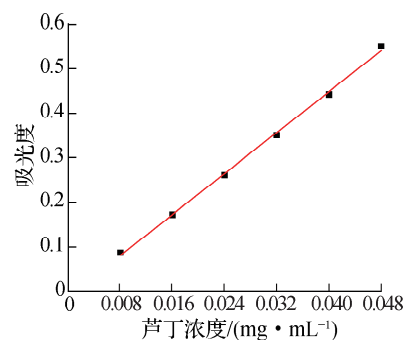


图 2 芦丁的标准曲线

$$\text{DPPH}\cdot\text{的清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

1.2.7 蒲公英黄酮类萃取物抑菌性能的测定

将淀粉液化芽孢杆菌、大肠杆菌、黑曲霉分别接种到已灭菌的装有 50 mL LB 液体培养基的锥形瓶中,置于 37 °C、120 r·min⁻¹的摇床中培养 6 h。用分光光度计分别测定各种菌悬液在波长 600 nm (OD₆₀₀)时的吸光值。

将部分浓度为 2 mg·mL⁻¹的黄酮类萃取物用无菌水分别稀释为 1、1.5 mg·mL⁻¹,分别移取这 3 种萃取物 50 mL 至已灭菌的 LB 液体培养基中,用 50 mL 无菌水做对照。在各培养基中接种 1 mL 供试菌悬液,置 37 °C、120 r·min⁻¹的摇床内培养 24 h,间隔一段时间用可见分光光度计在 OD₆₀₀时分别测定以上菌悬液的吸光值并进行比较。

2 结果与分析

2.1 萃取因素对萃取率的影响

2.1.1 萃取压力对萃取率的影响

萃取压力是超临界 CO₂ 萃取过程中主要的影响因素之一。超临界流体对有效成分的溶解度与流体密度密切相关。萃取压力升高,超临界溶剂 CO₂ 的密度增加,CO₂ 分子间平均距离减小,溶质和溶剂分子间作用力增大,溶剂对溶质的溶解力增强。由图 3(a)可知,在萃取温度 40 °C、萃取时间 90 min、乙醇流速 3 mL·min⁻¹的条件下,混合物中黄酮的萃取率随着压力增大而增加,但当压力持续增大时,萃取率稍有下降。这可能是因为该体系是一个复杂的协同系统^[14];当压力继续增大,CO₂ 流体的扩散系数减小,同时物料粉末被压缩得紧密,不利于黄酮类物质溶出,导致萃取率下降。吕小健等的试验也呈现类似的现象^[15]。

此外,过高的压力对设备的要求较高,考虑到设备压力、操作成本及安全,选定 25、30、35 MPa 作为正交试验的压力水平。

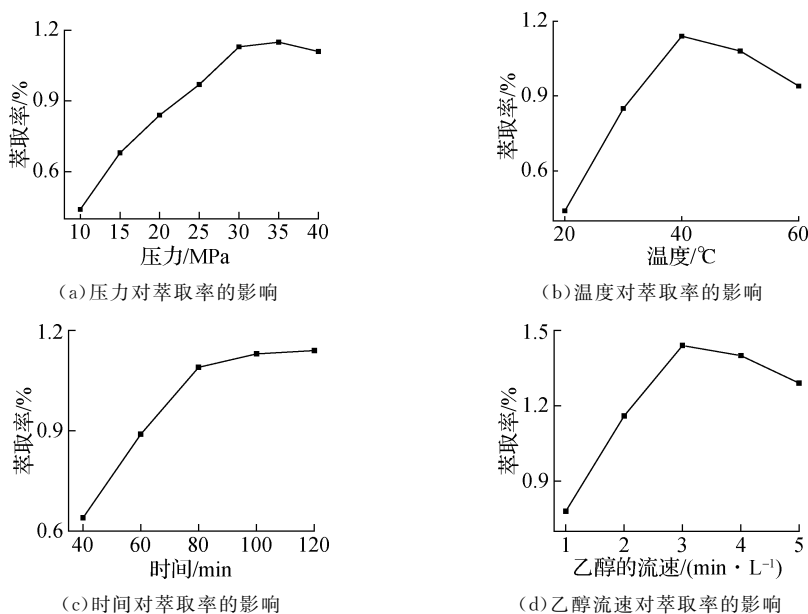


图3 萃取因素对萃取率的影响

2.1.2 萃取温度对萃取率的影响

在萃取压力 30 MPa、萃取时间 90 min、乙醇流速 3 mL·min⁻¹的条件下,不同萃取温度产生的结果如图 3(b)所示。开始阶段,黄酮萃取率随着温度升高而迅速增加;当温度高于 40 °C后,萃取率下降。这

可能是因为:在较低温度下,黄酮在超临界 CO₂ 中的溶解过程主要为动力学控制,温度升高,分子热运动加快,相互碰撞几率增加,物质的蒸气压增大,物质在超临界 CO₂ 流体中的溶解度增大,有利于黄酮类化合物的萃出;在较高温度下,黄酮在超临界 CO₂ 中的溶解过程主要为热力学控制,温度升高,CO₂ 流体的密度降低,导致 CO₂ 流体的溶剂化效应下降,使黄酮等在其中的溶解度下降,不利于萃取。这与高世会等^[16]的试验结果相似。根据试验结果,选定 35、40、45 °C 作为正交试验的温度水平。

2.1.3 萃取时间对萃取率的影响

如图 3(c)所示,在萃取压力 30 MPa、萃取温度 40 °C、乙醇流速 3 mL·min⁻¹ 的条件下,萃取初期随着时间的延长黄酮萃取率增加迅速;但 80 min 后,黄酮萃取率增加不太明显。这可能是由于起始阶段超临界流体 CO₂ 与溶质还未达到良好接触状态,因此延长后萃取率增加明显;萃取一定时间后,超临界流体与黄酮类化合物逐渐接近溶解平衡,继续延长萃取时间,萃取率增加有限。综合考虑,选定 70、80、90 min 作为正交试验的时间水平。

2.1.4 乙醇流速对萃取率的影响

由图 3(d)可知,在萃取压力 30 MPa、萃取温度 40 °C、萃取时间 90 min 时,随着携带剂乙醇流速的增加,黄酮类物质的萃取率呈先增加后降低的趋势。其原因可能是,乙醇流速的增加,改善了超临界 CO₂ 对黄酮的溶解性;但随着流速的持续增加,使得超临界 CO₂ 流体的渗透力下降,从而降低了黄酮类物质的萃取率。从结果来看,选定 2.5、3、3.5 mL·min⁻¹ 作为正交试验的乙醇流速水平。

2.1.5 正交试验结果

以总黄酮萃取率为考察指标,以萃取压力、萃取温度、萃取时间和乙醇流速为考察因素的正交试验结果如表 2 所示。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	萃取率/%
1	1	1	1	1	1.22
2	1	2	2	2	1.52
3	1	3	3	3	1.42
4	2	1	2	3	1.65
5	2	2	3	1	1.57
6	2	3	1	2	1.21
7	3	1	3	2	1.28
8	3	2	1	3	1.31
9	3	3	2	1	1.12
I	4.16	4.15	3.74	3.91	
II	4.43	4.4	4.29	4.01	
III	3.71	3.75	4.27	4.38	
R	0.72	0.65	0.55	0.47	

由 L₉(3⁴) 正交分析(表 2)可知:萃取压力对蒲公英中总黄酮萃取率的影响程度最大,其次是萃取温度,再次为萃取时间,最后是乙醇流速。由表 2 可以看出最佳条件是 A₂B₂C₂D₃,即萃取压力 30 MPa、萃取温度 40 °C、萃取时间 80 min、乙醇流速 3.5 mL·min⁻¹。根据所得的最佳条件,进行了 3 次超临界 CO₂ 萃取试验,得到平均萃取率为 1.68%±0.02%。

2.2 蒲公英黄酮类萃取物的抗氧化活性

黄酮类物质为多羟基物质,能够提供氢原子,与·OH 和 DHHP· 结合^[17],从而减少自由基的数量,起到抗氧化作用。DHHP· 存在单电子,在 517 nm 处有吸收,其醇溶液为紫色。当其与黄酮类物质作用时,溶液颜色的褪色程度与黄酮清除自由基能力呈正比关系。由图 4 可知,蒲公英的黄酮类萃取物对·OH 和 DHHP· 都有一定的清除作用,且清除效果随萃取物浓度的增加而增加,此现象与李晨晨^[18]的试验结果相似。当黄酮类萃取物浓度为 0.7 mg·mL⁻¹ 时,·OH 和 DHHP· 的清除率分别为 59.00% 和

50.11%。在相同浓度下,黄酮类萃取物的清除能力低于维生素C,这可能是因为黄酮类萃取物浓度低、含有杂质,干扰了黄酮类物质清除自由基的能力。

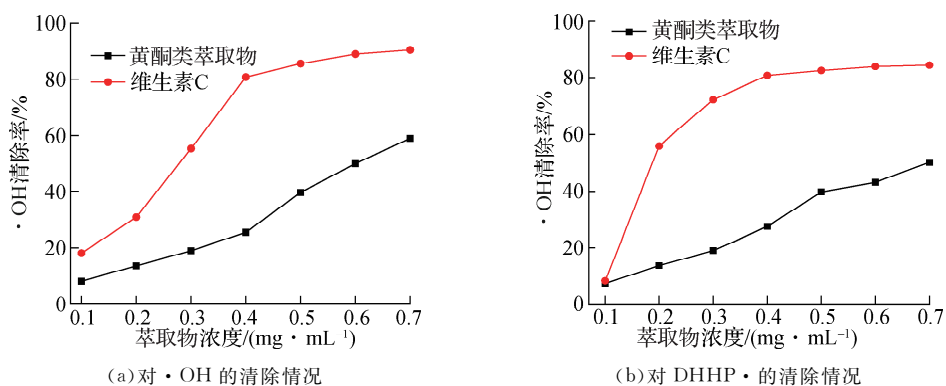


图4 黄酮类萃取物对自由基的清除情况

2.3 蒲公英黄酮类萃取物的抑菌效果

从图5可以看出,不同浓度的蒲公英黄酮类萃取物对大肠杆菌、黑曲霉、淀粉液化芽孢杆菌均具有抑制作用,且蒲公英黄酮类萃取物的浓度越高,吸光值越小,抑菌效果越好。三者相比较可以看出,蒲公英黄酮类萃取物对淀粉液化芽孢杆菌具有较强的抑制作用,对大肠杆菌、黑曲霉也有一定的抑制作用。

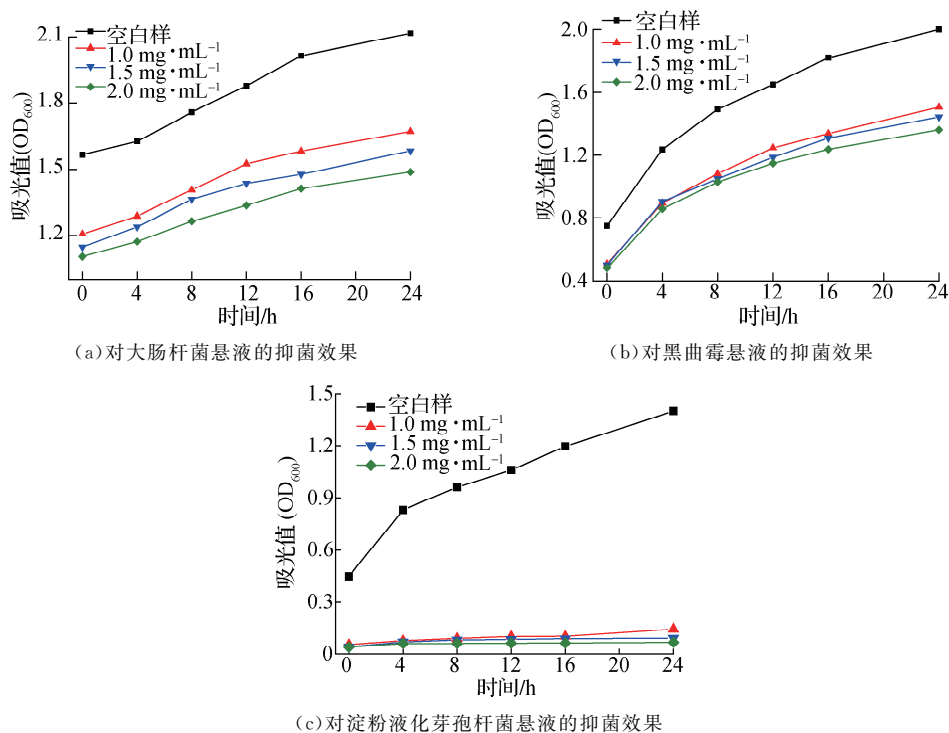


图5 蒲公英黄酮类萃取物对菌液的抑菌效果

3 结 语

本文试验结果表明,超临界CO₂萃取蒲公英中黄酮类物质的最佳条件是萃取压力30 MPa、萃取温度40℃、萃取时间80 min、乙醇流速3.5 mL·min⁻¹,萃取率达1.68%±0.02%。同时,蒲公英的黄酮类萃取物具有抗氧化性与抑菌性,萃取物的浓度越大,抗氧化性和抑菌性越明显。本试验为开发蒲公英中黄酮类物质提供了试验依据,下一步可将黄酮类萃取物的抗氧化性和抑菌性更好地应用于食品、医疗等方面。

参考文献:

- [1] 孟然,薛志忠,鲁雪林,等. 蒲公英的功效成分与药理作用研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(9):36-43
- [2] 邹世辉. 蒲公英生物活性物质的研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2019(8):186-189
- [3] 赵阳,刘娜,王园,等. 蒲公英的活性成分及其在动物生产应用中的研究进展[J]. 饲料研究,2021,44(1):113-116
- [4] 葛冰洁,王政,周鸿缘,等. 蒲公英甾醇药理作用研究进展[J]. 动物医学进展,2020,41(9):102-105
- [5] SONG L J, LIU P Z, YAN Y Z. Supercritical CO₂ fluid extraction of flavonoid compounds from Xinjiang jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) leaves and associated biological activities and flavonoid compositions[J]. Industrial Crops & Products, 2019,139,111508
- [6] CUI J, DUAN X Q, KE L T, et al. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: a review[J]. Fitoterapia, 2022,157:105106
- [7] ARIAS J, MEJÍA J, CÓRDOBA Y, et al. Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation[J]. Industrial Crops and Products, 2020,146:112170
- [8] 高超. 一款冬叶黄酮的抗氧化活性研究[J]. 轻工学报, 2020,35(2):17-23
- [9] 许梦圆. 广西产紫皮百香果皮中总黄酮化学成分与生物活性研究[D]. 北京:中央民族大学, 2021
- [10] SUN Q R, SHI J, SCANLON M, et al. Optimization of supercritical-CO₂ process for extraction of tocopherol-rich oil from canola seeds[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021,145:111435
- [11] 杨怡萌,陈星宇,吴娅,等. 蒲公英黄酮抗氧化活性的构效关系分析[J]. 化学通报, 2020,83(11):1031-1037
- [12] XIE P J, HUANG L X, ZHANG C H, et al. Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract; antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 111: 238-246
- [13] MOUAHID A, CLAEYS-BRUNO M, BOMBARDA I, et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from Moroccan unroasted argan kernels; effects of process parameters to produce cosmetic oil[J]. Journal of CO₂ Utilization, 2022,59:101952
- [14] 赵敏,杨宝卫,胡舰,等. 超临界 CO₂ 萃取地梢瓜叶片黄酮工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 美食研究, 2021,38(2): 78-83
- [15] 吕小健,许引,董攀飞,等. 响应面优化超临界 CO₂ 萃取陈皮多甲氧基黄酮研究[J]. 食品研究与开发, 2019,40(11): 16-20
- [16] 高世会,郁崇文. 罗布麻中黄酮的超临界 CO₂ 萃取及其抗菌性[J]. 纺织学报, 2018,39(8):71-76,82
- [17] 周孟焦. 竹叶花椒中黄酮类物质提取及抗氧化性研究[D]. 绵阳:西南科技大学, 2021
- [18] 李晨晨. 香椿老叶黄酮含量及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2021,42(13):34-39

(责任编辑:湛江)