

马尾松松针中黄酮类化合物的提取工艺及抑菌活性研究

张宇铭, 吴晨昀, 石新茹, 陈玉娟*

长春理工大学生命科学技术学院, 吉林 长春
Email: *chenyujuan@cust.eud.cn

收稿日期: 2021年7月23日; 录用日期: 2021年8月6日; 发布日期: 2021年8月27日

摘要

通过乙醇浸渍法从马尾松松针中提取黄酮类化合物, 采用正交实验确定了乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度等最佳的提取技术条件。提取后, 回收乙醇, 用水分散提取物, 用石油醚去除叶绿素, 采用正丁醇萃取, 减压回收正丁醇, 得到总黄酮。采用平板菌落计数法测定总黄酮的抑菌活性。结果表明, 最佳提取条件为: 乙醇浓度75%, 材料比1:30 g/mL, 提取时间90 min, 提取温度90℃; 主要和次要因素的影响是: 乙醇浓度 > 萃取时间 = 物质/液体比 > 萃取温度。马尾松松针黄酮类化合物对沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑制作用, 其中对沙门氏菌的抑制作用最强。

关键词

马尾松松针, 黄酮, 提取, 抑菌效果

Study on Extraction Technology and Antibacterial Activity of Flavonoids from *Pinus massoniana*

Yuming Zhang, Chenyun Wu, Xinru Shi, Yujuan Chen*

School of Life Sciences, Changchun University of Science and Technology, Changchun Jilin
Email: *chenyujuan@cust.eud.cn

Received: Jul. 23rd, 2021; accepted: Aug. 6th, 2021; published: Aug. 27th, 2021

Abstract

Flavonoids were extracted from *Pinus massoniana* needles by ethanol impregnation, and the op-

*通讯作者。

文章引用: 张宇铭, 吴晨昀, 石新茹, 陈玉娟. 马尾松松针中黄酮类化合物的提取工艺及抑菌活性研究[J]. 有机化学研究, 2021, 9(3): 23-31. DOI: 10.12677/jocr.2021.93004

timal extraction technical conditions such as ethanol concentration, ratio of material to liquid, extraction time, and extraction temperature were determined by orthogonal experiments. After extraction, ethanol was recovered, the extract was dispersed with water, chlorophyll was removed with petroleum ether, n-butanol was extracted using n-butanol, and n-butanol was recovered under reduced pressure to obtain total flavonoids. The antibacterial activity of total flavonoids was determined by plate colony counting. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration 75%, material ratio 1:30 g/mL, extraction time 90 min, extraction temperature 90°C; the effects of main and secondary factors were as follows: ethanol concentration > extraction time = substance/liquid ratio > extraction temperature. *Pinus massoniana* flavonoids inhibited *Salmonella*, *E. coli* and *S. aureus*, with the strongest inhibition against *Salmonella*.

Keywords

Masson Pine Needle, Flavone, Extraction, Bacteriostatic Effect

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

马尾松(学名: *Pinus massoniana* Lamb.)是松科, 松属乔木, 其叶为松针。马尾松木材极耐水湿, 是重要的用材树种, 其经济价值高, 用途广, 遍布于华中华南各地[1] [2] [3]。和许多植物产品一样, 黄酮类化合物是研究的热点之一。黄酮类化合物在抗菌、抗氧化、抗癌等方面具有显著效果, 且毒性小, 安全性好, 因此有重要的开发意义[4] [5]。松针中黄酮类化合物常用的提取方法有酶提法、碱提酸沉法、超声波和微波辅助法等[6] [7]。目前, 研究集中在松叶中黄酮类化合物的提取方法上, 但关于其抑菌活性的研究几乎没有报道。本文采用乙醇浸渍法提取马尾松针叶中的黄酮类化合物。采用单因素和正交法研究了松针提取的最佳条件并进行了抑菌实验, 为进一步研究松针的抑菌机理提供了实验依据, 也为松针资源的进一步开发提供了参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

马尾松松针, 采自长春市内公园; 土豆, 市售; 95%乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠, 均是分析纯级别, 购于北京化学工业集团有限责任公司; 芦丁标准品(天津渤化化学试剂有限公司); 大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、青霉菌(*Penicillium*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*), 所有供试菌种均来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心; 琼脂粉(源叶生物)、酵母提取物(斯诺特生物), 均为分析纯级别。

电子天平(上海菁海); 高压蒸汽灭菌锅(宁波永兴); 恒温培养箱(哈尔滨东联); 恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司); 真空冻干机(无锡沃信仪器制造有限公司); 蒸馏装置, 加热回流装置, 实验室自备。

2.2. 马尾松针中总黄酮的提取

芦丁标准曲线的测定: 称取芦丁标准品 10 mg, 用适量 60%乙醇溶解后转移至 50 mL 的容量瓶定容,

得到浓度为 0.2 mg/mL 的标准品溶液。分别精密量取标准品溶液 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 于试管中，用 60% 的乙醇溶液将各试管溶液均补至 10 mL。然后各个试管中分别加入 0.3 mL 的亚硝酸钠溶液 5%，静置 6 min。再加入 10% 的硝酸铝溶液 0.3 mL，静置 6 min。最后在加入 4 mL 的 4% 氢氧化钠溶液，静置下反应 10 min。吸光度数据在 490 nm 处用 60% 乙醇为空白进行酶标测定。以标准品的浓度为横轴，以紫外吸光度为纵轴，绘制标准曲线[8]。

马尾松松针中总黄酮的提取：将松针洗净后置于干热烘干箱中，于 60℃ 烘干 12 h。将干燥的松针剪成 1 cm 长。每次称取松针 1.000 g，在恒温水浴中，用不同浓度的乙醇、固液比、提取温度和提取时间提取，高速离心后，稀释上清液 10 倍。按芦丁标准曲线法依次加入亚硝酸铝、硝酸铝和氢氧化钠。用微孔板分析仪测定提取物在 490 nm 处的紫外吸收。根据兰伯特 - 比尔定律计算了提取物中黄酮类化合物的浓度和提取率[9]。

$$\text{黄酮提取率} = \left[\frac{C \times D \times V \times 10^{-3}}{M} \right] \times 100\%$$

式中 C 为黄酮浓度，mg/mL； D 为稀释倍数； V 为提取液总体积，mL； M 为松针质量，mg。

单因素实验各条件的设定如下：

乙醇浓度：40%、50%、60%、70%、80%、95% 的乙醇；料液比：1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60；提取温度：50℃、60℃、70℃、80℃、90℃；提取时间：1 h、2 h、3 h、4 h、5 h。

正交实验：以乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间 4 个影响较大因素设计以单个因素为变量的 L9 (3⁴) 正交实验，以提取效果确定提取黄酮类物质最适条件[10]。

2.3. 黄酮类化合物抑菌实验

马尾松针中总黄酮的制备：用上述 2.2 中正交实验中得出的最佳提取条件提取 120 g 松针中的黄酮类化合物。回收乙醇，剩余物用水分散，用石油醚对其萃取三次后用正丁醇再萃取三次，取上层，回收正丁醇，残存物加适量水分散，于 -80℃ 预冻过夜，最后将样品放入冻干机中冻干，得到总黄酮类化合物[11]。

制备菌悬液：取菌体，活化后于相应的液体培养基中，待细菌在 37℃ 中培养环境中生长至对数生长期，通过平板计数法观测细菌数量，将菌悬液浓度调整至每毫升 $10^3 \sim 10^4$ 个菌落群；真菌在 29℃ 培养环境中培养至对数生长期，用血球计数法观察菌落数量，将菌浓度调为每毫升 $10^3 \sim 10^4$ 个菌落群。

黄酮类化合物悬浊液的制备：用去离子水将冻干的黄酮类化合物粉末配成 100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL 三个浓度的溶液，密封保存备用。

平板菌落计数法测定黄酮类化合物抑菌活性：在超净工作台内将培养基倒入平板凝固后。将菌悬液与黄酮类化合物悬浊液按不同比例混合，分别得到黄酮类化合物浓度为 50 mg/mL、10 mg/mL、2.5 mg/mL 的混合溶液，用去离子水与菌悬液混合作为对照。每个菌种的四种混合溶液含菌量一致。取不同浓度的混合液 100 uL 接种到培养基，细菌放置在 37℃ 环境中培养约 24 h 后数出菌落数，真菌放在 29℃ 环境中培养 72 h。

3. 结果与分析

3.1. 芦丁标准曲线的绘制

经测试得到标准曲线见图 1，线性回归后得到回归方程： $y = 5.41x + 0.0026$ ， $R^2 = 0.9982$ ，上式里 y 为吸光度值， x 为芦丁标准品浓度(mg/mL)。芦丁浓度在 20~60 $\mu\text{g/mL}$ 范围内，本文所使用的方法浓度与吸光度可呈现良好的线性关系。

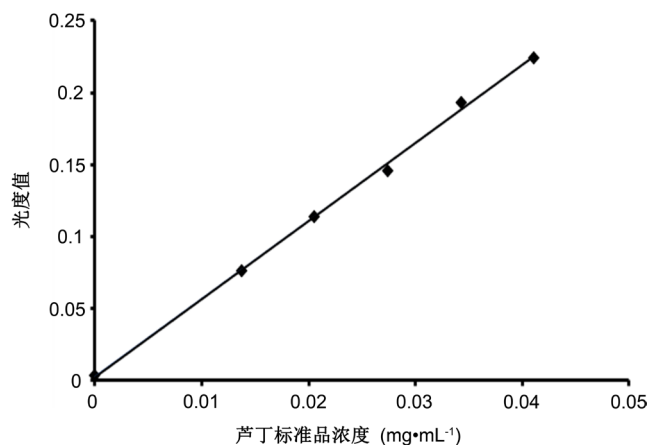


Figure 1. Standard curve of aloë

图 1. 芦丁标准曲线

3.2. 单个变量因素条件下马尾松松针中黄酮提取率的影响

乙醇浓度的影响：由图 2 折线图可以看出，乙醇在 40%~80% 浓度区间里时，随着溶解度的增加，松针中黄酮类化合物的提取率稳步上升，乙醇浓度超过 80% 后提取率陡坡式降低。其中原因可能是因为在乙醇浓度过高时，含水量过低，则乙醇极性快速降低，与黄酮类物质中羟基等极性基团的亲和力就会有所下降，导致黄酮类物质无法从松针种提取到乙醇相中，进而导致提取率快速下降[12]。

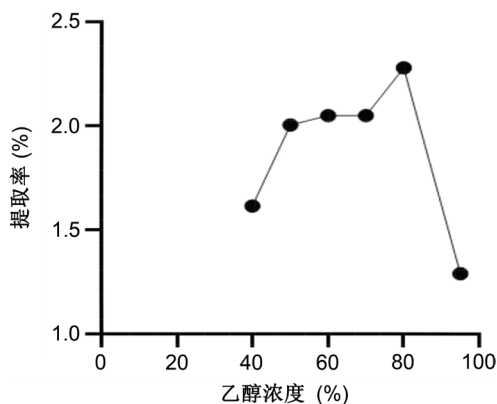


Figure 2. Effect of ethanol concentration on extraction rate of flavonoids from *Pinus massoniana*

图 2. 乙醇浓度对马尾松松针中黄酮提取率的影响

料液比的影响：从图 3 可以看出黄酮类化合物的提取率在料液比 1:10~1:30 间逐渐递增；当料液比大于 1:30 时提取率非常接近但是均小于峰值。

温度的影响：由图 4 可知，当温度在 50℃~90℃ 之间时，温度上升会使松针中黄酮类化合物的提取率递增。估计原因为温度的升高会软化植物组织，可溶性成分的溶解速度会因此上升。60% 浓度的乙醇溶液沸点为 81.1℃，所以在 90℃ 达到最高后，继续升温对提取率无影响。

提取时间的影响：由图 5 可知，在提取时长为 1 h、2 h、3 h 时，黄酮类化合物的提取效果相近，在 3~5 h 间提取率随时间而递增。这种实验现象的出现推测可能为黄酮类化合物中某些成分不耐热，长时间加热导致其分解。在前 3 小时的提取中黄酮类化合物被提取的同时也会有部分分解，提取与分解相对处于动态平衡状态，而在三小时后，易分解的黄酮均已分解，因此提取率上升。由于提取时间的延长杂质

浸出率也相提高,不利于后续纯化分离实验;并且黄酮类化合物中某些不耐热成分会随着时间分解殆尽,所以最佳提取时长定为2 h。

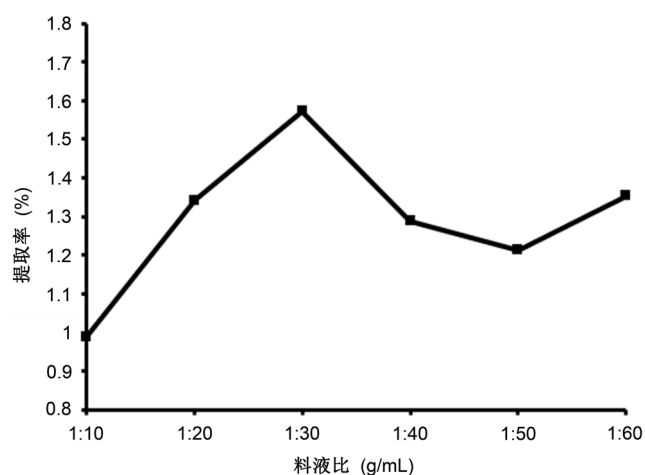


Figure 3. Effect of ratio of material to liquid on extraction rate of flavone from *Pinus massoniana*
图 3. 料液比对马尾松松针中黄酮提取率的影响

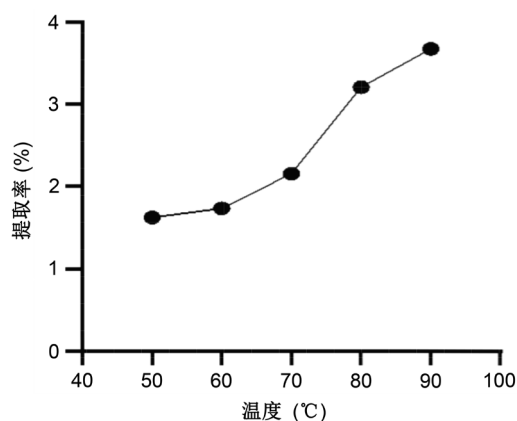


Figure 4. Effect of extraction temperature on extraction rate of flavonoids from *Pinus massoniana*
图 4. 提取温度对马尾松松针中黄酮提取率的影响

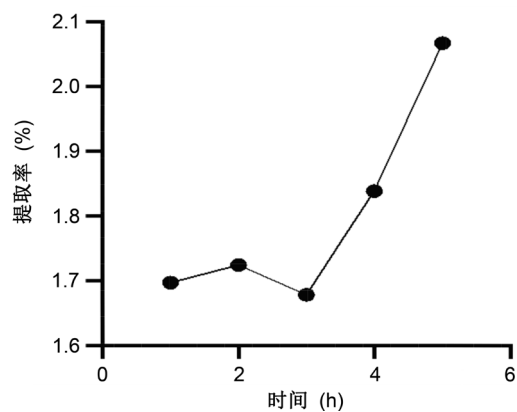


Figure 5. Effect of extraction time on extraction rate of flavonoids from *Pinus massoniana*
图 5. 提取时间对马尾松松针中黄酮提取率的影响

3.3. 正交实验

以黄酮提取率为指标, 根据上述单个量变化正交实验结果为参考从而确定乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度 4 个影响较大因素的最佳解, 表 1 为因素与水平, 表 2 为最后结果。

Table 1. Factor level table

表 1. 因素水平表

| 水平 | A | B | C | D |
|----|--------|------------|---------|----------|
| | 乙醇浓度/% | 料液比/(g/mL) | 提取温度/°C | 提取时间/min |
| 1 | 75 | 1:25 | 80 | 60 |
| 2 | 80 | 1:30 | 85 | 90 |
| 3 | 85 | 1:35 | 90 | 120 |

Table 2. Orthogonal test results

表 2. 正交实验结果

| 实验号 | A | B | C | D | 提取率 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.65% |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3.20% |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2.68% |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1.83% |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2.41% |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2.58% |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1.76% |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1.51% |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.58% |
| K1 | 0.075 | 0.052 | 0.057 | 0.056 | |
| K2 | 0.068 | 0.071 | 0.066 | 0.075 | |
| K3 | 0.049 | 0.068 | 0.068 | 0.06 | |
| k1 | 0.025 | 0.017 | 0.019 | 0.019 | |
| k2 | 0.023 | 0.024 | 0.022 | 0.025 | |
| k3 | 0.016 | 0.023 | 0.023 | 0.02 | |
| R | 0.009 | 0.006 | 0.004 | 0.006 | |

由表 2 可知, 4 种单因素对黄酮提取率影响相关性陈列为: 乙醇浓度 > 提取时间 = 料液比 > 温度, 所以最佳条件组合为 A1B2C3D2, 即当控制乙醇浓度为 75%, 料液比为 1:30 g/mL, 提取时长为 90 min, 提取温度为 90°C 时, 提取率最高。

3.4. 黄酮类化合物抑菌实验

以纸片扩散法探究抑菌性时现象未达到期望目标。在此基础上, 我们设计以平板菌落计数法为参考, 通过记录菌落数量的方法检测黄酮类化合物悬浊液对目标菌类的抑制效果的活性实验。图 6~10 示出了黄酮类化合物抑制 5 种微生物的结果, 其中显示了对 3 种细菌均有抗菌效果, 但黄酮类化合物的抗菌作用对黑曲霉和青霉菌微弱, 效果不明显。

图 11 为黄酮类化合物悬浊液对三种细菌的抑制作用对比, 黄酮类化合物对沙门氏菌的抑制作用是最强的, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用中等, 没有特别强烈, 其中黄酮类化合物对大肠杆菌的抑制作用是

最弱的。这与黄晓敏教授的研究结果一致[13]。

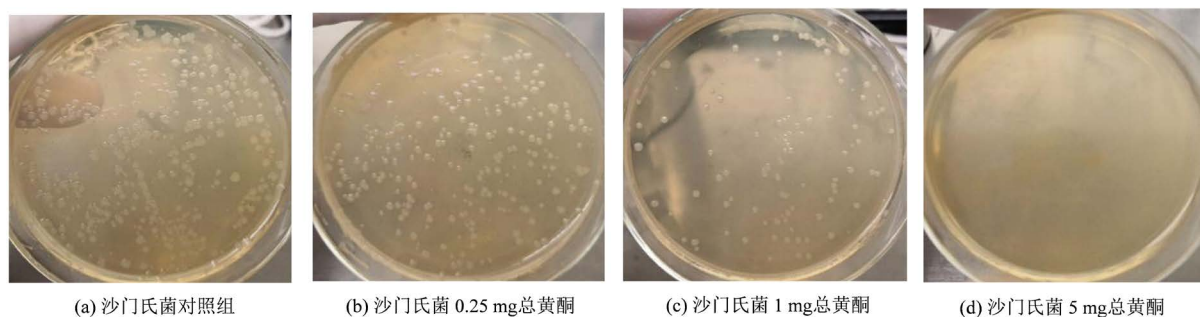


Figure 6. Antibacterial activity of flavonoid suspension against *Salmonella*

图 6. 黄酮类化合物悬浊液对沙门氏菌的抑菌活性

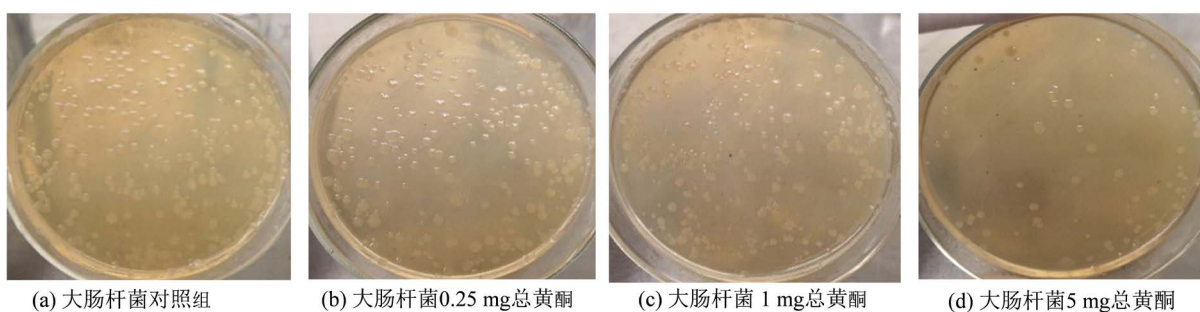


Figure 7. Antibacterial activity of flavonoid suspension against *Escherichia coli*

图 7. 黄酮类化合物悬浊液对大肠杆菌的抑菌活性

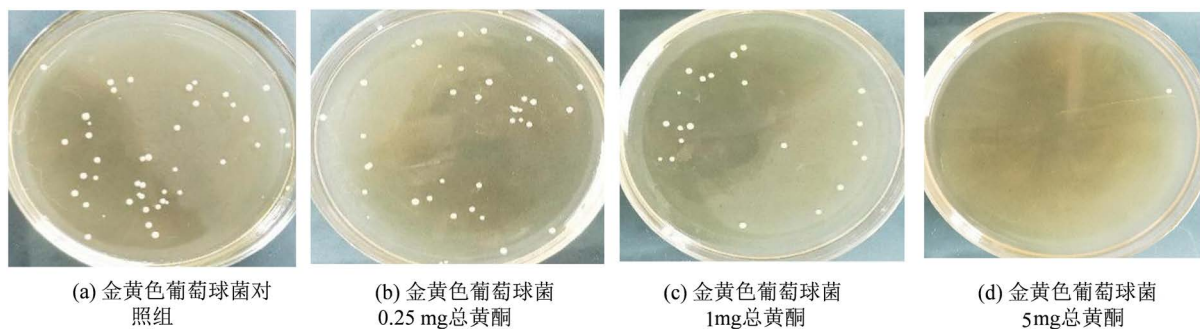


Figure 8. Antibacterial activity of flavonoid suspension against *Staphylococcus aureus*

图 8. 黄酮类化合物悬浊液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

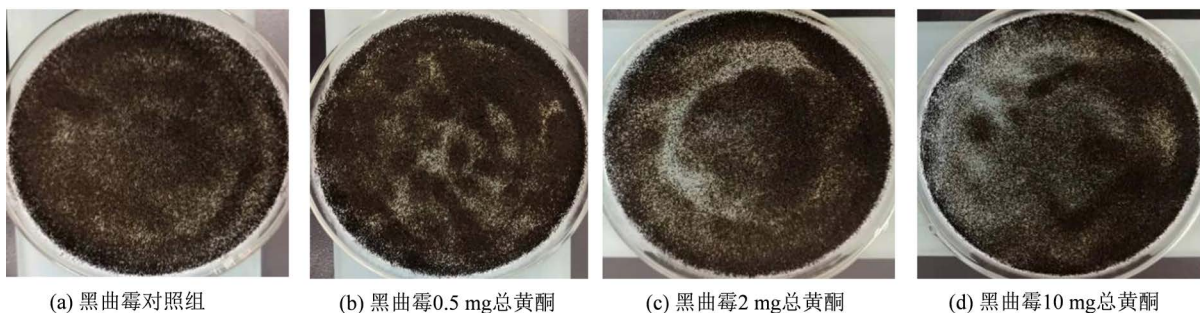


Figure 9. Antibacterial activity of flavonoid suspension against *Aspergillus niger*

图 9. 黄酮类化合物悬浊液对黑曲霉的抑菌活性

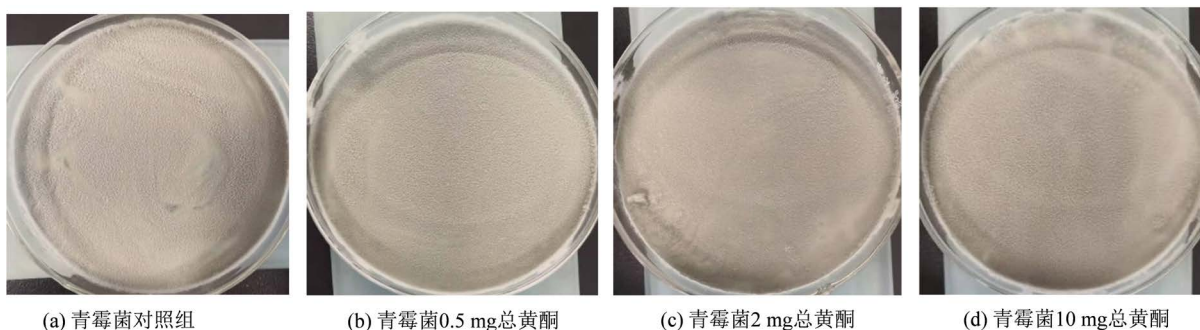


Figure 10. Antibacterial activity of flavonoid suspension against *Penicillium*

图 10. 黄酮类化合物悬浊液对青霉菌的抑菌活性

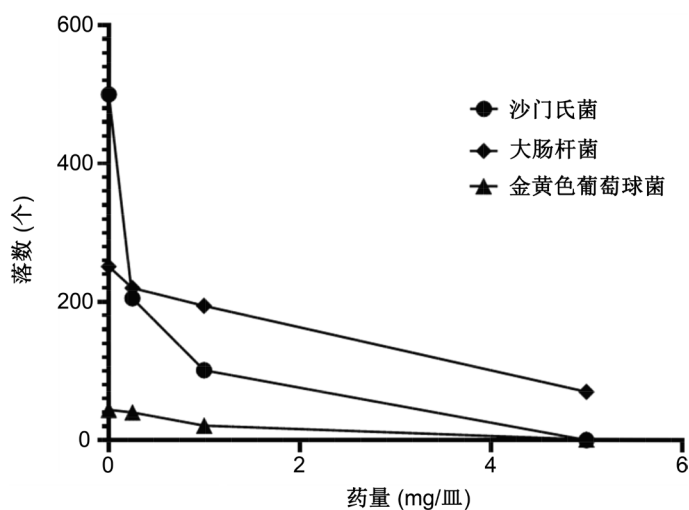


Figure 11. Comparison of antibacterial effect of bacteria

图 11. 细菌的抑菌效果对比

4. 结论

最佳条件组合为 A1B2C3D2, 即当控制乙醇浓度为 75%, 料液比为 1:30 g/mL, 提取时长为 90 min, 提取温度为 90°C 时, 提取率最高。黄酮提取率的影响效果大小为: 乙醇浓度最大, 提取时间、料液比次之, 温度最小。马尾松松针中的黄酮能够强烈抑制广谱细菌以及沙门氏菌, 对霉菌的抑制作用不明显。

松针中的黄酮有良好的广谱抗菌性; 并且原材料廉价易得, 提取工艺简单; 同时, 与化学抑菌剂相比, 从植物中提取黄酮类物质, 具有纯天然, 没有副作用, 没有耐药性的优点; 因此其在食品加工及医疗制药产业均有着广泛的应用前景和可观的商业价值。

参考文献

- [1] 鄂周寸. 马尾松种植技术及经济效益分析[J]. 农业与技术, 2019, 39(19): 72-73.
- [2] 叶青山. 马尾松种植技术和经济效益分析[J]. 乡村科技, 2019(9): 86-87.
- [3] 刘淑芳. 浅谈马尾松的种植技术和经济效益[J]. 南方农业, 2017, 11(18): 50+52.
- [4] 王婷, 徐俞悦, 陈素红, 颜美秋, 吕圭源, 刘婷. 松针的保健功效及相关产品研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4171-4177.
- [5] Sklodowski, J., Bajor, P. and Trynkos, M. (2018) Carabids Benefit More from Pine Stands with Added Understory or Second Story of Broad-Lleaved Trees Favored by Climate Change than from One-Storied Pine Stands. *European*

Journal of Forest Research, **137**, 745-757. <https://doi.org/10.1007/s10342-018-1137-9>

- [6] 曹侃, 朱利. 松针黄酮类成分研究与应用进展[J]. 绵阳师范学院学报, 2019, 38(5): 75-79.
- [7] 付文鹏, 李永飞, 杨秀云, 杨柳, 杨永寿. 云南松松针中黄酮类化合物抗氧化活性研究[J]. 大理大学学报, 2017, 2(4): 32-35.
- [8] Liu, X., Yang, D.-L., Liu, J.-J., *et al.* (2013) Modeling of Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from Calycopteris Floribunda Leaves. *Chemical Papers*, **68**, 316-323.
- [9] 董睿, 高治平, 李彩琳. 马尾松松针黄酮恒温乙醇浸提工艺研究[J]. 应用化工, 2017, 46(7): 1297-1299+1305.
- [10] 谢鹏, 张敏红. 黄酮类化合物抑菌作用的研究进展[J]. 中国动物保健, 2004(12): 35-37.
- [11] 包怡红, 刘文丽. 黑皮油松松针精油的超声波辅助-盐析-水蒸气蒸馏法提取及其抑菌效果和稳定性[J]. 东北林业大学学报, 2018, 46(10): 54-58.
- [12] 闫琳娜. 松针落叶总黄酮的提取、纯化及抗氧化性能分析[D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [13] 黄晓敏. 马尾松针黄酮类物质的抑菌作用及成分研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2014.