

桉叶超声波提取工艺优化及其抑菌活性研究

田英 李柯影

武汉华夏理工学院 生物与制药工程学院, 中国·湖北 武汉 430000

摘要: 为优化蓝桉叶超声波提取工艺并研究其抑菌活性, 本研究以乙醇为溶剂, 通过单因素实验考察温度、时间、料液比及乙醇浓度对提取效果的影响。结果表明, 蓝桉叶活性成分最佳超声波提取工艺为: 温度 60℃、提取时间 20min、料液比 1:10、乙醇体积分数 60%。抑菌结果表明, 蓝桉叶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有明显抑菌活性, 可为蓝桉叶后续开发及抑菌应用提供实验依据。

关键词: 蓝桉叶; 超声波提取; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌

Optimization of Ultrasonic Extraction Process of Eucalyptus Leaf and Its Antibacterial Activity Study

Tian Ying, Li Keying

School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Huaxia Institute of Technology, China Hubei Wuhan 430000

Abstract: To optimize the ultrasonic extraction process of Eucalyptus globulus leaves and study its antibacterial activity, this study used ethanol as the solvent and investigated the effects of temperature, time, solid-liquid ratio, and ethanol concentration on the extraction efficiency through single-factor experiments. The results showed that the optimal ultrasonic extraction process for the active components of Eucalyptus globulus leaves was: temperature 60℃, extraction time 20 min, solid-liquid ratio 1:10, and ethanol volume fraction 60%. The antibacterial results indicated that Eucalyptus globulus leaves had significant antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus, which can provide experimental basis for the subsequent development and antibacterial application of Eucalyptus globulus leaves.

Keywords: Eucalyptus globulus leaves; Ultrasonic extraction; Escherichia coli; Staphylococcus aureus

0 引言

桉树是桃金娘科桉属、杯果木属、伞房属树种总称^[1], 种类多、生长快、适应性强, 广泛引种于世界各地, 在我国主要分布于广东、广西、云南等^[2], 常见栽培种有尾叶桉、巨桉、赤桉、蓝桉等^[3]。蓝桉为桃金娘科桉属常绿植物^[4], 原产于澳大利亚, 19 世纪末引入我国, 速生、抗逆性强、经济价值高^[5,6]。蓝桉叶主要活性成分为 1,8-桉叶素, 其次是 α -蒎烯、 α -松油醇、 β -桉叶醇等^[7]。蓝桉的叶和果实为传统中草药, 具有疏风散热、抑菌消炎、防腐止痒等功效; 现代药理研究表明, 蓝桉还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等活性^[8]。目前蓝桉活性成分提取常用溶剂提取、微波提取、超临界流体萃取及超声波提取等方法^[9], 提取溶剂以水、乙醇、石油醚为主^[10,11]。超声波提取法利用空化效应、机械效应与热效应破碎植物细胞壁, 可显著提高提取效率, 但现有工艺尚不完善, 最优提取条件仍不明确^[12]。本研究采用超声波提取法, 通过单因素实验优化蓝桉叶活性成分提取工艺, 并探究其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 为蓝桉叶的开发利用及产业化应用提供依据与技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

蓝桉叶: 云南省中药材, 产自云南; 桉叶油醇: 上海源叶生物科技有限公司; 琼脂粉、酵母粉、胰蛋白胨: 北京兰杰柯科技有限公司; 蛋白胨: 北京奥博生物技术有限公司; 无水乙醇、氢氧化钠、氯化钠: 国药集团化学试剂有限公司; 氨苄青霉素: 福州飞净生物科技有限公司; Mueller-Hinton 琼脂: 海博生物; 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为武汉华夏理工学院实验室现有保藏菌种。

1.1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限公司; 多频恒温超声波提取机: 上海比朗仪器制造有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器: 合肥华泰医疗设备有限公司; 多功能粉碎机: 永康市小宝电器有限公司; 恒温培养箱: 上海福玛实验设备有限公司; 生物安全柜: 济南鑫贝西生物。

1.2 实验方法与分组

1.2.1 单因素试验

采用超声提取法, 研究提取温度、提取时间、料液比

及乙醇体积分数对蓝桉叶中 1,8-桉叶素提取含量的影响。

(1) 提取温度对 1,8-桉叶素提取含量的影响

蓝桉叶粉碎后,称取 2g,加入 40mL 70% 乙醇溶液混匀,分别在 30、40、50、60、70℃超声提取 30min; 提取液过滤后定容至 5mL,用紫外分光光度法测定吸光度,并计算提取含量。

(2) 提取时间对 1,8-桉叶素提取含量的影响

蓝桉叶粉碎称取 2g,加入 40mL 70% 乙醇溶液混匀,于 60℃条件下分别超声提取 20、30、40、50、60min,过滤后稀释定容至 6mL 测定吸光度,并计算提取含量。

(3) 料液比对 1,8-桉叶素提取含量的影响

蓝桉叶粉碎称取 2g,按料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 加入 70% 乙醇溶液混匀,于 60℃条件下超声提取 20min,过滤后稀释定容至 6mL 测定吸光度,并计算提取含量。

(4) 乙醇体积对 1,8-桉叶素提取含量的影响

蓝桉叶粉碎称取 2g,分别加入 20mL 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液混匀,60℃超声提取 20min; 滤液稀释定容至 6mL 后测定吸光度,计算提取含量。

1.2.2 1,8-桉叶素含量测定

(1) 标准曲线的绘制

分别以 70% 乙醇和 60% 乙醇为溶剂,配制 1,8-桉叶素标准系列溶液并建立两条标准曲线。配制浓度均为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的 1,8-桉叶素标准溶液。于 210 nm 波长下分别测定各标准溶液的吸光度,以标准品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,进行线性回归分析,绘制标准曲线。

(2) 样品含量测定

单因素试验以 70% 乙醇为参比测吸光度,代入标准曲线 $y = 0.6115x + 0.1527$ ($R^2 = 0.99$) 计算桉叶素含量并绘制趋势图。确定最优提取条件后进行样品提取,以 60% 乙醇为参比,按曲线 $y = 0.6975x + 0.1907$ ($R^2 = 0.99$) 计算 1,8-桉叶素提取含量。

1.2.3 最佳提取条件下桉叶提取物的制备

蓝桉叶粉碎后称取 4 g,加入 40 mL 60% 乙醇溶液,浸泡 20 min。采用超声提取仪,于 60 °C 条件下超声提取 20 min。过滤后于 4 °C 保存。

1.2.4 实验分组

阴性对照组: 60% 乙醇溶液; 阳性对照组: 氨苄青霉素溶液; 实验组为 60% 乙醇制备的桉叶提取物,设低、中、高浓度组,分别为提取原液稀释 13 倍、7 倍、4 倍,

每组 3 次平行重复。

1.2.5 菌种培养与菌悬液制备

(1) 菌种活化与纯化

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌接种于 LB 液体培养基(酵母提取物 1g、胰蛋白胨 2g、氯化钠 2g,加 NaOH 100 μ L,定容至 200mL),37℃、180r/min 振荡培养 6-12h 至菌液浑浊。菌液在 MH 琼脂平板(10.5g,定容至 250mL)划线纯化,35 \pm 1℃培养 24h。

(2) 菌悬液制备

挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌单菌落于生理盐水,制成浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液。

1.2.6 牛津杯法抑菌实验

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌悬液加入 MH 琼脂平板,涂布均匀;放置牛津杯,分别加入 100 μ L 不同浓度桉叶溶液、氨苄青霉素溶液及 60% 乙醇溶液,35~37℃培养 24h,观察并测量抑菌圈直径。

1.2.7 数据统计分析

实验数据取自 3 次独立试验,采用 GraphPad Prism 10 统计分析。结果显著性以 P 值表示: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素对桉叶 1,8-桉叶素提取量的影响

2.1.1 提取温度的影响

如图 1 所示,1,8-桉叶素含量随温度升高呈先升后降趋势。30℃时超声作用较弱,细胞破壁不充分,有效成分溶出较少;60℃时提取效果最佳,提取量达到峰值;温度继续升高时,会加速 1,8-桉叶素挥发与分解,致使提取量明显下降。

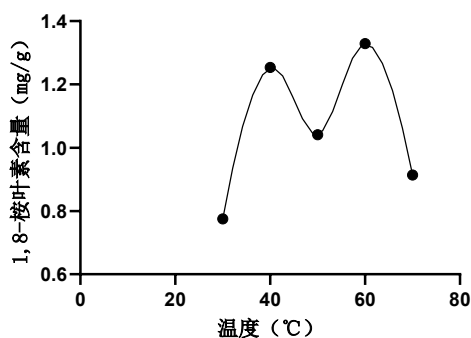


图1 提取温度对1,8-桉叶素提取量的影响

2.1.2 提取时间的影响

如图 2 所示,1,8-桉叶素含量随提取时间延长先升高后降低,提取时间较短时有效成分释放尚不充分;当提取 20 min 时 1,8-桉叶素含量释放达到峰值;提取 30~60 min

时含量持续下降,说明继续延长提取时间会导致其挥发、氧化与降解。

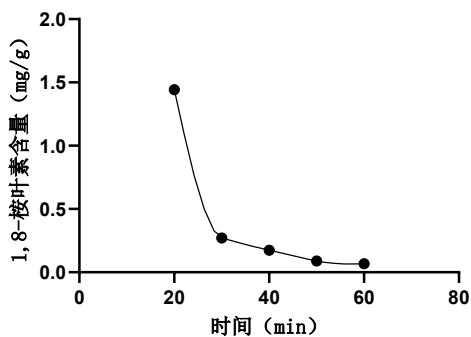


图2 提取时间对1,8-桉叶素提取量的影响

2.1.3 料液比的影响

如图3所示,料液比 1:10 时 1,8-桉叶素含量最高, 1:15 下降、1:20 微升,继续增大料液比则含量持续降低。说明 1:10 可充分浸润桉叶促进溶出;溶剂过量会稀释成分、降低浓度差导致效率下降;1:20 回升与少量残留成分浸出有关,整体含量随溶剂量增加呈下降趋势。

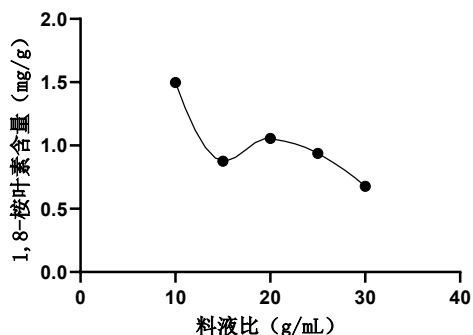


图3 料液比对1,8-桉叶素提取量的影响

2.1.4 乙醇体积分数的影响

如图4所示,随乙醇体积分数升高,1,8-桉叶素含量整体呈先升后降趋势,当60%时达到峰值。乙醇体积分数过低时,溶解与渗透能力不足;60%时溶剂极性与成分溶解度匹配最佳;体积分数过高时,溶剂极性降低,且细胞壁脱水收缩,阻碍成分向溶剂中扩散,导致含量降低。

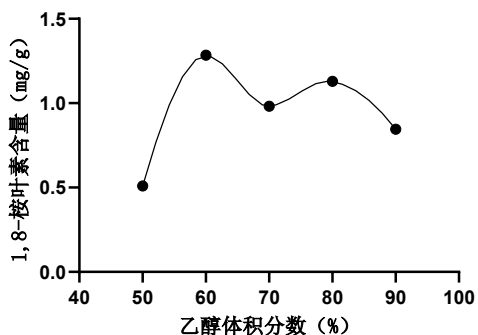


图4 乙醇体积分数对1,8-桉叶素提取量的影响

2.1.5 最佳条件下桉叶提取及 1,8-桉叶素含量测定

如图5所示,以 1,8-桉叶素标准品浓度为横坐标, 210 nm 波长下吸光度为纵坐标,绘制标准曲线并计算回归方程。最佳提取条件下稀释后所得 1,8-桉叶素提取含量见表1。

表1 蓝桉叶超声提取最佳提取条件及含量

提取方法	主要参数	提取含量 (mg/g)
超声波辅助提取法	提取时间20min, 温度60℃, 料液比 1:10(m:v), 乙醇体积分数60%,稀释, 提取3次	1.502

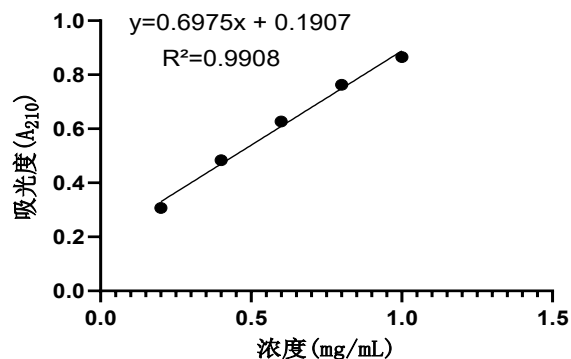


图5 1,8-桉叶素标准曲线

2.2 蓝桉叶提取物对两种供试菌的抑菌效果

蓝桉叶提取物各浓度组、阴性对照(60%乙醇)及阳性对照(氨苄青霉素)对两种供试菌的抑菌效果见图6-7。结果显示,提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑菌作用,阳性对照可见明显抑菌圈,阴性对照无抑菌圈。

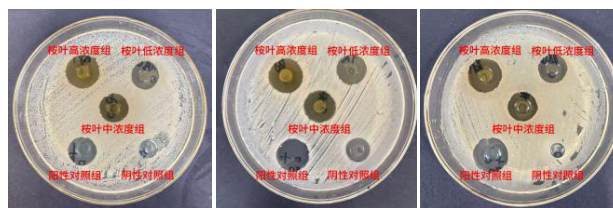


图6 蓝桉叶提取物对大肠杆菌的抑菌效果

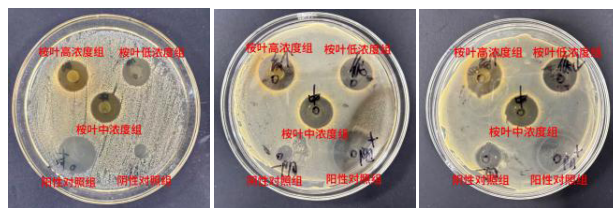


图7 蓝桉叶提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

2.3 蓝桉叶提取物抑菌效果统计分析

基于抑菌圈直径测定数据,对不同浓度蓝桉叶提取物、阳性对照及阴性对照的抑菌效果进行统计学分析。如图8A所示,大肠杆菌中提取物各浓度组与阳性对照组均高于阴性对照组($P < 0.0001$);低、中浓度组间无统计

学意义,且均低于高浓度组($P<0.01$ 、 $P<0.05$),抑菌效果随浓度升高呈增强趋势,高浓度组与阳性对照组无统计学意义。如图8B所示,金黄色葡萄球菌中提取物各浓度组与阳性对照组均高于阴性对照组($P<0.0001$),提取物各浓度组间无统计学意义;阳性对照组高于高浓度组($P<0.01$)及中、低浓度组($P<0.001$),表明提取物对金黄色葡萄球菌具有抑菌作用,但效果弱于阳性对照。

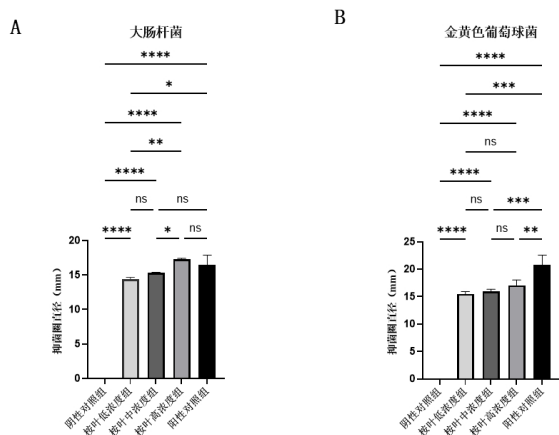


图8 桉叶提取物对两种供试菌的抑菌统计分析

3 结语

本研究通过单因素实验确定超声波提取法提取桉叶活性成分的最佳工艺条件为:提取温度 60 °C、时间 20 min、料液比 1:10、乙醇体积分数 60%。采用牛津杯法进行抑菌实验,结果表明,桉叶乙醇提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌作用,对大肠杆菌的抑菌效果随浓度升高显著增强。对金黄色葡萄球菌的抑菌作用随浓度升高呈增强趋势,但浓度组间差异无统计学意义。综上所述,桉叶乙醇提取物对革兰氏阴性菌和阳性菌均有良好抑菌活性。

参考文献:

[1] Perry M J, Wangchuk P. The Ethnopharmacology,

Phytochemistry and Bioactivities of the Corymbia Genus (Myrtaceae)[J]. Plants (Basel), 2023, 12(21): 3686.

[2] 何然. 浅谈桉树的功用[M]. 2005 全国首届壮医药学术会议暨全国民族医药经验交流会论文集汇编. 2005.

[3] 陈婷. 不同品种桉叶有效部位及抗菌药效研究[D]. 广东海洋大学, 2010.

[4] 韦学丰, 邓年方. 桉树叶的开发利用[J]. 贺州学院学报, 2008, 24 (2): 133-136.

[5] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.

[6] 朱永芳. 桉树叶的利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.

[7] 田玉红. 广西桉叶挥发性成分分析及抗菌抗氧化性能研究[D]. 广西大学, 2006.

[8] 唐云, 李伟. 蓝桉的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2015,46(06):923-931.

[9] 姜萍, 刘鑫, 萧伟等. 巨尾桉叶中原花色素提取工艺比较及不同溶剂萃取物生物活性的研究[J]. 生物质化学工程, 2015,49(4):19-24.

[10] 王筱雄, 姚祖春, 黄照成等. 提取赤桉树叶中黄酮类化合物的最佳工艺参数[J]. 轻工标准与质量, 2016(3): 55-57.

[11] 梁振益, 杨雪蕊, 李海峰等. 桉树叶中黄酮类化合物的提取工艺研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2007, 25(3):256-258.

[12] 项昭保, 霍丹群. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23 (5): 289-291.

作者简介: 田英 (1997.11-), 女, 蒙古族, 内蒙古自治区通辽市人, 硕士, 助教, 研究方向: 天然产物研究与应用。