

连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性

张俊顺¹, 骆嘉原¹, 姜喆卉¹, 包怡红^{1,2}, 包洪涛³

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040) (3. 黑龙江省轻工科学研究院, 黑龙江哈尔滨 150010)

摘要: 本研究以连翘叶为原料, 采用超声辅助半仿生法提取连翘苷, 在单因素实验的基础上, 设计四因素三水平的响应面试验, 确定最佳提取工艺条件。通过滤纸片法测定其抑菌活性, 并研究了温度、pH 以及紫外对连翘苷抑菌保持率的影响。方差分析结果表明: 回归模型较好的反映了连翘苷得率与乙醇体积分数、液料比、提取温度以及提取时间之间的关系, 得到最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数为 40%, 液料比为 36:1 (mL/g), 提取温度为 48 °C, 提取时间为 100 min。在此工艺条件下, 连翘苷得率为 4.42%, 高于其他提取方法。抑菌活性试验表明连翘苷对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌均有抑制作用, 对四种供试菌种的抑菌圈直径分别为 8.33、9.85、8.85、和 8.81 mm。高温以及强酸、强碱会减弱连翘苷的抑菌效果, 而紫外对连翘苷的抑菌效果基本没有影响。

关键词: 连翘叶; 连翘苷; 超声辅助半仿生法; 响应面; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2020)07-193-201

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1170

Optimization of Extraction Process of Phillyrin and Its Antibacterial Activity

ZHANG Jun-shun¹, LUO Jia-yuan¹, JIANG Zhe-hui¹, BAO Yi-hong^{1,2}, BAO Hong-tao³

(1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2.Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

(3.Heilongjiang Academy of Light Industry, Harbin 150010, China)

Abstract: *Forsythia suspensa* leaves were used as raw materials for phillyrin extraction by ultrasonic assisted semi-bionic method. According to the results of one-factor-at-a-time method, a four-factor and three-level response surface methodology was applied with ethanol concentration, liquid-to-solid ratio, extraction time, temperature as influencing factors. The antibacterial activity was determined by the filter paper method, and the effects of temperature, pH and UV on the antibacterial retention rate of phillyrin were studied. The results of variance analysis showed that the regression model better reflected the relationship between the yield of phillyrin and ethanol concentration, liquid-to-solid ratio, extraction time, temperature. The optimum extraction conditions were obtained: the ethanol concentration was 40%, the liquid-to-liquid ratio was 36:1, the extraction temperature was 48 °C and the extraction time was 100 min. Under these condition, the yield of phillyrin reached 4.42%, which was higher than other extraction methods. Antibacterial activity test showed that phillyrin could inhibit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Bacillus subtilis*. In addition, the diameters of inhibition zone of the four tested strains were 8.33, 9.85, 8.85, and 8.81 mm respectively. The high temperature, strong acid and strong base could weaken the antibacterial effect of phillyrin, while UV had little effect on the antibacterial effect of phillyrin.

Key words: *Forsythia suspensa* leaves; phillyrin; ultrasonic assisted semi-bionic method; response surface test design; antibacterial activity
引文格式:

张俊顺, 骆嘉原, 姜喆卉, 等. 连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 193-201

ZHANG Jun-shun, LUO Jia-yuan, JIANG Zhe-hui, et al. Optimization of extraction process of phillyrin and its antibacterial activity [J].

Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 193-201

收稿日期: 2019-11-29

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD2019C0002); “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2017YFC1601901)

作者简介: 张俊顺 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 林下资源精深加工

通讯作者: 包怡红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 林下资源精深加工, 功能性食品

连翘为木犀科 (*Oleaceae*) 连翘属 (*Forsythia* Vahl), 其果实可入药, 具有清热解毒, 散结消肿的功效^[1], 主要含有连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、连翘苷以及连翘脂素等成分^[2,3]。连翘叶是连翘植物叶片, 资源丰富, 具有与连翘果实基本相同的化学成分^[4], 有的成分含量甚至高于果实^[5], 民间常把连翘嫩叶加工制作成保健茶饮用^[6]。研究证实, 连翘叶具有保肝^[7]、降脂^[8]、抑菌^[9]、抗氧化^[10]及抗衰老^[11]等作用。连翘苷是双环氧木脂素苷类化合物, 是连翘药材的主要成分之一, 也是国家药典所规定的连翘质量控制指标性成分^[12]。王婷婷等^[13]研究了连翘苷的抗炎作用, 并对叶片与果实中连翘苷含量进行了测定, 得出连翘叶对慢性炎症具有治疗作用, 且叶片中连翘苷的含量高于果实。曲欢欢等^[14]用清除 DPPH·法评价连翘的抗氧化作用, 结果表明连翘苷对 DPPH·有一定的清除作用。王业梅等^[15]研究了连翘苷对铜绿假单胞菌黏附功能及生物被膜形成能力的影响, 发现连翘苷对铜绿假单胞菌细胞的黏附性和生物被膜有一定的抑制作用。

连翘苷提取通常采用煎煮法、渗漉法、索氏提取法以及微波提取法等^[16]方法, 本研究采用超声波辅助半仿生的提取方法^[17]提取连翘苷。半仿生提取法^[18]是一种新型的植物提取工艺, 基于仿生学原理, 人工模拟有效成分在胃肠道的消化吸收环境, 通常是模拟人体胃 (pH 2.2 左右)、小肠 (pH 7.6 左右) 和大肠 (pH 8.5 左右) 的体液酸度, 先用酸性溶液提取目标物质, 再用碱性溶液进行提取, 最后将提取液进行离心和浓缩。超声波属于声波中的一种, 其频率为 20~106 kHz, 超声波具有的空化效应、机械效应及热效应能使植物细胞变形、破壁^[19], 超声波辅助半仿生的提取工艺意在模拟体内环境的同时提高目标物质的得率。本文采用 Design-Expert 软件对提取条件进行优化, 得到提取连翘苷的最佳工艺条件, 同时对连翘苷的抑菌性能进行了研究, 为连翘叶资源的合理开发利用提供依据。

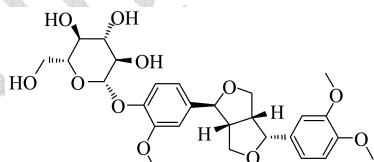


图 1 连翘苷的分子结构

Fig.1 Solecular structure of phillyrin

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

连翘叶, 购于安徽省亳州市; 连翘苷标准品 (纯度≥98%), 购于上海源叶生物科技有限公司; 大肠杆菌

(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 等供试菌种均来源于东北林业大学微生物实验室; 无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、氯化钠等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

高速多功能粉碎机, 上海市顶帅工贸有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; 电子万用炉, 天津天泰仪器有限公司; 电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 旋转蒸发器 RE-2000A, 巩义市予华仪器有限责任公司; 超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂制造。

1.3 试验方法

1.3.1 连翘苷标准曲线的测定

取 6 mg 连翘苷标准品, 无水乙醇溶解, 在 50 mL 的容量瓶中定容, 准确吸取 1、2、3、4、5 mL 于 50 mL 容量瓶中定容, 在波长 229 nm 处分别测量吸光度值^[20], 以连翘苷标准溶液的质量浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光度值 (*A*) 为纵坐标, 得到标准曲线方程:

$$A=0.02593x+0.007459, R^2=0.9991$$

1.3.2 超声辅助半仿生法提取连翘苷

连翘叶清洗, 置于烘箱中烘干, 粉碎, 过 100 目筛得干燥的连翘叶粉, 备用。准确称取 1 g 连翘叶粉末放入烧杯中, 加入一定体积分数的乙醇溶液, 300 W 的超声辅助提取, 首先根据胃液酸度, 调节 pH 至 2.2 提取一定时间; 然后根据小肠液的酸度, 调节 pH 至 7.6 提取一定时间; 最后根据大肠液的酸度, 调节 pH 至 8.5 提取一定时间, 提取时间为三次提取的总时间, 得到连翘苷提取液。在波长 229 nm 处测定其 OD 值, 代入标准曲线, 计算提取液中连翘苷浓度, 根据公式 (1) 计算得率。

$$\text{得率}/\% = \frac{X \times N \times V}{1000 \times M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: *X* 为根据标准曲线计算所得的连翘苷含量, mg/g; *N* 为连翘叶粉提取液稀释倍数, *V* 为提取液体积, mL; *M* 为样品质量, g。

1.4 连翘苷提取单因素试验

本文分别以乙醇体积分数 (30%、40%、50%、60%、70%)、液料比 (20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1)、

提取温度(20、30、40、50、60℃)和提取时间(80、90、100、110、120 min)为影响因素进行单因素试验,考察四种因素对连翘苷得率的影响。提取时间为不同pH环境提取的总时间,具体时间分配为:pH 2.2时,提取时间依次为40、50、50、60、60 min;pH 7.6时,提取时间依次为20、20、25、25、30 min;pH 8.5时,提取时间为20、20、25、25、30 min,提取的总时间依次为80、90、100、110、120 min。

1.5 响应面试验

在单因素实验的基础上,以连翘苷得率为响应值,根据单因素实验结果选定水平范围,采用中心组合Box-Behnken Design进行四因素三水平响应面设计,进行数据分析,模型确立,从而确定超声辅助半仿生法提取连翘苷的最优提取工艺条件。

1.6 连翘苷抑菌性能测定

1.6.1 连翘苷抑菌活性的测定

采用滤纸片法测定连翘苷对四种供试菌的抑菌活性^[21],用打孔器制直径为6 mm的滤纸片,高温灭菌备用。在无菌条件下,将培养基倒入灭过菌的平板,冷却凝固后,取100 μL菌悬液于培养基上并涂布均匀,取4片滤纸片放置于含菌平板上,其中3片滴加10 μL浓度为3.86 mg/mL的连翘苷提取液,另外1片滴加10 μL无菌水作对照,于37℃培养箱中培养12 h,多次试验后用交叉法测得抑菌圈直径大小。

1.6.2 温度对连翘苷抑菌活力保持率的影响

将同浓度的连翘苷在4℃、25℃、50℃、75℃和100℃温度下处理15 min,至室温进行抑菌试验^[22],抑菌圈直径用 L_1 表示,对照组连翘苷不进行处理,抑菌圈直径用 L_0 表示,根据以下公式计算抑菌活力保持率。

$$\text{抑菌活力保持率}/\% = \frac{L_1}{L_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.6.3 pH对连翘苷抑菌活力保持率的影响

调连翘苷pH分别为2、4、6、8、10,静置15 min后,调回原pH(pH 6.8),进行抑菌试验^[23],对照组连翘苷不进行处理,观察并测量抑菌圈的直径大小,根据公式(2)计算抑菌活力保持率。

1.6.4 紫外对连翘苷抑菌活力保持率的影响

将连翘苷分别置于紫外灯下照射10、20、30、40、50 min,对照组不进行紫外照射,紫外灯波长为254 nm,功率为20 W,连翘苷距离紫外灯的垂直距离为30 cm,进行抑菌试验,观察并测量不同紫外照射时间下抑菌圈的直径大小^[24],根据公式(2)计算抑菌活

力保持率。

1.7 数据分析

用Excel 2010与SPSS 20软件进行数据统计以及显著性分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。采用Design-Expert 8.0.6软件进行响应面优化分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对连翘苷得率的影响

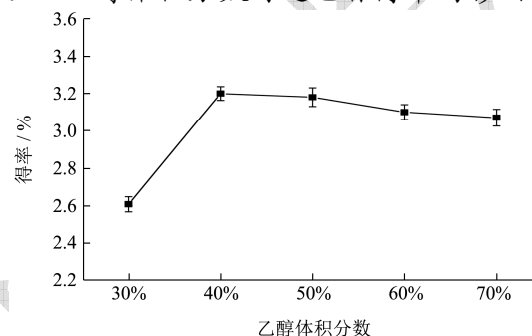


图2 乙醇体积分数对连翘苷得率的影响

Fig.2 Effects of ethanol concentration on forsythoside yield

乙醇体积分数对连翘苷得率的影响如图2所示,当乙醇体积分数为40%时,连翘苷得率达到最高值(3.21±0.06)%,随着乙醇体积分数的增加提取率开始下降,原因可能是在乙醇体积分数为40%时连翘苷的溶出趋于饱和,较高的乙醇体积分数使脂溶性杂质增多,促进其他物质与乙醇结合溶出,从而抑制了连翘苷与乙醇的结合,导致连翘苷得率下降。综合提取成本以及得率考虑,选择乙醇体积分数为40%为最佳。

2.1.2 液料比对连翘苷得率的影响

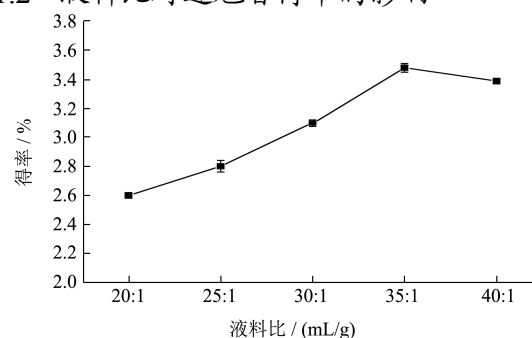


图3 液料比对连翘苷得率的影响

Fig.3 Effects of liquid-to-solid ratio on forsythoside yield

液料比对连翘苷得率的影响如图3所示,当液料比从20:1(mL/g)增加到35:1(mL/g)时,连翘苷得率逐渐上升,在液料比为35:1(mL/g)时达到最大值(3.48±0.03)%,随着液料比继续增大,连翘苷得率开始下降,原因可能是在液料比为35:1(mL/g)时,

连翘苷已基本溶出, 继续增加溶剂的使用量反而会促进其他物质与乙醇结合溶出, 从而抑制了连翘苷与乙醇的结合, 得率降低。此外, 溶剂用量较大时还会造成物料以及溶剂的浪费, 增加了提取成本, 所以选择 35:1 (mL/g) 作为最佳液料比。

2.1.3 提取温度对连翘苷得率的影响

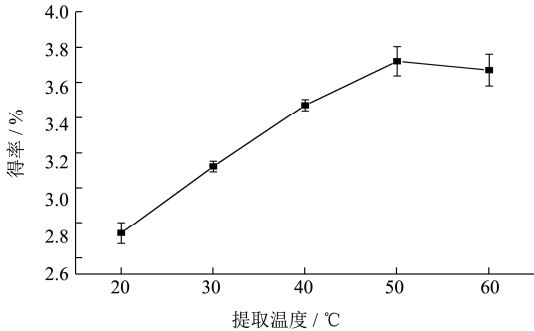


图 4 提取温度对连翘苷得率的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature on forsythoside yield

提取温度对连翘苷得率的影响如图 4 所示, 随着提取温度的增大, 提取率也逐渐增大, 在提取温度为 50 °C 时达到最高, 此时提取率为 (3.72±0.04) %, 当提取温度继续升高时, 提取率开始下降, 原因可能是高温破坏了连翘苷的结构, 提取量减少, 使得连翘苷的得率下降, 所以最佳提取温度为 50 °C。

2.1.4 提取时间对连翘苷得率的影响

提取时间对连翘苷得率的影响如图所示, 当提取时间在 80~100 min 时, 提取率随之增大, 在 100 min 时提取率达到最大值 (3.81±0.03) %。随着提取时间继续增加, 提取率不但没有增加, 反而有所下降, 原因可能是当提取时间为 100 min 时, 连翘苷已基本充分溶解, 随着提取时间增加, 部分连翘苷可能发生降解^[25], 同时其他物质也会与乙醇结合溶出, 抑制了连翘苷与乙醇的结合, 导致连翘苷的得率下降, 因此选

择最佳提取时间为 100 min。

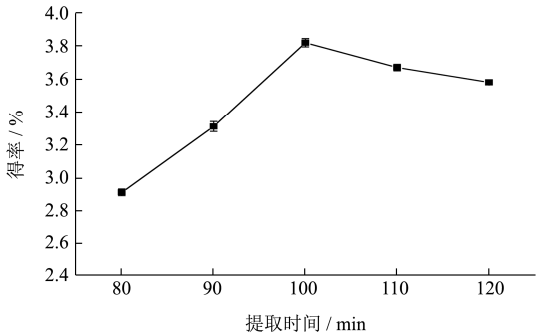


图 5 提取时间对连翘苷得率的影响

Fig.5 Effects of extraction time on forsythoside yield

2.2 响应面实验设计与结果

利用软件 Design-Expert 8.0.6 中的 Box-Behnken 模式对提取时间、液料比、提取温度和乙醇体积分数进行响应面实验设计, 自变量因素水平及编码如表 1 所示, 实验设计与结果见表 2。

由表 2 可知, 对试验数据进行多元二次回归拟合, 可得到以连翘苷得率为响应中的回归方程:

$$Y=4.42-0.14*A+0.16*B-0.073*C-0.18*D+0.075*A*B-0.10*A*C+0.14*A*D+0.11*B*C-0.050*B*D-0.097*C*D-0.76A^2-0.59*B^2-0.60C^2-0.50*D^2$$

表 1 响应面实验自变量因素水平及编码

Table 1 Variables and levels in response surface analysis

因素	自变量 (A~D) 编码值及水平		
	-1	0	1
A 提取时间/min	90	100	110
B 液料比/(mL/g)	30:1	35:1	40:1
C 乙醇体积分数	30%	40%	50%
D 提取温度/°C	40	50	60

表 2 连翘苷响应面分析实验设计及结果

Table 2 RSM design and results of forsythoside

试验序号	A: 提取时/min	B: 料液比/(mL/g)	C: 乙醇体积分数/%	D: 提取温度/°C	得率/%
1	100	40:1	50	50	3.69±0.03
2	100	35:1	30	60	3.52±0.03
3	100	30:1	40	40	3.42±0.04
4	100	35:1	40	50	4.32±0.03
5	90	35:1	40	60	3.16±0.05
6	90	30:1	40	50	3.22±0.06
7	110	35:1	40	40	2.97±0.10
8	100	35:1	40	50	4.41±0.09
9	100	35:1	30	40	3.57±0.12
10	100	35:1	50	40	3.28±0.09

转下页

接上页

11	110	35:1	30	50	3.17±0.09
12	90	35:1	50	50	3.07±0.08
13	100	40:1	40	40	3.73±0.07
14	90	40:1	40	50	3.36±0.03
15	100	30:1	40	60	2.93±0.05
16	110	35:1	40	60	3.04±0.03
17	90	35:1	30	50	2.93±0.16
18	110	40:1	40	50	3.04±0.09
19	90	35:1	40	40	3.67±0.05
20	100	35:1	40	50	4.39±0.04
21	100	35:1	40	50	4.40±0.03
22	110	35:1	50	50	2.91±0.04
23	100	40:1	30	50	3.37±0.05
24	100	30:1	50	50	2.99±0.03
25	100	35:1	40	50	4.20±0.09
26	100	35:1	50	60	2.84±0.12
27	110	30:1	40	50	2.60±0.05
28	100	40:1	40	60	3.04±0.03
29	100	30:1	30	50	3.10±0.06

表 3 连翘苷回归模型与方差分析

Table 3 The regression model and variance analysis of forsythin

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	7.70	14	0.55	12.92	<0.0001	**
A	0.24	1	0.24	5.53	0.03	*
B	0.32	1	0.32	7.60	0.02	*
C	0.07	1	0.07	1.52	0.23	NS
D	0.37	1	0.37	8.72	0.01	*
AB	0.02	1	0.02	0.53	0.48	NS
AC	0.04	1	0.04	0.94	0.35	NS
AD	0.08	1	0.08	1.98	0.18	NS
BC	0.05	1	0.05	1.09	0.32	NS
BD	0.01	1	0.01	0.23	0.64	NS
CD	0.04	1	0.04	0.89	0.36	NS
A ²	3.73	1	3.73	87.57	<0.0001	**
B ²	2.25	1	2.25	52.92	<0.0001	**
C ²	2.30	1	2.30	54.05	<0.0001	**
D ²	1.65	1	1.65	38.75	<0.0001	**
残差	0.60	14	0.04			
失拟项	0.51	10	0.05	2.30	0.22	NS
纯误差	0.09	4	0.02			
总和	8.29	28				
R ² =0.93						
R ² _{adj} =0.86						

注: *, 表示有显著差异, $p<0.05$; **, 表示有极显著差异, $p<0.01$; NS, 表示无显著差异, $p>0.05$ 。

2.3 回归模型及方差分析

由表 3 可知,二次回归模型的 F 值为 12.92, $p < 0.0001$, 表明该模型达到极显著水平。失拟项 $p = 0.22 > 0.05$, 表明此模型失拟度不显著。模型相关系数 R^2 为 0.93, 校正系数 R^2_{adj} 为 0.86, 说明模型的拟合度较好, 试验误差小, 可用该模型来分析和预测各因素对连翘苷的影响。一次项 A、B、D 具有显著性 ($p < 0.05$), 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 具有极显著性 ($p < 0.01$)。由 F 值可判断出四个因素的影响程度大小为 $D > B > A > C$, 即提取温度对得率的影响最大, 其次是液料比和提取时间, 最后是乙醇体积分数。

2.4 响应面分析

各因素交互作用对响应值的影响如图 6 所示, 连翘苷得率随着提取温度、液料比、提取时间和乙醇体积分数的增大, 呈现先增大后减少的趋势。在所选两因素范围内响应面存在最高点, 即连翘苷得率极值^[26]。响应面坡度越陡, 说明该因素对连翘苷得率的影响越大; 反之则表明因素对得率的影响越小^[27]。提取温度和液料比两因素交互作用的响应面最陡, 说明这两个因素对得率影响最大, 这与方差分析的结果一致。

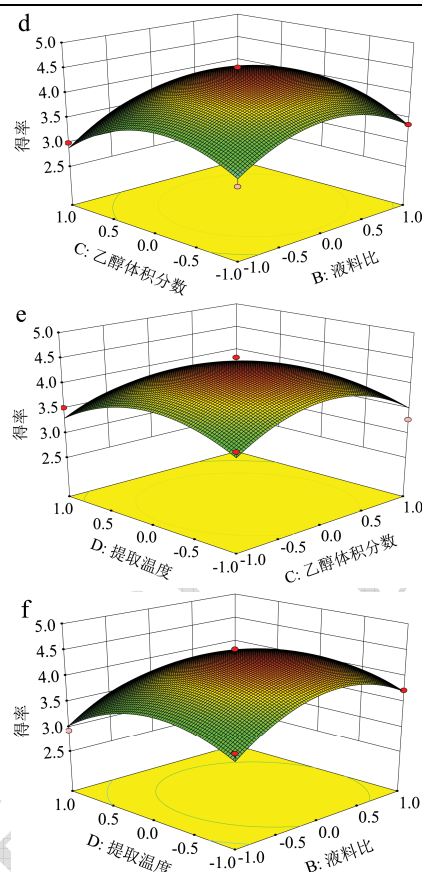
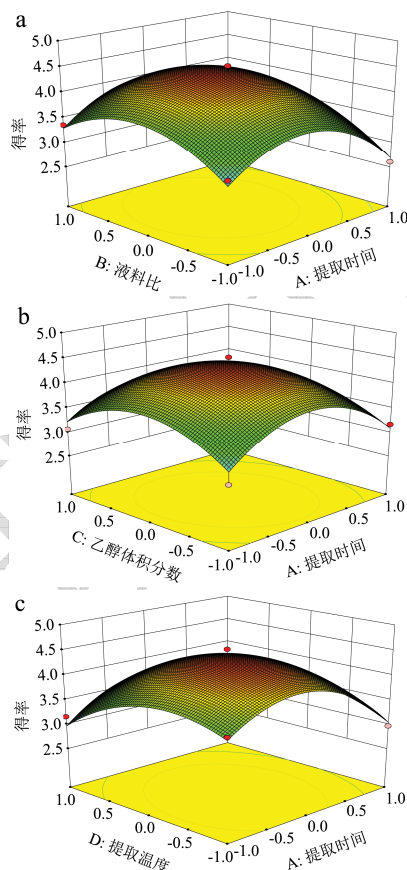


图 6 各因素交互作用对连翘苷得率影响的响应面图

Fig.6 Response surface showing the interactive effects of variables on forsythin yield

2.5 最佳提取工艺条件及验证

利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行工艺参数的优化组合, 得到预测的连翘苷提取最佳工艺条件为: 提取时间为 98 min, 提取温度为 48.12℃, 乙醇体积分数为 39.84%, 液料比为 35.73:1 (mL/g), 此时最佳得率达到 $(4.45 \pm 0.05)\%$ 。为了验证模型的有效性, 考虑到实际操作的可性, 将最佳工艺条件修改为提取时间为 100 min, 提取温度为 48℃, 乙醇体积分数为 40%, 液料比为 36:1 (mL/g), 在此工艺条件下, 进行三次平行实验, 连翘苷平均得率为 $(4.42 \pm 0.04)\%$, 与预测的最佳得率基本一致, 说明该模型可较好的预测连翘苷得率, 优化工艺条件可靠。

2.6 连翘苷抑菌性能的测定结果

2.6.1 连翘苷抑菌活性测定结果

由表 4 可知连翘苷对大肠杆菌的抑菌圈直径最大, 为 9.85 mm, 说明连翘苷对大肠杆菌的抑菌效果最好, 其次是沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄

球菌，原因可能是大肠杆菌为革兰氏阴性细菌，而枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌为革兰氏阳性菌，革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，结构较为致密，阻碍了连翘苷的进入。

表 4 连翘苷对四种供试菌的抑菌活性

Table 4 Antimicrobial activities of berberine against 4 tested

microbes		
菌种	抑菌圈直径/mm	无菌水
大肠杆菌	9.85±0.11 ^c	0
枯草芽孢杆菌	8.81±0.18 ^b	0
金黄色葡萄球菌	8.33±0.13 ^a	0
沙门氏菌	8.85±0.14 ^b	0

2.6.2 温度对连翘苷抑菌保持率的影响

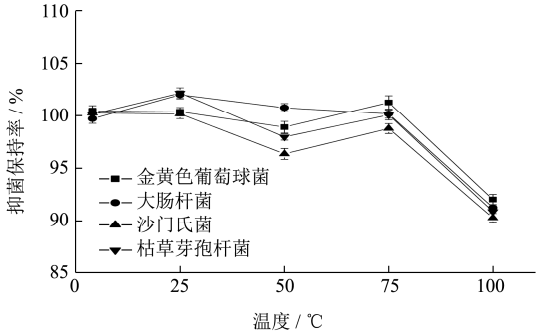


图 7 温度对连翘苷抑菌保持率的影响

Fig.7 Effect of temperature on the inhibition rate of forsyth

温度对连翘苷的抑菌保持率如图 7 所示，当温度分别为 4℃，25℃，50℃以及 75℃时，其抑菌保持率基本维持在 95%~102%，而当温度高于 80℃时，抑菌保持率均有降低，当温度增至 100℃时，金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的抑菌保持率降至 90%~92%，下降约 5%~10%，达到最低，原因可能是高温破坏了部分连翘苷的结构^[28]，使其抑菌活性降低，导致抑菌保持率降低，连翘苷对高温的稳定性差，不耐高温。原江锋等^[29]对连翘花提取物的成分及稳定性进行分析，结果表明，连翘花提取物中连翘苷的含量最高，并且连翘花提取物在 25~27℃范围内处理 1 h 稳定性变化较小，而 100℃处理时稳定性较差。

2.6.3 pH 对连翘苷抑菌保持率的影响

pH 对连翘苷的抑菌保持率的影响如图 8 所示，在强酸性 (pH 为 2) 时，其抑菌保持率较低，对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的抑菌保持率分别为 89.21%、88.54%、87.45%和 86.52%，当 pH 为中性 (pH 6~8) 时，其抑率保持在 95%~100%，提高约 8%~10%。而在强碱 (pH 为 10) 时，抑菌保持率下降约 10%，说明强酸或强碱会使连翘苷的抑菌活性降低，原因可能是强酸或强碱使部分连翘苷的

键断裂，结构破坏，从而导致抑菌能力下降，可见强酸或强碱能使连翘苷的稳定性变差。原江锋等^[30]研究了 pH 对连翘叶提取物抑菌作用的影响，结果表明连翘叶提取物在中性和弱酸性条件下抑菌活性较稳定，与本实验结果基本一致。

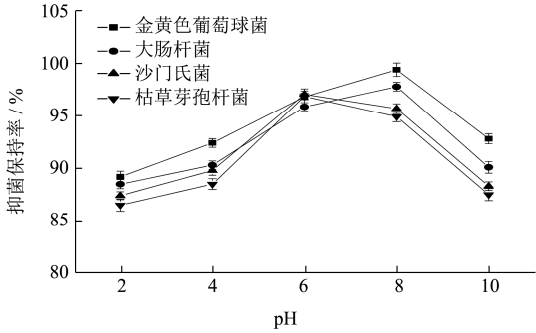


图 8 pH 对连翘苷抑菌保持率的影响

Fig.8 Effect of pH on the inhibition rate of forsyth

2.6.4 紫外对连翘苷抑菌保持率的影响

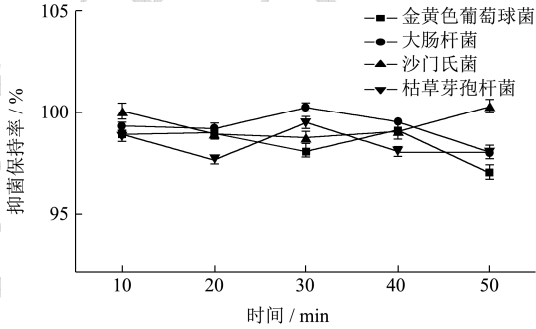


图 9 紫外对连翘苷抑菌保持率的影响

Fig.9 Effect of ultraviolet on the inhibition rate of forsyth

紫外对连翘苷抑菌保持率的影响如图 9 所示，紫外照射时间为 10 min 时，连翘苷对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的抑菌保持率分别 98.82%、99.35%、100%、98.90%，当紫外照射时间增加至 50 min 时，连翘苷对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的抑菌保持率分别 97%、98%、100.2%、98%，稳定在 97%~101%，其抑菌保持率几乎没有变化，说明紫外对连翘苷的抑菌保持率没有影响，连翘苷的抑菌活性未发生变化，连翘苷对紫外的稳定性较好。

3 结论

本研究以连翘叶为原料，通过超声辅助半仿生法提取连翘苷，响应面优化实验及综合分析得到最佳工艺提取条件为：提取时间为 100 min，提取温度为 48℃，乙醇体积分数为 40%，液料比为 36:1 (mL/g)，在此工艺条件下，连翘苷得率为 (4.42±0.04)%。此外，抑菌活性试验表明连翘苷对食品中常见的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌均有

抑制作用。连翘苷抑菌活性的稳定研究表明:紫外对连翘苷的抑菌效果几乎没有影响,而高温、强酸、强碱条件会使其部分苷键断裂,结构破坏,抑菌效果减弱。本实验初步探究了连翘苷的抑菌活性,但目前对连翘苷抑菌机理的研究较少,今后应对其抑菌机理进行探究,为连翘苷在抑菌方面的深入研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 支旭然,苑霖,生宁,等.HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分[J].中草药,2013,44(22):3231-3235
ZHI Xu-ran, YUAN Lin, SHENG Ning, et al. Determination of nine components in *Forsythia folium* collected in different periods [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(22): 3231-3235
- [2] 栾兰,王钢力,林瑞超.连翘水提物化学成分研究[J].中草药,2010,41(6):883-884
LUAN Lan, WANG Gang-li, LIN Rui-chao. Studies on the chemical constituents of extract with water from *Forsythia suspensa* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(6): 883-884
- [3] Cui Y, Wang Q, Shi X, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia suspensa* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2010, 21(3): 253-260
- [4] 陈玲,李晓,李倩,等.连翘属植物化学成分的研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(3):441-445
CHEN Ling, LI Xiao, LI Qian, et al. Research advances in chemical constituents in plants of *Forsythia vahl* [J]. Drugs & Clinic 2013, 28(3): 441-445
- [5] 王晓燕,杨莹莹,叶松华,等.有机连翘叶茶中核心营养素及功效成分的测定[J].农产品加工,2016,13:55-56
WANG Xiao-yan, YANG Ying-ying, YE Song-hua, et al. Determination of core nutrients and functional components of organic *Forsythia suspensa* leaves tea [J]. The Processing of Agricultural Products, 2016, 13: 55-56
- [6] 杨建雄,刘静,李发荣,等.连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J].营养学报,2004,1:65-67
YANG Jian-xiong, LIU Jing, LI Fa-rong, et al. Experimental study on antioxidant and anti-aging effects of *Forsythia* leaf tea [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2004, 1: 65-67
- [7] 侯改霞,习雪峰,杨建雄.连翘叶提取物对力竭及恢复小鼠肝脏、骨骼肌的保护作用[J].现代预防医学,2011,38(2):316-318
HOU Gai-xia, XI Xue-feng, YANG Jian-xiong. Protection effects of extract From *Forsythia suspensa* leaves on liver and quadriceps femoris tissue of mice at exhaustion and recover [J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(2): 316-318
- [8] 侯改霞,杨建雄.连翘叶提取物对实验小鼠的降脂保肝作用研究[J].河南大学学报(自然科学版),2010,40(5): 504-506
HOU Gai-xian, YANG Jian-xiong. Effects of extracts from *Forsythia suspensa* leaves on modulating blood lipids and protecting liver of hyperlipidemic mice [J]. Journal of Henan University Natural Science Edition, 2010, 40(5): 504-506
- [9] 马文兵,李红鹏.连翘叶体外抑菌作用的实验研究[J].时珍国医国药,2013,24(2):379-380
MA Wen-bing, LI Hong-peng. Experimental study on antibacterial activity of *Forsythia Suspensa* leaves *in vitro* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2013, 24(2): 379-380
- [10] 黄九林,魏春雁,李庆华.连翘提取液中连翘苷和总黄酮的含量测定与抗氧化活性的研究[J].安徽农业科学,2012,40(9):5209-5210
HUANG Jiu-lin, WEI Chun-yan, LI Qing-hua. Study on the content of *Forsythoside*, total flavonoids of *Forsythia suspensa* and their antioxidant ability [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 5209-5210
- [11] 杨建雄,刘静.连翘叶茶保肝作用的实验研究[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2005,3:82-85
YANG Jian-xiong, LIU Jing. Experimental on effect of protecting liver of *Forsythia suspensa* leaves tea [J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2005, 3: 82-85
- [12] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等.连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J].天然产物研究与开发,2005,2:157-159
ZHAO Yong-mei, LI Fa-rong, YANG Jian-xiong, et al. Study on the reducing blood lipid and antioxidation effects of phillyrin [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 2: 157-159
- [13] 王婷婷,张蕙,杨志敏,等.连翘及连翘叶抑菌抗炎活性及其主要化学成分研究[J].中国药物与临床,2019,19(14):2380-2381
WANG Ting-ting, ZHANG Hong, YANG Zhi-min, et al. Antibacterial activity and main chemical constituents of *Forsythia suspensa* and *Forsythia suspensa* leaves [J]. Chinese Remedies & Clinics, 2019, 19(14): 2380-2381
- [14] 曲欢欢,李白雪,燕菲,等.用清除有机自由基 DPPH 法评价连翘不同部位抗氧化作用[J].中国中医药信息杂志,2008(S1):32-34

- QU Huan-huan, LI Bai-xue, YAN Fei, et al. Evaluation of antioxidation in different parts of *Forsythia suspensa* by DPPH method [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2008(S1): 32-34
- [15] 王业梅,程惠娟.连翘苷对铜绿假单胞菌黏附功能及生物被膜形成能力的影响[J].中成药,2013,35(4):832-834
- WANG Ye-mei, CHENG Hui-juan. Effects of *Forsythin* on adhesion function and biofilm formation ability of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(4): 832-834
- [16] 魏晋宝,杨光义,陈欢,等.连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展[J].中国药师,2015,18(12):2144-2148
- WEI Jin-bao, YANG Guang-yi, CEHN Huan, et al. Recent advances in extraction methods, pharmacology, toxicology and pharmacokinetics studies of philly [J]. China Pharmacist, 2015, 18(12): 2144-2148
- [17] 符群,张海婷.半仿生法提取细叶小檗总生物碱及抑菌性研究[J].北京林业大学学报,2018,40(5):117-123
- FU Qun, ZHANG Hai-ting. Using the method of semi-bionic to extract total alkaloids from *Berberis poiretii* and to study the antibacterial property [J]. Journay of Beijing Forestry University, 2018, 40(5): 117-123
- [18] 黄良永,孟斐,杨光义.均匀设计法优选连翘半仿生提取工艺[J].中国药师,2014,17(10):1633-1636
- HUANG Liang-yong, MENG Fei, YANG Guang-yi. Optimization of semi-bionic extraction technology of *forsythia suspensa* by uniform design [J]. China Pharmacist, 2014, 17(10): 1633-1636
- [19] 陈纯馨,孙恢礼,吴嘉辉,等.超声波技术在波纹巴非蛤酶解反应中的应用[J].食品科学,2010,31(20):152-158
- CHEN Chun-xin, SUN Hui-li, WU Jia-hui, et al. Application of ultrasonic technology to the enzymatic hydrolysis of *paphiaundulata* muscle [J]. Food Science, 2010, 31(20): 152-158
- [20] 王杰,韩晓彤,董新荣,等.响应面法优化微波辅助提取连翘叶中连翘连翘苷工艺[J].中国酿造,2013,32(6):65-68
- WANG JIE, HAN Xiao-tong, DONG Xin-rong, et al. Optimization of the microwave-assisted extraction condition of *Forsythin* from leaves of *Forsythia* by response surface methodology [J]. China Brewing, 2013, 32(6): 65-68
- [21] 樊梓鸾,张艳东,张华,等.红松松针精油抗氧化和抑菌活性研究[J].北京林业大学学报,2017,39(8):98-103
- FAN Zi-luan, ZHANG Yan-dong, ZHANG Hua, et al. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil from *Pinus koraiensis* needles [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(8): 98-103
- [22] 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
- BAO Yi-hong, LIU Wen-li. Extraction of *Pinus tabulaeformis* Needles essential oils by ultrasoni-assisted salting-out hydrodistillation and its antibacterial effect and stability [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2018, 46(10): 54-58
- [23] 孙义玄,包怡红.艾蒿多糖抑菌活性及稳定性[J].食品与生物技术学报,2017,36(9):990-995
- SUN Yi-xuan, BAO Yi-hong. Study on antimicrobial activities of polysaccharides from *Artemisia argyi* and its stability [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(9): 990-995
- [24] 段伟丽,刘艳秋,包怡红.艾蒿精油的抑菌活性和稳定性[J].食品与生物技术学报,2015,34(12):1332-1337
- DUAN Wei-li, LIU Yan-qiu, BAO Yi-hong. Study on antimicrobial activities and stability of essential oil from *Artemisia argyi* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(12): 1332-1337
- [25] 于海鑫,张秀玲,高诗涵,等.紫苏叶花色苷微波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业,2019,40(10):51-55
- YU Hai-xing, ZHANG Xiu-lin, GAO SHi-han, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanin from perilla leaves and its antioxidant activity [J]. The Food Industry, 2019, 40(10): 51-55
- [26] 赵云韵,杨心怡,王申萌,等.超声波协同高剪切法高效提取树莓果渣黄酮及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].现代食品科技,2019,35(5):220-227
- ZHAO Yun-yun, YANG Xin-yi, WANG Shen-men et al. Efficient extraction of flavonoids from *Rubus idaeus* Residue by ultrasonic wave combined with high shear method and its inhibition of α -glucosidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(5): 220-227
- [27] 潘思源,田英姿,韦士鹏.微波辅助离子液体提取罗布麻叶总黄酮及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2019,35(7):182-190
- PAN Si-yuan, TIAN Ying-zi, WEI Shi-peng. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Apocynum venetum* L. Leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 182-190

(下转第 104 页)