

地参总多酚提取及其抗氧化活性研究

李月^{1,2}, 范媛媛¹, 王昀¹, 左绍远^{1,2}, 陈贵元^{1,2}

(1. 大理大学 基础医学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

摘要:以总多酚得率为考察指标,用乙醇冷凝回流法,在单因素试验基础上,响应面优化制备地参总多酚,测定其抗氧化活性。结果表明:地参总多酚提取最佳工艺条件为料液比1:58、乙醇体积分数60%、提取温度90℃、提取时间3 h,在此条件下地参总多酚得率为(1.08±0.56)%;地参总多酚清除DPPH·的 IC_{50} 为114 μg/mL。表明响应面优化的地参总多酚提取工艺稳定可行,地参总多酚具有一定的抗氧化活性。

关键词:地参;多酚;响应面法;提取;抗氧化活性

中图分类号:TS229;TS209

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)09-0078-05

Extraction and antioxidant activity of total polyphenol from *Lycopus lucidus* Turcz.

LI Yue¹, FAN Yuanyuan¹, WANG Yun¹, ZUO Shaoyuan^{1,2}, CHEN Guiyuan^{1,2}

(1. College of Basic Medicine, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China; 2. Provincial Key Laboratory of Entomology Biopharmaceutical R & D, Dali 671000, Yunnan, China)

Abstract: With yield of total polyphenol as investigation indicator, the preparation process of total polyphenol from *Lycopus lucidus* Turcz. by ethanol condensation reflux method was optimized by response surface methodology based on single factor experiment. The antioxidant activity of total polyphenol was determined. The results showed that the optimal extraction process conditions were obtained as follows: ratio of material to liquid 1:58, volume fraction of ethanol 60%, extraction temperature 90℃ and extraction time 3 h. Under these conditions, the yield of total polyphenol was (1.08±0.56)%. The IC_{50} of scavenging DPPH free radical by total polyphenol was 114 μg/mL. The extraction process of total polyphenol from *Lycopus lucidus* Turcz. optimized by response surface methodology was stable and feasible, and the total polyphenol from *Lycopus lucidus* Turcz. had a certain antioxidant activity.

Key words: *Lycopus lucidus* Turcz.; polyphenol; response surface methodology; extraction; antioxidant activity

地参(*Lycopus lucidus* Turcz.)又名虫草地参,属唇形科水苏属多年生草本植物,药食同源,味甘而辛、性温、无毒,分布广泛,具有滋阴降火、开胃化食、润燥滑肠、骨蒸劳热等功效^[1],国内种植历史悠久,

是一种名贵的中草药。现代研究发现,地参中含有多种微量元素及脂类、蛋白质、多酚、多糖等多种活性成分,其中含蛋白质1.45%,多糖达42.53%,脂类占4.13%,且脂类中含软脂酸77.37%、硬脂酸13.14%、亚麻酸3.54%^[2]。

多酚类化合物,作为一种天然成分,广泛存在于植物组织中,其结构上具有一个或多个芳香环及羟基基团,为芳香族羟基衍生物的总称,多包含酮类、单宁、香豆素类、酚酸类等,具有抗炎、抗氧化、抗动脉硬化症、抗肿瘤等多种生物学活性^[3-8],可作为油脂的天然抗氧化剂。研究发现多酚类化合物主要来源于植物加工处理后的副产物^[9-10]。目前,关于地参中多酚类化合物的研究尚未见报道。因此,本试

收稿日期:2018-01-11;修回日期:2018-06-26

基金项目:大理大学博士科研启动费项目(KY83701401);云南省教育厅科学研究基金项目(2015Z147);云南省昆虫生物医药研发重点实验室项目(2015)

作者简介:李月(1987),男,硕士研究生,研究方向为天然产物提取分离纯化、结构解析与生物学活性(E-mail)wj1010@foxmail.com。

通信作者:陈贵元,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)cgylyx@163.com。

验采用单因素试验和响应面设计对地参总多酚提取中的关键因素进行考察,以探索出最佳提取工艺,并采用 DPPH· 对其抗氧化活性进行研究,从而为地参总多酚的功能及开发应用等后续研究提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

地参购于大理市剑川县农贸市场;没食子酸(含量 $\geq 99\%$,批号:110833-201506,中国食品药品检定研究院);DPPH(批号:D4313,日本东京化成工业株式会社);水为去离子水;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

FST-III-20 普力菲尔超纯水机;SHA-C 恒温水箱;AG135 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);RE-52A 型旋转蒸发器;FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康技术有限公司);754 紫外可见分光光度计(上海菁华科学仪器有限公司);LD4-2A 低速离心机(北京市医用离心机厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 地参总多酚提取工艺流程

地参粉 \rightarrow 石油醚回流(3 倍体积,4 h) \rightarrow 乙醇回流、离心 \rightarrow 减压浓缩 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 地参总多酚。

1.2.2 总多酚标准曲线的绘制

参照文献[11]绘制总多酚标准曲线。

1.2.3 地参总多酚得率的测定

取 1 g 地参粉,石油醚脱脂处理,乙醇抽提后,离心取上清液,60% 乙醇定容,取适量,加水至 5 mL,依次加入酒石酸亚铁溶液 3 mL,pH 7.5 的 PBS 液 2 mL 混匀,按 1.2.2 方法测定并计算总多酚的含量。按下式计算地参总多酚得率:

地参总多酚得率 = 上清液中总多酚的质量/地参粉质量 $\times 100\%$

1.2.4 对 DPPH· 的清除作用^[12]

制备质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 地参总多酚溶液,各取 2 mL,依次加入 0.1 mmol/L 的 DPPH 2 mL 混匀,避光室温 0.5 h,测 517 nm 处吸光度。空白组以 2 mL 的蒸馏水代替地参总多酚溶液,以 V_c 为阳性对照同法操作。按下式计算地参总多酚液对 DPPH· 清除率,并测定地参总多酚清除 DPPH· 的 IC_{50} 。

DPPH· 清除率 = $[1 - (A_a - A_b)/A_0] \times 100\%$

式中: A_0 为空白组吸光度; A_a 为地参总多酚溶

液或 V_c 溶液吸光度; A_b 为地参总多酚溶液或 V_c 溶液的本底吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对地参总多酚得率的影响

固定料液比 1:20、提取时间 1 h、提取温度 60 $^{\circ}C$,考察乙醇体积分数对地参总多酚得率的影响,结果见图 1。

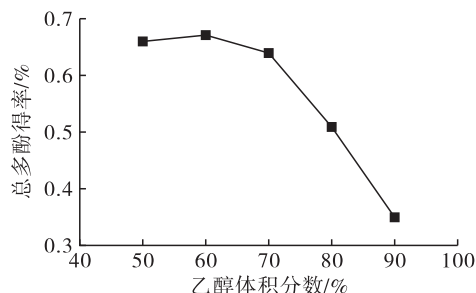


图 1 乙醇体积分数对地参总多酚得率的影响

由图 1 可知,在乙醇体积分数 50% ~ 60% 范围内,总多酚得率随乙醇体积分数的增加而增大。当乙醇体积分数继续增大时,总多酚得率呈下降趋势。该现象解释为乙醇体积分数增加时,加大了乙醇与溶质接触,同时溶剂浓度不同极性不同,在一定的乙醇体积分数范围内,会利于多酚类物质的溶出^[13];随后乙醇体积分数继续增加,会导致蛋白质等物质变性,阻碍多酚类物质溶出。故最优乙醇体积分数为 60%。

2.1.2 料液比对地参总多酚得率的影响

固定提取时间 1 h、乙醇体积分数 60%、提取温度 60 $^{\circ}C$,考察料液比对地参总多酚得率的影响,结果见图 2。

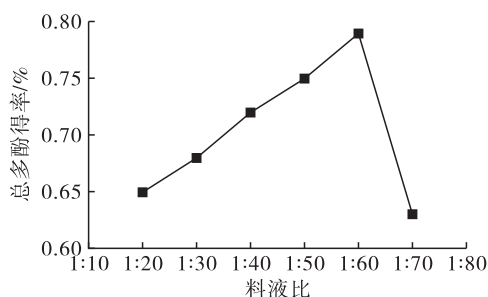


图 2 料液比对地参总多酚得率的影响

由图 2 可知,随料液比的增加,总多酚得率依次增大,在料液比 1:60 时总多酚得率达到最大值。当料液比继续增加时,总多酚得率呈下降趋势。可能由于溶剂量的增加,增大了乙醇与原料的接触面积及溶液传质推动力,利于多酚类物质扩散及溶出,从而总多酚得率增加^[14];随料液比的继续增加,会有糖类等其他物质溶出,阻碍多酚类物质溶出,不利于

其提取。因此,最佳料液比为 1:60。

2.1.3 提取温度对地参总多酚得率的影响

固定料液比 1:60、提取时间 1 h、乙醇体积分数 60%,考察提取温度对地参总多酚得率的影响,结果见图 3。

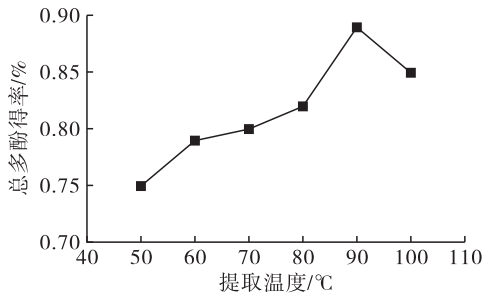


图 3 提取温度对地参总多酚得率的影响

由图 3 可知,总多酚得率随提取温度的升高而增大,在提取温度 90 °C 时总多酚得率达到最大值。当提取温度继续升高时,总多酚得率呈下降趋势。这可解释为温度升高利于降低溶剂的黏性,加速分子运动,便于多酚类物质溶出,但温度过高会导致多酚类物质降解、氧化^[15],进而总多酚得率降低。故最适提取温度为 90 °C。

2.1.4 提取时间对地参总多酚得率的影响

固定料液比 1:60、提取温度 90 °C、乙醇体积分数 60%,考察提取时间对地参总多酚得率的影响,结果见图 4。

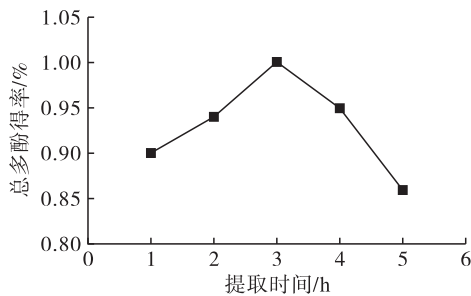


图 4 提取时间对地参总多酚得率的影响

由图 4 可知,随提取时间的延长,总多酚得率依次增大,在 3 h 时总多酚得率达到最大值。当提取时间继续延长时,总多酚得率呈下降趋势。可能是提取时间较短时,蛋白质等物质吸附多酚不利其溶出;随提取时间的延长,多酚类物质溶出增多,得率增加^[16]。但长时间高温提取,会导致多酚类物质降解、氧化,使得率降低^[17]。因此,选取提取时间为 3 h。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验设计

在单因素试验的基础上,以总多酚得率(Y)为考察指标,根据 Design - Expert 8.0.6 进行试验设

计,以料液比(A)、乙醇体积分数(B)、提取温度(C)、提取时间(D)为考察因素,进行四因素三水平响应面试验设计,响应面因素与水平见表 1,Box - Behnken 试验设计与结果见表 2。方差分析见表 3。

表 1 响应面因素与水平

水平	A	$B/\%$	$C/^\circ\text{C}$	D/h
-1	1:50	50	80	2
0	1:60	60	90	3
1	1:70	70	100	4

表 2 Box - Behnken 试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	$Y/\%$
1	1	0	-1	0	0.81
2	1	-1	0	0	0.90
3	0	0	0	0	1.19
4	0	0	-1	-1	0.96
5	1	0	1	0	0.88
6	0	0	1	-1	1.03
7	0	-1	-1	0	1.00
8	0	0	1	1	1.04
9	0	0	0	0	1.13
10	0	-1	0	1	1.06
11	1	1	0	0	0.97
12	0	-1	0	-1	0.99
13	0	0	0	0	1.08
14	0	0	-1	1	0.94
15	0	1	0	1	1.04
16	-1	0	0	-1	1.01
17	-1	0	1	0	1.04
18	0	1	0	-1	0.93
19	0	0	0	0	1.16
20	1	0	0	-1	0.75
21	0	1	1	0	1.05
22	-1	0	-1	0	0.98
23	-1	1	0	0	1.01
24	1	0	0	1	0.96
25	0	0	0	0	1.21
26	0	-1	1	0	1.08
27	-1	0	0	1	1.03
28	-1	-1	0	0	1.02
29	0	1	-1	0	0.98

采用多元二项式模型回归及多元线性分析 A 、 B 、 C 、 D 对响应值 Y 的影响。回归方程为 $Y = 1.15 - 0.068A - 0.005833B + 0.038C + 0.033D + 0.02AB + 0.0025AC + 0.047AD - 0.0025BC + 0.01BD + 0.0075CD - 0.13A^2 - 0.051B^2 - 0.081C^2 - 0.087D^2$ 。

表3 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.255 681	14	0.018 263	9.199	<0.000 1***
A	0.056 033	1	0.056 033	28.223	0.000 1***
B	0.000 408	1	0.000 408	0.206	0.657 1
C	0.016 875	1	0.016 875	8.500	0.011 3**
D	0.013 333	1	0.013 333	6.716	0.021 3**
AB	0.001 6	1	0.001 6	0.806	0.384 5
AC	2.5E-05	1	2.5E-05	0.013	0.912 2
AD	0.009 025	1	0.009 025	4.546	0.051 2
BC	2.5E-05	1	2.5E-05	0.013	0.912 2
BD	0.000 400	1	0.000 400	0.201	0.660 4
CD	0.000 225	1	0.000 225	0.113	0.741 4
A ²	0.117 342	1	0.117 342	59.104	<0.000 1***
B ²	0.016 706	1	0.016 706	8.415	0.011 6**
C ²	0.042 296	1	0.042 296	21.304	0.000 4***
D ²	0.049 096	1	0.049 096	24.729	0.000 2***
残差	0.027 795	14	0.001 985		
失拟项	0.017 275	10	0.001 728	0.657	0.731 8
纯误差	0.010 520	4	0.002 630		
总值	0.283 476	28			

注: **表示差异显著($P < 0.05$); ***表示差异极显著($P < 0.01$)。

由表3可知,模型 $P < 0.000 1$,表明该模型极显著,具有统计学意义。失拟项 P 为0.731 8($P > 0.05$),差异不显著,表明该二元多项回归方程对试验中的拟合较好,可用于地参总多酚得率的分析。 R^2_{Adj} 为0.803 9,表明模型能解释80.39%实际数据。相关系数 R^2 为0.901 9,表明实测值与理论值有很高的关联性,能准确地对地参总多酚得率进行预测和分析。由表3中模型的回归系数及显著性可知,A、A²、C²、D²对总多酚得率有极显著的影响,C、D、B²对总多酚得率的影响显著,对地参总多酚提取影响程度大小依次为料液比>提取温度>提取时间>乙醇体积分数。

2.2.2 验证试验

根据软件 Design - Expert 8.0.6 预测的地参总多酚提取最佳工艺条件为:料液比1:57.64,提取温度92.36℃,提取时间3.13 h,乙醇体积分数59.02%。为方便操作,各因素修正为:料液比1:58,提取温度90℃,提取时间3 h,乙醇体积分数60%。平行3组试验,测得总多酚得率为(1.08 ± 0.56)%,与理论值1.16%相比,误差为0.08个百分点。表明该模型能很好地模拟地参总多酚提取工艺,且响应面法优化的工艺稳定可行,具有一定的参考意义。

2.3 地参总多酚对 DPPH· 的清除作用

地参总多酚对 DPPH· 的清除作用见图5。

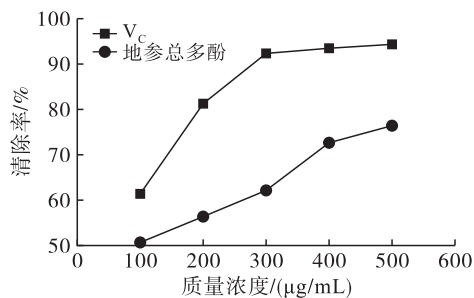


图5 地参总多酚对 DPPH· 的清除作用

由图5可知,试验范围内,随地参总多酚质量浓度的增大,DPPH· 的清除率变大,呈一定的剂量依赖关系, IC_{50} 为114 μg/mL,最大清除率为76.43%,清除作用弱于V_c,但其来源于天然产物,具有安全、低毒、低耐药性等特点,而临床中V_c过度使用会导致胃酸过多、泌尿系统结石等副作用。因此,地参总多酚可作为一种天然新型抗氧化剂进行开发及应用。

3 结论

本研究在单因素试验的基础上,采用 Box - Behnken 响应面设计优化地参总多酚的提取工艺。结果表明,建立的二元多项回归方程的拟合度较好,对地参总多酚提取影响程度大小依次为料液比>提取温度>提取时间>乙醇体积分数。得到地参总多酚提取最佳工艺条件为料液比1:58、提取时间3 h、提取温度90℃、乙醇体积分数60%,该条件下总多酚得率为(1.08 ± 0.56)%,接近理论值。表明模型能很好地模拟地参总多酚的提取条件,且响应面优化的工艺稳定可行。抗氧化试验研究表明,试验范围内,地参总多酚具有较强的抗氧化活性,DPPH· 的清除作用与其呈一定的剂量依赖关系, IC_{50} 为114 μg/mL。地参总多酚可作为一种天然的新型抗氧化剂,有待开发及广泛应用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012.
- [2] 许泳吉, 钟惠民, 杨波, 等. 野生植物地参中营养成分的测定[J]. 光谱实验室, 2003, 20(4): 528 - 529.
- [3] 伊娟娟, 王振宇, 曲航. 植物多酚抗肿瘤活性及其机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 391 - 395.
- [4] GEORGE J, SINGH M, SRIVASTAVA A K, et al. Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53 [J]. PLoS One, 2011, 6(8): 1440 - 1450.

(下转第92页)

0.095 和 0.36 g/L。而 F/2 培养基更有利于斜生栅藻总脂和中性脂的积累。总脂含量可达细胞干重的 24.75%，中性脂占总脂的 36.64%，产率达 0.98 mg/(L·d)。同时 F/2 培养基中 C16:0 和 C18:1 含量占总脂肪酸的 25.84% 和 54.47%。但油脂产率不及 BG11 培养基。因此，斜生栅藻采用 F/2 培养基培养更适宜于生产生物柴油，但如何协调其生长与油脂积累的一致性有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] HSIEH C H, WU W T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(17): 3921–3926.
- [2] LIANG Y, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1043–1049.
- [3] LI Y, HORSMAN M, WANG B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(4): 629–636.
- [4] 杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述 [J]. *海洋湖沼通报*, 2001(1): 76–82.
- [5] XU N J, ZHANG X C, FAN X, et al. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2001, 13(6): 463–469.
- [6] 张毅, 费晓雯, 彭世清, 等. 4 种不同培养基对小球藻 *Chlorella* spp. 生长和油脂积累的影响 [J]. *热带作物学*

报, 2010, 31(8): 1340–1345.

- [7] 胡慧慧, 徐年军. 不同培养基及组成对 2 种小球藻生长和油脂的影响 [J]. *生物学杂志*, 2012, 29(4): 12–16.
- [8] WANG H, ZHOU W J, CHENG W T, et al. Strategy study on enhancing lipid productivity of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 218: 161–166.
- [9] WELLBURN A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. *J Plant Physiol*, 1994, 144(3): 307–313.
- [10] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canad J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911–917.
- [11] ALONZO F, MAYZAUD P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red [J]. *Marine Chem*, 1999, 67(3): 289–301.
- [12] BOUSSIBA S. Carotenogenesis in the green alga *Haemato-coccus pluvisialis*: cellular physiology and stress response [J]. *Physiol Plantar*, 2000, 108(2): 111–117.
- [13] 朱顺妮, 王亚杰, 黄伟, 等. 缺氮培养对小球藻碳水化合物和油脂积累的影响 [J]. *太阳能学报*, 2016, 37(8): 2118–2122.
- [14] HARRINGTON K J. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance [J]. *Biomass*, 1986, 9(1): 1–17.
- [15] 高利飞, 王昌禄, 陈勉华, 等. 酶法催化蓖麻油生产生物柴油的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(16): 6950–6952.

(上接第 81 页)

- [5] JEONG W Y, JIN J S, CHO Y A. Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: their contribution to overall antioxidant and anticancer activity [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(11): 2967–2974.
- [6] OI N, JEONG C H, NADAS J. Resveratrol, a red wine polyphenol, suppresses pancreatic cancer by inhibiting leukotriene a hydrolase [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9755–9764.
- [7] 王齐明. 绿茶多酚 EGCG 增强动脉粥样硬化斑块稳定性及其相关机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [8] ZHU X X, WANG J J, OU Y. Polyphenol extract of *Phyllanthus emblica* (PEEP) induces inhibition of cell proliferation and triggers apoptosis in cervical cancer cells [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 1–5.
- [9] 王彩云. 石榴叶多酚的提取富集工艺及其药理作用研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [10] 杨婉, 葛学惠, 赵晨伟, 等. 大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的研究 [J]. *中国油脂*, 2018, 43(2): 120–123, 128.

- [11] 罗永会, 张翠香, 徐春萍. 大理野生橄榄多糖、总黄酮和总多酚的含量测定 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(7): 88–91.
- [12] 丁宁. 红松松子壳多糖的提取纯化、组成分析及抗氧化活性研究 [D]. 山东 青岛: 青岛科技大学, 2014.
- [13] 侯丽丽, 于常乐, 胡洋. 人参皂苷微波超声辅助提取工艺研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2017, 5(9): 124–128.
- [14] 霍宗庆, 徐婉晴, 刘言娟. 响应面法优化白玉菇多糖的提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 145–149.
- [15] 郭彩霞, 任晓婷, 张万生, 等. 响应面法优化超声波辅助提取猕猴桃果皮多酚工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(11): 244–250.
- [16] 向莉, 胡艳, 王月慧, 等. 响应面法优化黑粒小麦麸皮多酚提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 173–183.
- [17] CHEW K, KHOO M, NG S, et al. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts [J]. *Int Food Res J*, 2011, 18(4): 571–578.