

朝天罐总酚的提取纯化及其抗氧化活性研究

陈艳华¹, 蒋霞^{2*}, 陈依雨², 陆洪艳¹, 姚石丽¹, 黄崇煊¹

(1. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院药学部, 广西南宁 530021)

摘要 [目的] 优化朝天罐总酚的提取纯化工艺并评价其抗氧化活性。[方法] 采用单因素和正交试验方法优化朝天罐总酚回流提取工艺, 并使用大孔树脂对朝天罐总酚进行分离纯化。采用清除 DPPH、ABTS·及 Fe³⁺ 还原能力试验, 与维生素 C 的抗氧化能力进行比较, 评价朝天罐总酚的抗氧化活性。[结果] 最佳提取工艺条件为乙醇浓度 35%, 提取温度 80 °C, 料液比 1:50 (g:mL), 提取时间 3 h, 提取次数 1 次; AB-8 型大孔树脂为纯化朝天罐总酚的最佳树脂, 最佳动态工艺条件为上样液质量浓度 2.0 mg/mL、上样流速 2 mL/min、洗脱液乙醇浓度 60%、洗脱流速 3 mL/min、洗脱用量 120 mL。在最佳工艺条件下, 纯化后的朝天罐总酚含量为 74.26%, 对比于粗提物中的总酚含量 (15.36%) 提高了 3.83 倍。朝天罐总酚的抗氧化活性随质量浓度的增大而增强, 其清除 DPPH 自由基的能力较维生素 C 强, 对 ABTS⁺ 自由基和铁离子也有较好的清除能力和还原能力, 经 AB-8 树脂纯化后, 其抗氧化能力显著提高 ($P < 0.01$)。[结论] 优选的提取纯化工艺稳定可行、提取率高, 朝天罐总酚抗氧化性能较强, 为朝天罐总酚的应用提供了科学依据和理论基础。

关键词 朝天罐; 总酚; 提取工艺; 大孔树脂; 抗氧化

中图分类号 R 282.71 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0163-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.039

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Study on Extraction, Purification and Antioxidant Activity of Total Phenols from *Osbeckia opipara***CHEN Yan-hua¹, JIANG Xia², CHEN Yi-yu² et al (1. Pharmacy College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021; 2. Dept of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021)

Abstract [Objective] The research aimed to optimize extraction and purification technology of total phenols from *Osbeckia opipara* and evaluate its antioxidant activity. [Method] The total phenols extraction technology was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. In addition, the total phenols were purified by macroporous resin. Antioxidant activity of total phenols from *Osbeckia opipara* was evaluated through several *in vitro* antioxidant assays, such as DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant effect with vitamin C as a reference. [Result] Optimum extraction conditions of total phenols were as follows: ethanol concentration of 35%, extraction temperature of 80 °C, solid-liquid ratio of 1:50 (g:mL), extraction time of 3 h and number of extractions of once. The results showed that A B-8 type resin was the most suitable resin for the purification of total phenols from *Osbeckia opipara*. The optimum dynamic conditions were as follows: sample concentration of 2.0 mg/mL, sample flow rate of 2 mL/min, with 60% ethanol as eluent, elution rate of 3 mL/min and eluent volume of 120 mL. Under the optimal conditions, the total phenols content was 74.26%, which was 3.83 times higher than that of crude extract (15.36%). Antioxidant capacity of total phenols from *Osbeckia opipara* was concentration-dependent, its DPPH radical scavenging ability was stronger than vitamin C. It also had a better scavenging activity of ABTS and ferric reducing antioxidant effect. After purification, its antioxidant activities were improved significantly than before ($P < 0.01$). [Conclusion] The preferred extraction and purification process is stable and feasible, with high extraction rate, and the antioxidant capacity of total phenol from *Osbeckia opipara* is strong, which provides a scientific basis and theoretical basis for the application of total phenol from *Osbeckia opipara*.

Key words *Osbeckia opipara*; Total phenols; Extraction technology; Macroporous resin; Antioxidant

朝天罐 (*Osbeckia opipara* C.Y. Wu et C. Chen) 为野牡丹科金锦香属植物, 又名倒罐草、张天刚、七孔莲、向天葫芦等, 产于浙江、福建、台湾、江西、湖南、广东、海南、广西、贵州及四川南部, 生于海拔 250~800 m 的山坡、山谷、水边、路边、疏林中或灌木丛中, 越南至泰国也有分布^[1], 为广西少数民族地区常用本草药材。主要以根入药, 其味甘、微苦, 性平, 归肾、大肠经, 具有清热利湿、散瘀止血、解毒散结等功效, 主治腰膝酸软、咯血、痢疾、肠炎、咽喉痛等; 亦可全株入药, 用于治疗小儿风热、痔疮出血、月经不调、癌症等^[2]。研究发现, 酚类为朝天罐根的主要化学成分之一^[3]。大量研究表明, 酚类化合物为植物中重要的药理活性物质, 具有抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、抗炎^[6]、抗菌、抗病毒^[7]、降血糖、降血脂^[8]等作用。目前关于朝天罐酚类提取物的研究鲜见文献报道, 笔者对朝天罐总酚的提取工艺和分离纯化工艺进行了研究, 确定最佳提

取纯化条件, 并评价其抗氧化活性, 旨在为朝天罐活性成分的综合利用及进一步研究开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器 EL204 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); R-1001N 旋转蒸发器 (郑州长城科工贸有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 材料 朝天罐药材采于广西金秀瑶族自治县, 经广西医科大学天然药物与生药学教研室焦爱军教授鉴定为朝天罐根; 没食子酸对照品 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 519D021); 大孔吸附树脂: D101、AB-8、HPD-100、HPD-450、HPD-600、HPD-700 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司); 1,1-二苯基-2-苦基胍自由基 (东京化成工业株式会社); ABTS 快速法试剂盒、FRAP 法试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 朝天罐总酚提取工艺优选

1.3.1 朝天罐总酚的提取。 工艺流程: 经预处理的朝天罐干燥根 → 粉碎 → 过 60 目筛 → 回流提取 → 过滤 → 旋蒸浓缩 → 定

基金项目 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题 (Z20190913, Z20190916)。**作者简介** 陈艳华 (1995—), 女, 广西桂林人, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。* 通信作者, 主任药师, 博士, 从事中药药理学研究。**收稿日期** 2019-10-17

容→测定总酚含量。取朝天罐药材粉末(60目)约1g,精密称定,加入体积分数为75%乙醇20mL,80℃水浴回流提取1h,重复3次,过滤,滤渣用75%乙醇洗涤,合并滤液,将提取液经50℃旋转蒸发,75%乙醇定容至25mL,摇匀,即得。

1.3.2 标准曲线的绘制。采用福林酚法^[9]测定总酚含量。精密称取没食子酸对照品2.83mg,加入超纯水溶解定容至25mL;取朝天罐总酚提取液和没食子酸对照品溶液适量,分别置于10mL容量瓶中,加入0.5mL福林-酚试剂,摇匀,6min后加入20%Na₂CO₃溶液1.5mL,超纯水定容至刻度,摇匀,于室温下避光反应1h后,以相应的试剂为空白对照,于400~900nm光谱扫描,结果对照品与样品溶液在750nm处均有最大吸收,故选择测定波长750nm。精密量取没食子酸对照品溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL分别加入10mL容量瓶内,按上述方法显色后,依法测定吸光度,以对照品浓度(*X*)为横坐标、吸光度(*Y*)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0837X+0.0319$ ($r=0.9995$),且在1.132~9.056μg/mL其线性关系良好。

1.3.3 单因素试验。精密称取朝天罐药材粉末约1g(过60目筛)回流提取,在其他提取条件固定的前提下,分别选取乙醇浓度(35%、45%、55%、65%、75%、85%、95%)、提取温度(50、60、70、80、90℃)、料液比[1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60(g:mL)]、提取时间(1、2、3、4、5h)、提取次数(1、2、3次)5个因素,考察其对朝天罐总酚含量的影响。各提取液按“1.3.2”项下方法测定,计算朝天罐总酚含量。

1.3.4 正交试验设计。根据单因素试验结果,选取对朝天罐总酚含量有显著影响的因素和水平进行正交试验设计。确定对乙醇浓度(*A*)、提取温度(*B*)、料液比(*C*)及提取时间(*D*)4个因素进行考察,每个因素选择3个水平,采用L₉(3⁴)正交表安排试验,具体正交试验因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	A(乙醇浓度 Ethanol concentration %)	B(提取温度 Extraction temperature ℃)	C(料液比 Solid-liquid ratio)	D(提取时间 Extraction time//h)
1	35	70	1:40	2
2	45	80	1:50	3
3	55	90	1:60	4

1.3.5 验证试验。精密称取3份朝天罐粉末30g,根据优选的最佳提取工艺进行3次验证试验。

1.4 优化朝天罐总酚纯化工艺

1.4.1 大孔树脂预处理^[10]。大孔树脂先用95%乙醇浸泡24h,湿法装柱后用95%乙醇洗至流出液加适量水无白色浑浊,再用水洗至无醇味。加5%盐酸浸泡4h后,用水洗至中性,再加5%氢氧化钠溶液浸泡4h,最后用水洗至中性备用。

1.4.2 大孔吸附树脂的选择^[11]。称取D101、AB-8、HPD-100、HPD-450、HPD-600和HPD-700各2.00g置于100mL

具塞锥形瓶中,设置平行3组试验,最后结果计算平均数。加入30mL浓度为0.5mg/mL的朝天罐总酚粗提液,于恒温振荡器(25℃,120r/min)振荡吸附24h,抽滤,取滤液测定总酚含量。用水清洗3次树脂,用滤纸吸干树脂表面水分,转入100mL具塞三角瓶中,加入50%的乙醇30mL,于恒温振荡器(25℃,120r/min)振荡解吸12h,取上清液测定总酚含量。计算不同树脂的吸附量、吸附率、解吸量及解吸率。

1.4.3 AB-8大孔树脂对朝天罐总酚的动态吸附-解吸试验。将处理后的大孔树脂10g湿法装入(2.5cm×30.0cm)层析柱内,超纯水平衡后进行动态吸附与解吸试验^[12],分别考察朝天罐总酚上样液浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mg/mL)、上样流速(1、2、3、4、5mL/min)、上样量(每10mL收集1管流出液,共收集50管)、洗脱液浓度(30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇水溶液)、洗脱流速(1、2、3、4、5mL/min)与洗脱用量(每10mL收集1管流出液,共收集20管)对吸附与解吸效果的影响,绘制泄漏和洗脱曲线,计算动态吸附率和解吸率。

1.4.4 工艺验证试验。精密称取3份朝天罐粉末30g,按最佳提取纯化工艺条件进行提取和纯化,计算总酚得率和纯度。

1.5 抗氧化活性测定

1.5.1 DPPH自由基清除能力。测定方法参照文献^[13],并稍作改动。精确吸取质量浓度分别为5、10、15、20、25、30、35、40μg/mL的朝天罐总酚粗提物及纯化物供试品溶液各1mL,分别与3mL浓度为0.1mmol/L的DPPH无水乙醇溶液混合,充分摇匀后避光放置30min,于波长517nm处以A_{空白}(1mL蒸馏水+3mL无水乙醇)调零测定吸光度。以V_c为阳性对照,根据公式(1)计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中,A₁为样品(1mL样品+3mLDPPH工作液)吸光度;A₂为样品对照组(1mL样品+3mL无水乙醇)吸光度;A₀为空白对照组(1mL蒸馏水+3mLDPPH工作液)吸光度。

1.5.2 ABTS⁺自由基清除能力。参照ABTS快速法试剂盒说明书,并参考研究方法^[14]。在96孔板的每个检测孔中加入20μL过氧化物酶工作液;空白对照孔中加入10μL蒸馏水,样品检测孔内加入10μL各种样品(各样品浓度为40、60、80、100、120、140、160、180μg/mL),混匀;每孔内再加入170μL ABTS工作液,轻轻混匀;室温孵育6min后测定波长414nm处的吸光度。以V_c为阳性对照,根据公式(2)计算清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中,A₀为空白对照吸光度;A₁为样品吸光度;A₂为样品对照组吸光度。

1.5.3 铁离子还原能力(FRAP)。参照FRAP法试剂盒说明书,并参考文献^[15],稍作改动。精确称取27.8mgFeSO₄·7H₂O溶解定容至10mL,浓度即为10mmol/L。在96孔板的每个检测孔中加入180μL FRAP工作液;空白对照孔中加入5μL蒸馏水,标准曲线检测孔内加入5μL各种浓度的FeSO₄

标准溶液(浓度分别为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.4 mmol/L),样品检测孔内加入 5 μL 各种样品(各样品浓度分别为 20、40、60、80、100、120、140、160、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$),混匀;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后测定波长 593 nm 处的吸光度。以 V_c 为阳性对照,样品铁离子还原能力用 mmol/L FeSO_4 表示。

2 结果与分析

2.1 朝天罐总酚提取工艺优选

2.1.1 单因素试验结果。由图 1a 可见,总酚含量开始随着乙醇浓度的升高而逐渐增加,在 45% 时达到最高;但随着乙醇浓度进一步增加,总酚含量逐渐降低,这可能是由于部分朝天罐酚性成分亲水性较好造成。因此将乙醇浓度水平设置在 35%~55%。

由图 1b 可知,在 50~90 $^{\circ}\text{C}$,随着温度的升高,总酚含量也随之增加。在 50~80 $^{\circ}\text{C}$ 总酚含量显著升高,80~90 $^{\circ}\text{C}$ 总酚含量上升趋于平缓,因此提取温度水平设置在 70~90 $^{\circ}\text{C}$ 。

由图 1c 可知,随着料液比的增加,朝天罐总酚含量逐渐升高,在料液比为 1:50(g:mL)时达到最大值,可能是随着溶剂体积的增加,溶剂与溶质充分接触,溶出速度加快,使总酚含量升高。当料液比超过 1:50 时,总酚在溶剂中的溶解度已达到饱和,且随着其他提取物的增多,不利于总酚溶出,总酚含量呈下降趋势。因此将料液比设置在 1:40~1:60。

图 1d 显示,随着提取时间的增加,总酚含量逐渐升高,当提取时间达到 3 h 时,总酚含量达到最大值,此时提取效果最好。当提取时间进一步延长(>3 h),溶剂中酚性成分浓度逐渐增大,和固相中的浓度差逐渐变小,有效成分难以进一步溶解。因此将提取时间设置在 2~4 h。

图 1e 结果表明,提取 1、2、3 次后,总酚含量逐渐升高,但上升平缓,考虑工艺成本和节约资源,将提取次数设置为提取 1 次。

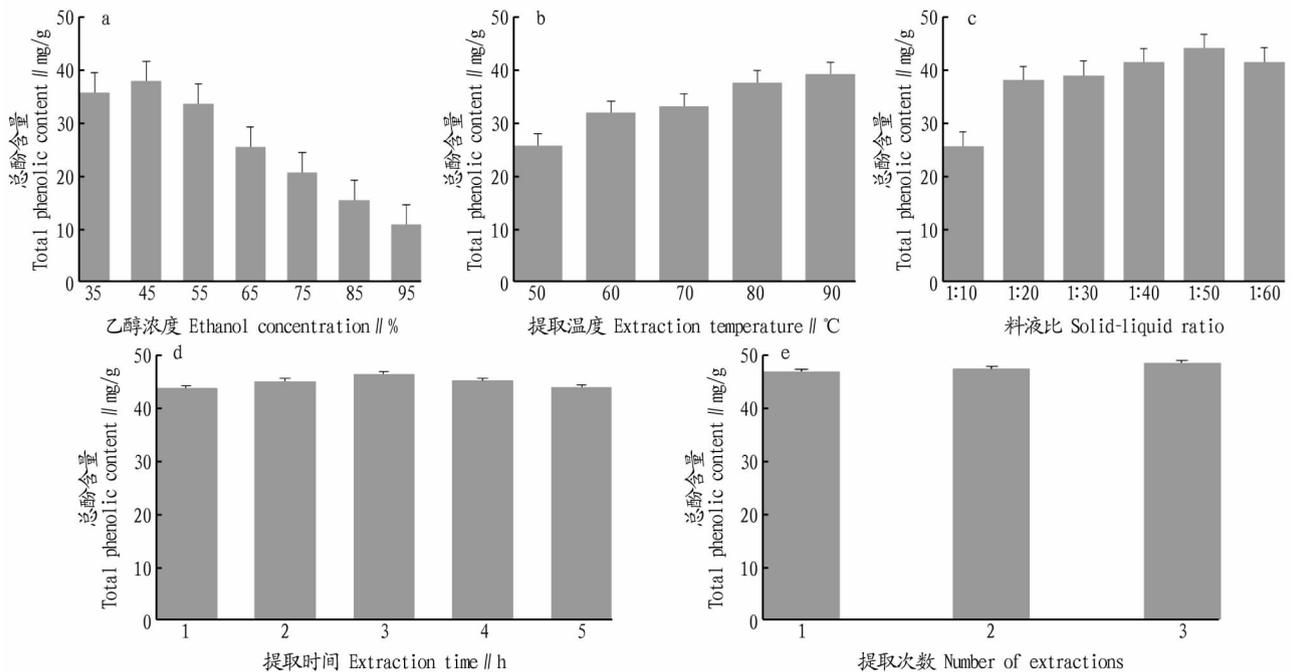


图 1 乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间和提取次数对朝天罐总酚提取效果的影响

Fig. 1 The effects of ethanol concentration, extraction temperature, solid-liquid ratio, extraction time and number of extractions on the extraction efficiency of total phenols from *Osbeckia opipara*

2.1.2 正交试验结果。由表 2 可知,乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间对朝天罐总酚含量均有不同程度的影响,其中乙醇浓度对总酚提取率的影响最大,其次为料液比、提取时间,提取温度对总酚含量的影响最小。影响总酚含量的因素作用主次为 A>C>D>B,即乙醇浓度>料液比>提取时间>提取温度。确定最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2D_2$,由于温度对总酚的提取影响较小,考虑到实际生产中能耗的减少及生产效率,故提取温度设置为 80 $^{\circ}\text{C}$,即加 50 倍量 35% 乙醇在温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取 3 h,1 次。

2.1.3 验证试验。根据优选的最佳提取工艺进行 3 次验证试验,结果见表 3,朝天罐总酚平均得率为 32.13%,RSD 为 1.42%;平均纯度为 15.36%,RSD 为 2.08%;表明优选的提取

工艺稳定性好,合理可行。

2.2 朝天罐总酚纯化工艺优化

2.2.1 大孔吸附树脂的筛选。由表 4 可见,不同型号的树脂由于极性、比表面积、平均孔径不同,对朝天罐总酚的吸附和解吸能力各不相同。其中,HPD-600 虽然有较高的吸附能力,吸附率可达 92.86%,但是其解吸率较低,为 87.45%,较难将总酚解吸出来,所以 HPD-600 不适合用于朝天罐总酚的纯化。AB-8、D101 和 HPD-100 的吸附能力相近,但解吸率 AB-8>HPD-100>D101,由于适宜的纯化树脂不仅要目标成分吸附量大,而且要求解吸率高,以保证目标成分最大程度地被回收,因此综合考虑选择 AB-8 为朝天罐总酚的最佳纯化树脂。

2.2.2 AB-8 大孔树脂对朝天罐总酚的动态吸附-解吸试验。从图 2a 可以看出,随着朝天罐总酚浓度的升高,吸附率随之增大,但在上样液浓度大于 2.0 mg/mL 时,吸附率增加趋于平缓,且观察到上样液开始出现浑浊,上样后在柱床上层出现沉淀,对大孔树脂造成污染和堵塞,不利于树脂的吸附。因此,上样液浓度选择 2.0 mg/mL 为宜。

表 2 朝天罐总酚提取正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment on extraction of total phenols from *Osbeckia opipara*

序号 No.	A	B	C	D	总酚含量 Total phenolic content//mg/g
1	1	1	1	1	43.323 7
2	1	2	2	2	48.632 3
3	1	3	3	3	47.791 8
4	2	1	2	3	43.959 6
5	2	2	3	1	44.074 3
6	2	3	1	2	43.989 6
7	3	1	3	2	44.681 3
8	3	2	1	3	40.828 8
9	3	3	2	1	44.536 4
k_1	46.582 6	43.988 2	42.714 0	43.978 1	
k_2	44.007 8	44.511 8	45.709 4	45.767 7	
k_3	43.348 8	45.439 3	45.515 8	44.193 4	
R	3.233 8	1.451 1	2.995 4	1.789 6	

表 3 提取工艺验证($n=3$)

Table 3 Extraction process verification %

编号 No.	总酚得率 Total phenol yield	总酚纯度 Total phenol purity
1	31.65	15.68
2	32.56	15.24
3	32.19	15.06
平均值 Mean value	32.13	15.36
RSD	1.42	2.08

从图 2b 可以看出,随着上样流速的增大,树脂泄漏加快,致使吸附率逐渐下降。流速小能使总酚有足够的时间与树脂内表面接触,有利于树脂的吸附,减少总酚的泄漏量,从而提高其吸附率。但是流速过小,会影响生产效率。因此,综合考虑树脂的吸附性能及吸附效率,上样流速以 2 mL/min 较好。

由图 3 可知,随着总酚上样量的增加,流出液总酚含量逐渐升高。当流出液中总酚的含量达到上样液中总酚含量的 1/10 时,认为到达上样终点,已经发生泄漏,所以当上样量为第 3 管(30 mL)时,朝天罐总酚开始泄露,当上样量到第 45 管(450 mL)时,大孔吸附树脂趋于饱和。泄漏点与饱和点之间有较大的差距,大孔树脂达到完全饱和和吸附,需连续上样 450 mL(吸附量为 39.6624 mg/g),因此在实际的生产中,可采用循环上样 200 mL/10 g 树脂。

图 2c 试验结果表明,AB-8 大孔树脂的解吸性能随着洗脱液乙醇浓度的增加呈先上升后降低的趋势,当洗脱液乙醇

浓度为 30%时,解吸率最低,为 78.10%;随着洗脱液乙醇浓度的升高,在 60%时,解吸率达到最大,为 97.26%;当乙醇浓度继续增高,解吸率下降。因此,选取洗脱液乙醇浓度为 60%。

表 4 大孔树脂对朝天罐总酚的静态吸附与解吸性能

Table 4 Adsorption and desorption capabilities of different macroporous resins to total phenols from *Osbeckia opipara*

树脂型号 Resin model	吸附量 Adsorption capacity mg/g	吸附率 Adsorption rate %	解吸量 Desorption capacity mg/g	解吸率 Desorption rate//%
AB-8	6.663 0	88.73	6.568 6	98.60
D101	6.682 0	88.69	6.077 5	90.96
HPD-100	6.670 8	88.98	6.443 0	96.74
HPD-450	6.429 9	85.48	5.977 4	92.98
HPD-600	6.984 9	92.86	6.108 5	87.45
HPD-700	6.531 3	87.12	6.141 8	94.04

由图 2d 可见,随着洗脱流速的增大,洗脱液不能与被树脂吸附的朝天罐总酚充分作用,造成解吸率逐渐减小。当洗脱流速为 1~3 mL/min 时,解吸率下降不明显,因此考虑洗脱效率和解吸率变化情况,确定洗脱流速为 3 mL/min。

图 4 结果表明,当解吸液体积为 120 mL(12 管)时,可以将朝天罐总酚较为完全地解吸下来,故最终确定乙醇洗脱用量为 120 mL/10 g 树脂。

2.2.3 工艺验证试验。该纯化工艺稳定、重复性较好,朝天罐总酚固形物平均得率为 6.46%,RSD 为 1.08%;平均纯度为 74.26%,RSD 为 1.14%,结果见表 5。

表 5 纯化工艺验证($n=3$)

Table 5 Purification process verification($n=3$) %

编号 No.	总酚得率 Total phenol yield	总酚纯度 Total phenol purity
1	6.54	73.58
2	6.41	75.21
3	6.43	73.99
平均值 Mean value	6.46	74.26
RSD	1.08	1.14

2.3 朝天罐总酚纯化前后抗氧化活性分析

2.3.1 清除 DPPH 自由基能力。由图 5 可知,各样品清除 DPPH 自由基的效果随浓度的增加而增加,当质量浓度小于 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,纯化总酚清除 DPPH 自由基的能力强于维生素 C 和粗总酚;当质量浓度大于 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,纯化总酚清除 DPPH 自由基的能力显著强于粗总酚($P<0.01$),但两者均弱于维生素 C。维生素 C、纯化总酚和粗总酚的 IC_{50} 值分别为 13.96、10.98、96.40 $\mu\text{g/mL}$,说明纯化后的朝天罐总酚有较强的 DPPH 自由基清除能力。

2.3.2 清除 ABTS⁺ 自由基能力。由图 6 可知,维生素 C 和朝天罐总酚纯化前后对 ABTS⁺ 自由基均有一定的清除能力,且清除能力随质量浓度的增加而增强。在同一质量浓度下,维生素 C 和纯化前后总酚的清除能力从大到小依次维生素 C、

纯化总酚、粗总酚。与粗总酚相比,纯化总酚对 ABTS⁺ 自由基的清除能力显著提高 ($P < 0.01$), 维生素 C 和纯化总酚的 IC_{50} 值分别为 73.14、82.91 $\mu\text{g/mL}$, 而粗总酚的 IC_{50} 值为

533.09 $\mu\text{g/mL}$, 说明纯化后的朝天罐总酚组分中总酚含量显著增加, 故 ABTS⁺ 自由基的清除活性显著提高。

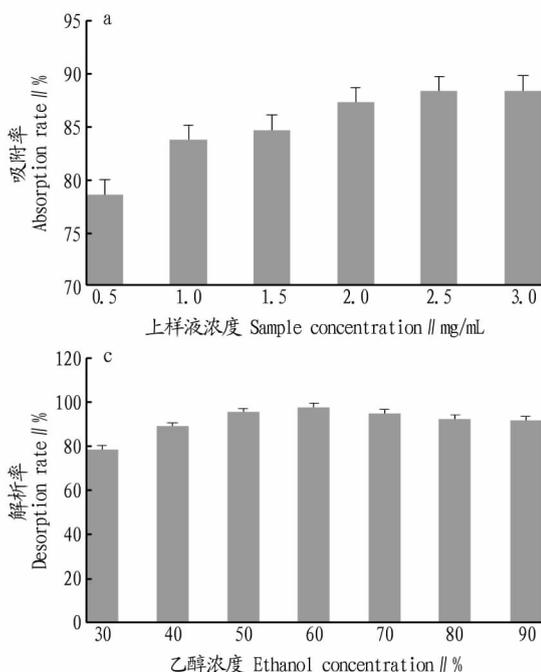


图 2 上样浓度、上样流速、乙醇浓度和洗脱流速考察结果

Fig.2 Results of sample concentration, flow rate, ethanol concentration and desorption flow rate

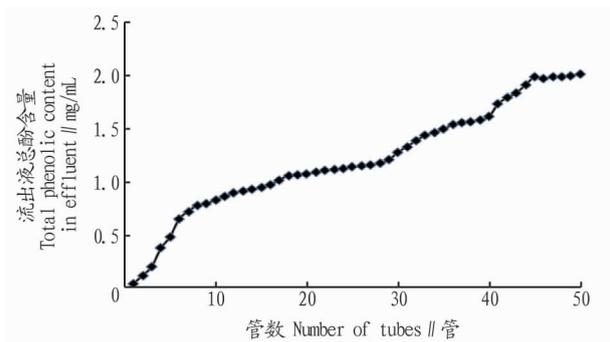


图 3 泄露曲线

Fig.3 Leakage curve

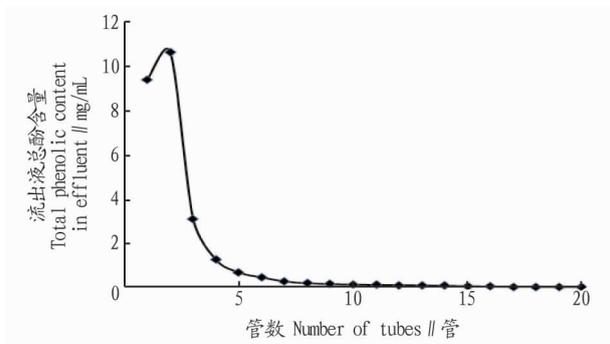


图 4 洗脱曲线

Fig.4 Elution curve

2.3.3 铁离子还原能力 (FRAP)。由图 7 可知, 维生素 C 和纯化前后的朝天罐总酚对 Fe^{3+} 均有一定的还原能力, 且还原能力与样品质量浓度呈正相关, 在同一质量浓度下, 维生素

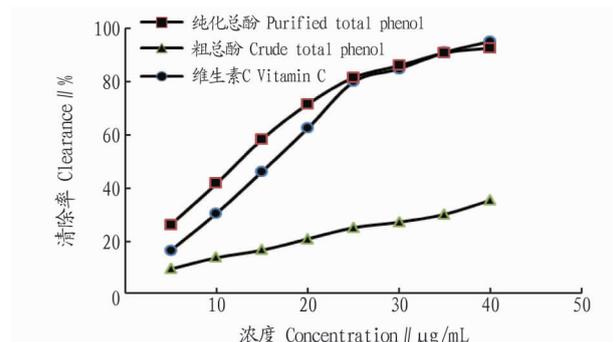


图 5 粗总酚和纯化总酚提取物对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.5 Scavenging effect on DPPH free radical of purified and crude phenols extracts

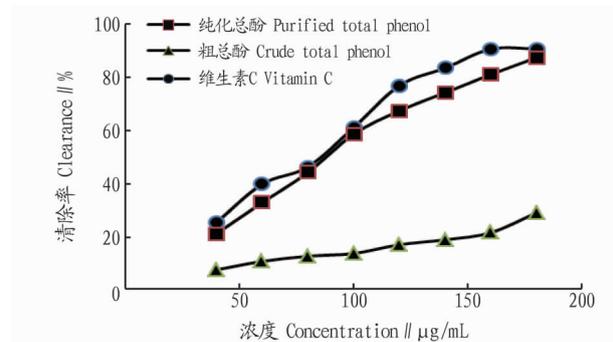


图 6 粗提总酚和纯化总酚提取物对 ABTS⁺ 自由基的清除效果

Fig.6 Scavenging effect on ABTS⁺ radical of purified and crude phenols extracts

C 和纯化前后总酚的还原能力从大到小依次为维生素 C、纯

化总酚、粗总酚。朝天罐纯化总酚对 Fe^{3+} 的还原能力比粗总酚有了显著的增强 ($P < 0.01$), 样品质量浓度为 $60 \mu\text{g/mL}$ 的纯化总酚对 Fe^{3+} 的还原能力与浓度为 $180 \mu\text{g/mL}$ 的粗总酚的还原能力相当。该研究通过大孔树脂纯化可能去除了大部分的蛋白质和糖类, 使酚性物质的相对含量升高, 抗氧化结果表明纯化总酚的抗氧化活性明显高于粗总酚, 进一步证实了总酚是朝天罐提取物的主要抗氧化成分。

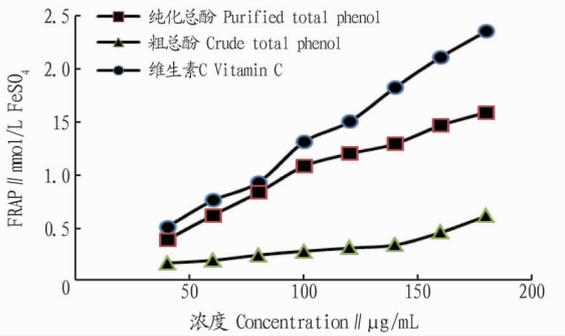


图7 粗总酚和纯化总酚提取物对铁离子的还原能力

Fig.7 Ferric reducing antioxidant effect of purified and crude phenols extracts

3 结论与讨论

该研究采用单因素试验探讨了乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间及提取次数对朝天罐总酚含量的影响, 并选取4个影响较大的因素进行正交试验设计, 从而确定了朝天罐总酚最优回流提取工艺为乙醇浓度35%、提取温度 80°C 、料液比1:50、提取时间3h、提取次数1次; 经验证, 所确定的提取工艺条件稳定可行、经济合理, 适用于大工业生产。通过大孔树脂的静态吸附-解吸试验和动态吸附-解吸试验, 确定了AB-8大孔吸附树脂纯化朝天罐总酚的最佳工艺: 上样液总酚浓度为 2.0 mg/mL , 上样流速为 2 mL/min , 上样量为 $200 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 树脂循环上样, 洗脱液乙醇浓度60%, 洗脱流速 3 mL/min , 洗脱用量120 mL, 纯化后所得朝天罐总酚纯度达74.26% (纯化前为15.36%), 纯度提高了3.83倍, 纯化效果明显, 该工艺对今后规模化分离纯化朝天罐总酚具有较高的应用价值。采用DPPH、ABTS⁺自由基清除能力以及FRAP法对朝天罐总酚提取物的抗氧化活性进行评价, 并用维生素

C作阳性对照, 结果表明, 朝天罐总酚纯化前后均具有一定的抗氧化活性, 且随着总酚质量浓度的增加而逐渐增强, 其中纯化总酚的抗氧化活性明显大于粗总酚 ($P < 0.01$), 尤其对DPPH自由基的清除能力较强。综上所述, 大孔树脂纯化工艺可明显提高朝天罐总酚纯度和抗氧化活性, 该试验结果为朝天罐作为抗氧化剂开发利用提供了技术支持和理论基础, 其总酚的组成、结构及抗氧化机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 傅立国, 陈潭清, 朗楷永, 等. 中国高等植物: 第7卷[M]. 青岛: 青岛出版社, 2001: 929.
- [2] 广西中药资源普查办公室. 广西中药资源名录[M]. 南宁: 广西民族出版社, 1993: 90.
- [3] 徐鸿华, 贺红. 中草药图谱(二)[M]. 广州: 广东省出版集团, 广东科技出版社, 2007: 338.
- [4] VAN HUNG P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2016, 56(1): 25-35.
- [5] SHVARZBEYN J, HULEIHEL M. Effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on NF κ B activation by HTLV-1 Tax[J]. Antiviral research, 2011, 90(3): 108-115.
- [6] 祖元刚, 胡艳, 姜守刚. 红松多酚物质的提取工艺及其抗炎活性初步研究[J]. 植物研究, 2016, 36(4): 634-640.
- [7] PIZZOLITTO R P, DAMBOLENA J S, ZUNINO M P, et al. Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production[J]. Industrial crops & products, 2013, 47: 286-290.
- [8] OBOH G, ADEMILUYI A O, AKINYEMI A J, et al. Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*[J]. Journal of functional foods, 2012, 4(2): 450-458.
- [9] MUSCI M, YAO S C. Optimization and validation of Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea[J]. International journal of food sciences and nutrition, 2017, 68(8): 913-918.
- [10] 韦琴, 梅辉, 乐薇, 等. 板栗壳原花青素的含量测定及其纯化工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(9): 81-85.
- [11] 王慧芳, 苏淑云, 邵圣娟, 等. 大孔树脂分离纯化陈皮黄酮工艺及其抑菌活性[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2667-2672.
- [12] 贺丽莹, 王晶, 肖萌, 等. 延龄草总皂苷 AB-8 大孔树脂纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12): 2870-2872.
- [13] NIU X N, QIN R L, ZHAO Y D, et al. Simultaneous determination of 19 constituents in *Cimicifugae Rhizoma* by HPLC-DAD and screening for antioxidants through DPPH free radical scavenging assay[J]. Biomedical chromatography, 2019, 33(10): 1-8.
- [14] MICHALINA G, GRZEGORZ B, ANDRZEJ D, et al. Antioxidant properties of ferrous flavanol mixtures[J]. Food chemistry, 2018, 268: 567-576.
- [15] ABDULQADER A, ALI F, ISMAIL A, et al. Antioxidant compounds and capacities of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruits[J]. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2019, 9(4): 158-167.
- [16] 顾仲, 养小录[M]. 刘筑琴, 注译. 西安: 三秦出版社, 2005: 128.
- [17] 中国科学院广西植物研究所. 广西野生食用植物[M]. 南宁: 广西壮族自治区科委情报研究所, 1961: 63.
- [18] 上海科学技术出版社. 上海野生食用植物[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1961: 13-14.
- [19] 叶桔泉. 食物中药与便方[M]. 南京: 江苏人民出版社, 1973: 92-93.
- [20] 董淑炎. 中国野菜食谱大全[M]. 北京: 中国旅游出版社, 1993: 475-476.
- [21] 郎国良. 野菜鉴别与开发利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 124-125.
- [22] 樊守金, 朱海涛. 野菜食谱[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1997: 51-52.
- [23] 于新. 野菜食用与药用手册[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2012: 103-104.

(上接第157页)

- [4] 田连福. 壶瓶碎米荠的营养成分分析及其生态条件研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2003.
- [5] 石爱华, 胡百顺, 杨丽琛, 等. 恩施产董叶碎米荠中氨基酸及活性成分比较[J]. 海峡药学, 2016, 28(11): 35-37.
- [6] 丁莉, 彭诚. 董叶碎米荠营养成分的分析与评价[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2005, 23(3): 293-295.
- [7] YUAN L X, ZHU Y Y, LIN Z Q, et al. A novel selenocystine-accumulating plant in selenium-mine drainage area in Enshi, China[J]. PLoS One, 2013, 8(6): 1-9.
- [8] 殷红清, 向极钎, 杨永康, 等. 董叶碎米荠野生转家种栽培技术[J]. 南方农业, 2018, 12(20): 25-26.
- [9] 姚可成. 食物本草点校本[M]. 北京: 人民卫生出版社 1994: 10.