

白花菜子总多酚的提取及抗氧化活性考察

李国金, 耿红梅*, 藏威
(衡水学院, 河北 衡水 053000)

[摘要] 目的: 优选白花菜子总多酚的提取工艺并初步探讨其抗氧化活性。方法: 采用UV测定总多酚含量, 检测波长760 nm。以总多酚提取量为指标, 选择料液比、提取温度、乙醇体积分数、提取时间为考察因素, 通过单因素试验和正交试验优选白花菜子总多酚的提取工艺条件, 考察其对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)的清除能力。结果: 最佳提取工艺为加20倍量70%乙醇于50℃超声提取40 min; 总多酚提取量 $1.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。抗氧化活性试验表明当白花菜子总多酚提取液质量浓度为 $1.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 清除DPPH·自由基的能力与抗坏血酸抗氧化能力相近, 均>96%。结论: 优选的超声提取工艺稳定可行, 白花菜子总多酚具有较强的抗氧化活性, 为白花菜子资源的开发利用提供实验依据。

[关键词] 白花菜子; 总多酚; 抗氧化活性; 抗坏血酸

[中图分类号] R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0028-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210028

Investigation on Extraction and Antioxidant Activity of Total Polyphenols from Seeds of *Cleome gynandra*

LI Guo-jin, GENG Hong-mei*, ZANG Wei
(Hengshui University, Hengshui 053000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total polyphenols from seeds of *Cleome gynandra* and evaluate its antioxidant activities. **Method:** UV was adopted to determine the content of total polyphenols with detection wavelength at 760 nm. Taking the content of total polyphenols as index, selecting solid-liquid ratio, extracting temperature, solvent concentration, extracting time as factors, extraction conditions of total polyphenols were optimized by single factor tests and orthogonal test, its scavenge activity on DPPH· free radical was discussed. **Result:** The best extraction technology was as follows: extracted 40 min with 20 times the amount of 70% ethanol; the content of total polyphenols was $1.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Antioxidative activity test showed that DPPH·scavenging abilities of total polyphenols extract from seeds of *C. gynandra* and vitamin C had no difference when its concentration of $1.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, they were more than 96%. **Conclusion:** This optimized ultrasonic extraction technology is stable and feasible, total polyphenols have strong antioxidant activity, this article can provide experimental basis for development and utilization of seeds of *C. gynandra*.

[Key words] seeds of *Cleome gynandra*; total polyphenols; antioxidant activities; ascorbic acid

白花菜的种子称为白花菜子, 为河北省习用药材, 味苦、辛, 性温, 具有祛风除湿、活血止痛的功效, 常用于治疗风湿痹痛、跌打损伤等^[1]。白花菜子中主要成分为挥发油类、三萜类和多酚类物质^[2-4]。大量研究表明植物总多酚具有清除自由基、抗脂质

过氧化、延缓衰老、预防心血管疾病、防癌、抗辐射等生物活性, 人体摄入一定量植物多酚类成分可有效预防和控制某些疾病的发生^[5]。目前有关白花菜子中多酚类物质提取工艺的研究尚未见报道, 本实验以总多酚提取量为评价指标, 通过正交试验优选

[收稿日期] 20140413(003)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(B2009000966); 河北省专家出国培训项目(2012)

[第一作者] 李国金, 硕士, 讲师, 从事体育保健的研究, Tel: 15350827680, E-mail: liguojin1982@126.com

[通讯作者] *耿红梅, 博士, 教授, 从事药物分析、食品分析、生物分离等研究, Tel: 15931368829, E-mail: hsgm@126.com

白花菜子总多酚的提取工艺,并采用 DPPH 法评价其抗氧化活性,为白花菜子资源的开发利用提供实验依据。

1 材料

TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),DZF-6021 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),FZ102 微型植物试样粉碎机(北京永光明仪器有限公司),laborota-4000 型旋转薄膜蒸发仪(德国 Heidolph 公司)。

白花菜子购于河北省安国药材市场,经衡水市食品药品检验所蔡永梅主任药师鉴定为白花菜科植物白花菜 *Cleome gynandra* L. 的成熟种子;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,日本和光纯药工业株式会社,批号 047-04051),没食子酸、抗坏血酸(vitamin C,VC)对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 120563-200412,021225),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白花菜子的脱脂处理 将干燥的白花菜子粉碎,过 40 目筛,取适量置于索氏提取器中,以石油醚为溶剂,回流 6 h,脱脂后的粉末晾干备用。

2.2 总多酚的含量测定^[5] 精密量取没食子酸对照品 2.72 mg,置于 50 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容至刻度,得储备液;精密吸取储备液适量,加 70% 乙醇稀释成系列对照品溶液,于 760 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.3305X - 0.1196$ ($r = 0.9993$),表明没食子酸在 $0.001 \sim 0.008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 A 具有良好线性关系。精密量取供试品溶液 1 mL 置于 25 mL 量瓶中,于 760 nm 处测定 A ,计算白花菜子总多酚浓度。

2.3 单因素试验考察 准确称取脱脂种子粉末 5.0 g,按不同工艺条件超声提取总多酚,提取液过滤,浓缩,浓缩液加 70% 乙醇定容至 100 mL,备用。

2.3.1 料液比 设定提取温度 50 °C,乙醇体积分数 60%,提取时间 40 min,考察不同料液比(1:10,1:15,1:20,1:25,1:30)对总多酚提取工艺的影响,结果总多酚提取量分别为 1.10,1.20,1.29,1.24,1.21 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明料液比在 1:10 ~ 1:20 时,随溶剂用量的增加,总多酚提取量不断增大;再增加溶剂用量,总多酚提取量有所下降,综合考虑,料液比水平设置 1:10,1:20,1:30。

2.3.2 乙醇体积分数 设定料液比 1:10,提取温度 50 °C,提取时间 40 min,考察乙醇体积分数

(40%,50%,60%,70%,80%)对总多酚提取工艺的影响,结果总多酚提取量分别为 0.49,0.91,1.65,1.52,0.90 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明总多酚提取量随乙醇体积分数的增加呈现先增加后减小的规律。乙醇体积分数 >60% 后,总多酚提取量不断减小,原因可能是在植物组织中多酚类物质与蛋白质、生物碱、多糖以酯键和苷键等疏水键缔合,水分子很小可自由通过细胞膜进入细胞中,但对疏水键的断裂作用很弱;乙醇为有机溶剂能有效破坏疏水键,但在植物细胞中渗透力太弱。60% 乙醇在白花菜子植物细胞中渗透能力最强,使大量多酚被提取出来,故乙醇体积分数水平设置 50%,60%,70%。

2.3.3 提取温度 固定料液比 1:10,乙醇体积分数 60%,提取时间 40 min,考察提取温度(30,40,50,60,70 °C)对总多酚提取工艺的影响,结果总多酚提取量分别为 1.11,1.23,1.57,1.45,1.36 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明 50 °C 时总多酚提取量达最大值,因为升高温度有利于多酚类成分的扩散和溶剂的渗透,但温度过高又会增加多酚类物质的氧化,导致提取量下降,故提取温度水平定为 40,50,60 °C。

2.3.4 提取时间 固定料液比 1:10,乙醇体积分数 60%,提取温度 50 °C,考察提取时间(20,30,40,50,60 min)对总多酚提取工艺的影响,结果总多酚提取量分别为 0.75,1.22,1.41,1.38,1.31 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明总多酚提取量随提取时间的增加不断增大,至 40 min 时达最大值。因为提取时间太短,多酚类物质还未完全扩散至溶液中,提取不完全;而提取时间太长,多酚类物质可能被氧化分解。

2.4 正交试验 在单因素试验基础上,选择料液比、提取温度、乙醇体积分数、提取时间为考察因素,每个因素选取 3 个水平,准确称取脱脂种子粉末 9 份,每份 5.0 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,试验安排及直观分析见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,各因素对提取效果的影响顺序为 $B > A > D > C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果显示各因素影响均不显著,确定最佳提取工艺组合为 $A_2B_2C_3D_1$,即料液比 1:20,提取温度 50 °C,乙醇体积分数 70%,超声提取时间 40 min。准确称取脱脂种子粉末 3 份,每份 100 g,按优选的工艺条件进行提取,计算总多酚提取量平均值 1.93 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.65%,说明该工艺条件具有可操作性。

2.5 抗氧化活性测定^[6-7] 配制 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 无水乙醇溶液。取按最佳工艺条件提取的总

表 1 白花菜子总多酚提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 料液比 /g·mL ⁻¹	B 提取温度 /℃	C 乙醇体积 分数/%	D 提取 时间/h	总多酚 /mg·g ⁻¹
1	1:10	40	50	40	1.16
2	1:10	50	60	50	1.40
3	1:10	60	70	60	1.32
4	1:20	40	60	60	1.21
5	1:20	50	70	40	1.81
6	1:20	60	50	50	1.08
7	1:30	40	70	50	0.88
8	1:30	50	50	60	1.20
9	1:30	60	60	40	1.16
K ₁	3.88	3.25	3.44	4.13	
K ₂	4.10	4.41	3.77	3.36	
K ₃	3.24	3.56	4.01	3.73	
R	0.27	0.39	0.19	0.26	

表 2 总多酚提取量方差分析

方差来源	SS	F	P
A	18.850	3.631	>0.05
B	11.328	1.985	>0.05
C(误差)	2.552		
D	10.539	1.302	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

多酚提取液和 DPPH 溶液各 2.0 mL, 摇匀, 放置 30 min, 以提取溶剂调零, 于 517 nm 处测定吸光度, 记为 A_s ; 同法取提取溶剂 2.0 mL, 加入 DPPH 溶液 2.0 mL, 摇匀, 测定吸光度, 记为 A_0 ; 取提取液 2.0 mL, 加入提取溶剂 2.0 mL, 摇匀, 测定吸光度, 记为 A_r 。每个质量浓度 (0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 g·L⁻¹) 平行测定 3 次, 取平均值。以 VC 作阳性对照, 依上述方法测定, 按 $[1 - (A_s - A_r)/A_0] \times 100\%$ 计算清除率。结果总多酚提取液对 DPPH 自由基的清除率分别为 9.80%, 15.5%, 20.8%, 33.9%, 40.5%, 75.1%, 80.8%, 96.1%; VC 对 DPPH 自由基的清除率依次为 70.3%, 72.4%, 80.6%, 93.5%, 94.4%, 95.0%, 95.2%, 96.8%。表明以 VC 作阳性对照, 两者清除 DPPH 自由基的能力随着质量浓度的增加而增强, 当质量浓度增至 1.28 g·L⁻¹ 时, 白花菜子总多酚提取物和 VC 的自由基清除率均 >96%, 两者抗氧化活性非常接近, 表明白花菜子总多酚具有较强的抗氧化能力。

3 讨论

研究表明心脑血管病、癌症、关节炎、帕金森症等疾病的发生均与自由基有关, 寻找清除自由基或阻断自由基产生的方法或手段一直是科学家们的孜孜以求^[8]。摄入抗氧化物质可有效抵消自由基氧

化对人体造成损伤。研究显示植物多酚类成分具有优越的抗氧化性能, 可满足这些需要。植物总多酚广泛存在于植物体内, 可通过减少或消除自由基的产生来调节细胞氧化还原状态, 从而减少机体的损伤和疾病的发生^[9], 但目前植物总多酚真正作为药物应用于临床的实践鲜见报道。

白花菜子在我国北方民间一直用于治疗类风湿性关节炎, 效果非常明显。总多酚抗氧化作用的意义不仅仅在于抗氧化作用本身, 因为经过抗氧化作用研究可发现一些成分的抗氧化能力, 而这一成分可通过合成和半合成的方法衍生出一大类成分, 通过这一大类成分的过筛和遴选, 可能会发现更佳的抗氧化化合物, 如若使其能达到安全无毒, 极低浓度即有效, 在产品中稳定, 并且无令人不愉快的气、味和口感, 这便是从抗氧化作用向抗氧化剂的迈进。中草药中往往含有多种抗氧化活性成分, 不同的萃取溶剂、方法和条件将使成分的种类和含量各不相同, 导致评价效果的差异, 研究时需引起注意。

[参考文献]

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志. 第三册[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 303.
- [2] Jain A C, Gupta S M. Minor phenolic components of the seeds of *Gynandropsis gynandra* [J]. J Nat Prod, 1985, 48(2): 332.
- [3] Lwande W, Ndakala A J, Nyandat E, et al. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents [J]. Phytochemistry, 1999, 50(3): 401.
- [4] Songsak T, Lockwood G B. Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand [J]. Fitoterapia, 2002, 73(3): 209.
- [5] 刘畅, 周家春. 植物多酚抗氧化性研究 [J]. 粮食与油脂, 2011, 12(2): 43.
- [6] 何文静, 张帆, 田树革, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定啤酒花中总多酚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 58.
- [7] 李西柳, 庞明, 王俊儒, 等. 柿子渣中多酚的提取工艺及其抗氧化性研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1475.
- [8] 郑晶泉. 抗氧化剂抗氧化实验研究进展 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 2000, 27(1): 37.
- [9] 邓慧. 近五年国内中药抗氧化作用研究进展 (上) [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 155.

[责任编辑 刘德文]