

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2020. 01. 009

红泡刺藤酚类物质提取工艺优化和抗氧化活性比较*

宋志姣, 李建珊, 章金龙, 李志强, 祝冉, 马前涛, 李悦

(保山学院 资源环境学院, 云南 保山 678000)

摘要: 以干燥的红泡刺藤叶片粉末为原料, 在单因素试验的基础上进行正交试验, 探讨超声时间、超声功率、乙醇浓度、料液比对酚类物质得率的影响, 并以最优提取工艺比较红泡刺藤各个部位的酚类物质含量和抗氧化活性。研究表明, 酚类物质的最佳提取工艺为: 超声时间 35min, 超声功率 213W, 乙醇浓度 30%, 料液比 0.5 : 25g/mL, 在此提取条件下叶片酚类物质得率为 1.21mg GAE/g。红泡刺藤各个部位中根的酚类物质含量最高, 为 1.46mg GAE/g, 其次为叶、茎、果实。提取的酚类物质对 ·OH 自由基和 DPPH 自由基有良好的清除能力, 其 IC₅₀ 值分别为 0.39mg/L、1.58mg/L、0.04mg/L、0.01mg/L 和 1.00mg/L、1.23mg/L、1.25mg/L、1.24mg/L。研究结果为红泡刺藤的综合利用提供借鉴。

关键词: 红泡刺藤; 酚类物质; 提取工艺; 抗氧化活性

中图分类号: Q 946; R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-8246 (2020) 01-0053-06

Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Contents of *Rubus niveus*

SONG Zhi-jiao, LI Jian-shan, ZHANG Jin-long, LI Zhi-qiang, ZHU Ran, MA Qian-tao, LI Yue

(College of Resources and Environmental Sciences, Baoshan University, Baoshan Yunnan 678000, P. R. China)

Abstract: The ultrasonic pretreatment time and percentage of ultrasonic rated power and ethanol concentration and ratio of material to ethanol were employed to assess the effect of extraction technique on the yield of phenolic contents from leaves powder of *Rubus niveus* based on single factor experiments and orthogonal test. Herein, phenolic substances and antioxidant activities of various parts of *R. niveus* were compared by the optimal extraction process. The optimum extraction parameters were as follows: 35min ultrasonic pretreatment time, 213W ultrasonic rated power, 30% ethanol concentration, and 0.5 : 25g/mL of material to ethanol. Under these optimized conditions, the yield of phenolic contents was 1.21mg GAE/g. The content of phenolic compounds in the roots of the *R. niveus* was the highest, 1.46mg GAE/g, followed by leaves, stems and fruits. The contents of phenolic substances which extracted from different parts of *R. niveus* showed good antioxidant activity. The half inhibitory concentration (IC₅₀) for scavenging of ·OH were 0.39mg/L, 1.58mg/L, 0.04mg/L, 0.01mg/L, and scavenge of DPPH were 1.00mg/L, 1.23mg/L, 1.25mg/L, 1.24mg/L, respectively. The research results provide a reference for the comprehensive utilization of *R. niveus*.

Key words: *Rubus niveus*; contents of phenolic substances; extraction process; antioxidant activity

红泡刺藤 (*Rubus niveus* Thunb.) 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus*) 空心莓组 (Section

Idaeobatus Focke) 弓曲灌木, 常生长于山坡灌木丛、山谷河滩、溪流旁, 根和叶可入药^[1-2]。研究

* 收稿日期: 2019-07-25

基金项目: 云南省科技计划项目青年项目 (2018FD097), 保山市“第八批中青年学术和技术带头人”项目 (201903), 保山市第八批创新团队“药食同源”产品质量及品牌建设研究创新团队项目资助 (201911), 国家留学基金资助。

第一作者简介: 宋志姣 (1988-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物资源利用研究。E-mail: janeolo@163.com

通讯作者简介: 李悦 (1988-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事食品开发研究。E-mail: xixiliyue@tom.com

表明,红泡刺藤含有酚酸类、萜类、黄酮类和维生素等活性成分,其中酚酸是存在于植物的根、茎、叶、果实中的酚类物质^[3-4]。酚类物质是芳香烃中苯环上的氢原子被羟基取代所生成的化合物,包括简单的小分子酚类到复杂的高分子量聚合物及其衍生物^[5],广泛存在于植物组织中,是植物次生代谢物的主要类型之一。酚类物质可以作为植物叶、茎、花、果实等器官的着色剂,可以对逆境胁迫有防御作用,可以充当信号分子^[6]等等。对人类而言,酚类物质有抗衰老、消炎、抑菌、抗癌和镇痛的疗效^[7]。

随着现代提取工艺技术的发展,微波辅助提取^[8]、超临界萃取^[7]、膜技术^[9]等逐步应用于植物酚类物质提取,为植物酚类物质的提取提供更加简便、快速及高效的工艺。超声波辅助提取法因其提取效率高、所需时间短、适用范围广、成本低、能保持提取物活性等优点得到越来越广泛的应用。

目前,我国对红泡刺藤的研究主要集中在种质资源的评价和利用^[10]、果实品质研究^[11-12]等方面,其生物活性成分的提取和抗氧化性研究较少。仅有余丽焯等^[4]对同属的掌叶复盆子(*Rubus chin-gii*)总酚含量差异进行过研究,结果表明掌叶复盆子中含有较丰富的酚类物质。迄今为止,未有红泡刺藤根、茎、叶的有效成分提取和加工利用研究,酚类物质的提取和抗氧化性评价尚未展开。因此本研究以红泡刺藤的根、茎、叶、果实为原料,在单因素试验和正交试验的基础上探索超声波辅助提取酚类物质工艺,同时比较不同部位的酚类物质含量及其抗氧化活性,旨在为充分研究和利用红泡刺藤提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

红泡刺藤根、茎、叶、果实于2018年6至7月份采于云南省保山市施甸县水长乡七零七工业园区,根、茎、叶于40℃烘至恒重,粉碎过60目筛,存放于干燥器中。果实冷冻干燥至恒重,粉碎过60目筛,存放于4℃冰箱。

无水乙醇、盐酸、水杨酸、磷酸购自重庆川东化工有限公司,无水碳酸钠、钨酸钠、钼酸钠、硫酸钾、溴酸钾购自北京化工厂,硫酸、硫酸亚铁购自成都化学试剂厂,VC购自国药集团化学试剂有限公司,30%过氧化氢购自天津市协和色谱科技有

限公司,没食子酸、DPPH购自上海金穗生物科技有限公司,以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHZ-D型循环水式多用真空泵(上海予华仪器设备有限公司);CP214型电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司);UV-2600型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);手提式高速万能粉碎机(常州市伟嘉仪器制造有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);冷冻干燥机(北京德天科技发展有限公司);SK250HP型超声清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 酚类物质含量测定^[13]

采用福林-酚比色法绘制标准曲线和测定提取物中酚类物质含量。分别移取质量浓度为0μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、15μg/mL、20μg/mL、25μg/mL、30μg/mL、35μg/mL、40μg/mL的标准液1mL,加入1mL福林-酚试剂,静置30s,再加5mL 7.5%碳酸钠,蒸馏水定容至25mL,混匀避光静止1.5h后,取中间浓度的标准待测液用分光光度计在200-780nm波长范围内的扫描光谱,结果显示没食子酸标准溶液在735.5nm处有最大吸收。在最佳吸收波长下分别测定标准溶液吸光度,以没食子酸质量浓度为横坐标, $A_{735.5nm}$ 为纵坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线为 $y=0.0104x+0.0697$, $R^2=0.9986$ 。按上述方法测定提取液酚类物质含量,结果以没食子酸当量计(mg GAE/g,以干质量计,下同)。

1.3.2 单因素试验

由于红泡刺藤叶片易获得,故以干燥的红泡刺藤叶粉末为材料探讨不同参数对酚类物质提取率的影响。准确称取0.5000g样品(精确到0.0001g),按超声时间35min,超声功率238W,料液比0.5:20(m:v,g/mL,下同)的比例加入40%的乙醇,固定其中3个因素,依次对超声提取时间(15min、25min、35min、45min、55min)、超声功率(200W、213W、225W、238W、250W)、乙醇浓度(20%、30%、40%、50%、60%)和料液比(0.5:10g/mL、0.5:15g/mL、0.5:20g/mL、0.5:25g/mL、0.5:30g/mL)进行单因素实验,提取液抽滤后定容至50mL,在735.5nm波长下测定多酚提取率,重复3次。

1.3.3 正交试验

最优工艺条件正交试验 结合单因素试验结果,参考 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行正交试验,正

交试验因素水平如表 1，其余步骤相同。采用最佳工艺条件提取红泡刺藤根、茎、叶、果实中的酚类物质并进行测定。

表 1 正交试验设计表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment for phenolic contents

水平	因素			
	A 超声时间/min	B 超声功率/W	C 乙醇浓度/%	D 料液比 /g · mL ⁻¹
1	25	213	20	0.5 : 20
2	35	225	30	0.5 : 25
3	45	238	40	0.5 : 30

1.3.4 验证试验

根据正交试验和极差分析结果，对理论最佳工艺和实际最佳提取工艺进行验证试验，重复提取 3 次，比较两个工艺的酚类物质提取率，以确定最优提取工艺。

1.3.5 不同部位提取物抗氧化活性测定

不同部位提取物清除 ·OH 能力和清除 DPPH 自由基能力的测定：参考李晓英等^[13]的方法进行。

1.4 数据处理

所有数据用 Microsoft Excel 2016 绘制图表，用 SPSS 16.0 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助提取单因素试验及结果

2.1.1 超声时间对红泡刺藤叶片酚类物质得率的影响

从图 1 可以看出，红泡刺藤叶片中酚类物质得率随着超声时间的增加呈现先增后降的趋势，在超声时间为 35min 时红泡刺藤叶片中酚类物质得率最高，为 0.75mg GAE/g；随着超声时间的进一步增加，酚类物质得率下降。因此，超声时间为 35min 时最佳。

2.1.2 超声功率对红泡刺藤叶片酚类物质得率的影响

从图 2 可以看出，红泡刺藤叶片中酚类物质得率随着超声功率的增加呈现先升后降最后趋于平缓的趋势，在超声功率为 225W 时，酚类物质得率最高，为 0.77mg GAE/g。在一定范围内超声功率越大，酚类物质得率也会越高，但当超声功率大于 225W 之后，酚类物质的溶出受接触面积等因素的

影响不能继续增大，但是其余物质的溶出会与酚类物质竞争溶剂，因此实验后期得率先下降后保持稳定。因此，选择超声功率为 213W、225W、238W 进行正交试验。

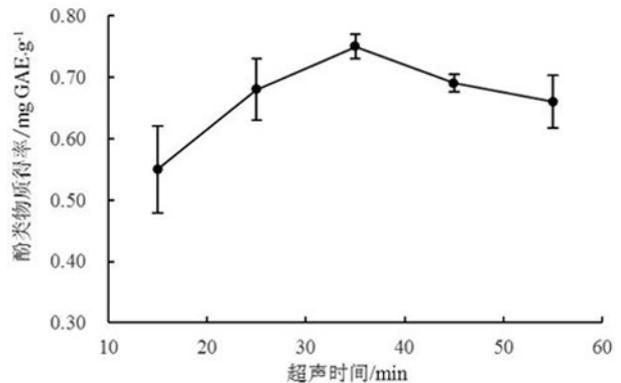


图 1 超声时间对类物质得率的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic time on extraction rate of phenolics

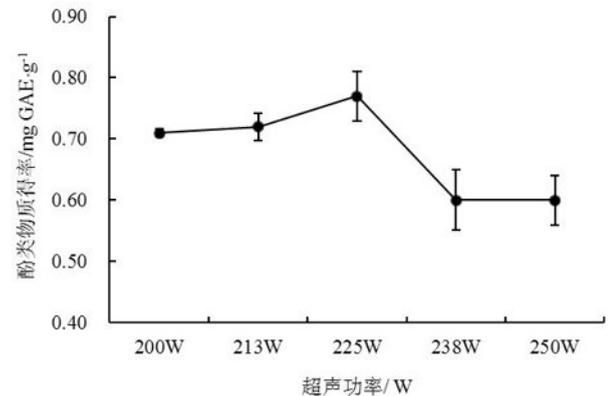


图 2 超声功率对类物质得率的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic power on extraction rate of phenolics

2.1.3 乙醇浓度对红泡刺藤叶片酚类物质得率的影响

从图 3 可以看出，红泡刺藤叶片中酚类物质的得率随着乙醇浓度不断提高呈现先升后降的趋势，在乙醇浓度为 30% 时，酚类物质得率最高。这可能是由于随着乙醇浓度的升高溶剂极性减小，从而减少酚类物质在溶剂中的溶解，与此同时叶片中的极性小的分子溶出，导致酚类物质得率下降。因此，选择乙醇浓度为 20%、30% 和 40% 进行正交试验。

2.1.4 料液比对红泡刺藤叶片酚类物质得率的影响

从图 4 可以看出，红泡刺藤叶片中酚类物质得率随着料液比的不断增大，呈现先下降后升高最后

又下降的趋势,在料液比为0.5:25mL/g时红泡刺藤叶片中酚类物质得率最高,为1.13mg GAE/g。伴随着料液比的增加,越来越多的酚类物质被充分的提取出来,达到最高点后由于酚类物质含量有限,过多的溶剂溶出其他物质,使得酚类物质得率有所下降。因此,选择料液比为0.5:20g/mL、0.5:25g/mL和0.5:30g/mL进行正交试验。

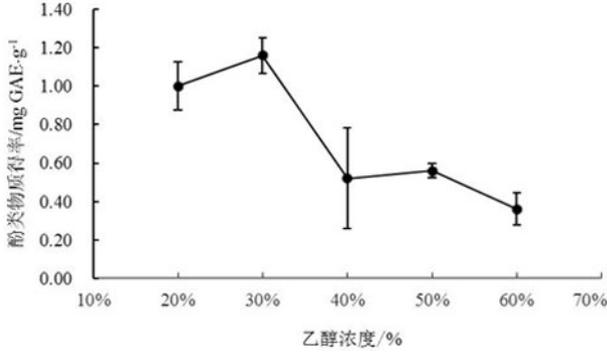


图3 乙醇浓度对类物质得率的影响

Fig. 3 Effects of ethanol concentration on extraction rate of phenolics

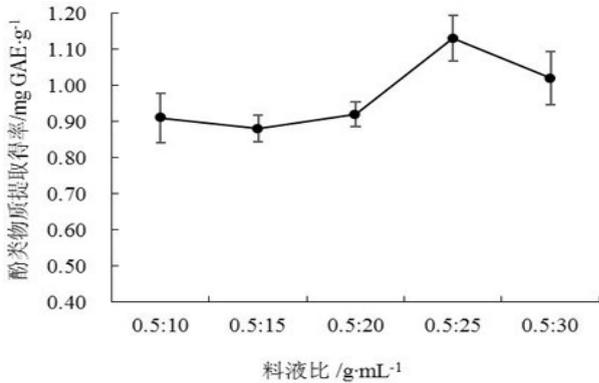


图4 料液比对类物质得率的影响

Fig. 4 Effects of ratio of material to ethanol on extraction rate of phenolics

2.2 酚类物质提取的正交试验结果与分析

正交试验的结果表明,红泡刺藤叶片酚类物质提取的最佳方案是 $A_1B_3C_2D_2$,但是极差分析的结果却显示提取方案 $A_2B_1C_2D_2$ 最佳。因此,在相同条件下对 $A_1B_3C_2D_2$ 和 $A_2B_1C_2D_2$ 分别进行3次重复提取试验以验证结果,得到红泡刺藤叶片酚类物质的提取率分别为1.15mg GAE/g和1.21mg GAE/g。综上所述,超声波辅助提取红泡刺藤叶片酚类物质的最佳工艺为:超声时间35min,超声功率213W,乙醇浓度30%,料液比0.5:25g/mL。

以酚类物质得率为考察指标(表3),经方差

分析可得除了乙醇浓度对酚类物质得率影响显著以外,超声时间、超声功率和料液比对酚类物质得率的影响并不显著,根据显著性可将因素对酚类物质得率的影响从大到小排序为乙醇浓度>超声功率>料液比>超声时间。与表2的R所得的因素影响结果乙醇浓度>料液比>超声功率>超声时间不符,查看原始数据,发现是由于保留两位小数导致的差异,若保留三位小数则方差分析与极差结果一致,故因素对酚类物质得率的影响从大到小排序为乙醇浓度>超声功率>料液比>超声时间。

表2 酚类物质提取正交试验表

Tab. 2 Orthogonal experimental results of phenolics extraction

实验号	超声时间/min	超声功率/W	乙醇浓度/%	料液比/g·mL ⁻¹	提取得率/mg GAE·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.88
2	2	2	1	2	0.99
3	3	3	1	3	0.97
4	2	1	2	3	1.11
5	3	2	2	1	1.00
6	1	3	2	2	1.17
7	3	1	3	2	0.98
8	2	2	3	3	0.97
9	1	3	3	1	1.05
k1	1.01	0.99	0.95	0.97	
k2	1.05	0.98	1.09	1.05	
k3	0.98	0.98	1.00	1.02	
R	0.06	0.02	0.14	0.07	

表3 正交试验结果方差分析

Tab. 3 Variance analysis of orthogonal array design

误差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
超声时间/min	0.012	2	0.006	0.602	0.556
超声功率/W	0.035	2	0.018	1.998	0.157
乙醇浓度/%	0.095	2	0.048	7.501	0.003
料液比/g·mL ⁻¹	0.024	2	0.012	1.265	0.300

2.3 叶、茎、根、果实酚类物质含量比较

红泡刺藤叶、茎、根、果实的酚类物质含量差异显著(表4),其中根的酚类物质含量最高为1.46mg GAE/g,叶次之为1.17mg GAE/g,果实中酚类物质最少0.18mg GAE/g,不到根部的十分之一。综合考虑红泡刺藤各个部位的生物量和材料获得的容易性,建议在以酚类物质为主要利用对象时,以红泡刺藤叶片为原料提取酚类物质。

表 4 红泡刺藤不同部位酚类物质含量

Tab. 4 Phenolic contents from different parts of *R. niveus*

样品	叶	茎	根	果
酚类物质含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	1.17±0.10b	0.92±0.05c	1.46±0.07a	0.18±0.02d

注：不同的小写英文字母表示各个部位间酚类物质含量差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 叶、茎、根、果实抗氧化活性比较

2.4.1 叶、茎、根、果实清除·OH能力比较

由表 5 可知，红泡刺藤各部位提取物的·OH 自由基清除能力随着酚类物质质量浓度的升高而增大，且在 9.25–89.25mg/mL 范围内呈明显的剂量-效应关系，但是随着质量浓度不断增加，清除率增加逐渐减缓。除去酚类物质质量浓度为 64.75 mg/mL 和 89.25mg/mL 时的数据，其余测定质量浓度范围内根、茎、叶、果实等部位的·OH 自由基清除能力均高于 VC。通过计算得到红泡刺藤叶、茎、根、果实酚类物质及 VC 对·OH 自由基的半数抑制浓度 IC_{50} 值分别为 0.39mg/L、1.58mg/L、0.04mg/L、0.01mg/L、14.67mg/L，清除能力大小为果实>根>叶>茎>VC。

表 5 红泡刺藤不同部位乙醇提取物对·OH 的清除能力

Tab. 5 Hydroxyl radical scavenging activity of ethanol extracts from different parts of *R. niveus*

酚类物质含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	·OH 自由基清除率/%				
	叶	茎	根	果实	VC
9.25	81.97	67.18	85.97	79.22	50.41
27.75	89.07	76.18	86.39	80.92	58.51
46.25	91.74	82.26	87.50	80.99	63.94
64.75	93.45	83.46	91.39	81.88	88.86
89.25	93.92	83.80	93.83	81.95	99.62

2.4.2 叶、茎、根、果实清除 DPPH 自由基能力比较

由表 6 可知，红泡刺藤根、茎、叶、果实的乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力在不同质量浓度条件下各不相同。红泡刺藤各部位提取物的 DPPH 自由基清除能力总体随酚类物质质量浓度的增加而提高。通过计算得到红泡刺藤叶、茎、根、果实酚类物质及 VC 对 DPPH 自由基的半数抑制浓度 IC_{50} 值分别为 1.00mg/L、1.23mg/L、1.25mg/L、1.24mg/L、1.29mg/L；DPPH 自由基清除能力大小为叶>茎>果实>根>VC。

表 6 红泡刺藤不同部位乙醇提取物对 DPPH 的清除能力

Tab. 6 DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from different parts of *R. niveus*

酚类物质含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	DPPH 自由基清除率/%				
	叶	茎	根	果实	VC
0.83	49.51	45.84	31.56	45.39	45.09
1.67	65.65	51.32	64.66	49.61	50.57
2.50	76.22	61.26	75.89	63.89	60.47
3.33	83.31	66.29	90.40	73.95	65.57
4.16	97.50	75.02	95.09	81.97	74.23

3 结论与讨论

试验以超声辅助提取红泡刺藤酚类物质，单因素结合正交试验的结果表明，各因素对酚类物质得率的影响从大到小依次为：乙醇浓度>超声功率>料液比>超声时间；最佳提取工艺条件为超声时间 35min，超声功率 213W，乙醇浓度 30%，料液比 0.5 : 25g/mL。本研究首次在红泡刺藤中展开酚类物质提取，各个部位的酚类物质得率有显著差异，其中根和叶的酚类物质得率最高，为 1.46mg GAE/g 和 1.17mg GAE/g，考虑到获取材料的难易程度，建议在以酚类物质为主要利用对象时，以叶片为原料进行提取。研究结果显示红泡刺藤的果实酚类物质得率为 0.18mg GAE/g，远低于其他悬钩子属植物果实的 1.982mg/g–3.567mg/g^[14–15]，这可能是悬钩子属不同种之间酚类物质含量存在差异，也可能是由于贮存方式不同所致。红泡刺藤各部位提取的酚类物质对·OH 自由基、DPPH 自由基有较好的清除能力。叶、茎、根、果实提取物对·OH 自由基和 DPPH 自由基清除能力的表现不同：·OH 自由基清除能力表现为果实>根>叶>茎，DPPH 自由基清除能力表现为叶>茎>果实>根。这可能是因为酚类物质的单体种类和含量不一致导致，自然界中组成酚类物质的单体有 8 000 余种^[16]，其种类和含量不一致都会导致抗氧化性不一致^[17]，蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 的研究也显示出相同浓度不同部位的酚类物质，·OH 自由基和 DPPH 自由基清除能力表现不一致的情况^[14]。

研究虽然采用了单因素试验的基础上进行和正交试验探讨红泡刺藤酚类物质的提取工艺,但是没有对酚类物质的组成和含量进行进一步分析。试验中采用的超声波辅助提取法具有方便、快捷、安全的优点,所优化的提取工艺可为综合利用红泡刺藤提供借鉴。

参考文献:

- [1] 俞德浚, 陆玲娣, 谷粹芝, 等. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1983, 37: 10-218.
- [2] Melim Carla, Guimaraes Karoliny, Martin - Quintal Zhelmy, et al. Antimicrobial activity of extracts and fractions from aerial parts of selected plants (*Garcinia achachairu*, *Macrosiphonia velame*, *Rubus niveus* and *Pilea microphylla*) against some pathogenic microorganisms [J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8(11): 1567.
- [3] 石永芳. 复盆子的营养成分和药理作用的研究进展[J]. *山东化工*, 2017, 46(6): 71-72.
- [4] 余丽焱, 申屠望楠, 鲍洁, 等. 不同产地复盆子中的总酚含量的比较[J]. *食品与发酵科技*, 2017, 53(3): 85-88.
- [5] 赵天瑶, 毛圣培, 王佑成, 等. 酚类化合物的提取方法及生物活性研究进展[J]. *食品工业*, 2017, 38(12): 212-215.
- [6] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds, in plants and agricultural products: antioxidant activity, concurrence, and potential uses [J]. *Food Chemistry*, 2006, 99(1): 191-203.
- [7] 林樱姬, 赵萍, 王雅. 植物多酚的提取方法和生物活性研究进展[J]. *陕西农业科学*, 2009(6): 105-107.
- [8] 刘云, 陈玉春, 阚欢, 等. 高黎贡山糯橄榄多酚的提取方法改进及工艺优化[J]. *西部林业科学*, 2019, 48(3): 122-126, 132.
- [9] 董科, 冷云, 何方婷, 等. 植物多酚及其提取方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(2): 326-330.
- [10] 和志姣, 和加卫, 杨正松, 等. 红泡刺藤群居的遗传多样性研究[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(12): 2406-2411.
- [11] 张良英, 刘林, 牛歆雨. 西藏几种野生树莓的果实性状评价[J]. *种子*, 2016, 35(08): 70-71, 75.
- [12] 王仕玉, 段修安, 张泽, 等. 六种滇产悬钩子的果实品质评价[J]. *北方园艺*, 2008(6): 7-9.
- [13] 李晓英, 薛梅, 樊汶樵. 蓝莓花、茎、叶酚类物质含量及抗氧化活性比较[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 142-147.
- [14] 陈青, 王玉珠, 梁延群, 等. 干燥方式对树莓总酚、总黄酮含量及其体外抗氧化活性的影响[J]. *北方园艺*, 2019(13): 130-134.
- [15] 张志敏, 朱祥, 刘针杏. 野生树莓果实总酚含量及抗氧化能力分析[J]. *农产品加工*, 2018(22): 49-51.
- [16] 陈彩薇. 脱脂米糠中不同存在形态酚类物质的抑菌和抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [17] 李楠. 海棠多酚的种类及其体外抗氧化活性和抑菌活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.

(编辑: 成伶俐)