

淡竹叶多酚的提取纯化工艺优化、 组分分析及体外抗氧化活性研究

周文月¹, 文语佳², 周森林¹, 杨明龙¹, 时政^{1*}

(1. 成都大学临床医学院/附属医院, 食品与生物工程学院, 成都 610106;

2. 川北医学院临床医学院, 南充 637100)

摘要: **目的** 确定淡竹叶多酚提取纯化工艺, 分析主要成分及体外抗氧化活性。**方法** 采用超声辅助提取淡竹叶多酚, 通过响应面实验确定最佳提取条件。选取适合淡竹叶多酚纯化的大孔树脂, 对纯化工艺参数进行优化。通过高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)鉴定淡竹叶多酚的主要成分, 并评价其体外抗氧化活性。**结果** 淡竹叶多酚的最佳提取工艺参数为: 乙醇体积分数 60%、超声功率 500 W、料液比 1:25 (g/mL)、超声时间 24 min 及超声温度 59°C, 该条件下淡竹叶多酚提取量为 8.01 mg/g。淡竹叶多酚纯化工艺参数为: 上样质量浓度 6 mg/mL、pH 4、流速 2 mL/min、解吸液为 70%乙醇、解吸体积 90 mL, 纯化后的淡竹叶多酚纯度由 12.86%提高到 76.18%。通过 HPLC-MS 鉴定出 16 种酚类成分, 且纯化后多酚有较高的抗氧化活性。**结论** 本研究得到了淡竹叶多酚提取纯化工艺, 得到的多酚纯化物有明显的抗氧化活性。

关键词: 淡竹叶; 多酚; 响应面法; 纯化工艺; 抗氧化活性; 高效液相色谱-质谱法

Optimization of extraction and purification process, component analysis and antioxidant activity *in vitro* of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn.

ZHOU Wen-Yue¹, WEN Yu-Jia², ZHOU Sen-Lin¹, YANG Ming-Long¹, SHI Zheng^{1*}

(1. Clinical Medical College/Affiliated Hospital, College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. Clinical Medicine Department, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

ABSTRACT: Objective To determine the extraction and purification process of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn., and study the main components and antioxidant activity *in vitro*. **Methods** Ultrasonic-assisted

基金项目: 四川省科技厅农业科技成果转化资金项目(2022NZZJ0015)、四川省 2021-2023 年高等教育人才培养质量和教学改革项目(JG2021-1103)、龙泉驿英才计划 C 类创新人才计划项目(90)、成都大学附属医院院级课题项目(Y2021006、Y202232、Y202234)、成都大学临床医学院/附属医院创新团队项目(CDFYCX202208)

Fund: Supported by the Sichuan Provincial Department of Science and Technology Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund Project (2022NZZJ0015), the Sichuan Province 2021-2023 Higher Education Talent Training Quality and Teaching Reform Project (JG2021-1103), the Longquanyi Talent Program Class C Innovative Talent Program (90), the Hospital-level Project of the Affiliated Hospital of Chengdu University (Y2021006, Y202232, Y202234), and the Innovation Team Project of the School of Clinical Medicine/Affiliated Hospital of Chengdu University (CDFYCX202208)

*通信作者: 时政, 博士, 教授, 主要研究方向为天然产物活性研究。E-mail: drshiz1002@hotmail.com

*Corresponding author: SHI Zheng, Ph.D, Professor, Clinical Medical College/Affiliated Hospital, Chengdu University, No.2025, Chengluo Road, Longquanyi District, Chengdu 610106, China. E-mail: drshiz1002@hotmail.com

extraction of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. was used, and the optimal extraction conditions were determined by response surface test. The macroporous resin suitable for the purification of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. was selected, and the purification process parameters were optimized. The main components of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. were identified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), and the antioxidant activity *in vitro* was subsequently evaluated.

Results The extraction process parameters of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. were as follows: Ethanol volume fraction 60%, ultrasonic power 500 W, material-liquid ratio 1:25 (g/mL), ultrasound time 24 min, ultrasound temperature 59°C, the maximum content of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. was 8.01 mg/g under these conditions. The purification process parameters of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. were as follows: Mass concentration of 6 mg/mL, pH 4, loading flow rate of 2 mL/min, elution concentration of 70% ethanol, elution volume of 90 mL, and the purity of purified polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. increased from 12.86% to 76.18%. Sixteen kinds of phenolic components were identified by HPLC-MS, and the purified polyphenols had high antioxidant activity. **Conclusion** In this study, the extraction and purification process of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn. is obtained, and the purified polyphenols shows significant antioxidant activity.

KEY WORDS: *Lophatherum gracile* Brongn.; polyphenols; response surface method; purification process; antioxidant activity; high performance liquid chromatography-mass spectrometry

0 引言

淡竹叶为禾本科植物淡竹叶(*Lophatherum gracile* Brongn.)的干燥茎叶,已被国家卫生部列为药食同源物质^[1-2],广泛分布于我国山东、江苏、浙江等省,资源丰富。淡竹叶含有丰富的多酚、多糖、黄酮等生物活性物质^[3-4]。多酚是植物体内的次级代谢产物,具有多元酚结构^[5-6],许多研究表明植物多酚具有抗氧化、抑菌等生物活性^[7],例如,王萍等^[8]研究发现 13 种植物中提取的多酚具有较强抗氧化活性。因此从淡竹叶中提取多酚,对淡竹叶资源的深层次开发有重要意义。

目前多酚提取主要方法之一有超声辅助提取法^[9]。其与传统提取方法相比,具有操作方便、高效、短时等优点^[10-11]。但淡竹叶多酚的超声提取研究暂未见报道,因此本研究采用超声提取法研究多酚的最佳提取工艺,后续将对其进行分离纯化,以获得纯度更高的多酚类物质。植物多酚的分离纯化方法主要有醇沉法、大孔树脂法、凝胶法等^[12]。其中大孔树脂吸附法是最常用的多酚类物质纯化方法之一,具有高效快速、选择性高等优点^[13-14]。孟令志等^[15]利用 XAD-7HP 型号大孔树脂对余甘子多酚进行纯化,余甘子多酚纯度由 16.45%提升到 60.67%。现有的研究仅限于淡竹叶粗提物的活性研究,但其中杂质含量较多,对其药效活性的评价有一定影响。因此寻找合适的提取纯化方法,对淡竹叶中多酚进行鉴定分析和活性评价,是当前亟待解决的问题。

因此本研究将通过响应面法及大孔树脂法探讨淡竹叶多酚提取纯化方案,鉴定淡竹叶多酚主要成分,并测定

纯化前后淡竹叶多酚的体外抗氧化活性,以期淡竹叶多酚提取纯化及运用于各类功能性食品开发提供理论和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

淡竹叶(成都吉安康药业公司);没食子酸、福林酚试剂、氢氧化钠(分析纯,成都科隆化学制品有限公司);无水乙醇、盐酸、碳酸钠(分析纯,成都金山化学试剂有限公司);D101 型大孔树脂、HPD100 型大孔树脂、NKA-9 型大孔树脂、AB-8 型大孔树脂、NKA-2 型大孔树脂、CAD-40 型大孔树脂、DA201 型大孔树脂(东鸿化工有限公司);乙腈、甲酸、乙醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)试剂、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]试剂(分析纯,美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器与设备

DTC-33 型超声波清洗机(鼎泰生化科技设备制造有限公司);HZB-B5000 型电子天平(精度 0.01 g,福州华志科学仪器有限公司);L6 型紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);TD-5Z 型低速离心机(四川蜀科仪器有限公司);HNY-2101C 型恒温振荡器(天津欧诺股份有限公司);XZ-2+型无油隔膜真空泵(杭州齐威仪器有限公司);RV10 型真空旋转蒸发仪(德国 IKA 公司);DHG-9203A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);30A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB SCIEX Triple ToF 5600 型高分辨率

飞行时间质谱仪(美国 SCIEX 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 淡竹叶多酚提取液的制备

将淡竹叶放入 60℃烘箱中烘 3 h 后粉碎过 65 目筛,得到淡竹叶粉末,称取 1 g 淡竹叶粉末,加入一定浓度乙醇溶液混匀,按照设计的功率、温度、时间进行超声提取,将淡竹叶多酚粗提物在 4000 r/min 条件下离心 10 min,过滤得到淡竹叶多酚提取液。

1.3.2 淡竹叶多酚含量测定

参考李坪^[16]的方法,制作标准曲线。得到回归方程为 $Y=0.0043X+0.0045$, $r^2=0.9993$ 。取 1 mL 淡竹叶粗提物稀释至 10 mL,取 1 mL 加入 1 mL 0.1 mol/L 福林酚溶液及 4 mL 7.5% NaCO_3 溶液,混匀后定容,1 h 避光处理,在 765 nm 波长下测定吸光度值(A)。利用标准曲线计算多酚提取量,按照公式(1)计算多酚提取量:

$$\text{多酚提取量}/(\text{mg/g})=\frac{C \times V \times N}{M_1 \times 1000} \tag{1}$$

式中,C—由标准曲线得出的多酚质量浓度,μg/mL;N—样品稀释倍数;V—提取液定容后体积,mL;M₁—淡竹叶粉末的质量,g。

1.3.3 单因素实验

准确称取 1 g 淡竹叶粉末,按照不同乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声功率和超声温度提取淡竹叶多酚。乙醇体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%,料液比分别为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g/mL),超声时间分别为 15、20、25、30、35 min,超声功率分别为 300、400、500、600、700 W,超声温度分别为 40、50、60、70、80℃。

1.3.4 响应面法优化实验方案设计

根据单因素实验结果,选取表 1 所示 4 个因素进行响应面实验,利用 Design-Expret 8.0.6.1 软件设计实验并分析影响淡竹叶多酚提取得率主要因素,得出最佳提取工艺。

1.3.5 淡竹叶多酚的纯化

(1)大孔树脂预处理

选取 7 种不同型号大孔吸附树脂,参考袁欢等^[17]的方法预处理大孔树脂。

(2)大孔树脂筛选

将大孔树脂与淡竹叶多酚粗提液混合振荡 12 h 后测吸光度值,通过公式(2)、(3)计算吸附率及吸附量。将吸附

后大孔树脂与 60%乙醇溶液混合避光振荡 12 h,通过公式(4)、(5)计算解吸率及解吸量:

$$\text{吸附率}/\%=\frac{C_1-C_2}{C_1} \times 100 \tag{2}$$

$$\text{吸附量}/(\text{mg/g})=\frac{C_1-C_2}{M_2} \times V_1 \tag{3}$$

$$\text{解吸率}/\%=\frac{C_3}{C_1-C_2} \times 100 \tag{4}$$

$$\text{解吸量}/(\text{mg/g})=C_2V_2 \tag{5}$$

式中,M₂—D101 大孔树脂质量,g;C₁—D101 大孔树脂吸附前淡竹叶多酚质量浓度,mg/mL;C₂—D101 大孔树脂吸附后多酚质量浓度,mg/mL;C₃—解吸后多酚质量浓度,mg/mL;V₁—淡竹叶多酚溶液体积,mL;V₂—解吸液体积,mL。

(3)静态吸附解吸动力学曲线

准确称取 1 g 大孔树脂,加入 8 mg/mL 淡竹叶粗多酚溶液避光振荡,隔 30 min 测定浓度直至无明显变化,随后洗净加入 60%乙醇溶液,隔 30 min 测定上清液浓度。

(4)多酚质量浓度对大孔树脂吸附的影响

准确称取 1 g 大孔树脂,分别加入质量浓度为 4、5、6、7、8 mg/mL 的淡竹叶粗多酚溶液,避光振荡 30 min 测定多酚浓度。

(5) pH 对大孔树脂吸附的影响

准确称取 1 g 大孔树脂,分别加入 6 mg/mL pH 为 2、3、4、5、6 的淡竹叶粗多酚溶液,避光振荡 30 min 测定多酚浓度。

(6)乙醇浓度对大孔树脂解吸的影响

准确称取 1 g 吸附饱和大孔树脂,分别加入浓度为 40%、50%、60%、70%、80%、90%的乙醇溶液,避光振荡 30 min 测定多酚浓度。

(7)上样流速对大孔树脂吸附的影响

称取处理好的大孔树脂以湿法装柱的方法置于层析柱中,将 pH 为 4、质量浓度为 6 mg/mL 淡竹叶粗多酚溶液按 1、2、3 mL/min 的进样速度过柱。20 mL 为一管测定吸光度值。

(8)洗脱体积的确定

称取处理好的大孔树脂以湿法装柱的方法置于层析柱中,将 pH 为 4、质量浓度为 6 mg/mL 淡竹叶粗多酚溶液以 2 mL/min 的速度进样,饱和后用去离子水冲洗,随后用 70%乙醇溶液洗脱,10 mL 为一管测定吸光度值。

表 1 响应面实验设计
Table 1 Responsive surface experimental design

实验水平	因素			
	A: 乙醇体积分数/%	B: 料液比(g/mL)	C: 超声时间/min	D: 超声温度/℃
-1	50	1:20	20	50
0	60	1:25	25	60
1	70	1:30	30	70

1.3.6 淡竹叶多酚纯度测定

参考干建松^[18]的方法,将洗脱液旋蒸浓缩后真空冷冻干燥,称取一定质量多酚纯化粉末(M_3)溶解,测定多酚含量(M_4),根据公式(6)计算多酚纯度。

$$\text{多酚纯度}/\% = \frac{M_4}{M_3} \times 100\% \quad (6)$$

1.3.7 淡竹叶多酚组分分析

色谱条件: WATERS C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1%甲酸, B 为乙腈; 洗脱条件: 0~0.5 min, 12%~100% B; 0.5~15.0 min, 100% B; 15.0~18.0 min, 100%~5% B; 18.0~20.0 min, 5% B。进样量 10 μL、流速 0.8 mL/min。质谱条件: 电负离子模式, 离子质量扫描范围为 40~1000 m/z ; 解吸气体的温度为 350℃, 解吸气体的流量为 11 L/min。毛细管电压设定为 3.5 kV, 锥体电压最高为 40 V。数据采集及分析采用 Analyst TF 1.8、SCIEX OS 软件。

1.3.8 多酚抗氧化活性的测定

(1) DPPH 自由基清除实验

参照干建松^[18]的方法,分别取 2 mL 多酚溶液及 1 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液混匀,避光反应 30 min,于 517 nm 处测定吸光度,空白组用等体积乙醇溶液代替。根据公式(7)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (7)$$

式中, A_1 —空白组吸光度; A_2 —样品组吸光度。

(2) ABTS 阳离子自由基清除实验

参照干建松^[18]的方法,配制 ABTS 溶液。取多酚溶液

与 ABTS 溶液混匀避光反应 10 min 后在 734 nm 处测定。

根据公式(7)计算 ABTS 阳离子自由基清除率。

1.4 数据处理

数据采用 SPSS Statistics 25 进行数据的计算, GraphPad Prism 8 进行作图,以均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

乙醇体积分数对多酚提取量的影响如图 1a 所示,随着乙醇体积分数的增加,多酚提取量呈现先逐渐升高后下降的趋势,当乙醇体积分数为 60%时淡竹叶多酚提取效果最佳,达到 7.80 mg/g。原因可能是不同的乙醇体积分数具有不同的极性,对多酚的溶解力也不同,而过大的乙醇体积分数导致多酚物质与溶剂的极性差增大,溶解性降低^[19];料液比对多酚提取量的影响如图 1b 所示,当料液比为 1:25 (g/mL)时多酚提取量上升到最大,为 7.76 mg/g。当料液比在 1:25~1:35 (g/mL)范围内,淡竹叶多酚提取量逐步下降。产生这种现象的原因可能随着溶剂增多,多酚溶出达到饱和且其他杂质的溶出率也会增大^[20];超声时间对多酚提取量的影响如图 1c 所示,超声时间为 25 min 时淡竹叶多酚提取量达到最大为 7.68 mg/g,随后呈下降趋势。原因可能是随着超声时间的增加,多酚在机械波和热效应的影响下不稳定被分解^[21];超声温度对多酚提取量的影响如图 1d 所示,随着温度升高,多酚提取量先升后降,当温度为 60℃时达到最大值为 7.80 mg/g。原因可能是过高的温

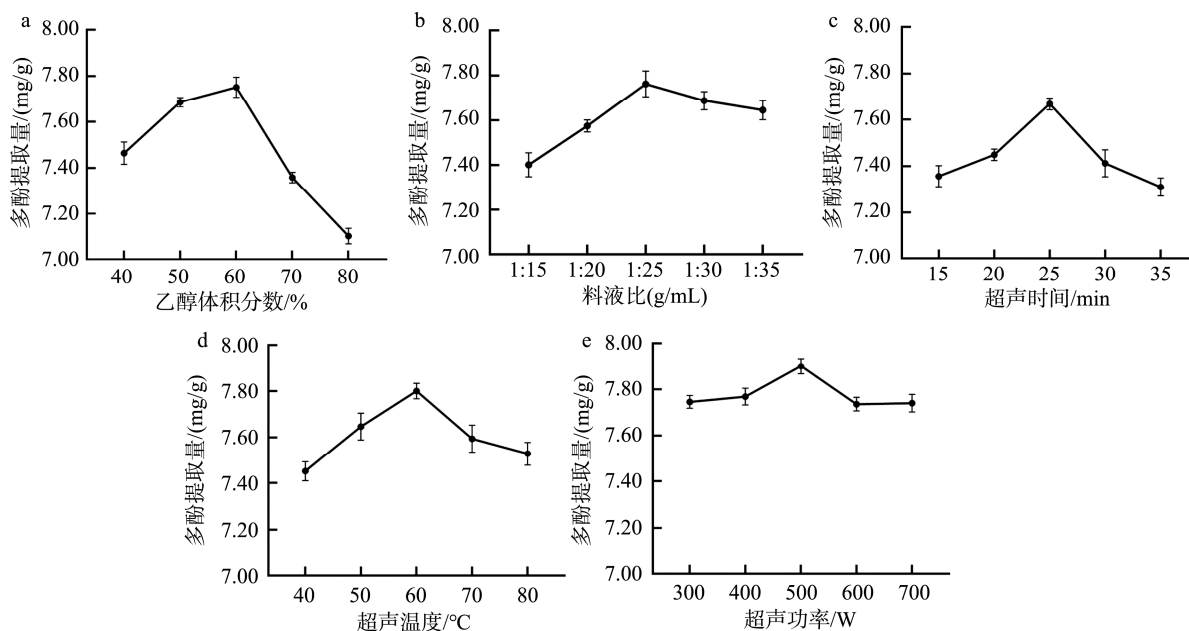


图1 乙醇体积分数(a)、料液比(b)、超声时间(c)、超声温度(d)、超声功率(e)对淡竹叶多酚提取量的影响

Fig.1 Effects of ethanol volume fraction (a), solid-liquid ratio (b), ultrasonic time (c), ultrasonic temperature (d), ultrasonic power (e) extraction amount of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn.

度使多酚氧化分解^[22-23], 超声功率对多酚提取量的影响如图 1e 所示, 功率为 500 W 时淡竹叶多酚提取量达到最大, 达到 7.88 mg/g。当超声功率超出 500 W 时, 淡竹叶多酚提取量呈下降趋势。原因可能是功率增加到 500 W 以上时, 超声波使多酚结构被破坏, 同时溶出的杂质也增多^[24-25]。

综上, 选取乙醇体积分数 60%、液料比 1:25 (g/mL)、超声时间 25 min、超声温度 60℃及超声功率 500 W 为单因素的最适值。

2.2 响应面实验结果分析

2.2.1 回归模型的建立与分析

根据表 2 选取 4 个实验因素。实验方案及结果如表 3 所示, 通过 Design-Expret 8.0.6.1 软件得到多元二次回归方程为: $Y=7.88-0.000667A-0.009667B-0.11C-0.092D+0.19AB-0.11AC+0.11AD+0.015BC+0.044BD-0.036CD-0.38A^2-0.43B^2-0.27C^2-0.51D^2$ 。如表 4 所示, 本研究模型 P 小于 0.0001, 失拟项 P 为 0.6672, R^2 为 0.9511, R^2_{adj} 为 0.9023, 证明该模型可靠、拟合度良好。 D 对多酚提取量影响显著($P<0.05$), C 、 AB 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对多酚提取量影响极显著($P<0.01$)。

2.2.2 两两因素交互作用分析

运用响应面回归方程模型和各因素交互作用三维曲面图进行分析, 响应面坡度越陡, 表明响应值对于条件的改变影响越大, 反之则越小^[26]。乙醇体积分数(A)、料液比(B)、超声时间(C)和超声温度(D)对响应值多酚提取量的影响如图 2 所示, 乙醇体积分数(A)和料液比(B)交互作用最为显著, 其他因素交互作用对多酚提取量的影响不显著, 这与方差分析结果一致。

表 2 单因素方差分析结果
Table 2 Analysis of variance results of single factor

因素	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
乙醇体积分数/%	45.386	<0.001	**
料液比(g/mL)	18.078	<0.001	**
超声温度/℃	21.493	<0.001	**
超声功率/W	4.292	0.028	*
超声时间/min	16.758	<0.001	**

注: *表示对结果影响显著($P<0.05$); **表示对结果影响极显著($P<0.01$), 表 4 同。

表 3 响应面实验结果与分析
Table 3 Experimental results and analysis of response surface method

实验号	因素				多酚提取量/(mg/g)
	<i>A</i> /%	<i>B</i> (g/mL)	<i>C</i> /min	<i>D</i> /℃	
1	60	1:25	25	60	7.91
2	60	1:20	25	70	6.82
3	70	1:20	25	60	6.94
4	60	1:30	20	60	7.32
5	60	1:30	30	60	7.14
6	70	1:30	25	60	7.32
7	60	1:30	25	70	6.80
8	70	1:25	25	70	7.04
9	60	1:30	25	50	6.97
10	50	1:30	25	60	6.80
11	60	1:20	25	50	7.17
12	60	1:20	20	60	7.29
13	70	1:25	30	60	6.90
14	50	1:25	30	60	7.19
15	50	1:25	20	60	7.33
16	60	1:20	30	60	7.06
17	60	1:25	20	50	7.19
18	70	1:25	25	50	6.90
19	50	1:20	25	60	7.17
20	60	1:25	25	60	7.91
21	60	1:25	20	70	7.04
22	60	1:25	25	60	8.06
23	60	1:25	25	60	7.77
24	60	1:25	30	50	7.19
25	60	1:25	30	70	6.90
26	50	1:25	25	70	6.90
27	60	1:25	25	60	7.77
28	50	1:25	25	50	7.19
29	70	1:25	20	60	7.48

表 4 回归模型方差分析表
Table 4 Analysis table of variance of regression model

项目	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	3.38	14	0.24	19.46	<0.0001	**
<i>A</i>	0.000005333	1	0.000005333	0.0004305	0.9837	
<i>B</i>	0.001121	1	0.001121	0.091	0.7680	
<i>C</i>	0.13	1	0.13	10.88	0.0053	**
<i>D</i>	0.10	1	0.10	8.26	0.0123	*
<i>AB</i>	0.14	1	0.14	11.41	0.0045	**
<i>AC</i>	0.048	1	0.048	3.84	0.0704	
<i>AD</i>	0.048	1	0.048	3.84	0.0704	

表 4(续)						
项目	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
<i>BC</i>	0.0009	1	0.0009	0.073	0.7915	
<i>BD</i>	0.007744	1	0.007744	0.63	0.4424	
<i>CD</i>	0.005184	1	0.005184	0.42	0.5282	
<i>A</i> ²	0.96	1	0.96	77.13	<0.0001	**
<i>B</i> ²	1.18	1	1.18	95.60	<0.0001	**
<i>C</i> ²	0.49	1	0.49	39.54	<0.0001	**
<i>D</i> ²	1.72	1	1.72	138.50	<0.0001	**
残项	0.17	14	0.012			
失拟项	0.11	10	0.011	0.77	0.6672	
纯误差	0.059	4	0.015			
总离差	3.55	28				

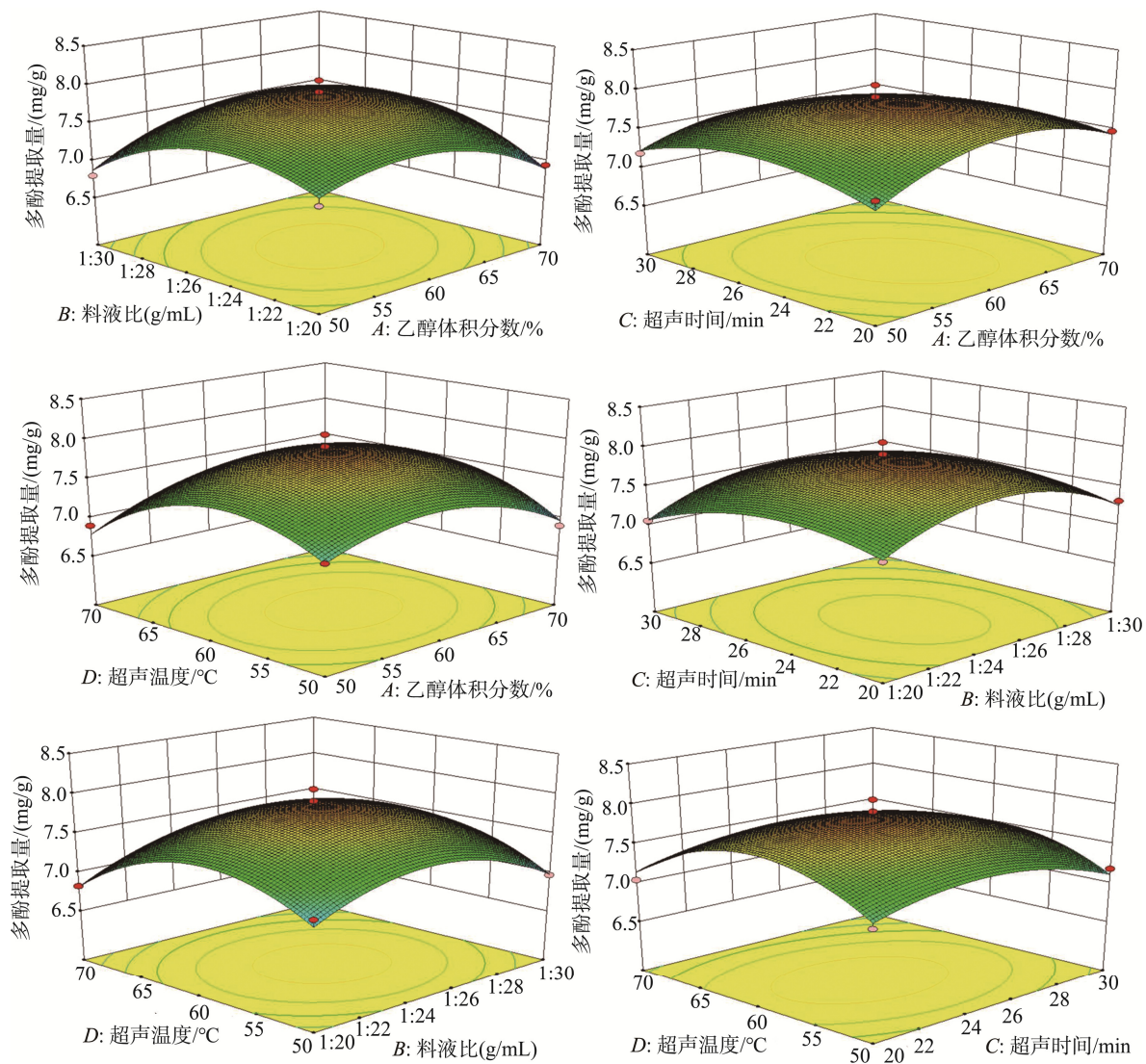


图 2 各因素交互作用对淡竹叶多酚含量的相互影响
Fig.2 Mutual influence of various factors on the content of polyphenols from *Lophatherum gracile* Brongn.

2.2.3 优化工艺验证

结合模型及回归方程, 得到响应面最佳条件为: 乙醇体积分数 60.10%、料液比 1:24.92 (g/mL)、超声时间 24.05 min、超声温度 59.17℃, 在此条件下多酚提取量为 7.90 mg/g。根据实际可操作性, 将最佳工艺调整为: 乙醇体积分数 60%、料液比 1:25 (g/mL)、超声时间 24 min、超声温度 59℃, 重复 3 次得到的多酚提取量为 (8.01±0.27) mg/g。实验测定值与理论预测值的偏差较小, 证明优化数据具有可行性, 该条件确定为最佳工艺条件。

2.3 淡竹叶多酚的纯化

2.3.1 大孔树脂的筛选

如表 5 所示, 7 种不同型号大孔树脂中 NKA-2 型、D101 型及 AB-8 型的吸附率最佳, 且三者间差异显著($P<0.05$), CAD-40 型、HPD100 型及 D101 型大孔树脂的解吸率最佳, 且三者间差异显著($P<0.05$), 综合选择最佳纯化大孔树脂为 D101 型。

2.3.2 大孔树脂静态吸附解吸动力曲线

由图 3 可知, D101 型大孔树脂对淡竹叶多酚的吸附量在 0~30 min 时, 随着时间的增加吸附量迅速增加, 30 min 后, D101 大孔树脂对淡竹叶多酚的吸附量达到最大, 且趋于平衡。D101 型大孔树脂对淡竹叶多酚的解吸率在 0~30 min 时, 迅速增加, 30 min 后达到平衡。因此, 30 min 为 D101 大孔树脂最佳静态吸附解吸时间。

2.3.3 上样质量浓度的确定

研究不同上样质量浓度(4、5、6、7、8 mg/mL)对大孔树脂吸附量的影响。随着质量浓度升高, 吸附量呈先升后降趋势, 当淡竹叶多酚上样质量浓度为 6 mg/mL 时, 大孔树脂吸附量达到最大值为 74.29 mg/g。这可能是因为浓度过高会使样液在树脂中产生积絮和沉淀, 影响多酚在溶液和树脂中的扩散, 造成树脂堵塞^[27]。因此后续大孔树脂吸附条件为上样质量浓度 6 mg/mL。

表 5 7 种树脂静态吸附洗脱结果
Table 5 Static adsorption elution results of 7 kinds of resins

树脂型号	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解吸量/(mg/g)	解吸率/%
D101	78.27±0.52 ^b	39.14±0.26 ^b	27.38±0.10 ^b	34.98±0.09 ^c
HPD100	67.37±1.12 ^c	33.68±0.55 ^c	28.56±0.56 ^a	42.39±0.13 ^b
NKA-9	71.00±1.00 ^d	35.50±0.50 ^d	23.76±0.26 ^d	33.47±0.10 ^c
AB-8	75.64±0.39 ^c	37.82±0.19 ^c	25.51±0.51 ^c	33.72±0.51 ^c
NKA-2	89.17±0.19 ^a	44.59±0.09 ^a	24.64±0.14 ^c	27.63±0.10 ^f
CAD-40	49.20±0.25 ^f	24.60±0.13 ^f	23.76±0.51 ^e	48.30±0.85 ^a
DA201	74.64±0.39 ^c	37.32±0.19 ^c	23.33±0.33 ^c	31.26±0.28 ^d

注: 同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

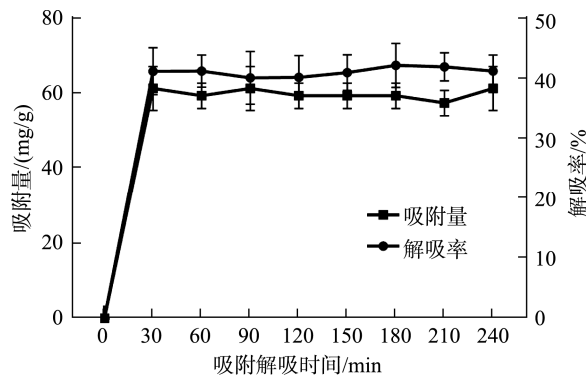


图 3 D101 大孔树脂静态吸附解吸曲线
Fig.3 Static adsorption and desorption kinetics curve of D101 resin

2.3.4 pH 的选择

研究不同的上样液 pH (2、3、4、5、6)对大孔树脂吸附量的影响。随着 pH 升高, 吸附量呈先升后降趋势, 当淡竹叶多酚 pH 为 4 时, 大孔树脂吸附量达到最大, 达到 75.39 mg/g。这可能是因为多酚有大量酚羟基, 呈弱酸性, 多酚在弱酸性条件下以分子状态存在^[27]。因此后续大孔树

脂吸附条件最佳 pH 为 4。

2.3.5 乙醇体积分数的确定

研究不同乙醇体积分数(50%、60%、70%、80%、90%)对大孔树脂解吸率的影响。乙醇体积分数为 70%时大孔树脂解吸率达到最大, 达到 63.44%。当乙醇的体积分数超出 70%时, 大孔树脂解吸率与乙醇体积分数成反比。原因可能是乙醇浓度过大, 导致极性改变, 破坏了对多酚结构。因此后续解吸液的最佳乙醇体积分数为 70%。

2.3.6 上样流速的选择

如图 4 所示, 上样流速越快, 泄漏点出现越早。当流出液多酚质量浓度为上样浓度的 1/10 时即到达泄露点。上样流速分别是 1、2、3 mL/min 时, 泄漏点依次出现在 100、80、60 mL 附近。高速流速下, 多酚没被吸附完全就流出。而低流速虽然会使多酚充分吸附, 但效率低, 吸附时间长。因此, 上样流速选择 2 mL/min。

2.3.7 洗脱液体积的确定

用浓度为 70%的乙醇溶液以 2 mL/min 的流速对大孔树脂进行洗脱, 解吸体积在 10~50 mL 时, 淡竹叶多酚质量

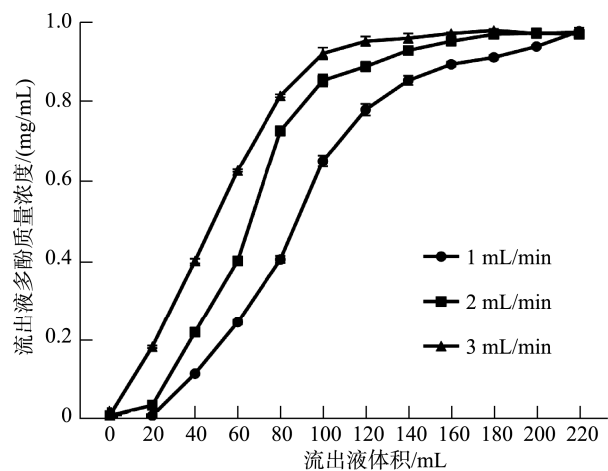


图 4 上样流速的确定

Fig.4 Determination of the flow rate of the load out

浓度快速上升。洗脱体积大于 50 mL 时, 淡竹叶多酚质量浓度下降趋势明显, 在 90 mL 时, 淡竹叶多酚几乎洗脱完全。因此, 洗脱液体积选择 90 mL。

2.3.8 纯化后多酚含量结果

将得到的淡竹叶多酚纯化液冷冻干燥成粉末, 经过公式计算出多酚纯度, 纯度由 12.86%提高到 76.18%, 纯化效果较好。

2.4 淡竹叶多酚的组分分析结果

采用高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)测定淡竹叶多酚成分, 主要酚类物质为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、5-O-对香豆酰基奎宁酸、3-O-对香豆酰基奎宁酸、4-O-对香豆酰基奎宁酸、阿魏酰奎尼酸、异荭草素、牡荆素、木犀草素-7-O-β-D 吡喃葡萄糖苷-6-C-α-L 阿拉伯吡喃糖苷、东方素、异牡荆素、日当药黄素、三胞苷-7-葡萄糖苷、阿福豆苷、木犀草素, 共 16 种, 详见表 6。

2.5 多酚抗氧化活性测定结果

DPPH 是一种相对稳定的自由基供体, 被广泛用于测定天然抗氧化剂或植物提取物的体外抗氧化活性^[30]。而 ABTS 阳离子法适用范围广, 几乎可以与所有亲油性和亲水性抗氧化剂发生快速反应, 具有快速可靠的优点^[31]。DPPH 自由基(图 5a)及 ABTS 阳离子自由基(图 5b)的清除能力随浓度呈正相关, 这表明淡竹叶多酚溶液具有较好抗氧化能力。其中多酚粗提物组活性较低, 而纯化后多酚抗氧化活性明显上升, 与 VC 清除能力结果相近, 说明多酚粗提物经过 D101 树脂纯化后, 使得多酚的纯度增加, 抗氧化活性增强。

表 6 淡竹叶中多酚成分的鉴定结果

Table 6 Identification results of polyphenol components in *Lophatherum gracile* Brongn.

保留时间/min	分子式	成分名称	质荷比(<i>m/z</i>)	离子碎片	偏差/ppm	参考文献
1.72	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸	353.088	191,119,163,173	2.6	[28–29]
1.88	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	5-O-对香豆酰基奎宁酸	337.093	191,163	2.8	[29]
3.05	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	353.088	173,135,191,179	3.3	[29]
3.19	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	3-O-对香豆酰基奎宁酸	337.093	173,119,163,93	2.1	[28]
3.25	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	隐绿原酸	353.088	173,135,191,179	3.4	[29]
3.52	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	4-O-对香豆酰基奎宁酸	337.093	173,119,163,93	2.4	[29]
3.72	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	阿魏酰奎尼酸	367.103	173,134,193	3.1	[29]
5.09	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	异荭草素	447.093	357,327,297,299	3.4	[29]
5.59	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	牡荆素	431.098	311,283,341	3.7	[29]
5.62	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷-6-C-α-L-阿拉伯吡喃糖苷	579.135	579,459,399,369	2.4	[29]
5.85	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	东方素	447.093	285,284,447,327	3.1	[29]
6.43	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	异牡荆素	431.098	269,268,431,311	3.9	[29]
6.52	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	日当药黄素	461.108	461,446,283,298	3.2	[29]
6.69	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	三胞苷-7-葡萄糖苷	491.118	491,476,461,313	3.5	[29]
6.77	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	阿福豆苷	431.098	284,285,311,255	3.8	[29]
7.81	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	285.041	285,133,151	1.1	[29]

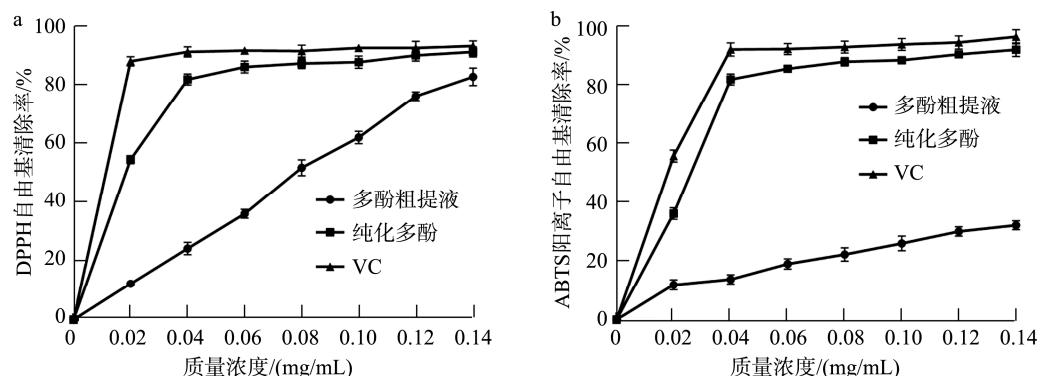


图5 淡竹叶多酚抗氧化能力分析

Fig.5 Analysis of antioxidant capacities of polyphenol in *Lophatherum gracile* Brongn.

3 结论

响应面法具有系统、实用、适用广泛等优点,因此通过响应面法得到最佳提取工艺,其多酚提取量为 8.01 mg/g。选取 D101 大孔树脂为多酚纯化最佳型号,通过静态及动态吸附解吸实验确定淡竹叶多酚纯化最佳工艺,纯化后的淡竹叶多酚纯度由 12.86% 提高到 76.18%,证明淡竹叶多酚提取纯化工艺的可行性。

植物多酚在植物中普遍存在,已成为天然抗氧化剂的主要来源^[32]。淡竹叶中含有丰富的酚类物质,本研究通过 HPLC-MS 鉴定出 16 种淡竹叶多酚成分,分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、5-O-对香豆酰基奎宁酸、3-O-对香豆酰基奎宁酸、4-O-对香豆酰基奎宁酸、阿魏酰奎宁酸、异荭草素、牡荆素、木犀草素-7-O- β -D 吡喃葡萄糖苷-6-C- α -L 阿拉伯吡喃糖苷、东方素、异牡荆素、日当药黄素、三胞苷-7-葡萄糖苷、阿福豆苷、木犀草素,这为后续进一步阐述功能活性作用机制提供了物质研究基础。同时本研究发现淡竹叶多酚具有显著的体外抗氧化活性,并与浓度呈正相关,且经纯化后的多酚抗氧化活性得到进一步提高。综上,本研究明确了淡竹叶多酚提取纯化工艺、组成成分及抗氧化活性,但抗氧化活性的验证仅局限于体外实验,后续应进一步探讨淡竹叶多酚的体内抗氧化活性,以为淡竹叶多酚的开发利用提供理论基础。

参考文献

- [1] 樊华, 刘夫国, 王玉堂, 等. 球磨联合碱辅助酶法改善淡竹叶水溶性膳食纤维的物化和功能特性[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 74–82.
- [2] KIM A, IM M, GU MJ, *et al.* Ethanol extract of *Lophatheri herba* exhibits anti-cancer activity in human cancer cells by suppression of metastatic and angiogenic potential [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36277.
- [3] 焦坤. 淡竹叶化学成分的分析方法研究进展[J]. 广州化工, 2017, 45(19): 20–21.
- [4] JIAO K. Research progress on chemical constituents analysis in *Lophatherum gracile* Brongn. [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2017, 45(19): 20–21.
- [5] WANG L, GUO H, WANG J, *et al.* Effects of herba lophatheri extract on the physicochemical properties and biological activities of the chitosan film [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 133: 51–57.
- [6] 徐雨生, 廖川江, 申科, 等. 植物多酚的功效及其作用机理综述[J]. 普洱学院学报, 2021, 37(3): 6–9.
- [7] XU YS, LIAO CJ, SHEN K, *et al.* A review of the efficacy and mechanism of plant polyphenols [J]. *J Puer Univ*, 2021, 37(3): 6–9.
- [8] ZHANG X, LI Z, YANG P, *et al.* Polyphenol scaffolds in tissue engineering [J]. *Mater Horiz*, 2021, 8(1): 145–167.
- [9] 马薇薇, 郑晓娇, 刘荣艳, 等. 加速溶剂萃取法提取小米多酚及其组分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(20): 279–286.
- [10] MA WW, ZHENG XJ, LIU RY, *et al.* Extraction of millet polyphenols by accelerated solvent extraction and analysis of components of millet polyphenols [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(20): 279–286.
- [11] 王萍, 刘慧, 付湘晋, 等. 13 种植物多酚提取物抗氧化活性分析及其对冻藏未漂洗鱼糜品质的影响研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(16): 50–56.
- [12] WANG P, LIU H, FU XJ, *et al.* Study on the analysis of antioxidant activity of 13 kinds of plant polyphenol extracts and its effect on the quality of frozen unwashed surimi [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(16): 50–56.
- [13] SRIDHAR A, PONNUCHAMY M, KUMAR PS, *et al.* Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: A review [J]. *Environ Chem Lett*, 2021, 19(4): 3409–3443.
- [14] GOMEZ BLP, CABRAL EM, ZHAO M, *et al.* Comparison study of an optimized ultrasound-based method versus an optimized conventional method for agar extraction, and protein co-extraction, from gelidium sesquipedale [J]. *Foods*, 2022. DOI: 10.3390/foods11060805
- [15] OROIAN M, URSACHI F, DRANCA F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from crude pollen [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(4): 1.
- [16] 伊娟娟, 左丽丽, 王振宇. 植物多酚的分离纯化及抗氧化、降脂降糖功能研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 391–395, 399.

- YIN JJ, ZUO LL, WANG ZY. Research of separation and purification of plant polyphenols and their antioxidant, lipid-lowering, hypoglycemic function [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(19): 391–395, 399.
- [13] 王跃生, 王洋. 大孔吸附树脂研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2006, (12): 961–965.
- WANG YS, WANG Y. Research progress of macroporous adsorption resin [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2006, (12): 961–965.
- [14] WANG X, WANG S, HUANG S, *et al*. Purification of polyphenols from distiller's grains by macroporous resin and analysis of the polyphenolic components [J]. *Molecules*, 2019. DOI: 10.3390/molecules24071284
- [15] 孟令志, 王佳慧, 王甄洁, 等. 余甘子多酚纯化工艺研究及组分分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(21): 147–153.
- MENG LZ, WANG JH, WANG ZJ, *et al*. Purification technology and component analysis of polyphenols from *Phyllanthus emblica* L. [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(21): 147–153.
- [16] 李坪. 玫瑰花多酚提取、分离纯化及其生物活性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2022.
- LI P. Extraction, separation, purification and biological activity of rose polyphenols [D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2022.
- [17] 袁欢, 彭莉莎, 孙梦瑶, 等. 大孔树脂对二角菱壳多酚的吸附及解吸性能研究[J]. *食品与机械*, 2021, 37(4): 47–52.
- YUAN H, PENG LS, SUN MY, *et al*. Study on absorption and desorption properties of macroporous resin for pericarps of *Trapa bispinosa* Roxb. [J]. *Food Mach*, 2021, 37(4): 47–52.
- [18] 干建松. 荸荠皮多酚的纯化与抗氧化性、稳定性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(17): 27–33.
- GAN JS. Purification, antioxidation and stability of eleocharis tuberosa peel polyphenols [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(17): 27–33.
- [19] 吕佳玮, 王颀, 刘亚琼, 等. 沙棘多酚提取纯化工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(3): 108–114.
- LV JW, WANG J, LIU YQ, *et al*. Study on extraction and purification process of sea buckthorn polyphenols [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(3): 108–114.
- [20] DASDEMIR Y, FINDIK BT, YILDIZ H, *et al*. Blueberry-added black tea: Effects of infusion temperature, drying method, fruit concentration on the iron-polyphenol complex formation, polyphenols profile, antioxidant activity, and sensory properties [J]. *Food Chem*, 2023, 410: 135463.
- [21] MOUSAVI SE, HATAMIPOUR MS, YEGDANEH A. Ultrasound-assisted extraction of alginic acid from *Sargassum angustifolium* harvested from persian gulf shores using response surface methodology [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 226: 660–669.
- [22] ISMAIL BB, GUO M, PU Y, *et al*. Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods [J]. *Ultrason Sonochem*, 2019, 52: 257–267.
- [23] ZHOU Y, ZHENG J, GAN RY, *et al*. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants from the mung bean coat [J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 638.
- [24] BALASOORIYA HN, DASSANAYAKE KB, SENEWEERA S, *et al*. Impact of elevated carbon dioxide and temperature on strawberry polyphenols [J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(10): 4659–4669.
- [25] NANDASIRI R, ESKIN NAM, THIYAM-HOLLANDER U. Antioxidative polyphenols of canola meal extracted by high pressure: Impact of temperature and solvents [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(11): 3117–3128.
- [26] 张敏君, 段雪伟, 王燕, 等. 构树根皮活性成分乙醇提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(11): 196–203.
- ZHANG MJ, DUAN XW, WANG Y, *et al*. Optimization of ethanol extraction process for active components from *Broussonetia papyrifera* root bark and its antioxidant activity [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(11): 196–203.
- [27] UMEOGUJU FU, AKANINWOR JO, ESSIEB EB, *et al*. Macroporous adsorptive resin-assisted enrichment of polyphenol from *Psidium guajava* leaves improved its *in vitro* antioxidant and anti-hemolytic properties [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2022, 1: 1–8.
- [28] MA YL, WU ZF, LI Z, *et al*. *In vitro* digestibility and hepato-protective potential of *Lophatherum gracile* Brongn. leave extract [J]. *Food Chem*, 2024, 433: 137336.
- [29] LIU XK, WANG Y, GE W, *et al*. Spectrum-effect relationship between ultra-high-performance liquid chromatography fingerprints and antioxidant activities of *Lophatherum gracile* Brongn. [J]. *Food Sci Nutr*, 2022, 10(5): 1592–1601.
- [30] IONITA P. The chemistry of DPPH· free radical and congeners [J]. *Int J Molecul Sci*, 2021, 22(4): 1545.
- [31] DAWIDOWICZ AL, OLSZOWY M. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay [J]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236: 1099–1105.
- [32] 杨恬, 张忠, 秦潇潇, 等. 基于新型互作模型的多酚不同羟基的抗氧化性评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(22): 7422–7430.
- YANG T, ZHANG Z, QIN XX, *et al*. Antioxidative evaluation of different hydroxyl groups of polyphenols based on a novel interaction model [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(22): 7422–7430.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



周文月, 硕士研究生, 主要研究方向为天然产物活性研究。

E-mail: zhouwenyue529@163.com



时 政, 博士, 教授, 主要研究方向为天然产物活性研究。

E-mail: drshiz1002@hotmail.com