

- Cancer, 2015, 15: 682.
- [7] Zhao J, Li Y L, Gao J F, et al. Hesperidin inhibits ovarian cancer cell viability through endoplasmic reticulum stress signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5569-5574.
- [8] 陈平, 樊瑞胜, 聂芊. 水溶性橙皮苷的合成及结构表征[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 143-147.
- [9] Gu S F, Wang L Y, Tian Y J, et al. Enhanced water solubility, antioxidant activity, and oral absorption of hesperetin by D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate and phosphatidylcholine[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(3): 273-281.
- [10] 刘蒸生, 郝海军, 范明松. 槲皮素磷脂复合物固体分散体和固体分散体的制备及评价[J]. *中国药学(英文版)*, 2019, 28(12): 868-877.
- [11] 徐新荣, 于海涛, 李敏, 等. 槲皮素磷脂复合物固体分散体增强对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(4): 775-778.
- [12] 刘蒸生, 郝海军, 马进安. 高乌甲素磷脂复合物及其固体分散体在大鼠体内的药动学[J]. *医药导报*, 2018, 37(4): 449-452.
- [13] 张铁山, 尚曙玉, 王聪颖, 等. 2种斯皮诺素固体分散体的制备及其体内药动学行为[J]. *中成药*, 2019, 41(9): 2025-2029.
- [14] 相聪坤, 温俊霞, 闫宝环, 等. 陈皮汤中橙皮苷大鼠体内药动学分析方法的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(18): 1542-1546.
- [15] 陆振举, 刘怡. 尼莫地平固体分散体的制备及其理化性质表征[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(12): 1786-1791.
- [16] 刘丹, 于丽红, 李磊. 提高白藜芦醇生物利用度的制剂策略[J]. *医药导报*, 2018, 37(3): 333-337.
- [17] 李强强, 王凯, 薛晓峰, 等. 黄酮类化合物磷脂复合物的制备与功能活性研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(1): 132-137.
- [18] 邓向涛, 郝海军, 贾幼智, 等. 葛根素磷脂复合物及其固体分散体的药代动力学及生物利用度研究[J]. *中药材*, 2015, 38(9): 1974-1976.
- [19] 吴先闯, 郝海军, 张永州, 等. 姜黄素磷脂复合物不同制剂对SD大鼠口服生物利用度的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(10): 2163-2166.
- [20] 付金芳, 高青, 胡瑞瑞, 等. 蒙花苷磷脂复合物的制备及其药动学评价[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(16): 2039-2043.
- [21] Singh C, Bhatt T D, Gill M S, et al. Novel rifampicin-phospholipid complex for tubercular therapy: synthesis, physicochemical characterization and *in vivo* evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2014, 460(1-2): 220-227.
- [22] 陈彦, 王晋艳, 贾晓斌, 等. 枳实中主要二氢黄酮类成分肠道吸收代谢及与药物相互作用的研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1564-1566.

## 蛋白桑叶多酚提取工艺的优化及其抗氧化、抑菌活性

陈向阳<sup>1</sup>, 穆爱洁<sup>1</sup>, 汪蒙蒙<sup>1</sup>, 付婕妤<sup>1</sup>, 陈永霞<sup>2</sup>, 王卫东<sup>3</sup>, 吴永祥<sup>1\*</sup>

(1. 黄山学院生命与环境科学学院, 安徽 黄山 245041; 2. 黄山祁弘韵蛋白桑农业科技有限公司, 安徽 黄山 245612; 3. 黄山峰源生物科技有限公司, 安徽 黄山 245600)

**摘要:** 目的 优化蛋白桑叶多酚提取工艺, 并评价其抗氧化、抑菌活性。方法 在单因素试验基础上, 以十二烷基硫酸钠(SDS)用量、超声功率、超声温度、乙醇体积分数为影响因素, 多酚含量为评价指标, 响应面法优化提取工艺。研究多酚还原能力、ABTS 自由基清除能力, 并检测其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌的抑制作用。结果 最佳条件为超声时间 15 min, 料液比 1:25, SDS 用量 0.34%, 超声功率 250 W, 超声温度 60 ℃, 乙醇体积分数 50%, 多酚质量分数达 15.11 mg/g。多酚还原能力、ABTS 自由基清除能力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.116、0.014 mg/mL, MIC 值为 0.2 mg/mL (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌) 或 0.4 mg/mL (普通变形杆菌、绿脓杆菌)。结论 该方法合理可行, 可用于提取抗氧化、抑菌活性较强的蛋白桑叶多酚。

**关键词:** 蛋白桑叶; 多酚; 提取; 抗氧化活性; 抑菌活性; 响应面法

**中图分类号:** R284.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2020)09-2259-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.003

**收稿日期:** 2020-03-12

**基金项目:** 安徽省高校优秀青年骨干人才国内访问研究项目(gxgnfx2019037); 安徽省校企合作实践教育基地项目(2019sjjd54); 横向课题项目(hxkt20180034, hxkt20190037); 黄山学院大学生创新创业项目(S201910375027, S202010375009X)

**作者简介:** 陈向阳(1970—), 男, 硕士, 副教授, 从事中草药化学成分与药理研究。Tel: 13855969819, E-mail: cxy@hsu.edu.cn

\* **通信作者:** 吴永祥(1987—), 男, 博士, 副教授, 从事天然植物资源功效成分分离鉴定及资源综合利用研究。E-mail: wyx2009sun@aliyun.com

# Extraction process optimization and anti-oxidant, anti-bacterial activities of polyphenols from *Morus alba* leaves

CHEN Xiang-yang<sup>1</sup>, MU Ai-jie<sup>1</sup>, WANG Meng-meng<sup>1</sup>, FU Jie-yu<sup>1</sup>, CHEN Yong-xia<sup>2</sup>,  
WANG Wei-dong<sup>3</sup>, WU Yong-xiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China; 2. Huangshan Qihongyun Danbaisang Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Huangshan 245612, China; 3. Huangshan Fengyuan Biological Science and Technology Co., Ltd., Huangshan 245600, China)

**ABSTRACT: AIM** To optimize the extraction process for polyphenols from *Morus alba* leaves and to evaluate their anti-oxidant, anti-bacterial activities. **METHODS** With sodium dodecyl sulfate (SDS) consumption, ultrasonic power, ultrasonic temperature and ethanol concentration as influencing factors, polyphenols yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by response surface method on the basis of single factor test. The reducing capacity and ABTS free radical scavenging capacity of polyphenols were studied, along with the detection of their effects on inhibiting *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 15 min for ultrasonic time, 1 : 25 for solid-liquid ratio, 0.34% for SDS consumption, 250 W for ultrasonic power, 60 °C for ultrasonic temperature, and 50% for ethanol concentration, the polyphenols mass fraction reached 15.11 mg/g. The reducing capacity, ABTS free radical scavenging capacity of polyphenols demonstrated the IC<sub>50</sub> values of 0.116, 0.014 mg/mL, respectively, along with the MIC value of 0.2 mg/mL (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) or 0.4 mg/mL (*P. vulgaris*, *P. aeruginosa*). **CONCLUSION** This reasonable and feasible method can be used for the extraction of polyphenols with strong anti-oxidant, anti-bacterial activities from *M. alba* leaves.

**KEY WORDS:** *Morus alba* leaves; polyphenols; extraction; anti-oxidant activity; anti-bacterial activity; response surface method

蛋白桑 *Morus alba* L. 又称饲料桑, 是我国经过长期选育、改良、优化的新型品种, 具有区域适应性和抗逆性强、产量高等优点, 已在许多地区得到大力推广<sup>[1]</sup>。桑叶主要化学成分包括多糖、生物碱、多酚、黄酮等<sup>[2-3]</sup>, 具有抗氧化、抗炎、降血糖、抑制胰脂肪酶等多种生物活性<sup>[4-6]</sup>, 其中多酚是一种非常重要的次生代谢产物<sup>[7]</sup>, 目前已有关于该成分提取工艺的报道<sup>[8-10]</sup>。但目前国内外学者都是基于单一的溶剂法或超声法提取蛋白桑叶多酚, 尚未利用表面活性剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 的增溶作用来协同超声提取, 而且缺少药理作用的研究。因此, 本实验优化蛋白桑叶多酚的提取工艺, 并评价其抗氧化、抑菌活性, 以期为该资源综合利用提供依据。

## 1 材料

1.1 试剂与药物 蛋白桑叶由黄山祁弘韵蛋白桑农业科技有限公司提供, 于2018年10月采自安徽省祁门县闪里镇, 经黄山学院生命与环境科学学院胡长玉教授鉴定为桑属桑科植物蛋白桑 *Morus alba* L.

的叶。福林酚试剂、十二烷基硫酸钠 (SDS)、丹宁酸、维生素C、DPPH、ABTS等 (美国Sigma公司); 蛋白胨、牛肉膏、琼脂 (北京陆桥技术股份有限公司)。

1.2 仪器 SQ510C型高压灭菌器 (重庆雅马拓科技有限公司); SpectraMax-190型全波长酶标仪 (美国Molecular Devices公司); SCQ-5201C型数控加热功率可调型超声波清洗器 (上海声彦超声波仪器有限公司)。

## 2 方法与结果

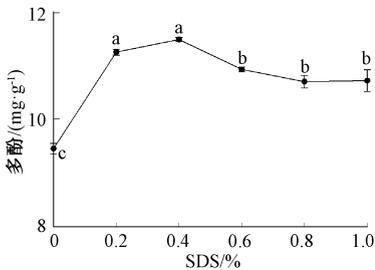
2.1 多酚提取物制备 取干燥蛋白桑叶粉末2.0 g, 按照1 : 15料液比加入0.6% SDS、60%乙醇, 调节超声温度50 °C, 超声功率200 W, 超声时间10 min, 将提取液置于离心管中, 3 000 r/min离心15 min, 取上清液浓缩, 即得。

2.2 多酚含量测定 参考文献 [11] 方法, 并作适当修改。精密配制25、50、75、100、150 μg/mL单宁酸对照品溶液, 各取0.05 mL, 与0.05 mL福林酚试剂 (0.25 mol/L) 一同置于1.75 mL离心管中混

合反应 3 min, 加入 1 mL 碳酸钠溶液 (0.7 mol/L), 室温下静置 1 h 后显色, 精密吸取 0.2 mL 反应液, 置于酶标仪上, 在 750 nm 波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 吸光度为纵坐标 ( $A$ ) 进行回归, 得方程为  $A=0.0017X+0.0068$  ( $R^2=0.9980$ ), 在 25~150  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好。根据上述方程, 测定多酚含量。

### 2.3 单因素试验

**2.3.1 SDS 用量** 固定乙醇体积分数 60%、料液比 1:15、超声温度 50  $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 200 W、超声时间 10 min, 考察 SDS 用量 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 对多酚含量的影响, 结果见图 1。由此可知, SDS 用量小于 0.4% 时多酚含量随着其增加而升高, 在 0.4% 时达到最大值, 为  $(11.49\pm 0.04)$  mg/g, 与未加 SDS 比较差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); SDS 用量大于 0.4% 时多酚含量反而略有降低, 可能是其达到临界胶束浓度后对该成分增溶作用的影响不大, 但对其他杂质影响较明显<sup>[12]</sup>。因此, 选择 SDS 用量为 0.2%~0.6%。

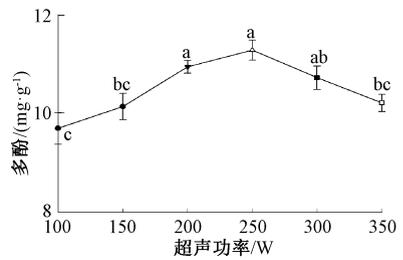


注: 不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

图 1 SDS 用量对多酚含量的影响

Fig. 1 Effects of SDS consumption on polyphenols content

**2.3.2 超声功率** 固定乙醇体积分数 60%、料液比 1:15、SDS 用量 0.6%、超声温度 50  $^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 10 min, 考察超声功率 100、150、200、250、300、350 W 对多酚含量的影响, 结果见图 2。由此可知, 超声功率 100~250 W 时多酚含量随着其增加而升高, 在 250 W 时达到最大值, 为  $(11.28\pm 0.20)$  mg/g, 与 100、150、200 W 比较差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 超声功率大于 250 W 时多酚含量反而呈降低趋势, 可能是功率过高会使该成分发生分解<sup>[13]</sup>。因此, 选择超声功率为 200~300 W。

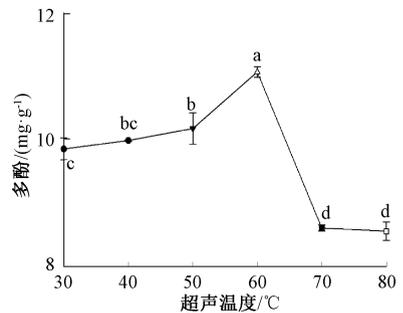


注: 不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

图 2 超声功率对多酚含量的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on polyphenols content

**2.3.3 超声温度** 固定乙醇体积分数 60%、料液比 1:15、SDS 用量 0.6%、超声功率 200 W、超声时间 10 min, 考察超声温度 30、40、50、60、70、80  $^{\circ}\text{C}$  对多酚含量的影响, 结果见图 3。由此可知, 提取温度 60  $^{\circ}\text{C}$  时多酚含量达到最大值, 为  $(11.07\pm 0.08)$  mg/g, 与 30、40、50  $^{\circ}\text{C}$  比较差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 提取温度高于 60  $^{\circ}\text{C}$  时多酚含量反而明显降低 ( $P<0.05$ ), 可能是高温会影响超声空化效果, 而且可引起该成分发生分解<sup>[14]</sup>。因此, 选择超声温度为 50~70  $^{\circ}\text{C}$ 。



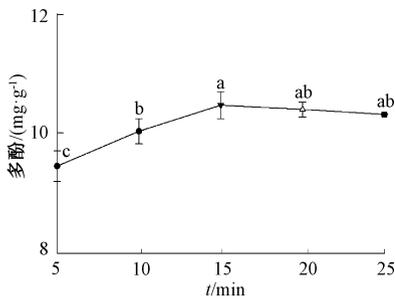
注: 不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

图 3 超声温度对多酚含量的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic temperature on polyphenols content

**2.3.4 超声时间** 固定乙醇体积分数 60%、料液比 1:15、SDS 用量 0.6%、超声温度 50  $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 200 W, 考察超声时间 5、10、15、20、25 min 对多酚含量的影响, 结果见图 4。由此可知, 超声时间 5~15 min 时多酚含量随着其延长而升高, 在 15 min 时达到最大值, 为  $(10.47\pm 0.23)$  mg/g, 与 5、10 min 比较差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 超声时间大于 15 min 时多酚含量反而略有降低, 可能是长时间超声振动会破坏该

成分结构<sup>[15]</sup>。因此,选择超声时间为15 min,并且不进行后续考察。

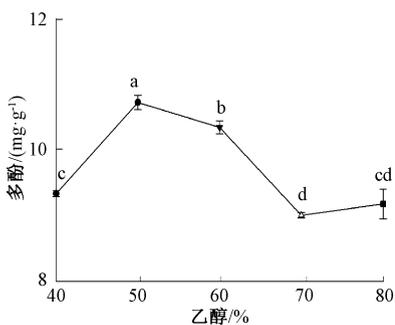


注:不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

图4 超声时间对多酚含量的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic time on polyphenols content

2.3.5 乙醇体积分数 固定料液比1:15、SDS用量0.6%、超声温度50℃、超声功率200W、超声时间10 min,考察乙醇体积分数40%、50%、60%、70%、80%对多酚含量的影响,结果见图5。由此可知,乙醇体积分数40%~50%时多酚含量随着其增加而升高,在50%时达到最大值,为(10.73±0.11) mg/g,与40%比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );乙醇体积分数大于50%时多酚含量反而降低,可能是乙醇体积分数过高会使蛋白质等大分子变性沉淀,阻碍该成分从组织细胞向溶剂的扩散<sup>[16]</sup>。因此,选择乙醇体积分数为40%~60%。



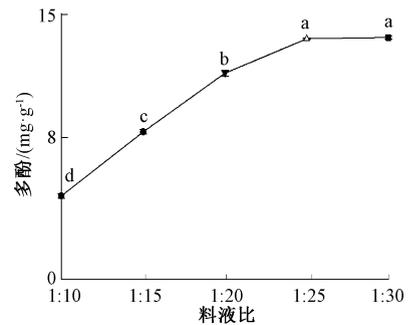
注:不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

图5 乙醇体积分数对多酚含量的影响

Fig. 5 Effect of ethanol concentration on polyphenols content

2.3.6 料液比 固定乙醇体积分数60%、SDS用量0.6%、超声温度50℃、超声功率200W、超声时间10 min,考察料液比1:10、1:15、1:20、

1:25、1:30对多酚含量的影响,结果见图6。由此可知,料液比为1:25时多酚含量达到最大值,为(13.58±0.05) mg/g,与1:10、1:15、1:20比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),表明随着溶剂用量升高该成分与溶剂的接触面积增加,有利于其溶出,而扩散达到平衡后提取量不再升高<sup>[17]</sup>。因此,从浓缩成本考虑,选择料液比为1:25,并且不进行后续考察。



注:不同小写字母表示对应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),同一小写字母表示其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

图6 料液比对多酚含量的影响

Fig. 6 Effect of solid-liquid ratio on polyphenols content

2.4 响应面法 在单因素试验基础上,选择SDS用量(A)、超声功率(B)、超声温度(C)、乙醇体积分数(D)作为影响因素,多酚含量(Y)作为评价指标,采用4因素3水平响应面法优化提取工艺。因素水平见表1,结果见表2。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A SDS/%	B 超声功率/W	C 超声温度/℃	D 乙醇/%
-1	0.2	200	50	40
0	0.4	250	60	50
1	0.6	300	70	60

对表2数据进行拟合,得到多元回归方程为  $Y = 15.41 - 0.36A + 0.16B + 0.12C - 0.12D + 0.27AB + 0.20AC - 0.30AD + 0.31BC + 0.28BD + 0.15CD - 0.54A^2 - 0.32B^2 - 0.74C^2 - 0.44D^2$ ,方差分析见表3。由此可知,模型  $P < 0.0001$ ,表明模型达到极显著水平;失拟项  $P > 0.05$ ,表明未知因素对结果影响较小;  $R^2$  为0.9168,  $R^2_{Adj}$  为0.8336,表明模型拟合程度良好;变异系数为1.65%,表明该模型重复性、可靠性理想;因素A、B、AB、AD、BC、BD、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$ 均达到显著 ( $P < 0.05$ )或极显著 ( $P < 0.05$ )水平。响应面分析见图7。

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A SDS/%	B 超声功率/W	C 超声温度/°C	D 乙醇/%	Y 多酚/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	0.2	200	60	50	14.93
2	0.6	200	60	50	13.62
3	0.2	300	60	50	14.91
4	0.6	300	60	50	14.68
5	0.4	250	50	40	14.14
6	0.4	250	70	40	14.56
7	0.4	250	50	60	13.54
8	0.4	250	70	60	14.57
9	0.2	250	60	40	14.49
10	0.6	250	60	40	14.71
11	0.2	250	60	60	14.89
12	0.6	250	60	60	13.93
13	0.4	200	50	50	14.58
14	0.4	300	50	50	14.30
15	0.4	200	70	50	13.94
16	0.4	300	70	50	14.90
17	0.2	250	50	50	14.78
18	0.6	250	50	50	13.36
19	0.2	250	70	50	14.41
20	0.6	250	70	50	13.78
21	0.4	200	60	40	14.94
22	0.4	300	60	40	14.50
23	0.4	200	60	60	14.13
24	0.4	300	60	60	14.81
25	0.4	250	60	50	15.22
26	0.4	250	60	50	15.54
27	0.4	250	60	50	15.57
28	0.4	250	60	50	15.37
29	0.4	250	60	50	15.36

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	8.88	14	0.63	11.02	<0.000 1
A	1.57	1	1.57	27.25	0.000 1
B	0.32	1	0.32	5.61	0.032 7
C	0.18	1	0.18	3.08	0.101 1
D	0.18	1	0.18	3.12	0.099 2
AB	0.29	1	0.29	5.01	0.041 9
AC	0.15	1	0.15	2.67	0.124 5
AD	0.35	1	0.35	6.08	0.027 2
BC	0.38	1	0.38	6.65	0.0219
BD	0.31	1	0.31	5.38	0.036 0
CD	0.094	1	0.094	1.63	0.223 1
A <sup>2</sup>	1.86	1	1.86	32.36	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.66	1	0.66	11.42	0.004 5
C <sup>2</sup>	3.55	1	3.55	61.74	<0.000 1
D <sup>2</sup>	1.27	1	1.27	22.13	0.000 3
残差	0.81	14	0.058	—	—
失拟项	0.72	10	0.072	3.44	0.122 6
纯误差	0.084	4	0.021	—	—

由此得到，最优提取工艺为 SDS 用量 0.34%，超声功率 259.92 W，超声温度 60.89 °C，乙醇体积分数 50.33%，多酚质量分数为 15.48 mg/g，考虑到生产操作的实际情况，将其修正为 SDS 用量 0.34%，超声功率 250 W，超声温度 60 °C，乙醇体积分数 50%。按照上述优化工艺进行验证试验，测得多酚质量分数为 (15.11±0.21) mg/g，与预测值 15.48 mg/g 接近（相对误差为 2.45%），表明模型预测性良好。

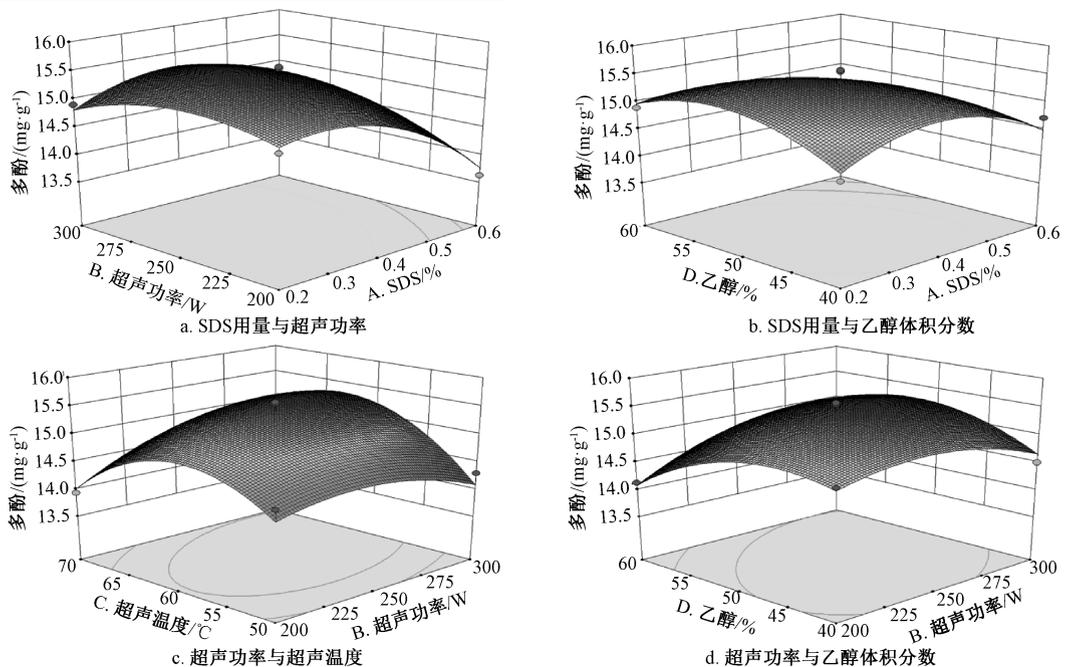


图 7 各因素响应面图

Fig. 7 Response surface plots for various factors

2.5 还原能力 参考文献 [18] 报道, 并作适当修改。取 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 提取液各 50  $\mu$ L, 与 1% 铁氰化钾溶液、pH 6.6 磷酸缓冲液各 50  $\mu$ L 混合, 置于 50  $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 20 min 后取出, 冷却, 加入 10% 三氯乙酸 50  $\mu$ L, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 90  $\mu$ L, 加入蒸馏水 100  $\mu$ L、0.1% 三氯化铁 10  $\mu$ L, 静置 10 min, 在 700 nm 波长处测定吸光度, 以维生素 C 为阳性对照, 蒸馏水为空白对照, 重复 3 次, 取平均值, 结果见表 4。由此可知, 多酚还原能力与其质量浓度呈正相关 ( $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  为 0.116 mg/mL。

表 4 多酚还原能力测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 4 Results of reducing capacity determination of polyphenols ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	吸光度(700 nm)
0.05	0.24±0.01 <sup>e</sup>
0.1	0.48±0.01 <sup>d</sup>
0.2	0.79±0.07 <sup>c</sup>
0.4	1.08±0.01 <sup>b</sup>
0.8	1.38±0.19 <sup>a</sup>

注: 同列不同字母表示相应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.6 ABTS 自由基清除能力 参考文献 [19] 报道, 并作适当修改。将 2.45 mmol/L 过硫酸钾与 7 mmol/L ABTS 自由基等量混匀后, 静置于暗处 16 h, 乙醇稀释 ABTS 自由基溶液直至在 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02, 作为使用液。取 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 提取液各 50  $\mu$ L、使用液 100  $\mu$ L, 混匀后避光反应 5 min, 在 734 nm 波长处测定吸光度  $A_i$ ; 将 100  $\mu$ L 使用液与 50  $\mu$ L 蒸馏水混匀, 5 min 后在 734 nm 波长处测定吸光度  $A_0$ ; 将 100  $\mu$ L 乙醇与 0.01、0.02、0.03、0.04、

0.05 mg/mL 提取液各 50  $\mu$ L 混匀, 静置 5 min, 在 734 nm 波长处测定吸光度  $A_j$ , 以维生素 C 为阳性对照, 重复 3 次, 计算清除率, 公式为清除率 =  $[(A_0 - A_i + A_j) / A_0] \times 100\%$ , 结果见表 5。由此可知, 多酚清除能力与其质量浓度呈正相关 ( $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  为 0.014 mg/mL。

表 5 多酚清除能力测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 5 Results of scavenging capacity determination of polyphenols ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	ABTS 自由基清除率/%
0.01	39.96±1.21 <sup>e</sup>
0.02	67.95±1.34 <sup>d</sup>
0.03	89.44±1.30 <sup>c</sup>
0.04	93.27±1.90 <sup>b</sup>
0.05	96.30±0.93 <sup>a</sup>

注: 同列不同字母表示相应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.7 抑菌活性 采用滤纸片扩散法<sup>[20-21]</sup>。在培养基中加入含有大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌的菌悬液各 100  $\mu$ L, 涂布均匀, 在直径 6 mm 的滤纸片中央加入 10  $\mu$ L 提取液, 以二甲基亚砜为空白对照, 对羟基苯甲酸丙酯为阳性对照, 37  $^{\circ}$ C 下倒置培养 24 h 后测定抑菌圈直径。同时, 将提取液依次稀释至 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL, 参照文献 [22] 报道的方法观察抑菌圈, 将首次出现抑菌圈所对应的提取液质量浓度作为最低抑菌浓度 (MIC), 结果见表 6。由此可知, 在 0.05~0.8 mg/mL 质量浓度范围内, 多酚对 5 种细菌的抑制作用呈量效关系 ( $P < 0.05$ ), 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 均为 0.2 mg/mL, 而对普通变形杆菌、绿脓杆菌的 MIC 均为 0.4 mg/mL。

表 6 多酚抑菌活性测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 6 Results of anti-bacterial activity determination of polyphenols ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	抑菌圈直径/mm				
		大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	普通变形杆菌	枯草芽孢杆菌	绿脓杆菌
二甲基亚砜	—	—	—	—	—	—
多酚	0.05	—	—	—	—	—
多酚	0.1	—	—	—	—	—
多酚	0.2	9.72±0.61 <sup>c</sup>	8.33±1.54 <sup>c</sup>	—	7.68±0.66 <sup>c</sup>	—
多酚	0.4	10.33±0.50 <sup>c</sup>	10.26±1.25 <sup>b</sup>	7.16±0.50 <sup>c</sup>	8.98±0.36 <sup>b</sup>	7.49±0.78 <sup>c</sup>
多酚	0.8	12.00±0.97 <sup>b</sup>	11.17±1.15 <sup>b</sup>	8.48±0.42 <sup>b</sup>	8.41±0.41 <sup>b</sup>	8.97±0.63 <sup>b</sup>
对羟基苯甲酸丙酯	1.0	15.22±0.87 <sup>a</sup>	14.39±0.89 <sup>a</sup>	14.00±0.20 <sup>a</sup>	13.17±1.00 <sup>a</sup>	12.83±0.79 <sup>a</sup>

注: 同列不同字母表示相应数据之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本实验采用响应面法优化蛋白桑叶多酚提取工艺, 测得多酚质量分数高达 15.11 mg/g, 较未添加 SDS 提高了 59.83%。代燕丽等<sup>[9]</sup>通过响应面法对上

述工艺进行了优化, 多酚得率提高了约 38.8%, 但仍低于本实验结果, 表明 SDS 能显著提高提取效率。

抗氧化实验结果显示, 蛋白桑叶多酚具有显著的还原能力, 能有效清除 ABTS 自由基, 并与其质

量浓度呈显著正相关。吴黄坦等<sup>[23]</sup>对金边桑叶多酚提取物的抗氧化作用进行了研究,发现其水提取物对 ABTS 自由基具有较强的清除能力, IC<sub>50</sub> 值为 41.25 μg/mL, 高于本实验的 14 μg/mL, 表明 SDS 协同超声提取能较好地保留其抗氧化活性。抑菌实验结果显示, 蛋白桑叶多酚对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌均具有较好的抑制作用, 并呈明显的剂量依赖性, 高欣妍等<sup>[24]</sup>发现桑叶乙醇提取物对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌均具有一定抑制作用, MIC 为 0.3 mg/mL, 高于本实验的 0.2 mg/mL, 表明优化工艺能显著增强上述活性。由此可知, 加入表面活性剂 SDS 协同超声提取时, 能较好地改善蛋白桑叶多酚的抗氧化、抑菌活性。

#### 参考文献:

[ 1 ] 王羚佳, 舒晓梦, 辛文, 等. 雅津蛋白桑多糖的分离纯化及生物活性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 175-179; 210.  
[ 2 ] Ying Z, Han X X, Li J R. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves[J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1273-1279.  
[ 3 ] Guo N, Jiang Y W, Kou P, et al. Application of integrative cloud point extraction and concentration for the analysis of polyphenols and alkaloids in mulberry leaves[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2019, 167: 132-139.  
[ 4 ] Yuan Q X, Xie Y F, Wang W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 128(5): 52-62.  
[ 5 ] Yang Z Z, Wang Y C, Wang Y, et al. Bioassay-guided screening and isolation of α-glucosidase and tyrosinase inhibitors from leaves of *Morus alba*[J]. *Food Chem*, 2012, 131(2): 617-625.  
[ 6 ] Jeong J Y, Jo Y H, Kim S B, et al. Pancreatic lipase inhibitory constituents from *Morus alba* leaves and optimization for extraction conditions[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(11): 2269-2274.  
[ 7 ] Sánchez-Salcedo E M, Mena P, García-Viguera C, et al. (Poly) phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: their potential for new products rich in phytochemicals [J]. *J Funct Foods*, 2015, 18 (Pt B): 1039-1046.  
[ 8 ] Zhou P F, Wang X P, Liu P Z, et al. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep

eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 120: 147-154.  
[ 9 ] 代燕丽, 沈维治, 廖森泰, 等. 响应面法优化超声波辅助提取桑叶多酚工艺[J]. 热带作物学报, 2016, 37(8): 1588-1594.  
[ 10 ] 祁伟亮, 阮梅, 冯鸿, 等. 桑叶多酚提取工艺优化及品种筛选[J]. 生物化工, 2018, 4(2): 53-54; 60.  
[ 11 ] 徐彩红, 金渭荃, 姜忠丽, 等. 玉米皮多酚提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 核农学报, 2019, 33(9): 1774-1782.  
[ 12 ] 俞浩, 毛斌斌, 刘汉珍. 表面活性剂协同超声波优化牯岭勾儿茶总黄酮提取工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 244-247.  
[ 13 ] 刘艳红, 许海燕, 彭修娟, 等. 响应面分析法优化秦皮多酚超声提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 574-579.  
[ 14 ] 陈义磊, 木尼热·阿布都克力木, 尹学博, 等. 库鲁木提草中多酚的提取工艺优化及其抗氧化活性的研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2019, 52(4): 10-16.  
[ 15 ] 王婧, 郭阳, 包怡红, 等. 仙人掌多酚超声辅助醇提工艺优化及抗氧化、降脂能力分析[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 177-182.  
[ 16 ] 张乔会, 黄晶晶, 熊坤, 等. 响应面法优化湖北海菜果实多酚提取工艺[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(14): 117-121.  
[ 17 ] 孙婧, 王文静, 孟庆华, 等. 盐肤木总多酚萃取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 化学工程, 2019, 47(5): 74-78.  
[ 18 ] 吴永祥, 王雅群, 戴毅, 等. 祁白术多酚酶法提取工艺优化及其抗氧化、抑制黑色素合成活性[J]. 核农学报, 2019, 33(6): 1146-1155.  
[ 19 ] Zhang H, Yang Y F, Zhou Z Q. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods[J]. *J Integr Agr*, 2018, 17(1): 256-263.  
[ 20 ] 杜银香, 张建伟, 胡泽华, 等. 华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2200-2203.  
[ 21 ] Li X L, Thakur K, Zhang Y Y, et al. Effects of different chemical modifications on the antibacterial activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 664-675.  
[ 22 ] 胡长玉, 戴毅, 王雅群, 等. 祁白术多酚提取工艺及抗氧化、抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 170-176.  
[ 23 ] 吴黄坦, 张友珍, 黄立森, 等. 金边桑叶多酚提取物抗氧化及肝保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 944-950.  
[ 24 ] 高欣妍, 王海英, 刘志明. 桑叶乙醇提取物的体外抗氧化与抑菌活性[J]. 生物质化学工程, 2019, 53(2): 35-40.