

[科 研 报 道]

郁金香总多酚提取工艺优化及其抗氧化活性研究

崔巧玉, 沈雯娟, 孙小璐, 王梓嫣, 毛振宇, 王春丽*

(华东理工大学药学院, 制药工程与过程化学教育部工程研究中心, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

摘要:目的 优化郁金香总多酚提取工艺, 并考察其抗氧化活性。方法 在单因素试验基础上, 以料液比、乙醇体积分数、提取时间为影响因素, 总多酚含量为评价指标, Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面优化提取工艺。以 DPPH、ABTS 自由基为指标, 测定所得总多酚的抗氧化活性。结果 最佳条件为料液比 1:25, 乙醇体积分数 60%, 提取温度 60℃, 提取时间 45 min, 超声功率 180 W, 总多酚含量为 145.16 mg/g。总多酚对 DPPH 自由基的抑制率为 96.28%, 对 ABTS 自由基清除率为 89.90%。结论 该方法稳定可靠, 可用于提取具有较强抗氧化活性的郁金香总多酚。

关键词: 郁金香; 总多酚; 提取工艺; 抗氧化活性; Plackett-Burman 设计; Box-Behnken 响应面试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1918-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.034

郁金香 *Tulipa gesneriana* L. 为百合科郁金香属球根花卉, 全世界约有 130 种, 以荷兰种植的最多^[1], 国内主要分布在新疆, 占全国的 70%^[2], 其鳞茎具有清热解毒、散结化瘀功效, 可治疗咽喉肿痛等症状^[3]。目前, 对郁金香中化学成分和药理活性的研究较少^[4], 有较大的挖掘空间。

植物多酚是植物体生命活动过程中的次生代谢而产生的多元酚, 可从多种植物体中通过各种提取方式得到, 提取产物分为黄酮类和非黄酮类, 两者主要存在结构差异, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌等活性, 一方面, 多酚能直接与体内自由基反应, 使后者丧失活性; 另一方面, 该成分能调节有机生物体内各种氧化酶活性和金属离子含量, 从而调控生物体内自由基浓度^[5]。因此, 本实验优化郁金香总多酚提取工艺, 并考察其抗氧化活性, 以期为该药用植物资源的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 试剂与药物 福林-酚试剂、十水合碳酸钠 (上海麦克林生化科技有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (上海源叶生物科技有限公司); 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 过硫酸钾 (上海安耐吉化学有限公司); 没食子酸、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司)。郁金香购于上海雷允上药店, 经华东理工大学马磊教授鉴定为正品。

1.2 仪器 JY5002 电子天平 (上海复平仪器仪表有限公司); UV-1900PC 紫外分光光度计 (上海奥谱勒仪器有限公司); SK3310HP 超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限

公司); 101-0 恒温干燥箱 (沪南电炉烘箱厂); SHZ-3 循环水多用真空泵 (上海予华分析仪器有限公司); HH-WO 电子恒温水浴锅 (上海予华分析仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海振捷实验设备有限公司); WK-400B 高速药物粉碎机 (山东精诚机械有限公司)。

2 方法

2.1 提取工艺优化

2.1.1 总多酚提取 精密称取 5.0 g 粉碎后的郁金香, 过 30 目筛, 置于锥形瓶中, 以 100 mL 50% 乙醇为溶剂, 在 60℃、180 W 下超声提取 30 min, 抽滤, 得到粗提物, 在 60℃ 下减压蒸馏除去乙醇, 去离子水配制成质量浓度为 50 mg/mL 的提取液。

2.1.2 总多酚含量测定 采用福林-酚测定法^[6]。精密称取 10 mg 没食子酸对照品, 去离子水溶解并定容至 100 mL, 得 0.1 mg/mL 溶液, 分别取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 至 25 mL 量瓶中, 加入 1 mL 福林酚试剂、2 mL 10% Na₂CO₃ 试剂, 摇晃均匀并定容至 4、6、8、10、12、14、16 μg/mL, 在 25℃ 下反应 1 h 后, 测定其在 765 nm 波长处的吸光度 (A_{765})。以没食子酸质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行回归^[7], 得方程为 $A = 0.121X - 0.0045$ ($R^2 = 0.9993$), 在 0~16 μg/mL 范围内线性关系良好。

将“2.1.1”项下提取液在 60℃ 下减压蒸馏除去乙醇, 去离子水定容至 10 mL 量瓶中, 再量取 0.5 mL 至 25 mL 量

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09735002)

作者简介: 崔巧玉 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为中药筛选和评价。Tel: 19921893727, E-mail: 779113814@qq.com

* 通信作者: 王春丽 (1971—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为天然抗氧化剂的发现与应用。Tel: 13801951663, E-mail: wangchunli@ecust.edu.cn

瓶中,依次加入1 mL 福林-酚试剂、2 mL 10% Na_2CO_3 试剂,混匀后定容,在25℃下反应1 h后测定吸光度。结果,总多酚含量^[8]为130.25 mg/g,药液终质量浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.3 单因素试验 以总多酚含量为评价指标,料液比、乙醇体积分数、提取时间、提取温度、超声功率为影响因素^[9]进行单因素试验,因素水平见表1。

表1 单因素试验因素水平

因素	水平
提取溶剂	水、40%乙醇、50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇
料液比	1:10、1:15、1:20、1:25、1:30
提取温度/℃	30、40、50、60、70
提取时间/min	15、30、45、60、75
超声功率/W	60、90、120、150、180

2.1.4 Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面设计 在单因素试验基础上,采用 Plackett-Burman 设计(表2)、Box-Behnken 响应面设计优化提取工艺,选取2个水平(-1、1),设置6个空白因素进行12批试验,测定总多酚含量,重复3次,取平均值,再通过 minitab5.2.0 软件进行方差分析。

表2 Plackett-Burman 设计因素水平

水平	A 料液比	B 乙醇/%	C 提取温度/℃	D 提取时间/min	E 超声功率/W
-1	1:10	40	30	30	90
1	1:20	60	50	60	180

2.2 抗氧化活性研究 参考文献[10]报道。

2.2.1 DPPH 自由基清除作用 精密称取 DPPH 2 mg,无水乙醇溶解并定容至100 mL,取3支试管,1支加入1 mL 提取液(1 mol/L)+4 mL DPPH 溶液,测定吸光度 A_i ;1支加入1 mL 提取液+4 mL 无水乙醇,测定吸光度 A_j ;1支加入1 mL 50%乙醇+4 mL DPPH 溶液,测定吸光度 A_e ,混合均匀,三者均静置30 min 后在517 nm 波长处进行,平行3次,取平均值,计算 DPPH 清除率,公式为清除率= $[1-(A_i-A_j)/A_e] \times 100\%$ 。

2.2.2 ABTS 自由基清除作用 将7 mmol/L ABTS、140 mmol/L 过硫酸钾等体积混合^[11],得到 ABTS 溶液,无水乙醇稀释,在734 nm 波长处测定其吸光度为 0.700 ± 0.005 ,作为 ABTS 工作液。取3支试管,1支加入4 mL ABTS 溶液+1 mL 多酚溶液,测定吸光度 A_i ;1支加入4 mL 无水乙醇+1 mL 多酚溶液,测定吸光度 A_j ;1支加入4 mL ABTS 溶液+1 mL 去离子水,测定吸光度 A_e ,混合均匀,三者均静置6 min 后在734 nm 波长处进行(无水乙醇调零),平行3次,取平均值,计算 ABTS 清除率,公式为清除率= $[1-(A_i-A_j)/A_e] \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 单因素试验

3.1.1 乙醇体积分数 选择乙醇体积分数为40%、50%、60%、70%、80%,固定其他提取条件不变,按“2.1.2”项下方法测定总多酚含量,结果见图1。由此可知,随着

乙醇体积分数增加,总多酚含量先升后降,在60%时最高,推测可能是其体积分数过高时大量醇溶性杂质开始溶出,溶剂与多酚之间极性差距明显,两者亲和力下降,导致含量锐减。因此,最优乙醇体积分数为60%。

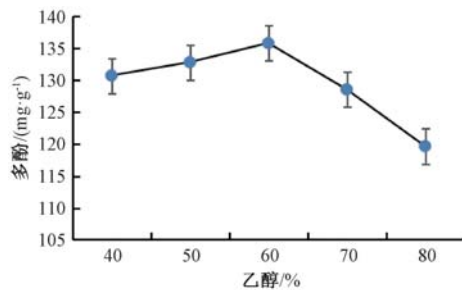


图1 乙醇体积分数对总多酚含量的影响

3.1.2 料液比 选择料液比为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30,固定其他提取条件不变,按“2.1.2”项下方法测定总多酚含量,结果见图2。由此可知,随着料液比增加总多酚含量先升后降,在1:25时最高,推测可能是上述2种因素相互制约的结果。因此,最优料液比为1:25。

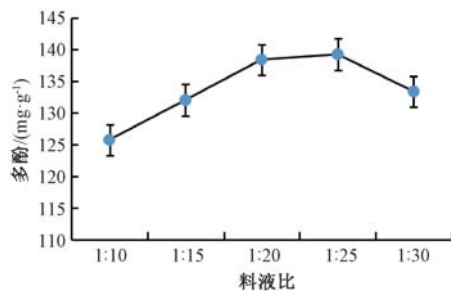


图2 料液比对总多酚含量的影响

3.1.3 提取温度 选择超声温度为30、40、50、60、70℃,固定其他提取条件不变,按“2.1.2”项下方法测定总多酚含量,结果见图3。由此可知,随着提取温度增加,总多酚含量先升后降,在60℃时最高,推测可能是温度过高会引起该成分热稳定性发生变化,同时乙醇也会挥发而使其无法稳定溶出。因此,最优提取温度为60℃。

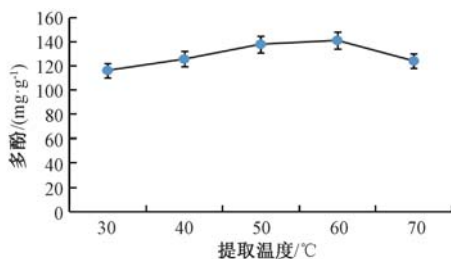


图3 提取温度对总多酚含量的影响

3.1.4 提取时间 选择提取时间为15、30、45、60、75 min,固定其他提取条件不变,按“2.1.2”项下方法测定总多酚含量,结果见图4。由此可知,随着提取时间延长,总多酚含量先升后降,在45 min 时最高,推测可能是时间过长而导致该成分不稳定。因此,最优提取时间为45 min。

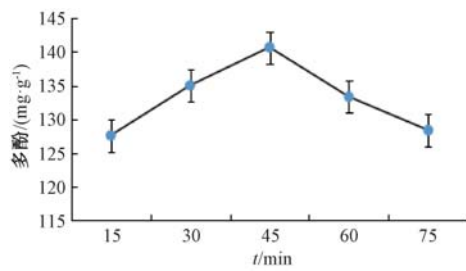


图4 提取时间对总多酚含量的影响

3.1.5 超声功率 设置超声功率为60、90、120、150、180 W,固定其他提取条件不变,按“2.1.2”项下方法测定总多酚含量,结果见图5。由此可知,超声功率增加能加剧郁金香细胞破壁程度,有利于总多酚的溶出,在180 W时最高。因此,最优超声功率为180 W。

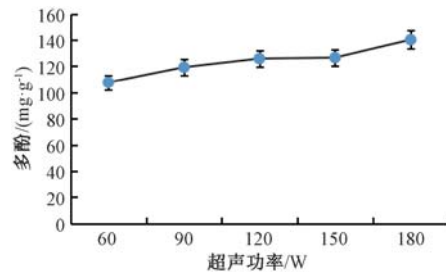


图5 超声功率对总多酚含量的影响

3.2 Plackett-Burman设计 按表2因素水平进行Plackett-Burman设计,结果见表3,方差分析见表4,标准化帕累托图见图6。由此可知,模型具有显著性($P<0.05$),料液比、乙醇体积分数、提取时间影响程度较大($P<0.05$),依次为料液比>乙醇体积分数>提取时间,而超声功率、乙醇体积分数影响程度不明显($P>0.05$)。

表3 Plackett-Burman设计结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

试验号	水平					总多酚/(mg·g ⁻¹)
	A	B	C	D	E	
1	1	1	-1	-1	-1	145.90±0.11
2	1	-1	1	1	1	142.60±0.13
3	-1	1	1	-1	1	104.50±0.23
4	1	1	1	1	-1	154.00±0.14
5	1	1	-1	-1	1	145.90±0.23
6	-1	1	1	1	-1	149.00±0.15
7	1	-1	-1	1	-1	129.30±0.22
8	-1	-1	1	-1	-1	110.00±0.18
9	-1	-1	-1	-1	-1	80.10±0.21
10	-1	1	-1	1	1	137.60±0.26
11	-1	-1	-1	1	1	123.60±0.09
12	1	-1	1	-1	1	130.30±0.21

3.3 Box-Behnken响应面试验 根据Plackett-Burman设计^[12]结果,固定超声功率为180 W,提取温度为60℃不变,以总多酚含量(Y)为评价指标,料液比(A)、乙醇体积分数(B)、提取时间(C)为影响因素,采用Box-Behnken响应面试验^[13]进行优化,因素水平见表5,结果见表6。

1920

表4 Plackett-Burman设计方差分析

来源	自由度	离均差平方和	均方差	F值	P值
模型	5	4.213	0.843	4.900	0.039
A	5	1.196	1.196	4.900	0.039
B	1	0.064	0.064	6.950	0.039
C	1	0.021	0.021	0.370	0.563
D	1	1.228	1.228	0.120	0.737
E	1	1.704	1.704	7.140	0.037
残差	6	1.032	0.017	9.910	0.020
总离差	11	5.246	—	—	—

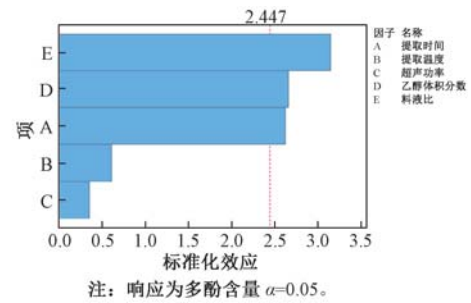


图6 各影响因素的标准化效果帕累托图

表5 Box-Behnken响应面试验因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 料液比	1:20	1:25	1:30
B 乙醇/%	50	60	70
C 提取时间/min	30	45	60

表6 Box-Behnken响应面试验设计与结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

试验号	水平			Y 总多酚/(mg·g ⁻¹)
	A	B	C	
1	-1	0	-1	130.03±0.12
2	-1	1	0	125.04±0.04
3	1	0	-1	135.75±0.16
4	0	-1	1	129.21±0.23
5	-1	0	1	139.42±0.15
6	0	1	-1	134.73±0.23
7	1	0	1	131.60±0.14
8	0	0	0	149.90±0.25
9	0	0	0	146.70±0.14
10	-1	-1	0	130.94±0.16
11	0	1	1	137.98±0.15
12	1	-1	0	127.69±0.25
13	0	0	0	147.50±0.15
14	1	1	0	138.60±0.23
15	0	0	0	145.40±0.14
16	0	0	0	147.10±0.25
17	0	-1	-1	131.07±0.13

通过Design Expert软件对上述结果进行多元回归拟合,得方程为 $Y = 147.32 + 1.03A + 2.18B + 0.83C + 4.20AB - 3.38AC + 1.28BC - 7.98A^2 - 8.85B^2 - 5.52C^2$,方差分析见表7。由此可知,模型极显著($P<0.01$),失拟项不显著($P>0.05$),表明其拟合程度较高^[14],误差较小; $R^2 = 0.9612$,表明相关性很强;Adj R^2 与Pred R^2 在合理范围内一致,差异小于0.4,表明模型可很好地解释大部分因

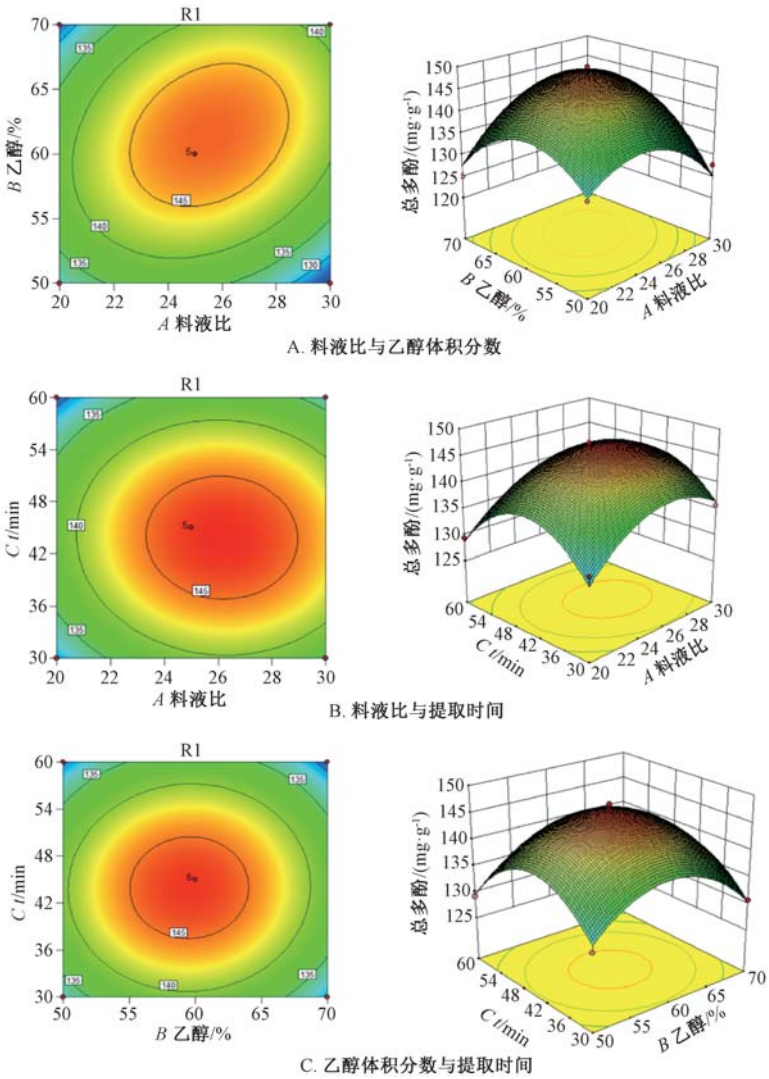
素变化引起的响应值变化;精密值为 12.242 5,表明试验设计合理,满足检验原则,置信度高,适应性好^[15];因素 B 、 AB 、 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 有显著影响 ($P<0.05$),而 A 、 C 、 BC 无显著影响 ($P>0.05$)。

表 7 Box-Behnken 响应面方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	960.64	9	106.74	19.26	0.000 4
A	8.43	1	8.43	1.52	0.257 4
B	38.02	1	38.02	6.86	0.034 4
C	5.49	1	5.49	0.99	0.352 6
AB	70.64	1	70.64	12.75	0.009 1
AC	45.83	1	45.83	8.27	0.023 8
BC	6.53	1	6.53	1.18	0.313 7
A^2	262.78	1	262.78	47.42	0.000 2
B^2	329.97	1	329.97	59.54	0.000 1
C^2	114.73	1	114.73	20.70	0.002 6
残差	38.79	7	5.54	—	—
失拟项	27.99	3	9.33	3.45	0.131 2
纯误差	10.81	4	2.70	—	—
总和	999.44	16	—	—	—

响应面分析^[16]见图 7。由此可知,随着料液比增加,响应值(总多酚含量)先升后降,极值点前的爬升速度大于极值点后的,即料液比在 1:20 一侧的变化速度大于在 1:30 一侧,同时乙醇体积分数在极值点后的变化使响应值变化更剧烈;随着料液比增加、提取时间延长,响应值先升后降,曲面图上有最大点,料液比方向的等高线密度高于提取时间,说明前者影响更显著;乙醇体积分数与提取时间存在一个响应指数的最大点,等高线为圆形,这表明两者之间有一定的互相作用。

3.4 验证试验 通过 Design-expert 软件,得到最优工艺为料液比 1:25.31,乙醇体积分数 58.30%,提取时间 43.50 min,超声功率 180 W,提取温度 60℃,总多酚含量为 145.83 mg/g,考虑到实验操作可行性,将其修正为料液比 1:25,乙醇体积分数 60%,提取时间 45 min,超声功率 180 W,提取温度 60℃。按照上述优化工艺进行 3 批验证试验,测得总多酚平均含量为 145.16 mg/g,与预测值 145.83 mg/g 接近(相对误差为 0.46%),表明模型稳定可靠。



注:左图为等高线图,右图为三维曲面图。

图 7 各因素响应面图

3.5 抗氧化活性 总多酚对 DPPH 自由基的抑制率为 96.28%，对 ABTS 自由基的清除率为 89.90%，表明该成分对上述 2 种自由基具有较强的清除作用，能达到较好的抗氧化效果。

4 讨论

Plackett-Burman 设计可用最少次数的试验来筛选得到影响结果的显著变量；Box-Behnken 响应面设计不仅能通过数据拟合来建立各因素与响应值之间的模型方程，还可筛选出最佳工艺，精确度高，预测性好。因此，本实验将上述 2 种方法相结合来优化郁金香总多酚提取工艺，得到最优工艺为料液比 1:25，提取溶剂 60% 乙醇，提取温度 60℃，提取时间 45 min，超声功率 180 W，总多酚含量为 145.16 mg/g。

多酚是植物中最常见的活性物质，具有很强的抗氧化、抗衰老、抗菌、抗炎、降胆固醇、预防心血管疾病等作用^[17]。Ibrahim 等^[18]从郁金香提取液中测定了 3 种具有抗氧化和自由基清除活性的化合物含量；本实验发现，该药材含有大量多酚，可能是潜在的抗氧化成分，可为后续研究提供基础。

参考文献：

- [1] 屈连伟, 雷家军, 张艳秋, 等. 中国郁金香科研现状与存在的问题及发展策略[J]. 北方园艺, 2016(11): 188-194.
- [2] 葛 翎, 黄晓德, 张峰伦, 等. 郁金香的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(5): 79-83.
- [3] 中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所. 新疆药用植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1981: 188.
- [4] 葛 翎, 黄晓德, 张峰伦, 等. 郁金香的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(5): 79-83.
- [5] 马莹莹, 姚金彤, 张 超, 等. 茶叶籽油酚类化合物抗氧化作用机制研究新进展[J]. 化学工程师, 2018, 32(9): 47-51.
- [6] 张单皓, 张晓寒, 冯叙桥. 茶多酚测定研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018(17): 4655-4663.
- [7] Struchkov P A, Beloborodov V L, Il'Yasov I R, et al. Assessment of total polyphenol compounds in the complex

phytopreparations angionorm and prostanorm using the folin-ciocalteu method[J]. *Pharm Chem J*, 2016, 50(7): 486-490.

- [8] 高玉萍, 涂云飞, 杨秀芳, 等. 茶多酚制品中多酚含量测定方法比较研究[J]. 中国茶叶加工, 2013(3): 28-32.
- [9] Cui C, Zhang S M, You L J, et al. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins[J]. *Food Chem*, 2013, 139(1-4): 1-8.
- [10] Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y, et al. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis[J]. *Anal Sci*, 2018, 34(7): 795-800.
- [11] 龚盛昭, 尹美娟, 邵晓曦, 等. 阿魏酸异辛酯抑制酪氨酸酶活性的动力学研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(1): 101-104.
- [12] 周亚敏, 熊苏慧, 赵灵佳, 等. 基于 Plackett-Burman 和响应面中心组合设计优选夏枯草多糖制备工艺及其活性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(12): 67-74.
- [13] 马秉智, 李 丽, 赫 军, 等. Plackett-Burman 设计结合响应面法优化苦豆子效应成分的提取工艺[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(12): 953-959.
- [14] Ghasemzadeh A, Jaafar H Z E, Rahmat A, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of zerumbone from *Zingiber zerumbet* L. rhizome and evaluation of antiproliferative activity of optimized extracts[J]. *Chem Cent J*, 2017, 11: 5.
- [15] Fakoor M, Bakhtiari M, Soleymani M. Optimal design of the satellite constellation arrangement reconfiguration process[J]. *Adv Space Res*, 2016, 58(3): 372-386.
- [16] Pascacio-Villafán C, Lapointe S, Williams T, et al. Mixture-amount design and response surface modeling to assess the effects of flavonoids and phenolic acids on developmental performance of *Anastrepha ludens*[J]. *J Chem Ecol*, 2014, 40(3): 297-306.
- [17] 詹 永, 廖 霞, 杨 勇, 等. 宛艾多酚类物质的提取工艺优化及组分分析[J]. 河南农业大学学报, 2021, 55(1): 97-105.
- [18] Ibrahim M F, Hussain F H S, Zaroni G, et al. The main constituents of *Tulipa systola* Stapf. roots and flowers; their antioxidant activities[J]. *Nat Prod Res*. 2017, 17(31): 2001-2007.