

## 肾茶多酚提取工艺及其抗氧化活性研究

李晓花<sup>1</sup>, 陈蕾西<sup>2</sup>, 牛迎凤<sup>1</sup>, 刘颖颖<sup>1</sup>, 张丽霞<sup>1\*</sup><sup>1</sup>西双版纳州傣药南药重点实验室 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所云南分所, 景洪 666100;<sup>2</sup>中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

**摘要:** 采用回流提取法, 进行单因素试验和  $L_9(3^4)$  正交试验, 确定肾茶多酚最佳提取工艺; 并通过测定 1,1-二联苯基-2-苦肟自由基(DPPH·)和羟自由基(·OH)清除率评价其抗氧化活性。得到的肾茶多酚的优化提取工艺为液料比 10:1 (mL/g), 50% 乙醇回流 3 次, 每次提取 2 h, 肾茶多酚提取率为 3.60%, 优选的提取工艺稳定可靠, 重现性好。体外抗氧化活性实验结果显示: 肾茶多酚的抗氧化能力随质量浓度的增大而增强, 在 1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内和 100~1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, 其清除 DPPH 自由基和羟基自由基的能力略强于抗坏血酸, 两者的对 DPPH 自由基半数抑制浓度分别为 5.78 和 6.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 对羟基自由基的半数抑制浓度为 851.1 和 940.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词:** 肾茶; 多酚; 提取工艺; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.016

Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from *Clerodendranthus spicatus*LI Xiao-hua<sup>1</sup>, CHEN Lei-xi<sup>2</sup>, NIU Ying-feng<sup>1</sup>, LIU Ying-ying<sup>1</sup>, ZHANG Li-xia<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Dai and Southern medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Yunnan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Yunnan Jinghong 666100, China;<sup>2</sup>Department of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract:** Reflux extraction method was used to extract the polyphenols from *Clerodendranthus spicatus* in this study. Single factor experiments and the  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment was applied to optimize the extraction conditions. In addition, the antioxidant activities of the extract were evaluated by DPPH· and ·OH scavenging assays. The optimal extraction conditions for extracting polyphenols were as follows: liquid/solid ratio of 10:1 mL/g, ethanol concentration of 50%, 2 h per time, and extract 3 times. Under the optimized conditions, the extraction yield of total polyphenol was up to 3.60%. *In vitro* antioxidant activity of total polyphenols increased with the increasing of concentration, the scavenging abilities against DPPH· and ·OH were stronger than vitamin C within the range of 1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and within the range of 100-1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The  $\text{IC}_{50}$  values were 5.78 and 6.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  toward DPPH·, and 851.1 and 940.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  toward ·OH, respectively.

**Key words:** *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu; polyphenols; extraction technology; antioxidant activity

肾茶 [*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu], 又名猫须草, 为唇形科肾茶属植物, 主产广东海南, 广西南部, 云南南部, 台湾及福建<sup>[1]</sup>; 傣医药中肾茶又称“雅糯妙”, 入土、水塔, 全草入药, 有利尿、抗菌、消炎、溶石、排石等作用。傣医书《档哈雅》记载傣医用其治疗小便热涩疼痛、腰酸、腰痛等泌尿系统疾病已有 2000 年历史, 目前有袋泡茶应用

于临床。现代研究表明, 肾茶在抗炎、抗菌、利尿排石等方面有较好的疗效<sup>[2,3]</sup>; 肾茶中富含多种化学类型的成分, 包括黄酮类、二萜类、三萜类、多酚及多酚酸类等成分<sup>[4]</sup>。大量研究表明, 植物多酚具有清除自由基、抗氧化、延缓衰老, 预防心血管疾病、防癌、抗辐射等活性<sup>[5,6]</sup>。本研究在单因素实验基础上, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计对肾茶中多酚的提取工艺进行优化, 并以 1,1-二联苯基-2-苦肟自由基(DPPH·)和羟自由基(·OH)清除实验评价其抗氧化活性, 为肾茶的进一步开发提供依据。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2015-09-23

接受日期: 2015-12-21

基金项目: 中国医学科学院药用植物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项基金(YNYZ-13-07)

\* 通讯作者 Tel: 86-013035998827; E-mail: lixiaohua1030@163.com

## 1.1 试验材料

### 1.1.1 试药

肾茶,采自中国医学科学院药用植物研究所云南分所试验基地,经张丽霞副研究员鉴定为唇形科植物肾茶 *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu 的干燥全草;没食子酸购自中国食品药品检定研究院(批号:110831-201204,纯度 89.9%);福林酚试剂(BR,南京奥多尼生物科技有限公司);DPPH(BR级,98%,成都艾科达化学试剂有限公司);碳酸钠、过氧化氢、水杨酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);硫酸亚铁(分析纯,上海第二钢铁厂)。

### 1.1.2 仪器

XL-5 型流水式粉碎机(上海润实电器有限公司);721 型分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);DRRH-S4 数显恒温水浴锅(上海双捷仪器设备有限公司);PL 203 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)等。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 多酚标准曲线的建立

按照 GB/T8313-2008 介绍的 Folin-Ciocalteu 方法建立标准曲线。准确称取 45 mg 没食子酸对照品(GA,相对分子量 188.14),蒸馏水溶解于 50 mL 棕色容量瓶中摇匀定容待用。用移液管分别移取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的标准没食子酸溶液于 100 mL 容量瓶中摇匀定容,其没食子酸的工作液浓度分别为 0.9、1.8、2.7、3.6、4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。分别移取

不同浓度的没食子酸溶液与水(做空白对照)1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,加入 10% 福林酚试剂 5 mL 摇匀后反应 3~8 min,加入 7.5% 碳酸钠溶液 4 mL,混匀。将反应体系室温反应 2 h,在 765 nm 处测定吸光值。以吸光度(A)横坐标,为没食子酸浓度纵坐标绘制标准曲线。

### 1.2.2 肾茶全草多酚的提取及测定

称取 1 g 肾茶粉末,按照单因素和正交试验设置的条件进行多酚回流提取,得到总多酚提取物;用移液管移取 2.5 mL 多酚样液于 50 mL 棕色容量瓶中,用提取溶剂稀释至刻度作为供试溶液;再吸取 1 mL 供试溶液加入 5 mL 10% 的福林酚试剂,待反应 3~8 min 后加入 4 mL 7.5% 的碳酸钠溶液,30  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 后于 765 nm 处测吸光值  $A_{765}$ ,代入标准曲线方程换算成稀释液中多酚含量值后按下式计算得到多酚含量。

$$\omega = C \times V \times N / 1000 M$$

式中:C—多酚浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; V—提取液体积(mL); N—稀释倍数; M—样品质量。

### 1.2.3 肾茶多酚提取单因素试验

肾茶全草经干燥、粉碎,称取 0.5 g 干粉/份,不同溶剂浓度、不同液料比、不同提取时间和不同提取次数的单因素条件下进行提取,提取液过滤后定容,取适量提取液稀释至一定倍数,按 1.2.2 项下方法进行检测,每个实验 3 次重复,取平均值。单因素实验水平设定见表 1,实验结果见图 1。

表 1 单因素水平表

Table 1 Factors and levels for single factor experiments

因素 Factors	水平 Levels				
乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	0	30	50	70	95
液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	10	15	20	25	30
提取时间 Extraction duration	1	2	3	4	5
提取次数 Times of extraction	1	2	3	4	5

### 1.2.4 肾茶多酚提取正交试验设计

为了进一步优化提取条件,根据单因素试验结果,选取 4 个因素:乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取次数(D),采用  $L_9(3^4)$  进行正交试验,每个实验 3 次重复,取平均值。因素水平见表 2,正交试验结果见表 3,方差分析结果见表 4。

### 1.2.5 验证试验

取肾茶干粉 3 份,每份 0.5 g,按照优选的提取工艺  $A_2B_1C_2D_3$  进行 3 次验证实验,结果如表 5 所

示。

## 1.3 抗氧化活性研究<sup>[7,8]</sup>

### 1.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

将肾茶多酚提取液配成浓度为 1、2、3、4、5、6、7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,移取 1 mL 多酚提取液与 3 mL,  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DPPH 溶液摇匀反应 30 min 后在 571 nm 处测吸光值  $A_1$ ;同时测定 1 mL 对应浓度提取液加入 3 mL 无水乙醇反应 30 min 后的吸光值  $A_2$ ;作为对照,在 1 mL 蒸馏水中加入 3 mL DPPH 溶液反

表2 正交试验因素水平  $L_9(3^4)$ Table 2 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal experiments

水平 Levels	因素 Factors			
	A	B	C	D
1	30	10	1	1
2	50	20	2	2
3	70	30	3	3

应 30 min 后测吸光值  $A_0$ , 以抗坏血酸为阳性对照组。每个实验做 3 份平行试验, 取平均值, 清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100$$

式中:  $A_1$ —1 mL 多酚溶液与 3 mL DPPH 反应后的吸光值;  $A_2$ —1 mL 多酚溶液与 3 mL 无水乙醇反应后的吸光值;  $A_0$ —1 mL 蒸馏水与 3 mL DPPH 空白的吸光值。

### 1.3.2 羟基自由基清除能力测定

将多酚溶液的浓度配制成 100、250、500、750、1000、1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液, 取 1 mL 向试管中一次加入 1 mL 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液与 1 mL 不同浓度的多酚提取液、6 mL 9 mmol/L 的水杨酸溶液和 1 mL 9 mmol/L 的过氧化氢溶液, 室温放置 60 min 后 517 nm 处测定吸光值  $A_1$ , 以蒸馏水代替水杨酸在相同条件下测吸光值  $A_2$ , 将多酚提取液用蒸馏水代替在相同条件下测吸光值  $A_0$ , 每个实验 3 次重复, 取平均值。清除率按照下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100$$

式中:  $A_1$ —多酚与过氧化氢-水杨酸体系反应后的溶液在 571 nm 处测得的吸光值;  $A_2$ —用蒸馏水代替水杨酸与体系反应后测得的吸光值;  $A_0$ —用蒸馏水代替多酚提取液与体系反应后测得的吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系测定结果

没食子酸含量在 0 ~ 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内与其吸光度保持较好的线性关系, 线性回归方程为  $y = 47.175x - 0.4903$ , 相关系数  $R = 0.9994$ 。

### 2.2 单因素试验结果

由图 1 试验结果显示: 乙醇浓度、液料比、提取时间和提取次数均会影响肾茶多酚提取效果, 在单因素试验的基础上, 正交试验因素水平设定为: 乙醇浓度设定为 30%、50% 和 70%; 液料比确定为 10:1、20:1 和 30:1 (mL/g); 提取时间因素水平为 1、2 h 和 3 h; 提取次数设定为 1、2 和 3 次三个水平。

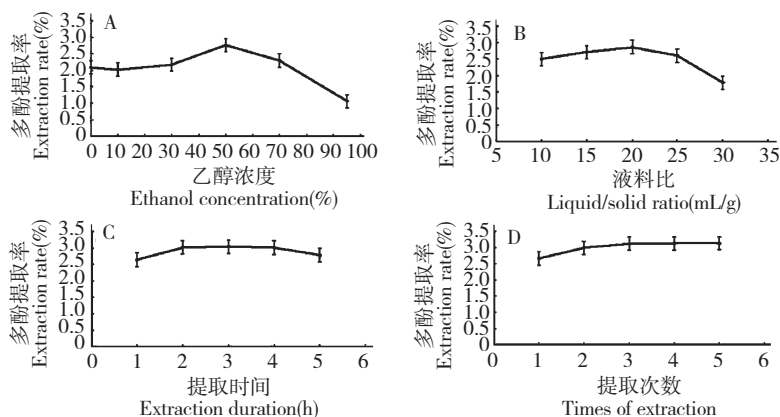


图1 乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)及提取次数(D)对肾茶多酚提取的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration (A), liquid/solid ratio (B), extraction duration (C) and times of extraction (D) on yield of total polyphenols from *C. spicatus*

### 2.3 正交试验优化结果

通过方差分析可知, 各因素对多酚提取效率的影响作用依次为:  $D > A > C > B$ , 即提取次数 > 乙醇

浓度 > 提取时间 > 液料比; 液料比对肾茶多酚提取率影响最小, 乙醇浓度和提取次数对肾茶多酚提取率具有显著性影响 ( $P < 0.05$ )。因此, 肾茶多酚回

流提取优选工艺为  $A_2B_1C_2D_3$ , 即乙醇浓度为 50%、液料比 10 倍、提取时间为 2h 条件下提取 3 次,

表 3 肾茶多酚提取工艺正交实验结果分析

Table 3 Orthogonal experimental results for the extraction of total polyphenols from *C. spicatus*

序号 No.	因素 Factors				多酚含量 Content of polyphenols (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.43
2	1	2	2	2	2.91
3	1	3	3	3	3.00
4	2	1	2	3	3.62
5	2	2	3	1	2.73
6	2	3	1	2	3.16
7	3	1	3	2	3.05
8	3	2	1	3	2.66
9	3	3	2	1	2.82
I	2.78	3.03	2.75	2.66	
II	3.17	2.77	3.12	3.04	
III	2.84	2.99	2.93	3.09	
R	0.39	0.27	0.37	0.43	

表 4 提取工艺方差分析

Table 4 Variance analysis of extraction technology

指标 Index	方差来源 Sources of variance	SS	<i>f</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
多酚含量 Extract rate (%)	A	0.810	2	5.013	0.015
	B	0.424	2	2.186	0.134
	C	0.544	2	2.963	0.071
	D	0.954	2	6.373	0.006

## 2.4 验证试验

按照最佳提取条件进行验证,多酚提取率平均

为 3.6%,结果与正交试验中 4 号试验结果相近,由

此可见正交试验的结果可靠且工艺稳定可行。

表 5 验证实验结果

Table 5 Results of verification test

提取工艺 Extraction technology	重复 Repetition			多酚平均含量 Content (%)
	1	2	3	
$A_2B_1C_2D_3$	3.59	3.63	3.58	3.60

由表 5 实验结果显示:优选的肾茶多酚提取工艺稳定,重现性好,具有较高的多酚提取效率。

## 2.5 肾茶多酚抗氧化活性实验

### 2.5.1 肾茶多酚清除 DPPH 自由基的活性

由图 2 实验结果显示,肾茶多酚对 DPPH 自由基的清除率略优于抗坏血酸,SPSS 13.0 计算二者的半数抑制浓度分别为 5.78 和 6.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.5.2 肾茶多酚对羟基自由基的清除力

由图 3 结果显示,肾茶多酚提取物对羟基自由基的清除率优于抗坏血酸效果,二者的  $\text{IC}_{50}$  分别为 851.1 和 940.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 3 讨论与结论

自由基(Free radical)是指能独立存在,含有未

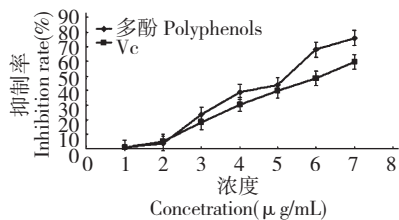


图2 肾茶多酚对DPPH自由基的清除率

Fig. 2 DPPH · scavenging effect of polyphenols from *C. spicatus*

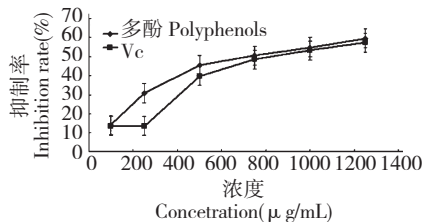


图3 肾茶多酚对羟基自由基的清除率

Fig. 3 ·OH scavenging effect of polyphenols from *C. spicatus*

成对电子的原子、原子团、分子或离子。在正常情况下,人体内的自由基处于产生与清除的动态平衡之中。生理状态下的自由基浓度是很低的,不仅不会损伤机体,而且还显示出独特的生理作用,在调节细胞间的信号传递和细胞生长、调节相关基因和信号通路、诱导细胞增殖和凋亡、抑制病毒和细菌等方面起重要的作用。但在病理情况下,如果自由基产生过多或清除过慢,由于自由基非常活泼,化学反应性极强,则可引起细胞生物膜上的脂质过氧化和蛋白质、核酸(DNA)变性,导致细胞和组织损伤,诱发各种疾病,造成生物体损害,甚至加速机体的衰老和死亡。许多研究证明,体内自由基产生过多或清除能力下降是疾病和衰老的“元凶”,它与全身性疾病(如炎症、肿瘤、衰老、血液病、糖尿病等)和各脏器疾病(如心、肝、肺、肾、脑、皮肤等)的发生均有密切关系<sup>[9]</sup>。

本实验通过优化肾茶多酚的回流提取工艺,采用正交试验设计法,优化的工艺条件为:10 倍量50%乙醇回流3次,每次提取2h,肾茶多酚提取率

为3.60%。体外抗氧化活性结果显示:肾茶多酚具有较强的抗氧化活性,且在一定范围内其抗氧化活性与浓度呈现良好的量效关系。本实验可以为肾茶的开发利用提供一定的实验依据。

#### 参考文献

- 1 China Flora Editorial Board (中国科学院植物志编辑委员会). *Flora of China* (中国植物志). Beijing: Science Press, 1994, 17: 50-299.
- 2 Zhao YH (赵应红), Lin YF (林艳芳), Zhang LL (张丽丽), et al. The research and application of Dai medicine "YaNuo-miao (*Clerodendranthus spicatus*)". *Med Pharm Chin Min J* (中国民族医药杂志), 2008, 10(6): 72-77.
- 3 Hou ZY (侯志勇), Wang LQ (王立强), Liang ZS (梁振生). Latest research progress of pharmacological action on *Clerodendranthus spicatus* extracts. *Chin Med Pharm* (中国医药科学), 2011, 1(2): 26-27.
- 4 Chen YL (陈伊蕾), Tan CH (谭昌恒), Tan JJ (谭俊杰), et al. The research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Clerodendranthus spicatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 885-891.
- 5 Paul K, Gary W. Perspective polyphenols dietary components with established benefits to health. *J Sci Food Agric*, 2005, 85: 1239-1240.
- 6 Zhao YF (赵杨帆), Zheng BD (郑宝东). Progress research of plant polyphenols and function. *Light Tex Ind Fujian* (福建轻纺), 2006, 11: 107-110.
- 7 Li YD (李云达), Yan ZD (颜祖弟), Huang T (黄涛), et al. Study on extraction progress and antioxidation activities of cowherb seed polysaccharide. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 446-450.
- 8 Zheng YX (郑宇翔), Xiao FX (肖凤霞), Lin L (林励), et al. Optimization of extraction progress for total polysaccharides from *Artemisiae Annuae* herb residue by response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(14): 8-11.
- 9 Xie WP (谢温品), Qin SX (秦士新). Research progress of radicals medical. *Chin J Injury Repair Wound Healing, Electronic* (中华损伤与修复杂志, 电子版), 2012, 7: 194-196.