

朝鲜蓟叶多酚提取及抗氧化活性研究

杨美莲¹, 程桂广¹, 蔡圣宝¹, 曹建新¹, 胡小松², 易俊洁¹

(1. 昆明理工大学食品安全研究院, 云南昆明 650500)(2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 本研究主要通过单因素和正交试验, 探讨了朝鲜蓟叶多酚的最佳提取工艺, 比较大孔树脂纯化前后朝鲜蓟叶多酚提取物的抗氧化和抑菌活性的差异。结果表明, 最佳提取工艺为: 乙醇浓度 70%, 料液比 1:20, 超声时间 40 min, 该条件下多酚提取量为 88.36 mg/g。通过 9 种大孔树脂静态吸附及解吸性能的比较, 确定了 NKA-2 型树脂为朝鲜蓟多酚的最佳纯化树脂。经过大孔树脂纯化后, 朝鲜蓟叶多酚的抗氧化能力显著增强, 如对 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除的 IC₅₀ 值分别从 82.79 μg/mL 和 251.30 μg/mL, 降低到 32.30±0.25 μg/mL、107.98±0.42 μg/mL。另外, 纯化工艺还显著提高了朝鲜蓟叶提取物的抑菌效果, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、绿脓杆菌和乳杆菌均有抑制作用。综上所述, 该研究为朝鲜蓟叶多酚的提取、纯化和应用提供了科学依据和理论基础。

关键词: 朝鲜蓟叶; 多酚; 大孔树脂; 抗氧化活性; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2019)04-157-165

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.022

Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from Artichoke Leaves

YANG Mei-lian¹, CHENG Gui-guang¹, CAI Sheng-bao¹, CAO Jian-xin¹, HU Xiao-song², YI Jun-jie¹

(1. Food Safety Institute, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

(2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, the optimal conditions for extracting polyphenols from artichoke leaves were investigated using single factor and orthogonal tests. The antioxidant and antibacterial activities of the polyphenol extracts from artichoke leaves before and after the purification by macroporous resins were compared. The results showed the optimal extraction conditions were: extraction solvent, 70% ethanol; sample/solvent ratio, 1:20 (g/mL); ultrasonic time, 40 min. Under these conditions, the total phenol content of the extract from artichoke leaves was 88.36 mg/g. Based on the comparison of static adsorption and desorption of nine macroporous resins, NKA-2 resin was found to be the best option for purification of the polyphenol extract. After such purification, the antioxidant activity of the purified polyphenol extract from artichoke leaves was significantly increased e.g. the IC₅₀ values of 1-diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging decreased to 32.30±0.25 μg/mL and 107.98 ± 0.42 μg/mL from 82.79 μg/mL and 251.30 μg/mL, respectively. In addition, the purification process significantly improved the antibacterial effect of the extract from artichoke leaves, including the inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Monilia albican*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Lactobacillus*. In summary, this work provides a scientific basis and theoretical foundation for the extraction, purification and application of the polyphenols from artichoke leaf.

Key words: artichoke leaf; polyphenols; macroporous resin; antioxidant activity; antibacterial effect

朝鲜蓟 (*Cynara scolymus*) 是菊科菜蓟属多年生草本植物, 又称食托菜蓟、球洋蓟、法国百合等, 它的花蕾常烹饪为菜肴。朝鲜蓟富含倍半萜内酯、多酚、黄酮和木脂素等成分, 具有抗菌、抗氧化、抗 HIV, 肝脏保护、降胆固醇和降脂等活性^[1], 其中治疗肝炎和降血脂功效可能与其倍半萜内酯成分有关, 而朝鲜

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31600274); 云南省应用基础研究计划面上项目 (2018FB036)

作者简介: 杨美莲 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 易俊洁 (1988-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品加工

蓟含有的多酚和类黄酮物质 (如咖啡酸、绿原酸和木犀草素等) 可能参与抗氧化、清除自由基以及细胞增值抑制, 使其在促进消化, 增强肝、胆、肾等方面具有较高的医用价值^[2]。Aktay 等^[3]研究表明, 朝鲜蓟提取物可作为有效的天然抗氧化剂。Wang 等^[4]发现朝鲜蓟叶富含多羟基酚类化合物, 其芳环上羟基的个数越多, 酚类化合物抗氧化能力越强。Gaafar 等^[5]发现朝鲜蓟叶提取物含有 27%咖啡酰奎宁酸和 7%黄酮类化合物, 在体外条件下诱导人肝细胞 HepG-2 中的线粒体活性增强, 促进总蛋白含量增殖, 且在体外条件下能抑制 H₂O₂ 损伤, 对乙醇诱导的细胞具有一定的保

护作用。另外, 朝鲜蓟提取物可通过影响胆固醇及脂类在肝脏中的合成分解途径来调节脂质水平, 达到降低血脂及抗动脉粥样硬化的药理活性^[6]。除此之外, Zhu 等^[7]还发现朝鲜蓟的花和茎提取物具有明显的抑菌活性。随着人们越来越重视天然抗菌化合物, 如草药或香料等植物提取物来保存食品, 以减少食源性致病微生物的暴发, 植物提取物作为天然抗菌剂备受关注, 因此, 朝鲜蓟提取物的抗菌功效值得深入研究。

我国西南地区种植了大量的朝鲜蓟, 除了作为出口蔬菜的部分, 剩余的大量茎叶多用于喂养牲畜或回田作为肥料, 造成了朝鲜蓟资源的大量浪费, 因此对朝鲜蓟叶中有效成分的提取利用, 可以更充分的利用资源, 提高朝鲜蓟叶的经济价值。本研究主要对朝鲜蓟叶部分多酚类化合物的提取工艺进行优化, 再透过大孔树脂对其纯化, 并对纯化前后的多酚化合物生物活性及抑菌作用进行评价, 旨在为朝鲜蓟叶综合利用及产品开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

朝鲜蓟叶样品于 2017 年 5 月采收于云南省陆良县, 经冷冻干燥后, 粉碎过 60 目筛, 备用。

1,3,5-tri(2-pyridyl)-2,4,6-triazine (TPTZ)、2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)、2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、福林酚试剂、没食子酸标准品(分析纯, 纯度≥99.0%) 购于 Sigma-Aldrich 公司; 大孔吸附树脂(LSD-762、NKA-2、XDA-6、D-101、HPD-100、HPD-400、XDA-7HP 和 AB-8) 购于北京索莱宝生物科技有限公司; LSD-296 型树脂购于沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、白色念珠菌 (*Monilia albican*) 购于中国微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与设备

EYELAN-1001 旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; CTK48 型离心机, 上海臣莲生物科技发展有限公司; TU-1901 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的制备

准确称取 1 g 朝鲜蓟叶粉末, 加入一定比例的溶剂, 在一定时间下进行超声辅助提取 3 次(具体见单因素及正交实验设计方法), 以 4000 r/min 离心 10 min 后合并上清液, 在 40 °C 下进行旋转蒸发浓缩, 得到浸膏, 保存在 4 °C 冰箱中待测。

1.3.2 没食子酸标准溶液的配制和标准曲线的绘制

使用福林酚法测定多酚含量^[8,9]。准确称取 0.5 g 没食子酸标准品, 用蒸馏水溶解并稀释至 0.05 mg/mL 得到标准溶液, 分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 该溶液于 10 mL 容量瓶中, 各加入 0.5 mL 福林酚试剂, 摇匀, 静置 1 min 后加入 1.5 mL 20%的 Na₂CO₃ 溶液, 用蒸馏水定容至 10.0 mL, 充分混匀后于 70 °C 水浴 10 min, 使用分光光度计在 765 nm 波长下测定吸光值, 以没食子酸浓度为 x 轴, 吸光值为 y 轴绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为: $y=0.0037x-0.003$ ($R^2=0.999$)。

1.3.3 朝鲜蓟叶多酚的提取及测定

采用超声辅助提取方法, 准确称取一定量的朝鲜蓟叶样品, 用一定浓度的乙醇作为提取溶剂, 超声提取一定时间后, 得到多酚粗提液, 按照上述 1.3.2 的方法测定朝鲜蓟中多酚含量, 并按下式(1)进行计算:

$$\text{总酚含量(以没食子酸计, mg/g)} = \frac{C \times V \times DF}{W} \quad (1)$$

式中: C 表示样液中多酚的含量(μg/mL), V 表示样液的体积(mL), DF 表示稀释倍数, W 表示朝鲜蓟叶粉末质量(g)。

1.3.4 提取工艺的优化

1.3.4.1 单因素试验

分别考察提取溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、水), 溶剂体积分数(50%、60%、70%、80%、90%), 料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60), 提取时间(20 min、30 min、40 min、50 min、60 min) 对提取朝鲜蓟叶中多酚含量的影响。

1.3.4.2 正交试验设计

在单因素试验结果的基础上, 将乙醇体积分数(A)、料液比(B)、时间(C)作为参考的三个因素, 设计三因素三水平 L₉(3³)正交试验。其中由单因素实验结果可知, 由于提取时间在 40 min 时达到最大值, 且提取效率在 40 min 以后趋近于稳定, 故选择 30 min、40 min、50 min 作为正交试验的水平。而乙醇体积分数在 70%时提取率达到最大值, 且料液比为 1:30 的时提取率最大, 故在单因素提取最高值周围选择正交实验的水平, 即乙醇体积分数分别选择 60%,

70%, 80%, 料液比分别选择 1:20, 1:30, 1:40。具体正交实验因素水平见表一。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factor levels of orthogonal experiments

水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 时间/min
1	60	1:20	30
2	70	1:30	40
3	80	1:40	50

1.3.5 大孔树脂筛选

大孔树脂制备方法参照文献^[10], 即用清水洗去杂质后, 用 100%乙醇浸泡 24 h, 使其充分溶胀后用水冲洗树脂至无乙醇味, 备用。

多酚纯化方法参照文献^[11], 略有改动。准确称取 9 种不同型号树脂各 2 g 于锥形瓶中, 加入 20 mL, 5.0 mg/mL 朝鲜蓟叶多酚粗提液, 于 25 °C、120 r/min 的摇床上振荡使其充分吸附, 24 h 后, 吸取上清液测定总酚含量。倒去上清液, 吸干表面水分后, 加入 20 mL, 70%乙醇溶液, 于相同条件下振荡 24 h, 再次吸取上清液测定总酚含量。按照公式(2)、(3)计算吸附和解吸率。

$$\text{吸附率} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{解吸率} = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中: C_0 表示朝鲜蓟多酚提取液中初始多酚的含量; C_1 表示吸附后溶液中的多酚剩余量; C_2 表示解吸后乙醇洗脱液中的多酚含量。

1.3.6 抗氧化能力的测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力

参考 Mensor 等^[12]的研究方法测定朝鲜蓟多酚提取物纯化前后对 DPPH 自由基清除能力。即将待测样品稀释为一定浓度梯度的样液, 准确吸取 0.5 mL 于 5 mL 的离心管中, 加入 2.0 mL, 0.1 mmol/L DPPH 反应液, 充分混匀, 避光不断震荡 30 min 后, 在 517 nm 波长下以 $A_{\text{空白}}$ 调零测定吸光值。每个样品重复测定三次, 按式(4)计算并求平均值。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_0 空白对照组吸光值: 0.5 mL 甲醇+2.0 mL DPPH 工作液; A_{x_0} 样品对照组吸光值: 0.5 mL 样品+2.0 mL 甲醇; A_x 样品吸光值: 0.5 mL 样品+2.0 mL DPPH 工作液; $A_{\text{空白}}$: 0.5 mL 蒸馏水+2.0 mL 甲醇。

1.3.6.2 ABTS⁺自由基清除能力

ABTS⁺自由基清除能力测定方法参照文献^[13-15],

稍作改动。将 88 μL 过硫酸钾 (40 mmol/L) 与 5 mL ABTS (7 mmol/L) 溶液充分混匀, 室温避光放置 16 h 后, 得到 ABTS⁺自由基储备液, 然后用无水乙醇进行稀释, 在 30 °C, 734 nm 下的吸光值为 0.70, 然后用乙醇调零该工作液, 备用。取 0.5 mL 不同浓度的样品与 4 mL ABTS⁺工作液混合均匀, 10 s 后, 在 30 °C 水浴中保温 6 min, 再于 734 nm 下以 $A_{\text{空白}}$ 调零测定吸光值, 按照公式 (5) 计算清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 空白对照组吸光值: 0.5 mL 乙醇+4.0 mL ABTS 工作液; A_1 样品对照组吸光值: 0.5 mL 样品+4.0 mL 乙醇; A_2 样品吸光值: 0.5 mL 样品+4.0 mL ABTS 工作液; $A_{\text{空白}}$: 0.5 mL 蒸馏水+4.0 mL 乙醇。

1.3.6.3 铁离子还原能力 (FRAP)

铁离子还原能力测定方法参照文献^[16], 并稍作改动。首先准确配制 TPTZ 溶液 (10 mmol/L)、FeCl₃ 溶液 (20 mmol/L)、醋酸缓冲液 (NaAc-HAc, pH 3.6, 0.3 mol/L), 再将配好的 TPTZ 溶液、FeCl₃ 溶液、NaAc-HAc 缓冲液按照 1:1:10 的比例混匀, 在 37 °C 水浴锅中保温得到 FRAP 溶液, 备用。取 0.5 mL 不同浓度的样品于 5 mL 试管中, 加入 4.5 mL 预热的 FRAP 溶液, 混匀后在 37 °C 下水浴 10 min, 用蒸馏水代替样品作为空白对照, 在 593 nm 下测定吸光值, 并以 1.0 mmol/L FeSO₄ 为标品, 样品抗氧化活性用 $\mu\text{mol/L}$ FeSO₄ 表示。

1.3.7 抑菌活性的测定

抑菌活性测定方法参照文献^[17-19], 首先用镊子从斜面上挑取活化好的不同菌种接至 4.0 mL 新鲜灭菌后的液体培养基中培养 (细菌 37 °C/24 h、真菌 28 °C/48 h), 按十倍稀释法取 1.0 mL 菌液稀释 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 倍, 用血球计数板计数, 将细菌和真菌菌液浓度调整为 10⁶ cfu/mL, 备用。将粗多酚样品配成 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、22.5、25.0、27.5、30.0、32.5 mg/mL 的梯度溶液, 纯化后多酚分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0 mg/mL。将配好的样品分别吸取 100 μL 的样加入 96 孔板中, 再向其中各加入 100 μL 向其中各 10⁶ cfu/mL 稀释好的梯度菌液作为实验组, 用只含菌液和完全培养基作为阳性对照, 只含样品稀释液和完全培养基作为阴性对照。将 96 孔板于 37 °C (细菌) 和 28 °C (真菌) 培养箱中分别培养 24 h 和 48 h。取出后细菌在酶标仪的 520 nm 波长下测定吸光值, 真菌于 620 nm 波长下测定吸光值, 根据结果确定多酚对供试菌的最小抑菌浓度 MIC (minimum inhibitory

concentration)。

1.4 数据统计分析

每组实验均重复3次, 结果表示为均值±标准差, 采用 Origin 8.5 绘图软件绘图, SPSS 17.0 对数据进行统计学分析, 并进行 Duncans 差异分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

由图 1a 可看出, 不同提取溶剂对朝鲜蓟叶多酚的提取效率有较明显差异, 提取率大小依次是: 乙醇>甲醇>丙酮>水。多酚物质对不同溶剂的亲合力也不同, 与溶剂的亲合力越好, 溶解的多酚物质越多。从提取效率来看, 选择乙醇作为朝鲜蓟叶的提取溶剂效果最佳。

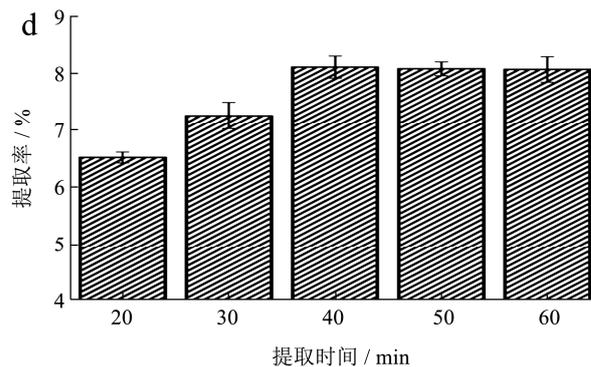
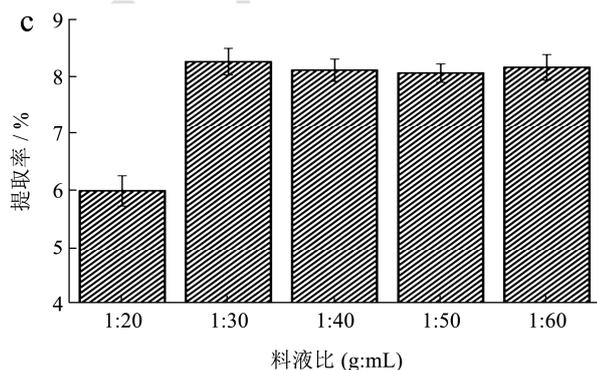
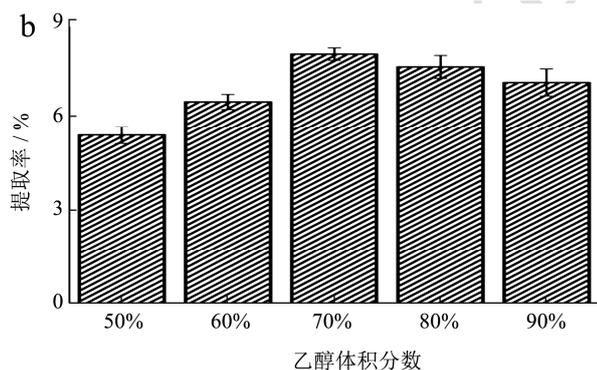
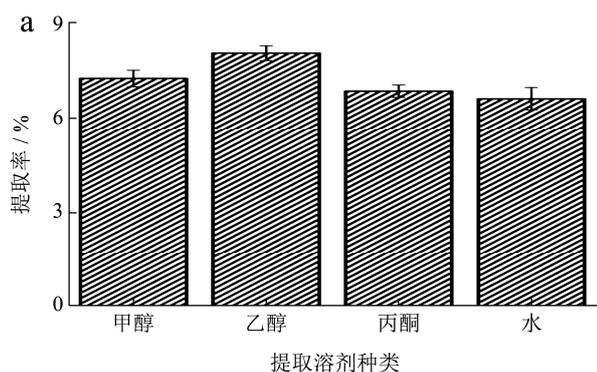


图1 溶剂种类、乙醇体积分数、料液比和提取时间对朝鲜蓟叶多酚提取效果的影响

Fig.1 Effect of different solvents, ethanol concentration, solid to solvent ratio, and extraction time on the extraction efficiency of polyphenols from artichoke leaf

图 1b 为乙醇含量对朝鲜蓟叶多酚物质提取效果的影响。由图可知, 乙醇体积分数从 50%增加到 70%时, 多酚在体系中的溶解度随乙醇体积分数的升高而增大, 多酚提取率不断升高。但当乙醇体积分数大于 70%时, 提取率呈现下降的趋势。因此, 从提取率及乙醇的消耗情况考虑, 乙醇的体积分数宜选 70%。

从图 1c 可看出, 料液比为 1:30 时, 提取率达到最大值, 随着料液比的升高, 提取率略微减少。料液比增加朝鲜蓟多酚与溶剂充分接触并向溶剂中扩散, 但当料液比达到某一临界值时, 再增加溶剂反而会抑制多酚的扩散, 甚至会增加了其他化合物的溶出^[20], 从而降低了提取液中多酚的相对含量, 且过大的料液比会造成溶剂的损失和浪费, 因此, 料液比选择 1:30。

朝鲜蓟叶多酚提取率随提取时间的延长呈现先增加后趋于平缓的趋势, 在提取时间为 40 min 时呈现最高提取率, 之后随着时间的增加, 提取率无显著差异 ($p > 0.05$) (见图 1d)。提取时间对朝鲜蓟叶多酚提取具有双重作用, 虽然随着提取时间的延长朝鲜蓟更多的多酚逐渐向提取溶剂中扩散, 但由于多酚极易氧化, 所以当提取时间延长后, 朝鲜蓟扩散到溶液中的多酚会逐渐被氧化, 当氧化多酚与扩散进入溶液的多酚量相当时, 提取溶液里的多酚总量趋于平衡, 不再随着提取时间增加而增多^[21], 且提取时间的延长, 会造成资源的过度消耗和浪费。因此, 综合考虑, 提取时间宜选为 40 min。

2.2 正交试验结果

正交试验结果如表 2 和表 3 所示, 由 $R_A > R_C > R_B$ 可知, 对朝鲜蓟叶多酚提取率影响大小依次为乙醇体积分数>超声时间>料液比。乙醇体积分数对于多酚提

取率有显著性影响 ($p<0.01$), 其次是超声时间, 而因素 B (料液比) 对于多酚的提取无显著性影响 ($p>0.05$)。朝鲜蓟叶总多酚提取率的优化水平组合为: $A_2B_1C_3$, 即: 70%乙醇、料液比 1:20、超声时间 50 min。此最佳工艺水平不在已知的正交试验设计组

中, 故在该最佳条件下进行验证试验, 得到朝鲜蓟叶总多酚含量为 89.03 ± 1.06 mg/g, 高于其他实验组, 但与正交实验结果中最优组合无显著差异。综合考虑能量及时间等成本问题, 朝鲜蓟叶多酚最佳提取工艺条件为: 70%乙醇、料液比 1:20、超声时间 40 min。

表 2 超声辅助提取法正交实验设计与结果

Table 2 Orthogonal experimental design and results by ultrasonic-assisted extraction method

水平	因素			多酚含量/(mg/g)
	A 乙醇体积分数/%	B 料液比/(g/mL)	C 超声时间/min	
1	60	1:20	30	75.66
2	60	1:30	40	78.25
3	60	1:40	50	86.03
4	70	1:20	40	88.36
5	70	1:30	50	87.20
6	70	1:40	30	86.90
7	80	1:20	50	87.20
8	80	1:30	30	84.35
9	80	1:40	40	83.60
K_1	79.65	87.41	82.97	
K_2	89.48	85.6	86.45	
K_3	86.72	85.84	87.91	
R	13.84	2.81	7.60	

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal tests

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F 值	显著性	因素
A	287.36	2	143.68	9.74	**	A
B	14.51	2	7.25	0.49		B
C	84.37	2	42.36	2.87		C
误差	29.52	2	14.76			误差

注: 查表得 $F_{0.05}(2,4)=4.46$, $F_{0.01}(2,4)=8.65$; 当 $F>F_{0.01}$ 时, 有极显著差异, 用**表示; 当 $F>F_{0.05}$ 时, 有显著性差异, 用*表示。

2.3 大孔吸附树脂的筛选

大孔树脂对酚类化合物的吸附、解吸性能与其本身的极性、空间结构、含水量有密切关系。不同大孔树脂之间由于极性、孔径、比表面积等条件不同, 导致其对化合物的吸附和解吸强弱程度也有差异^[22]。按上述 1.3.5 方法, 取 LSD-762、NKA-2、LSD-296 等九种多酚纯化树脂进行静态吸附和解吸试验。图 2 为九种大孔树脂对朝鲜蓟叶多酚吸附率和解吸率对比结果。其中, NKA-2 和 LXD-762 的吸附效率最好, 分别达到 93.58% 和 88.56%, 其次是 XDA-6、HPD-100、AB-8、HPD-400 和 LSD-296, XDA-7HP 的吸附率最

低, 仅为 71.09%。此外, 不同型号树脂对朝鲜蓟叶多酚的解吸性能也不同。结果表明, 其解吸率依次为 XDS-7HP>LSD-296>NKA-2>HPD-400>XDA-6>D-101>HPD-100>LSD-762>AB-8, 其中 XDS-7HP 解吸率最大, 为 88.72%, 而 LSD-296 和 NKA-2 解吸率接近, 分别为 80.69% 和 80.26%。不同种类树脂对多酚的吸附和解吸效率有明显差异, 综合考虑吸附和解吸两个指标, 认为 NKA-2 型大孔树脂纯化朝鲜蓟叶多酚性能较好, 因此, 选择 NKA-2 大孔吸附树脂为最佳纯化树脂。经过该树脂纯化后的朝鲜蓟叶多酚含量为 135.30 mg/g, 与粗提取相对比, 朝鲜蓟叶多酚含量提高了 1.53 倍。

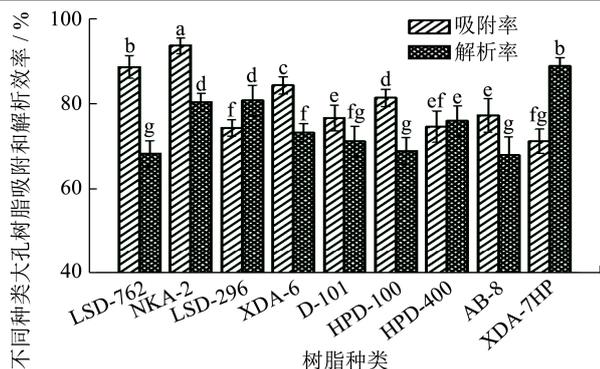


图2 九种不同树脂对朝鲜叶多酚的吸附率和解吸率比较

Fig.2 Comparison of adsorption and desorption rate of polyphenols from artichoke leaves between nine macroporous resins

注：不同小写字母表示差异显著， $p < 0.05$ 。

2.4 朝鲜蓟叶多酚纯化前后抗氧化结果及分析

2.4.1 DPPH 自由基清除活性

朝鲜蓟叶多酚纯化前后对 DPPH 自由基的清除能力如图 3 所示。结果表明多酚提取物对 DPPH 自由基清除率随浓度的增加而增大，且纯化后的多酚对 DPPH 自由基清除活性明显高于粗提多酚，其 IC_{50} 值分别为 $32.30 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ 和 $82.79 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ 。与 Zan^[23] 等人朝鲜蓟叶提取物对 DPPH 自由基清除能力呈现剂量依赖上升的结果一致。在相同浓度下纯化后的多酚对 DPPH 自由基的清除能力均明显强于粗多酚。此实验结果与赵艳红等人^[24]经 D-160 和 XRD-6 型大孔树脂纯化后的石榴皮多酚对 DPPH 自由基清除能力明显增强的实验结果类似。

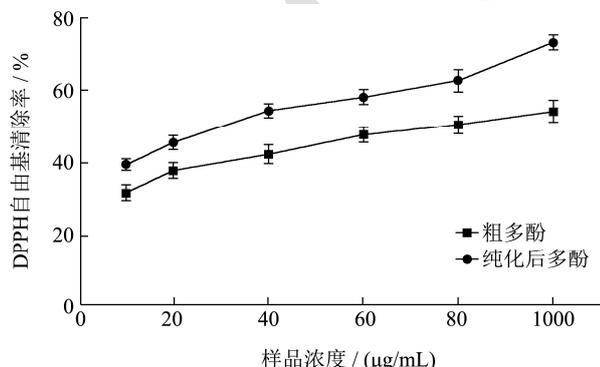


图3 粗多酚和纯化多酚提取物对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.3 Scavenging effect on DPPH free radical of purified and crude phenolic extracts

2.4.2 ABTS⁺ 自由基清除活性

如图 4 所示，朝鲜蓟叶多酚提取物纯化前后对 ABTS⁺ 自由基均有一定清除能力，且清除能力均随样

品浓度的增加而增大。与粗提多酚相比，纯化后的多酚对 ABTS⁺ 自由基清除率能力显著提高，纯化后的多酚的 IC_{50} 值为 $107.98 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$ ，而粗提多酚的 IC_{50} 值为 $251.30 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$ ，说明纯化后的多酚组分中多酚含量显著增加，从而对 ABTS⁺ 自由基的清除活性得到了显著的提高。蒋孟君等^[25]研究了大孔吸附树脂对食用玫瑰花总酚的 ABTS⁺ 自由基清除能力的影响，发现纯化后的多酚抗氧化能力明显强于纯化前的粗提取物，与本研究的结果一致，其主要原因是纯化工艺去除了一部分对 ABTS⁺ 自由基没有清除作用有机物（如多糖和蛋白等），使得纯化后多酚化合物的相对含量增加，从而对 ABTS⁺ 自由基的清除率有了显著的提高。

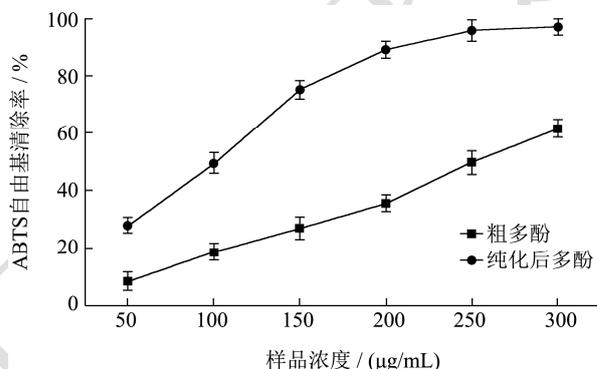


图4 粗提多酚和纯化多酚提取物对 ABTS⁺ 自由基的清除效果

Fig.4 Scavenging effect on ABTS⁺ radical of purified and crude phenolic extracts

2.4.3 Fe³⁺ 还原能力 (FRAP)

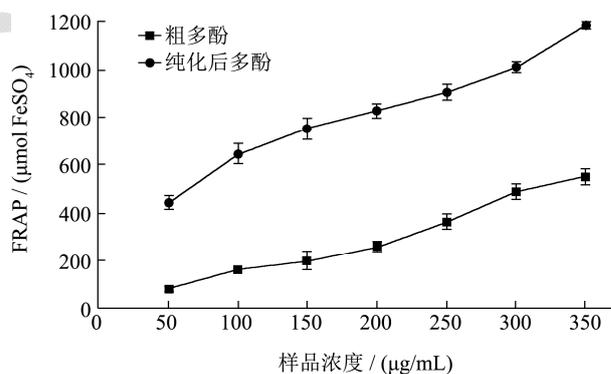


图5 粗多酚和纯化多酚提取物对铁离子的还原能力

Fig.5 Ferric reducing antioxidant effect of purified and crude phenolic extracts

纯化前后的朝鲜蓟叶多酚提取物对 Fe³⁺ 均有一定的还原能力，呈浓度依赖性增加，朝鲜蓟叶纯化后多酚对 Fe³⁺ 的还原能力有了显著的增强 ($p < 0.05$)，即浓度为 $80 \mu\text{g/mL}$ 的纯化多酚对 Fe³⁺ 的还原能力与浓度为 $321.00 \mu\text{g/mL}$ 的粗多酚的还原力相当。随着浓度的增加，纯化后多酚的还原力显著增加，当浓度为 $120 \mu\text{g/mL}$ 时其对 Fe³⁺ 的还原力达到 70.70%。Zan 等^[26]研究发现朝鲜蓟提取物中多酚含量越多抗氧化活性越

好。植物含有的化合物种类(多酚、矿物质、维生素和其他)以及含量均会影响其抗氧化能力,总酚含量与其抗氧化活性成正比。另外,一些研究发现朝鲜蓟抗氧化活性可能与木犀草苷、芹菜素、异槲皮素^[27]以及咖啡酸、绿原酸、阿魏酸^[28]等化合物有关,即朝鲜蓟中起抗氧化作用的物质主要来源于多酚。本研究通

过大孔树脂去除了大部分的蛋白以及糖类,使酚类物质的相对含量升高了,抗氧化结果显示纯化后多酚的抗氧化活性明显高于纯化前,进一步证实了多酚是朝鲜蓟叶提取物的主要抗氧化成分。

2.5 朝鲜蓟多酚纯化前后抑菌结果及分析

表4 朝鲜蓟叶粗提多酚提取物抑菌活性

Table 4 The antibacterial activity of crude phenolic extracts from artichoke leaf

溶液浓度/(mg/mL)	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	绿脓杆菌	肺炎克雷伯菌	乳杆菌
10.0	+	+	+	+	+	+	+
12.5	+	+	+	+	+	+	+
15.0	+	+	+	+	+	+	+
17.5	+	+	+	+	+	+	+
20.0	+	+	-	+	+	+	+
22.5	+	-	-	+	+	+	+
25.0	-	-	-	+	+	+	+
27.5	-	-	-	+	+	+	-
30.0	-	-	-	-	+	+	-
32.5	-	-	-	-	-	+	-

注:“-”表示无菌落出现;“+”表示有菌落出现。下表同。

表5 朝鲜蓟叶纯化多酚提取物抑菌活性

Table 5 The antibacterial activity of purified phenolic extracts from artichoke leaf

溶液浓度/(mg/mL)	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	绿脓杆菌	肺炎克雷伯菌	乳杆菌
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	-	+	+
13	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	+	-

由表4和表5可以看出,大孔树脂纯化前后的朝鲜蓟叶多酚提取物对实验所用的细菌和真菌均表现出一定的抑菌活性。相较于粗提多酚来说,纯化后的多酚抑菌活性更强。在实验浓度范围内,纯化前后朝鲜蓟叶多酚对肺炎克雷伯菌均未表现出抑菌效果。本实验中朝鲜蓟叶纯化前多酚对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、芽孢杆菌、白色念珠菌、绿脓杆菌和乳杆菌的MIC分别为25.0、22.5、20.0、30.0、32.5、27.5 mg/mL,而纯化后多酚对各菌种的MIC依次为10.0、8.0、12.0、13.0、12.0、13.0 mg/mL,纯化工艺显著提高了朝鲜蓟叶提取物的抑菌效果($p < 0.05$)。针对受试菌株,纯化前多酚对芽孢杆菌的抑菌活性最强,其次是大肠杆菌

和金黄色葡萄球菌,该结果与霍超等^[29]报道的朝鲜蓟叶提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等的抑菌实验抑制效果一致。而纯化后的多酚对大肠杆菌的抑制效果最好,其次是金黄色葡萄球菌。多酚具有广泛的抑菌活性,分子中的酚羟基是抑菌的结构基础。多酚与蛋白质分子有多个结合位点,通过抑制相关酶的活性进而抑制代谢,还可以通过破坏细胞膜结构、增加细胞通透性、影响细胞能量代谢从而对微生物起毒害作用,进而达到抑菌效果^[30]。朝鲜蓟提取物中酚类化合物以多羟基的木犀草素、芹菜素、二咖啡酰奎宁酸等为主^[27],Zhu^[31]等通过对朝鲜蓟不同极性部位的化合物进行抑菌活性测定,并从活性最好的正丁醇部分分

离得到绿原酸, 洋蓟素, 3,5-二咖啡酰奎宁酸, 4,5-二咖啡酰奎宁酸以及木犀草苷等 8 种具有较强抑菌活性的物质, 并说明酚类化合物为朝鲜蓟抑菌活性的主要成分。本研究经纯化工艺富集了大量的酚类化合物, 对比纯化前后发现经纯化后的朝鲜蓟叶提取物抑菌活性明显增强, 再次证实了多酚类化合物是朝鲜蓟叶提取物抑菌活性的主要成分来源。Zhu 等^[7]研究了朝鲜蓟叶、花和茎部分乙醇、氯仿和乙酸乙酯对 15 种微生物菌种的抑菌活性, 朝鲜蓟叶提取物活性优于其他部位, 乙醇提取物的最小抑菌浓度要低于氯仿和乙酸乙酯提取物的最小抑制浓度, 而且其抗微生物活性低于目前的许多抗生素, 这一结果为天然植物来源的抗细菌和抗真菌剂的研究提供了参考。王建超等^[32]也发现 D-101 树脂纯化可以显著提升枇杷叶多酚对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞杆菌的抗菌效果, 并且随着多酚浓度的升高, 抑制作用增加, 可能是因为抑菌活性物质在纯化后得到富集从而提升了抗菌活性, 这一结果基本与本研究相一致。

3 结论

本研究采用正交试验法, 考察了超声辅助提取中溶剂体积分数、料液比以及提取时间对朝鲜蓟叶多酚提取率的影响, 确定了最佳提取工艺参数, 分别为乙醇浓度 70%, 料液比 1:20, 超声时间 40 min, 并通过筛选得到 NKA-2 型树脂为朝鲜蓟叶多酚最佳纯化树脂。综合 DPPH·、ABTS⁺ 自由基清除活性以及 FRAP 法对朝鲜蓟叶多酚提取物的抗氧化活性进行评价, 发现其抗氧化活性明显, 可作为良好的天然抗氧化剂来源。同时, 经大孔树脂纯化后的多酚由于去除了对自由基清除无作用的糖类、蛋白质和部分有机物, 使得抗氧化能力明显高于粗提多酚。朝鲜蓟叶提取物对于不同的微生物具有不同的抑制效果, 本实验中对于大肠杆菌显示出最强的抑制活性, 其他依次为金黄色葡萄球菌、乳杆菌、芽孢杆菌、白色念珠菌、绿脓杆菌, 在实验浓度范围内对肺炎克雷伯菌未表现出抑制活性。纯化后的多酚对供试菌的最小抑制浓度较纯化前均有显著提高。总之, 纯化工艺可明显提高提取物的抗氧化活性和抑菌活性, 本实验结果为朝鲜蓟叶作为抗氧化剂以及植物来源的抑菌剂开发利用提供了理论基础。

参考文献

[1] Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat

hepatocytes [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 1997, 144(2): 279-286

- [2] Kraft K. Artichoke leaf extract-Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts [J]. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 1997, 4(4): 369-378
- [3] Aktay G, Deliorman D, Ergun E, et al. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 73(1): 121-129
- [4] Wang M F, Li J G, Rangarajan M, et al. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*) [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62(3): 454-456
- [5] Gaafar A A, Salama Z A, Baz F K E. Antioxidant and antiproliferative effects on human liver HepG2 epithelial cells from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products [J]. *Journal of Natural Sciences Research*, 2013, 3(10): 17-24
- [6] Saézn R T, García G D, De I P V R. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(8):687-693
- [7] Zhu X F, Zhang H X, Lo R, et al. Antimicrobial activities of *Cynara scolymus* L. leaf, head, and stem extracts [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 70(2): M149-M152
- [8] Liu S W, Chang X Dg, Liu X F, et al. Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink [J]. *Food Chemistry*, 2016, 212:87-95
- [9] 李柏榆, 杨美莲, 曹建新, 等. 超声辅助提取桑葚多酚及抗氧化活性分析 [J]. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 26(2):97-102
- LI Bo-yu, YANG Mei-lian, CAO Jian-xin, et al. Extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from mulberry [J]. *Journal of Yunnan Nationalities University: Natural Sciences Edition*, 2017, 26(2): 97-102
- [10] Ruan X, Zhan L M, Gao X X, et al. Separation and purification of flavonoid from *Taxus remainder* extracts free of taxoids using polystyrene and polyamide resin [J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(12): 1925-1934
- [11] 刘清, 李虎虎, 姚惠源, 等. 大孔吸附树脂分离富集大麦多酚的研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(11):98-102
- LIU Qing, LI Hu-hu, YAO Hui-yuan, et al. Study on isolation and enrichment of barley polyphenols by macroporous resin [J]. *Food Science*, 2007, 28(11): 98-102
- [12] Mensor L L, Menezes F S, Leitão G G, et al. Screening of

- Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method [J]. *Phytotherapy Research*, 2001, 15(2): 127-130
- [13] Zheng X L, Zhang R T, Liu C. Extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from wheat bran treated by steam explosion [J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2015, 14(10): 1857-1863
- [14] Sun D, Huang S Q, Cai S B, et al. Digestion property and synergistic effect on biological activity of purple rice (*Oryza sativa* L) anthocyanins subjected to a simulated gastrointestinal digestion *in vitro* [J]. *Food Research International*, 2015, 78(2): 114-123
- [15] 高凡丁,黄士淇,张成庭,等.发酵青刺果种子的酚类物质组成及抗氧化活性分析[J].云南民族大学学报(自然科学版),2018,27(3):167-175
- GAO Fan-ding, HUANG Shi-qi, ZHANG Cheng-ting, et al. Analysis of phenolic composition and antioxidant activities in fermented *Prinsepia utilis* Royle seeds [J]. *Journal of Yunnan Nationalities University: Natural Sciences Edition*, 2018, 27(3): 167-175
- [16] Floegel A, Kim D O, Chung S J, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2011, 24(7): 1043-1048
- [17] 付慧,杨萍,汪秋宽.茶多酚的制备及其抑菌活性的研究[J].食品科技,2012,37(6):273-276
- FU Hui, YANG Ping, WANG Qiu-kuan. Preparation and antimicrobial activities of tea polyphenols [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(6): 273-276
- [18] 陈建中,葛水莲,管立峰,等.响应面法优化双水相萃取大吴风草总黄酮工艺及抑菌活性测定[J].食品科学,2015, 36(24):57-62
- CHEN Jian-zhong, GE Shui-lian, ZAN Li-feng, et al. Optimization of aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Farfugium japonicum* (L.f.) Kitam by response surface methodology and antibacterial activity [J]. *Food Science*, 2015, 36(24): 57-62
- [19] 杨克沙.朝鲜蓟的化学成分和活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2015
- YANG Ke-sha. Study on the chemical constituents and bioactivity of *Cynara scolymus* [D]. Kunming: Kunming University of science and Technology, 2015
- [20] 张明,帅希祥,杜丽清,等.澳洲坚果青皮多酚提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(21):195-199.
- ZHANG Ming, SHUAI Xi-xiang, DU Li-qing, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of polyphenols from macadamia green peel [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(21): 195-199
- [21] 旷慧,迟超,吕长山,等.红树莓多酚的醇法提取工艺优化[J].食品科学,2016,37(10): 88-93
- KUANG Hui, CHI Chao, LYU Chang-shan, et al. Optimization of ethanol extraction process for polyphenols from red raspberry [J]. *Food Science*, 2016, 37(10): 88-93
- [22] 苗修港,余翔,张贝贝,等.NKA-9 大孔树脂纯化香椿叶黄酮类物质工艺优化[J].食品科学,2016,27(8):32-38
- MIAO Xiu-gang, YU Xiang, ZHANG Bei-bei, et al. Purification of flavonoids from *Toona sinensis* leaves with NKA-9 macroporous resin [J]. *Food Science*, 2016, 27(8): 32-38
- [23] Zan M A, Ferraz A B F, Richter M F, et al. *In vivo*, genotoxicity evaluation of an *Artichoke* (*Cynara scolymus* L.), aqueous extract [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(2): T367-371
- [24] 赵艳红,李建科,李国荣.石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J].食品科学,2010,31(11):31-37
- ZHAO Yan-hong, LI Jian-ke, LI Guo-rong. Purification with macroporous adsorbent resins and *in vitro* antioxidant evaluation of pomegranate peel polyphenols [J]. *Food Science*, 2010, 31(11): 31-37
- [25] 蒋孟君,王艺,任建青,等.超声提取食用玫瑰花总酚及其大孔树脂纯化前后抗氧化活性[J].食品工业科技,2017, 38(23):164-169
- JIANG Meng-jun, WANG Yi, REN Jian-qing, et al. Study on ultrasonic extraction of total phenol from edible rose and antioxidant activity of macroporous resin before and after purification [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(23): 164-169
- [26] Zan M A, Ferraz A B F, Richter M F, et al. *In vivo* genotoxicity evaluation of an artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(2): 5
- [27] Wang M F, Simon J E, Aviles I F, et al. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(3): 601-608
- [28] Azzini E, Bugianesi R, Romano F, et al. Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: A pilot study [J]. *British Journal of Nutrition*, 2007, 97(5): 963

(下转第 21 页)

现代食品科技