

二苯乙烯化合物的提取工艺优化 及其酪氨酸酶抑制活性

李紫微^{1,2}, 梁钰², 陈晓曼², 吴安萍², 吴晓翔², 阿卜杜拉·玉苏普¹, 刘果², 程金生³, 蒋文明³, 曹庸², 苗建银^{2*}

(1. 新疆特色药食用植物资源化学实验室, 新疆喀什 844000) (2. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642) (3. 韶关学院英东食品学院, 广东韶关 512015)

摘要: 该研究探讨了桑根来源的三种二苯乙烯化合物(氧化白藜芦醇, 白藜芦醇和白藜芦醇苷)的富集提取工艺, 并对提取物的抗氧化活性和酪氨酸酶抑制作用进行了研究。结果表明, 通过单因素试验和响应面法确定富集二苯乙烯化合物的最佳条件为: 提取时间 1 h, 料液比 1:20, 乙醇浓度 90%, 在此条件下, 桑根中氧化白藜芦醇, 白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量分别为 2923.59 $\mu\text{g/g}$, 32.45 $\mu\text{g/g}$ 和 3.15 $\mu\text{g/g}$, 富含三种二苯乙烯化合物提取物的得率为 10.23%。并且, 提取物表现出极强的 DPPH 自由基清除能力 ($\text{IC}_{50}=0.063 \text{ mg/mL}$) 和 ABTS 自由基清除能力 ($\text{IC}_{50}=0.008 \text{ mg/mL}$)。此外, 提取物比熊果苷表现出更强的酪氨酸酶抑制活性, 其酪氨酸酶抑制率 IC_{50} (2.514 $\mu\text{g/mL}$) 仅约为熊果苷 ($\text{IC}_{50}=15.551 \mu\text{g/mL}$) 的 16%。综上, 高活性的二苯乙烯化合物提取物具有天然抗氧化剂和美白剂的潜力, 在食品、美容与医药领域有很大的应用价值。桑根可作为二苯乙烯化合物的重要天然来源, 是值得被开发利用的抗氧化、美白的原料。

关键词: 氧化白藜芦醇; 白藜芦醇; 白藜芦醇苷; 富集提取; 抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制活性

文章编号: 1673-9078(2022)01-238-247

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0351

Optimization of the Extraction Process of Stilbene Compounds and Their Tyrosinase Inhibitory Activity

LI Ziwei^{1,2}, LIANG Yu², CHEN Xiaoman², WU Anping², WU Xiaoxiang², Abdullah Yusuf¹, LIU Guo², CHENG Jinsheng³, JIANG Wenming³, CAO Yong², MIAO Jianyin^{2*}

(1. Laboratory of Xinjiang Native Medicinal and Edible Plant Resources Chemistry, Kashi 844000, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(3. Henry-Fork School of Food Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512015, China)

Abstract: In this study, the enrichment and extraction processes of three stilbene compounds (oxyresveratrol, resveratrol and resveratrol glycosides) from the mulberry root were investigated, and the antioxidant activity and tyrosinase inhibition of the extracts were also studied. The results showed that the optimal conditions for enriching stilbene compounds were determined by single factor test and response surface tests as follows: extraction time, 1 h; solid-liquid ratio, 1:25; ethanol concentration, 90%. Under these conditions, the contents of oxyresveratrol, resveratrol and resveratrol glycosides in mulberry root were 2923.59 $\mu\text{g/g}$, 32.45 $\mu\text{g/g}$ and 3.15 $\mu\text{g/g}$, respectively, and the yield of the extract rich in three stilbene compounds was 10.23%. In addition, the extract showed a strong DPPH free radical scavenging ability ($\text{IC}_{50}=0.063$

引文格式:

李紫微, 梁钰, 陈晓曼, 等. 二苯乙烯化合物的提取工艺优化及其酪氨酸酶抑制活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 238-247

LI Ziwei, LIANG Yu, CHEN Xiaoman, et al. Optimization of the extraction process of stilbene compounds and their tyrosinase inhibitory activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 238-247

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0400204-3); 新疆特色药食用植物资源化学重点实验室开放课题 (KSUZSYS202002)

作者简介: 李紫微 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: liziwei@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miao jy8181@scau.edu.cn

mg/mL) and ABTS free radical scavenging capacity ($IC_{50}=0.008$ mg/mL). Furthermore, the extract showed a stronger tyrosinase inhibitory activity than arbutin, with its tyrosinase inhibitory rate IC_{50} (2.514 μ g/mL) being only 16% of that of arbutin ($IC_{50}=15.551$ μ g/mL). In summary, the highly active stilbene extract has the potential as a natural antioxidant and whitening agent, and has great application value in the fields of food, beauty and medicine. Mulberry root can be used as an important natural source of stilbene compounds, which is worth to be developed and utilized as a raw material for anti-oxidation and whitening.

Key words: oxyresveratrol; resveratrol; resveratrol glycosides; extraction and enrichment; antioxidant activity; tyrosinase inhibitory activity

随着人们生活水平的提高,食物除了需要满足基本的营养需求外,还期望能够在预防某些疾病中发挥有益作用。全球人口老龄化、慢性疾病的增加和当下新型冠状病毒肺炎的爆发等众多社会问题,使人们逐渐意识到健康维护、保健养生的重要性,预计在2030年我国的健康市场行业需求可达到16万亿人民币^[1]。越来越多的研究表明,食用水果和蔬菜直接对健康有很大的益处,其有益影响归因于水果和蔬菜中的各种抗氧化剂,主要包括多酚、类胡萝卜素、抗坏血酸等^[2]。近年来,研究者们从植物中提取多酚化合物做了大量研究,旨在寻求天然来源的抗氧化活性物质^[3,4]。

氧化过程是人体必不可少的生理变化,氧化自由基的过度产生会导致皮肤疾病,加速衰老。酪氨酸酶是人体黑色素生成的关键酶,酪氨酸酶的过量表达会引起黄褐斑等多种皮肤疾病,导致皮肤老化。因此,研究人员致力于研发可用于食品和化妆品的低毒有效的酪氨酸酶抑制剂。Oh等^[5]提取山葡萄根提取物发现,提取物是通过二苯乙烯类化合物对酪氨酸酶产生抑制效果。

二苯乙烯类是许多植物产生的重要次生代谢产物,属于植物多酚中的一大类化合物^[6]。值得注意的是,包括白藜芦醇、氧化白藜芦醇及其二苯乙烯衍生物的天然二苯乙烯类化合物在近些年被广泛研究。因为这些植物化学物质具有抗癌、抗炎、抗菌和抗氧化等多种重要的生物活性而受到广泛的关注^[7]。其中最具有代表性的白藜芦醇作为近几年热点研究的植物化学物质,在食品、药品和化妆品等众多领域都有良好的应用价值,被认为是一种最有希望预防癌症的化合物之一^[8]。目前,白藜芦醇的主要来源是葡萄和虎杖等少数植物,且价格昂贵限制了它的市场发展。氧化白藜芦醇是一种 α -葡萄糖苷酶抑制剂,与白藜芦醇相比,在2位上多了一个羟基,因此,被认为具有比白藜芦醇更强的生物活性^[9]。白藜芦醇苷作为白藜芦醇的糖苷形式,其对心血管的保护作用引起了广泛关注,并且在肠道糖苷酶的作用下,白藜芦醇苷可转化为白藜芦醇^[10]。因此,本研究将以氧化白藜芦醇、白藜芦醇和白藜芦醇苷这三个二苯乙烯化合物的典型代表作为

研究对象。

基于前期的研究发现植物桑的桑果、桑枝和桑根中,桑根来源的二苯乙烯化合物含量最为丰富。桑科植物由于具有丰富的营养价值和保健功能而受到人们的广泛青睐,桑白皮作为药食同源的原料之一往往能很好的被利用,但其桑根部分常常被丢弃,这不仅造成资源的浪费,而且引起严重的环境污染。为了合理开发和利用桑根资源,本研究以二苯乙烯化合物含量为依据,在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken响应面设计试验优化富集提取工艺条件,并探讨最佳富集条件下二苯乙烯化合物提取物的体外抗氧化、酪氨酸酶抑制活性,为开发具有抗氧化和美白效果的保健食品和化妆品提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

新鲜桑根采自广东省英德市。将桑根用水清洗并于50℃烘箱烘24h至干燥,粉碎过40目筛,随后密封于塑料袋中,于4℃下保存备用。

乙醇、石油醚,乙酸乙酯均为分析纯,天津富宇精细化工厂;乙腈,甲醇均为色谱纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;氧化白藜芦醇($\geq 98\%$),白藜芦醇($\geq 98\%$),白藜芦醇苷($\geq 98\%$),多酚氧化酶(25 KU),L-酪氨酸,上海源叶生物科技有限公司;ABTS(2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐, $\geq 98\%$),DPPH(2,2-联苯基-1-苦基肼基, $\geq 98\%$),熊果苷($\geq 98\%$),上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

AL104 万分之一电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DHG-9030A 电热恒温干燥箱,上海恒一仪器有限公司;WZ-100 恒温水浴锅,上海申生科技有限公司;119 型中药粉碎机,浙江温岭市药材机械厂;LC-10A 分析型高效液相色谱仪,岛津仪器(中国)有限公司;Enspire2300 多功能酶标仪,美国PerkinElmer公司。

1.3 试验方法

1.3.1 桑根二苯乙烯化合物提取物的富集制备

取 3 g 桑根粉末, 按照料液比 1:15 (g/mL) 的比例向样品中加入 80% 的乙醇溶液, 并于避光条件下超声提取两次, 每次 30 min。收集滤液, 然后用布氏漏斗进行抽滤, 将滤液减压浓缩至 10 mL 并向其中加入 NaCl 至析出, 静至 20 min。再次过滤, 收集的滤液于 4 °C 下静置 10 h。然后向其中加入 90 mL 的石油醚静置 2 h 后, 过滤, 并用旋转蒸发皿去除石油醚。然后向提取液中加入 40 mL 的乙酸乙酯水溶液 (V/V=1:1) 进行萃取。取上层 (乙酸乙酯层) 过滤蒸发至干, 用 50% 甲醇溶液溶解所得浓缩物, 最后利用超高速真空离心干燥机去除甲醇后冷冻干燥, 制得富含二苯乙烯化合物的冻干样品, -20 °C 下保存。富含二苯乙烯化合物提取物得率计算如下式:

$$W / \% = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

式中:

W—富含二苯乙烯化合物提取物得率, %;

m_1 —富含二苯乙烯化合物冻干样的质量, g;

m_2 —桑根粉末的质量, g。

1.3.2 二苯乙烯化合物的成分分析及含量测定

采用岛津 LC-10A 分析型高效液相色谱 (HPLC) 测定三种二苯乙烯化合物成分。色谱条件为 Innoval C18 柱 (4.6×250 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测器: 紫外分光检测器 (SPD), 306 nm 和 328 nm 处进行检测; 流动相组成: 0.1% 磷酸水 (A) 和乙腈 (B); 梯度洗脱程序: 0~20 min, 17%~25% B; 20~40 min, 25%~28% B; 40~75 min, 28%~45% B; 75~85 min, 45%~95% B; 85~95 min, 95%~95% B; 95~100 min, 95%~17% B。以标准品在色谱柱上的保留时间为对照, 判断各化合物成分。利用面积归一化法, 根据最大吸收峰确定各化合物含量。

质谱条件: ESI 离子源, 负离子模式, 电喷雾电压 4.5 kV, 离子源温度 500 °C, 雾化气流速采用中等流速, 离子化电压 5.5 kV, 喷雾器电压 20 psi。采用负离子多反应监测模式, 扫描范围 m/z 100~500。

1.3.3 单因素实验

在预实验的基础上, 分别考察提取时间 (0.5、1、1.5、2、2.5 h)、料液比 (1:10、1:15、1:20、1:25) 和乙醇浓度 (75%、80%、85%、90%) 3 个因素对桑根中二苯乙烯化合物含量的影响。去除杂质步骤按照方法 1.2.1 进行。

1.3.4 响应面实验设计

在单因素实验基础上, 选择提取时间 (A)、料液比 (B) 和乙醇浓度 (C) 作为影响因素进行试验, 因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计

Table 1 Experimental design of Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	1
A: 提取时间/h	1	1.5	2
B: 料液比/(g/mL)	1:10	1:15	1:20
C: 乙醇浓度/%	80	85	90

1.3.5 抗氧化能力的测定

1.3.5.1 DPPH 自由基抗氧化实验

DPPH 自由基清除能力的测定参考 Miao 等的方法^[11], 并稍作修改。取 100 μL 稀释至合适浓度样品溶液 (0.05、0.1、0.2、0.25、0.5 mg/mL) 于 96 孔酶标板中, 加入 100 μL 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液, 震荡 1~2 min, 室温避光静置 30 min, 然后在 517 nm 处测定样品组吸光度 A_t , 样品与溶剂混合液组吸光度 A_r , 乙醇代替样品的空白组吸光度 A_0 , DPPH 自由基清除能力按下式计算。每组实验重复 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_t - A_r}{A_0}\right) \times 100\%$$

并采用 SPSS 软件计算样品的 IC_{50} 值, 其中, IC_{50} 值越小, 则表示清除 DPPH 自由基的能力越强。

1.3.5.2 ABTS 自由基抗氧化实验

ABTS 自由基清除能力的测定参考 Miao 等的方法^[11], 并稍作修改。取 100 μL 稀释至合适浓度样品溶液 (0.05、0.1、0.2、0.25、0.5 mg/mL) 于 96 孔酶标板中, 加入 100 μL ABTS 工作液充分混合, 于 37 °C 避光静置 10 min 后在 734 nm 处测定反应液的吸光度 A_t , 样品与溶剂混合液的吸光度 A_r , 乙醇代替样品空白组的吸光度 A_0 , ABTS 自由基清除能力按下式计算。每组实验重复 3 次。

$$\text{ABTS 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_t - A_r}{A_0}\right) \times 100\%$$

并采用 SPSS 软件计算样品的 IC_{50} 值, 其中, IC_{50} 值越小, 则表示清除 ABTS 自由基的能力越强。

1.3.6 酪氨酸抑制活性的测定

酪氨酸抑制活性的测定参考 Deveci^[12]和 Lim^[13] 等的方法, 并稍作修改。吸取 40 μL 不同浓度样品 (0.5、2.5、5、10、20 μg/mL) 于 96 孔酶标板中, 加入 80 μL PBS (pH 6.8) 和 40 μL L-Tyr 底物溶液于 37 °C 的恒温箱孵育 10 min 后, 迅速加入 40 μL 预热过的酪氨酸酶启动反应。在 475 nm 处测定反应液 0 min 和 30 min 的吸光度 A。同时, 以熊果苷作为阳性对照组。按照

下式计算样品液对酪氨酸酶的抑制率。每组实验重复3次。

$$\text{抑制率}/\% = \left(1 - \frac{\Delta A_1 - \Delta A_2}{\Delta A_3 - \Delta A_4}\right) \times 100\%$$

式中:

A_1 ——加底物和样品溶液组;

A_2 ——加样品溶液, 不加底物组;

A_3 ——加底物, 不加样品组;

A_4 ——既不加样品也不加底物组。

1.4 数据分析

采用 Design-Expert.V8.0.6.1 和 SPSS 17.0 软件对试验数据进行分析, $p < 0.05$ 则认为样品间具有显著性差异, 所得结果进一步用 Excel 2016 作图。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取时间对二苯乙烯物质含量的影响

如图1所示, 提取时间在0.5~1.5 h内, 随着提取时间延长, 桑根中二苯乙烯化合物的含量也随之增加, 当提取时间高于1.5 h后, 化合物含量开始下降。这是因为时间过长, 提取过程产生了多余的热量, 导致二苯乙烯化合物分解。相似的研究也认同这一原因, 如: Xuan 等人优化提取时间对花青素含量的影响发现, 提取时间从45 min至90 min时, 花青素含量急剧从6.67 mg/g 下降至5.65 mg/g^[14]; 杨丹等^[15]发现提取时间过长, 桂花果皮多酚提取量下降。因此, 本研究选择1.5 h 继续优化提取工艺条件。

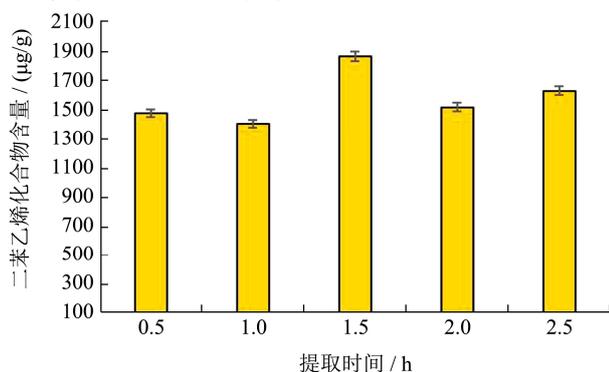


图1 提取时间对二苯乙烯化合物含量的影响

Fig.1 Effect of extraction time on the stilbene compounds contents

2.1.2 料液比对二苯乙烯物质含量的影响

由图2可知, 随着提取液体积的增加, 二苯乙烯化合物的含量也在增加, 当料液比为1:15时, 提取化合物含量最大, 之后随着料液比的增加提取化合物含

量反而减少。这是因为在一定浓度范围内, 增加溶剂用量, 可将未充分溶解的二苯乙烯化合物扩散至溶剂中^[3,16]。但是当料液比达到1:15 (g/mL) 的饱和状态时, 化合物含量不再增加, 这是因为提取溶剂用量增加会导致二苯乙烯化合物浓度降低, 从而使分子间作用力减弱, 降低稳定性, 最终导致含量稍降低。正如 Rinku 等人优化甜菜渣中甜菜碱的提取工艺时发现, 随着料液比从1:15增加到1:30, 酚类物质浓度显著下降, 认为是提取溶剂浓度较高时稀释了溶液所致^[17]。因此, 此研究选择当料液比为1:15作为最低水平进一步优化。

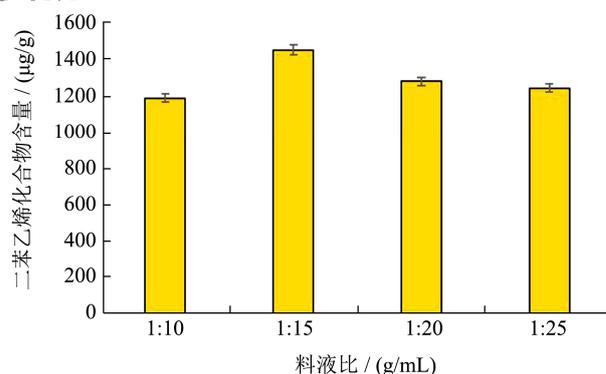


图2 料液比对二苯乙烯化合物含量的影响

Fig.2 Effect of solid to liquid ratio on the stilbene compounds contents

2.1.3 乙醇浓度对二苯乙烯物质含量的影响

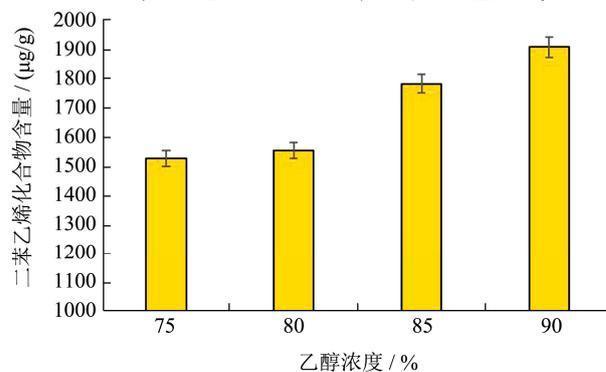


图3 乙醇浓度对二苯乙烯化合物含量的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the stilbene compounds contents

由图3可知, 桑根中二苯乙烯化合物的含量随乙醇浓度提高而提高。乙醇浓度在75%~85%时, 随乙醇浓度提高, 二苯乙烯化合物的含量提高速度较快, 乙醇浓度高于85%后, 二苯乙烯化合物的含量提高速度减慢。原因在于随着提取液中乙醇浓度的提高, 其他脂溶性物质和二苯乙烯化合物竞争溶解从而其含量提取速度减慢。相似的研究也认同这一原因, 如朱沛沛等人发现残茶多酚得率在乙醇浓度为50%时提取率最高, 认为可能原因是其他物质与多酚发生竞争溶解

[18]。因此,本研究进一步的工艺优化试验选择 85%乙醇为宜。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 Box-Behnken 实验设计与结果分析

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface methodologies

No.	A: 提取时间/h	B: 料液比/(g/mL)	C: 乙醇浓度/%	二苯乙烯化合物含量/(μg/g)
1	1.5	1:15	85	1782.38
2	2	1:20	85	2293.91
3	1.5	1:10	90	2459.82
4	2	1:10	85	1708.87
5	1.5	1:10	80	2960.38
6	1.5	1:15	85	1589.00
7	1	1:10	85	2880.29
8	1.5	1:15	85	1910.18
9	1	1:15	90	2263.16
10	2	1:15	90	2325.87
11	2	1:15	80	2030.12
12	1.5	1:20	80	1681.43
13	1	1:20	85	2192.07
14	1.5	1:15	85	2081.30
15	1.5	1:20	90	3112.59
16	1	1:15	80	1954.90
17	1.5	1:15	85	1806.27

根据单因素试验,继续选择提取时间(A),料液

比(B),乙醇浓度(C)三个因素为响应设计变量,设置 3 因素 3 水平响应面实验共有 17 个试验点,其中 5 个中心点,12 个析因点,设计方案及结果见表 2。

2.2.2 方差分析与显著性检验

利用 Design-Expert 软件对表 2 响应面的试验结果进行多元回归分析,得到二苯乙烯化合物含量(Y)对自变量提取时间(A),料液比(B),乙醇浓度(C)的多元二次回归方程为: $Y=1833.83-116.46 \times A-91.17 \times B+191.83 \times C+318.32 \times A \times B-3.13 \times A \times C+482.93 \times B \times C+12.46 \times A^2+422.5 \times B^2+297.23 \times C^2$

为了检验回归方程的可靠性,进一步确定各因素对二苯乙烯化合物含量的影响程度,对回归模型进行了方差分析。由表 3 可知,二次模型的 $p < 0.05$,是显著的,说明模型是有意义的,失拟项 $F=2.35$,失拟项误差不显著,失拟项 $P=0.2138 > 0.05$,说明该方程拟合度较好。模拟系数 $R^2=0.89 > 0.8$,说明该模型能够很好解释的各因素与响应值之间的真实关系,结果可靠。并且表 3 表明,一次项 C、交互项 AB、二次项 C^2 对二苯乙烯化合物的提取含量影响显著;交互项 BC、二次项 B^2 对二苯乙烯化合物的提取含量影响极显著。此外,由 F 值检验可获得影响二苯乙烯化合物提取含量的主次因素:料液比(B) > 提取时间(A) > 乙醇浓度(C)。

最后由图 4 的二苯乙烯化合物提取含量的残差分布图可以看出,17 个试验点基本分布在同一条直线上,表明各响应值之间相关性良好,该模型可以用其确定最佳提取工艺条件[19]。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	3.00E+06	9	3.34E+05	6.48	0.0111	*
A: 提取时间	1.09E+05	1	1.09E+05	2.11	0.1898	
B: 料液比	66496.49	1	66496.49	1.29	0.293	
C: 乙醇浓度	2.94E+05	1	2.94E+05	5.72	0.048	*
AB	4.05E+05	1	4.05E+05	7.88	0.0263	*
AC	39.11	1	39.11	7.60E-04	0.9788	
BC	9.33E+05	1	9.33E+05	18.13	0.0038	**
A^2	6.54E+02	1	6.54E+02	0.013	0.9134	
B^2	7.52E+05	1	7.52E+05	14.61	0.0065	**
C^2	3.72E+05	1	3.72E+05	7.23	0.0311	*
残差	3.60E+05	7	51457			
失拟项	2.30E+05	3	76593.57	2.35	0.2138	not significant
净误差	1.30E+05	4	32604.58			
总误差	3.36E+06	16				

注: $p < 0.05$, 差异显著; $p < 0.01$, 差异极显著。

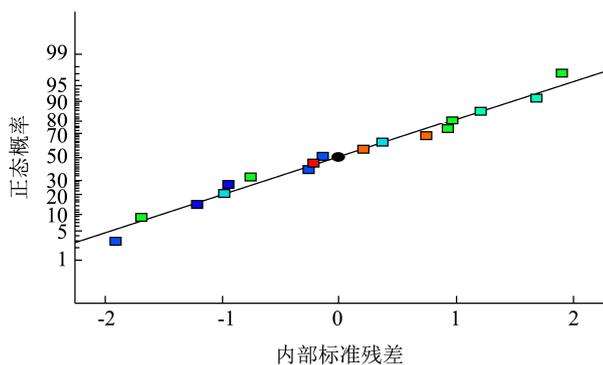


图4 二苯乙烯化合物提取含量的残差分布

Fig.4 Residual distribution of the stilbene compounds contents

2.2.3 响应面交互作用分析与最优条件验证

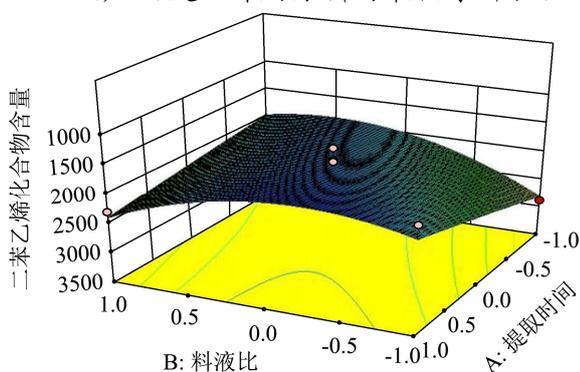


图5 提取时间(A)和料液比(B)对二苯乙烯化合物提取含量的影响

Fig.5 Effect of extract time (A) and solid to liquid ratio (B) on the stilbene compounds contents

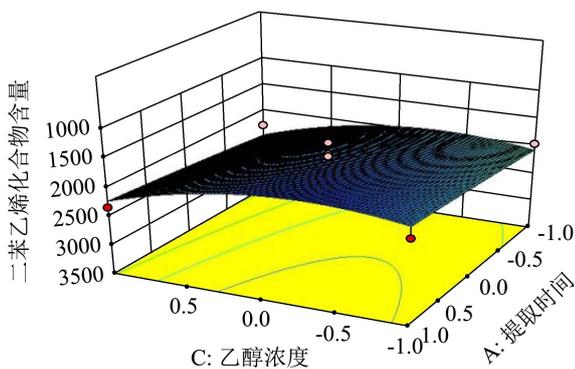


图6 提取时间(A)和乙醇浓度(C)对二苯乙烯化合物提取含量的影响

Fig. 6 Effect of extract time (A) and ethanol concentration (C) on the stilbene compounds contents

利用 Box-Behnken 分析各因素交互作用, 拟合出响应面 3D 图, 更直观描述各因素之间的交互作用对二苯乙烯化合物提取含量的影响, 结果如图 5~7 所示。

由图 5~7 可知, 在交互项对二苯乙烯化合物提取含量的影响中, 提取时间与乙醇浓度、提取时间与料液比交互作用明显, 表现为响应面曲面更为陡峭, 响应值变化较大; 乙醇浓度与料液比交互作用影响较小,

表现为响应面曲面较为平缓, 响应值变化较小。此结果与表 3 中方差分析所得结果一致。

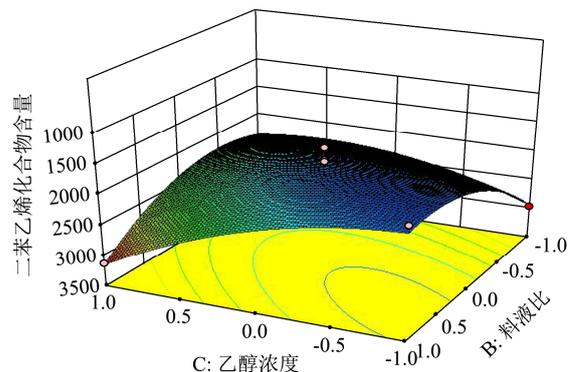


图7 料液比(B)和乙醇浓度(C)对二苯乙烯化合物提取含量的影响

Fig.7 Effect of solid to liquid ratio (B) and ethanol concentration (C) on the stilbene compounds contents

根据模型预测, 从桑根中富集二苯乙烯化合物的最佳提取工艺为: 提取时间 1.025 h, 料液比 1:20, 乙醇浓度 90%。此时理论的可从桑根中提取三种二苯乙烯化合物含量为 2958.84 $\mu\text{g/g}$ 。考虑到实验条件的可操作性, 将最佳提取工艺条件调整为: 提取时间 1 h, 料液比 1:20, 乙醇浓度 90%。在此条件下, 从 3 g 的桑根原料粉末中得到 307 mg 富含三种二苯乙烯化合物的提取物, 提取物得率为 10.23%。并且从桑根中提取得到的二苯乙烯化合物含量为 2959.2 $\mu\text{g/g}$, 与预测理论值仅相差 0.36%, 说明响应值法优化得到富集二苯乙烯化合物的最佳提取工艺条件可行、可信, 可为纯天然来源的二苯乙烯化合物的开发利用提供借鉴。

2.3 桑根中三种二苯乙烯化合物含量分析及结构鉴定

三种二苯乙烯化合物(氧化白藜芦醇、白藜芦醇和白藜芦醇苷)的标准品和富含三种二苯乙烯化合物提取液的高效液相色谱分析见图 8。为进一步确认化合物, 此研究通过液质联用技术对二苯乙烯化合物提取液的化学成分进行定性分析, 根据各化合物的保留时间和特征质谱信息, 并结合标准品及相关文献数据对比确认富集得到的三种二苯乙烯化合物, 结果见表 4。

最优提取富集条件下的桑根二苯乙烯化合物提取物通过高效液相色谱定量分析, 并将化合物含量换算成干桑根原料和提取液中的三种二苯乙烯的含量见表 5。可以看出, 桑根中氧化白藜芦醇、白藜芦醇、白藜芦醇苷的含量分别为 2923.59、32.45、3.15 $\mu\text{g/g}$ 。通过富集提取, 可在二苯乙烯化合物提取物中的氧化白藜芦醇、白藜芦醇、白藜芦醇苷的含量分别提升至

为 28569.326、317.131、30.816 $\mu\text{g/g}$ 。相比于桑根原料，二苯乙烯化合物提取物中氧化白藜芦醇、白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量约是原料的 10 倍，这表明此研究的提取方法达到了很好的富集二苯乙烯化合物的效果。同时提取物中氧化白藜芦醇含量最丰富，是不同

品种石斛甲醇提取物的 179.7~3048.4 倍^[22]。另外，桑根中的氧化白藜芦醇含量也比其他植物来源的丰富，比如，不同产地的金刚藤 (0.02~2.24 mg/g)^[23]等。因此，桑根可作为高活性化合物氧化白藜芦醇的重要天然来源之一。

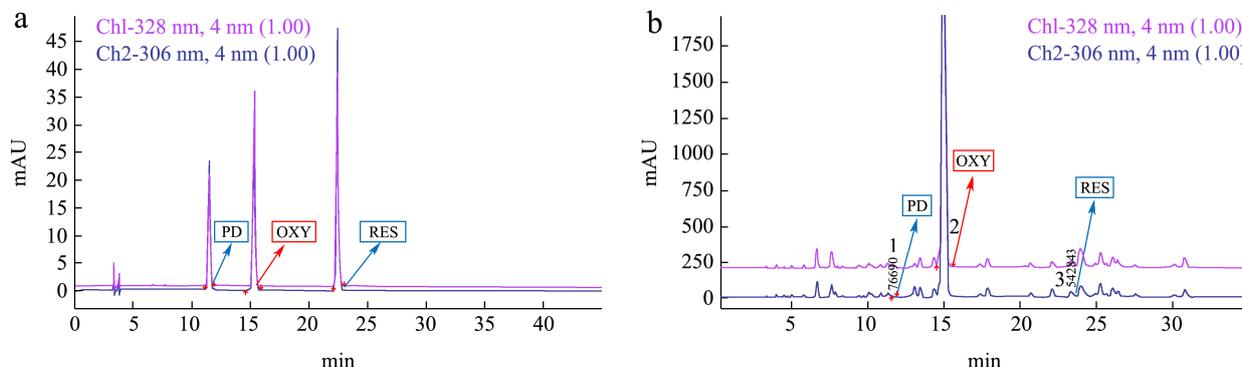


图 8 三种二苯乙烯化合物（氧化白藜芦醇、白藜芦醇和白藜芦醇苷）标准品 (a) 和富含三种二苯乙烯化合物提取液 (b) 的高效液相色谱

Fig.8 High performance liquid chromatograms of the three stilbene compounds (oxyresveratrol, resveratrol, and polydatin) standard (a) and the extracts (b)

注: OXY: 氧化白藜芦醇; PD: 白藜芦醇苷; RES: 白藜芦醇。

表 4 三种二苯乙烯化合物的高效液相分析与质谱数据信息

Table 4 High performance liquid chromatography and mass spectrometry data information and confirmation of three stilbene compounds

NO.	分子式	t_R/min	理论值[M-H]	实测值[M-H]	特征碎片离子	鉴定
1	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$	11.659	389.38	389.0	$\text{MS}^2[389]: 227; 162$	polydatin ^[20]
2	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$	14.997	243.24	242.9	$\text{MS}^2[243]: 175; 68$	Oxyresveratrol ^[21]
3	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$	23.328	227.34	227.0	$\text{MS}^2[227]: 184; 43$	Resveratrol ^[20]

表 5 三种二苯乙烯化合物的含量分析

Table 5 Content analysis of three stilbene compounds

含量/ $\mu\text{g/g}$	氧化白藜芦醇 (OXY)	白藜芦醇 (RES)	白藜芦醇苷 (PD)
桑根	2923.59±18.08	32.45±1.72	3.15±1.52
二苯乙烯化合物提取物	28569.326±176.7	317.131±16.8	30.816±14.88

2.4 抗氧化活性

2.4.1 DPPH 自由基的清除能力

由图 9 可知，随着富含二苯乙烯化合物提取物浓度的增加，DPPH 自由基的清除率也在增加，且各浓度之间有显著性差异 ($p < 0.05$)。样品浓度从 0.05 mg/mL 提高至 0.5 mg/mL ，其对 DPPH 自由基的清除率由 46.20% 上升至 94.97%，这表明二苯乙烯化合物提取物有很好的抗氧化活性。同时计算得到富含二苯乙烯化合物提取物对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 值为 0.063 mg/mL 。从 IC_{50} 值分析发现，提取物的 DPPH 自由基清除作用效果明显优于覆盆子 ($\text{IC}_{50}=0.82 \text{ mg/mL}$)^[24]，和多种药用植物如野甘草 ($\text{IC}_{50}=1.02 \text{ mg/mL}$) 和木橘 ($\text{IC}_{50}=0.97 \text{ mg/mL}$)^[25]等提取物。

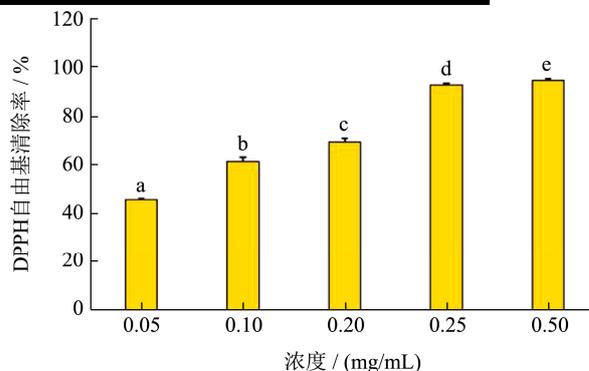


图 9 富含二苯乙烯化合物提取物对 DPPH 自由基的清除效果
Fig.9 The scavenging effect of stilbene extract on DPPH free radical

注: 同一指标, 不同组别不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同。

2.4.2 ABTS 自由基的清除能力

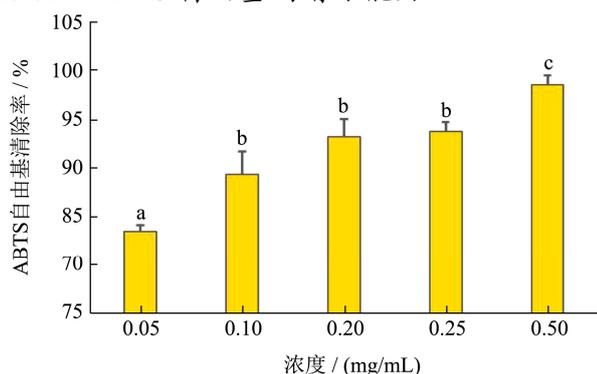


图 10 富含二苯乙烯化合物提取物对 ABTS 自由基的清除效果

Fig.10 The scavenging effect of stilbene extract on ABTS free radical

从图 10 可以看出,富含二苯乙烯化合物提取物对 ABTS 自由基的清除率随浓度增加而逐渐增加,清除 ABTS 自由基能力与浓度存在一定的量效关系。且所测样品浓度范围(0.05~0.5 mg/mL)清除 ABTS 自由基能力均大于 80%,0.5 mg/mL 的二苯乙烯化合物提取物的清除 ABTS 自由基率达到 98.59%。同时计算得到样品对 ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 值为 0.008 mg/mL。从清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 值分析,富含二苯乙烯化合物提取物的抗氧化活性显著优于山苍子水提取物($IC_{50}=149.82 \mu\text{g/mL}$)^[26]和苜蓿醇提取物($IC_{50}=12.33 \mu\text{g/mL}$)^[27],甚至强于一些纯化合物,比如橘皮苷($IC_{50}=8.1 \mu\text{g/mL}$)^[28],桦木酸($IC_{50}=105 \mu\text{g/mL}$)^[29]等。这可能是由于富集的二苯乙烯化合物发挥了重要的抗氧化能力协同作用^[30]。

2.5 对酪氨酸的抑制活性

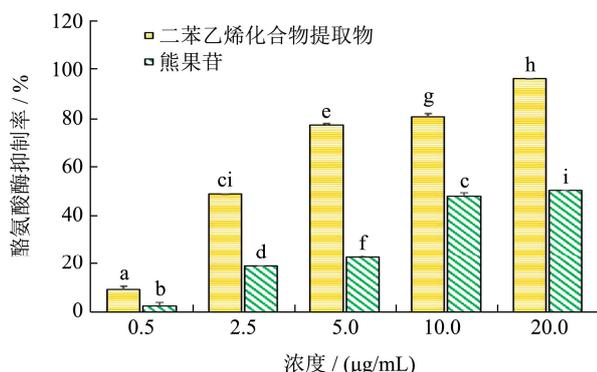


图 11 富含二苯乙烯化合物提取物对酪氨酸酶的抑制作用

Fig.11 Inhibitor effect of stilbenes extract on tyrosinase

酪氨酸酶又称多酚氧化酶,可参与人体黑素细胞黑素生成的调节过程,多个研究表明天然植物提取物可通过抑制酪氨酸酶活性和体外抗氧化能力来抑制黑色素形成^[31,32]。由图 11 可知,富含二苯乙烯化合物提取物表现出具有极好的抑制酪氨酸酶效果,其抑制能

力与样品浓度呈良好的剂量效应关系。在 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 的样品浓度内,富含二苯乙烯化合物提取物对酪氨酸酶的抑制率分别达到 9.76%、49.06%、77.08%、80.35%、96.00%。且在相同浓度时,相比于阳性对照品熊果苷,样品表现更强的抑制酪氨酸酶活性。0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 的熊果苷对酪氨酸酶的抑制率为 3.19%、19.33%、23.03%、48.07%、50.59%。计算两者抑制酪氨酸酶的 IC_{50} 值分别为 2.514 $\mu\text{g/mL}$ 和 15.551 $\mu\text{g/mL}$,提取物抑制酪氨酸酶活性的 IC_{50} 仅约为熊果苷的 16.00%,这表明富含二苯乙烯化合物提取物对酪氨酸酶的抑制效果非常显著得高于熊果苷,分析原因可能是提取物中的三类二苯乙烯化合物在酪氨酸酶抑制方面起到了协同增效的作用。同时,富含二苯乙烯化合物提取物的抑制酪氨酸酶活性明显强于其他植物提取物,比如接力草提取物($IC_{50}=9 \mu\text{g/mL}$)^[33]和草莓根提取物($IC_{50}=533.69 \mu\text{g/mL}$)^[34],甚至强于一些纯化合物比如黑松中提取的原花色苷($IC_{50}=37.64 \mu\text{g/mL}$)^[35]。此外,其他研究表明酚类物质可在提取物的体系中对酪氨酸酶活性起主导作用,并且可作为抗黑色素的天然来源添加到药物和化妆品中^[36]。由此可知,富含二苯乙烯化合物提取物具有美白效果,有望适用于美白类化妆品的开发。

3 结论

本研究利用桑根作为富集二苯乙烯化合物的原料来源,确定了最佳富集提取工艺,使得桑根提取物中的三种二苯乙烯化合物含量得到显著提升。同时,最佳提取工艺条件下的富含二苯乙烯化合物提取物表现出很好的清除 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和抑制酪氨酸酶活力,并表现出明显的量效关系。综上所述,本研究能有效提高三种二苯乙烯化合物(氧化白藜芦醇、白藜芦醇和白藜芦醇苷)的含量,这将对实现桑根的综合利用与其活性化合物的开发研究提供重要的参考价值,后期将深入探究富含二苯乙烯化合物提取物的抗氧化、美白相关的活性机制。

参考文献

- [1] 黄红,吕静薇,陈颖,等.我国中药健康产品管理及市场概况[J].中草药,2021,52(2):902-908
HUANG Hong, LYU Jingwei, CHEN Ying, et al. Management and market general situation of Chinese medicine health products [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(2): 902-908
- [2] J Fiedor, K Burda. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease [J]. Nutrients, 2014,

- 6(2): 466-488
- [3] 林锦铭,蔡尤林,李俊健,等.美藤果壳多酚物质的提纯及其抗氧化性[J].食品研究与开发,2021,42(5):106-112
LIN Jinming, CAI Youlin, LI Junjian, et al. Extraction and purification of polyphenol from sacha inchi shell and its antioxidation [J]. Food Research and Development, 2021, 42(5): 106-112
- [4] 王安华,龙国清,王东东,等.油橄榄果渣中多酚提取及活性研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(5):219-224
WANG Anhua, LONG Guoqing, WANG Dongdong, et al. Research progress on extraction and activities of polyphenols from *Olea europaea* fruit residue [J]. Food Research and Development, 2021, 42(5): 219-224
- [5] K E Oh, H Shin, M K Lee, et al. Characterization and optimization of the tyrosinase inhibitory activity of *Vitis amurensis* root using LC-Q-TOF-MS coupled with a bioassay and response surface methodology [J]. Molecules, 2021, 26(446): 1-11
- [6] R Flamini, A Zanzotto, M de Rosso, et al. Stilbene oligomer phytoalexins in grape as a response to *Aspergillus carbonarius* infection [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2016, 93: 112-118
- [7] H Krawczyk. The stilbene derivatives, nucleosides, and nucleosides modified by stilbene derivatives [J]. Bioorg Chem, 2019, 90: 103073
- [8] S Galiniak, D Aebisher, D Bartusik-Aebisher. Health benefits of resveratrol administration [J]. Acta Biochim Pol, 2019, 66(1): 13-21
- [9] G Yang, J Zhan, Y Yang, et al. Inhibitory effects of oxyresveratrol on ERK and Smad1/2 phosphorylation and HSC activation in preventing carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(1): 6-12
- [10] 欧阳恩鸿,刘君花,贺志明,等.虎杖苷的抗动脉粥样硬化作用[J].邵阳学院学报(自然科学版),2020,17(5):45-51
OUYANG Enhong, LIU Junhua, HE Zhiming, et al. Effects of polydatin on anti-atherosclerosis [J]. Journal of Shaoyang University (Natural Science Edition), 2020, 17(5): 45-51
- [11] J Miao, W Liao, M Kang, et al. Anti-fatigue and anti-oxidant activities of oyster (*Ostrea rivularis*) hydrolysate prepared by compound protease [J]. Food Funct, 2018, 9(12): 6577-6585
- [12] E Deveci, G Tel-Çayan, M E Duru. Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta* [J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 771-783
- [13] J Y Lim, K Ishiguro, I Kubo. Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves [J]. Phytotherapy Research, 1999, 13: 371-345
- [14] X T Le, M T Huynh, T N Pham, et al. Optimization of total anthocyanin content, stability and antioxidant evaluation of the anthocyanin extract from vietnamese *Carissa carandas* L. fruits [J]. Processes, 2019, 7(7): 1-15
- [15] 杨丹,梁正杰,徐广,等.Box-Behnken 优化微波萃取桂花果皮多酚提取工艺及体外抑制酪氨酸酶活性研究[J].广东化工,2021,1(48):16-19
YANG Dan, LIANG Zhengjie, XU Guang, et al. Optimization of microwave extraction technology of polyphenols from the pericarp of osmanthus fragrans by box-behnken and inhibition of tyrosinase activity *in vitro* [J]. Guangdong Chemical, 2021, 1(48): 16-19
- [16] A C Pedro, D Granato, N D Rosso. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability [J]. Food Chemistry, 2016, 191: 12-20
- [17] R Kushwaha, V Kumar, G Vyas, et al. Optimization of different variable for eco-friendly extraction of betalains and phytochemicals from beetroot pomace [J]. Waste and Biomass Valorization, 2017, 9(9): 1485-1494
- [18] 朱沛沛,梁晶,赵红珠.残茶多酚的提取工艺研究[J].江西饲料,2012,5:4-6
ZHU Peipei, LIANG Jing, ZHAO Hongzhu. Study on extraction technology of residual tea polyphenols [J]. Jiangxi Feed, 2012, 5: 4-6
- [19] 郑燕菲,张强,廖晓澜.巨尾桉叶中多酚的抗氧化性及稳定性的研究[J].食品科技,2019,44(9):243-247
ZHENG Yanfei, ZHANG Qiang, LIAO Xiaolan. Antioxidant activity and stability of polyphenols from leaf of *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(9): 243-247
- [20] 韩寒冰,王明阳,马超,等.HPLC-DAD和UPLC-MS/MS对蔓花生中二苯乙烯类化合物的研究[J].天然产物研究与开发,2014,26:699-703
HAN Hanbing, WANG Mingyang, MA Chao, et al. Simultaneous determination of stilbene compounds in *Arachis duranensis* by HPLC-DAD and UPLC-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26: 699-703
- [21] 王启平,魏旭,林耀才,等.高效液相色谱一串联质谱法测定大鼠血浆中氧化白藜芦醇的浓度[J].中国医院药学杂志,2013,33(21):1783-1786

- WANG Qiping, WEI Xu, LIN Yaocai, et al. HPLC-MS/MS method to determine oxyresveratrol in rat plasma [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2013, 33(21): 1783-1786
- [22] 贡小辉,朱益灵,魏渊,等.石斛甲醇提取物 HPLC-MS 分析及 4 种多酚测定[J].中成药,2020,42(5):1223-1228
- GONG Xiaohui, ZHU Yiling, WEI Yuan, et al. Analysis of methanol extract from *Dendrobii Caulis* by HPLC-MS and determination of four polyphenols [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(5): 1223-1228
- [23] B Shao, H Z Guo, Y J Cui, et al. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(3): 737-742
- [24] K Savikin, G Zdunic, T Jankovic, et al. Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64(3): 212-217
- [25] C Jayathilake, V Rizliya, R Liyanage. Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plants in Sri Lanka [J]. Procedia Food Science, 2016, 6: 123-126
- [26] A Dalimunthe, P Anjelisa Zaitun Hasibuan, J Silalahi, et al. Antioxidant activity of alkaloid compounds from *Litsea cubeba* Lour. [J]. Oriental Journal of Chemistry, 2018, 34(2): 1149-1152
- [27] M G Rana, R V Katbamna, A A Padhya, et al. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract of *Medicago sativa* L [J]. Plant Biol, 2010, 55(1): 15-22
- [28] W Widowati, W J B, S Nadya, et al. Antioxidant and antiaging activities of *Jasminum sambac* extract, and its compounds [J]. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 2018, 7(3): 270-285
- [29] W U Bari, M Zahoor, A Zeb, et al. Anticholinesterase, antioxidant potentials, and molecular docking studies of isolated bioactive compounds from *Grewia optiva* [J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1386-1396
- [30] D P Jain, S S Pancholi, R Patel. Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs [J]. J Adv Pharm Technol Res, 2011, 2(3): 177-183
- [31] 施扬,王力川,马占林,等.滇黄精提取物成分与活性测定及细胞毒性评价[J].日用化学工业,2020,50(11):788-792
- SHI Yang, WANG Lichuan, MA Zhanlin, et al. Determination of components and activity of extractions of *Polygonatum kingianum* and evaluation of its cytotoxicity [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2020, 50(11): 788-792
- [32] R Fu, Y Zhang, Y Guo, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves [J]. South African Journal of Botany, 2014, 93: 98-104
- [33] Q Abbas, M Saleem, A R Phull, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Bidens frondosa* extract and their tyrosinase activity [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 16(2): 763-770
- [34] A Bahuguna, S Bharadwaj, A K Chauhan, et al. Inhibitory insights of strawberry (*Fragaria × ananassa* var. Seolhyang) root extract on tyrosinase activity using computational and *in vitro* analysis [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 165(Pt B): 2773-2788
- [35] H Yang, Z Wang, W Song, et al. Isolation of proanthocyanidins from *Pinus thunbergii* needles and tyrosinase inhibition activity [J]. Process Biochemistry, 2021, 100: 245-251
- [36] 田丝竹,李绪文,臧爽,等.10 种野生植物果实对 α -淀粉酶和酪氨酸酶的抑制作用及其酚类化合物含量和抗氧化活性研究[J].分析化学,2021,49(3):449-459
- TIAN Sizhu, LI Xuwen, ZANG Shuang, et al. Investigation of α -amylase and tyrosinase inhibitory activities, phenolic compounds, and antioxidant activity in ten kinds of wild fruits [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(3): 449-459