

忧遁草多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharide from *Clinacanthus nutans* by response surface methodology

余腾飞¹ 唐年初¹ 刘诚毅²

YU Teng-fei¹ TANG Nian-chu¹ LIU Cheng-yi²

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 海南博禾农业发展有限公司, 海南 海口 570100)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. Hainan Bohe Agricultural Development Co., Ltd., Haikou, Hainan 570100, China)

摘要:以提取温度、料液比和提取时间为影响因素, 忧遁草多糖提取率为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。结果表明, 忧遁草多糖的最佳提取工艺条件为料液比 1:31 (g/mL), 提取温度 92 °C, 提取时间 1.6 h, 此时多糖提取率为 3.40%。抗氧化活性试验表明, 忧遁草多糖具有良好的 ABTS 自由基和 DPPH 自由基清除效果, 并具有一定的羟基自由基清除能力。

关键词:忧遁草; 提取工艺; 多糖; 抗氧化活性

Abstract: The extraction temperature, ratios of water to material and extraction time were taken as the influencing factors, and the extraction rate of polysaccharides from *Clinacanthus nutans* was taken as the evaluation index to carry out single factor experiment, and Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process on the basis of single factor test results. The results showed that the best extraction conditions of polysaccharides from *Clinacanthus nutans* were as follows: the ratio of material to liquid was 1:31 (g/mL), the extraction temperature was 92 °C, the extraction time was 1.6 h. and the extraction rate was 3.40%. The antioxidant activity test showed that the polysaccharide of *Clinacanthus nutans* had good scavenging ability in ABTS anion free radical and DPPH free radical and had certain scavenging ability on hydroxyl free radicals.

Keywords: *Clinacanthus nutans*; extraction process; polysaccharide; antioxidant activity

忧遁草学名鳄嘴花 (*Clinacanthus nutans*), 又被称为沙巴蛇草、青箭等, 爵床科鳄嘴花属, 广泛分布于华南热带至马来西亚、爪哇、加里曼丹, 在中国海南、广东、广西

和云南等地的低海拔疏林或灌丛内均有分布。研究表明, 忧遁草具有抗高血脂活性^[1]、免疫活性^[2-3]、抗氧化性^[4-5]、抗癌特性^[6-7]和抗菌特性^[8]等生物活性。忧遁草含有较丰富的多糖, 而关于忧遁草多糖的相关研究报道较少, 仅 Huang 等^[9]从忧遁草中分离出了一种多糖-肽复合物, 并表明该复合物具有免疫调节作用。

目前, 多糖的提取方法有热水浸提法、酶辅助提取法^[10]、超声提取法^[11]、微波辅助提取法^[12]、超临界流体萃取法^[13]、超声微波协同提取法^[14]和超高压提取法^[15]等。相比之下, 热水浸提法成本低且安全, 在实际的多糖提取中应用最为广泛。试验拟采用热水浸提法提取忧遁草多糖, 并对多糖的抗氧化性进行评价, 为忧遁草多糖的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

忧遁草: 海南博禾农业有限公司;

粉末活性炭: 阿拉丁试剂有限公司;

ABTS、DPPH: 西格玛奥德里奇(上海)贸易公司;

无水乙醇、硫酸、苯酚、过硫酸钾、抗坏血酸、硫酸亚铁、水杨酸、双氧水: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

旋转蒸发仪: RE5203 型, 上海亚荣仪器厂;

冷冻干燥机: LGJ-18 型, 北京四环科学仪器厂有限公司;

电热恒温震荡水槽: DKZ 型, 上海一恒科学仪器有限公司;

分光光度计: UVmini-1240 型, 日本岛津公司;

高速多功能粉碎机: HC-350Y 型, 永康市天祺盛世工贸公司。

作者简介: 余腾飞, 男, 江南大学在读硕士研究生。

通信作者: 唐年初(1962—), 男, 江南大学副教授, 博士。

E-mail: tangnc@126.com

收稿日期: 2019-10-09

1.3 试验方法

1.3.1 忧遁草多糖提取工艺路线

鲜叶采摘→晒干→粉碎机粉碎过 40 目筛→按一定比例加入去离子水提取→趁热过滤得上清液→60 °C 减压浓缩→加入 4 倍体积无水乙醇醇沉过夜→将沉淀物经丙酮、无水乙醇各洗两次→冻干得粗多糖

1.3.2 葡萄糖标准曲线绘制 根据 SN/T 4260—2015 的葡萄糖标准曲线测定方法,得回归方程 $y = 64.361x + 0.001$, $R^2 = 0.999 4$ 。

1.3.3 多糖提取率计算 按式(1)计算多糖提取率。

$$Y = \frac{CNV}{1\ 000m} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——多糖提取率, %;

C——稀释后的多糖浓度, mg/mL;

V——复溶多糖溶液的体积, mL;

N——稀释倍数;

m——忧遁草粉末质量, mg。

1.3.4 单因素试验

(1) 提取时间:称取忧遁草粉末 5.000 g, 固定料液比 1:25 (g/mL), 提取温度 80 °C, 考察提取时间(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h)对忧遁草多糖提取率的影响, 3 次平行。

(2) 料液比:称取忧遁草粉末 5.000 g, 固定提取时间 1.5 h, 提取温度 80 °C, 考察料液比[1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 (g/mL)]对忧遁草多糖提取率的影响, 3 次平行。

(3) 提取温度:称取忧遁草粉末 5.000 g, 固定料液比 1:30 (g/mL), 提取时间 1.5 h, 考察提取温度(60, 70, 80, 90, 100 °C)对忧遁草多糖提取率的影响, 3 次平行。

1.3.5 响应面优化 在单因素试验基础上, 以料液比、提取温度和提取时间为因素, 多糖提取率为响应值, 进行三因素三水平响应面试验设计, 采用 Box-Behnken 响应面法优化忧遁草多糖提取工艺。

1.3.6 忧遁草多糖抗氧化性研究

(1) 对 ABTS 自由基的清除能力:参考 Xu 等^[16]的方法并略作修改。将 15 mL ABTS 溶液(7 mmol/L)与 15 mL 过硫酸钾溶液(5 mmol/L)混合, 暗处静置 12 h, 用去离子水稀释至 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 。将 0.5 mL 粗多糖溶液分别稀释成 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL, 与制备的 ABTS 溶液(3 mL)混合, 室温下震荡 10 min, 测定 734 nm 处吸光度值。以去离子水代替多糖溶液作为空白对照, 以去离子水代替 ABTS 溶液作为样品对照, 以抗坏血酸(V_C)为阳性对照, 按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$Y = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

Y——自由基清除率, %;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品试验组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

(2) 对 DPPH 自由基的清除能力:参考 Xu 等^[16]的方法并略作修改。分别取 2.0 mL 浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 的粗多糖溶液, 与 3 mL 新制备的 0.1 mmol/L DPPH-乙醇溶液混合并反应 30 min, 测定 517 nm 处吸光度值。以乙醇溶液代替多糖溶液作为空白对照, 以去离子水代替 DPPH 溶液作为样品对照, 以抗坏血酸(V_C)为阳性对照, 按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

(3) 对羟基自由基的清除能力:参考王丽霞等^[17]的方法并略作修改。分别取 2.0 mL 浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 多糖溶液, 与 2.0 mL 硫酸亚铁溶液(6 mmol/L)、水杨酸-乙醇溶液(6 mmol/L)、双氧水(6 mmol/L)混匀, 静置 20 min, 测定 510 nm 处吸光度值。以去离子水代替双氧水作为空白对照, 以去离子水代替多糖溶液作为样品对照, 以抗坏血酸(V_C)为阳性对照, 按式(2)计算羟基自由基清除率。

1.4 数据处理

采用 Design-Expert V8.0.6、OriginPro 8.5 和 Excel 2016 等软件对试验数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

由图 1 可知, 随着提取时间的增加, 多糖提取率先上升后趋于稳定, 提取时间为 1.5 h 时达到峰值, 可能是 0.5~1.5 h 多糖溶解不充分, 而溶解完全后, 提取时间对忧遁草多糖提取率的影响变弱, 从而使多糖提取率趋于稳定^[18]。随着料液比的增加, 多糖提取率先迅速增长后趋于平稳, 料液比为 1:30 (g/mL) 时达到峰值, 可能是传质阻力随着料液比的增加而不断减小, 多糖扩散速率加剧; 而在料液比达到 1:30 (g/mL) 后, 多糖溶液已趋于饱和, 溶剂作用不再显著, 因此多糖提取率趋于稳定^[19]。随着提取温度的升高, 多糖提取率先迅速增长后缓慢下降, 可能是 60~90 °C 的升温过程破坏了忧遁草的细胞膜结构, 加快了多糖从细胞中释放; 当温度超过 90 °C 时, 多糖被氧化, 分子结构受到破坏的现象越来越严重, 引起多糖提取率下降^[20]。

2.2 响应面法优化多糖提取工艺

2.2.1 回归模型的建立与方差分析 以忧遁草多糖提取率为响应值, 以料液比、提取温度和提取时间为变量, 设计三因素三水平优化试验, 试验因素及水平见表 1, 试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

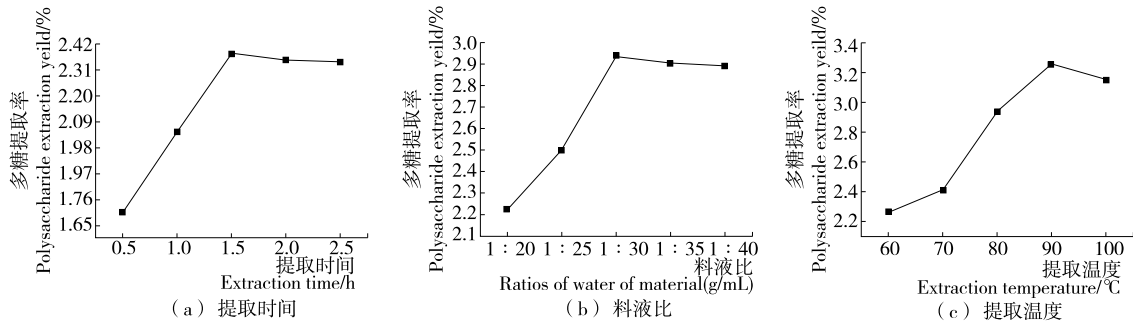


图1 各因素对忧遁草多糖提取率的影响

Figure 1 Effect of various factors on extraction rate of polysaccharide from *Clinacanthus nutans*

表1 试验因素与水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平	A 料液比 (g/mL)	B 提取温度/ °C	C 提取时间/ h
-1	1:25	80	1.0
0	1:30	90	1.5
1	1:35	100	2.0

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results %

试验号	A	B	C	多糖提取率	预测提取率
1	0	1	1	2.94	2.91
2	-1	0	-1	2.57	2.58
3	0	1	-1	2.78	2.77
4	1	1	0	2.68	2.72
5	0	0	0	3.24	3.22
6	0	0	0	3.31	3.30
7	-1	-1	0	2.39	2.41
8	0	0	0	3.29	3.29
9	1	0	-1	2.58	2.58
10	1	-1	0	2.68	2.69
11	0	0	0	3.28	3.26
12	1	0	1	3.05	3.00
13	0	-1	-1	2.53	2.53
14	0	0	0	3.30	3.21
15	0	-1	1	2.73	2.75
16	-1	1	0	2.74	2.73
17	-1	0	1	2.63	2.63

由软件分析可得二次回归方程:

$$Y = -41.875 + 0.9585A + 0.63262B + 1.9325C - 0.00175AB + 0.041AC - 0.0020BC - 0.0141A^2 - 0.00315B^2 - 0.92C^2 \quad (3)$$

由表3可知,模型 $P < 0.0001$,表明此模型具有显著性;失拟项 P 为0.1626,即失拟项不显著;拟合度为0.9909,说明该模型与实际情况拟合较好;校正拟合系数为0.9792,表明该回归方程能真实反映3个因素与多糖

表3 方差分析表[†]

Table 3 Analysis of variance table

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1.604	9	0.178	84.701	<0.0001	**
A	0.054	1	0.054	25.885	0.0014	**
B	0.082	1	0.082	38.987	0.0004	**
C	0.099	1	0.099	47.069	0.0002	**
AB	0.031	1	0.031	14.559	0.0066	**
AC	0.042	1	0.042	19.978	0.0029	**
BC	0.000	1	0.000	0.190	0.6759	
A ²	0.523	1	0.523	248.712	<0.0001	**
B ²	0.418	1	0.418	198.610	<0.0001	**
C ²	0.223	1	0.223	105.885	<0.0001	**
残差	0.015	7	0.002			
失拟项	0.010	3	0.003	2.935	0.1626	不显著
纯误差	0.005	4	0.001			
总和	1.618	16				

[†] $R^2 = 0.9909, R_{adj}^2 = 0.9792$; *表示 $P < 0.05$,为差异显著; **表示 $P < 0.01$,为差异极显著。

提取率间的关系;A、B、C、AB、AC、A²、B²和C²对提取率的影响极显著;各因素对多糖提取率的影响依次为提取时间>提取温度>料液比。

2.2.2 各因素间的交互作用 由图2可知,料液比和提取温度、料液比和提取时间的曲面坡度较陡,且各自的等高线呈椭圆形,表明AB、AC的交互作用对多糖提取率影响显著;提取温度和提取时间的响应曲面坡度较小,且等高线呈圆形,表明BC间的交互作用对多糖提取率影响不显著;交互作用分析结果与方差分析结果吻合。

2.2.3 最佳工艺验证 通过Design-Expert 8.0.6软件分析可知,忧遁草多糖的最佳提取工艺为料液比1:30.79(g/mL),提取温度91.58°C,提取时间1.644h,该条件下预测的多糖提取率为3.48%。根据实际操作的可行性,选择料液比1:31(g/mL),提取温度92°C,提取时间1.6h为最终的工艺条件,此时实测多糖提取率为3.40%(n=3),与预测值较接近。

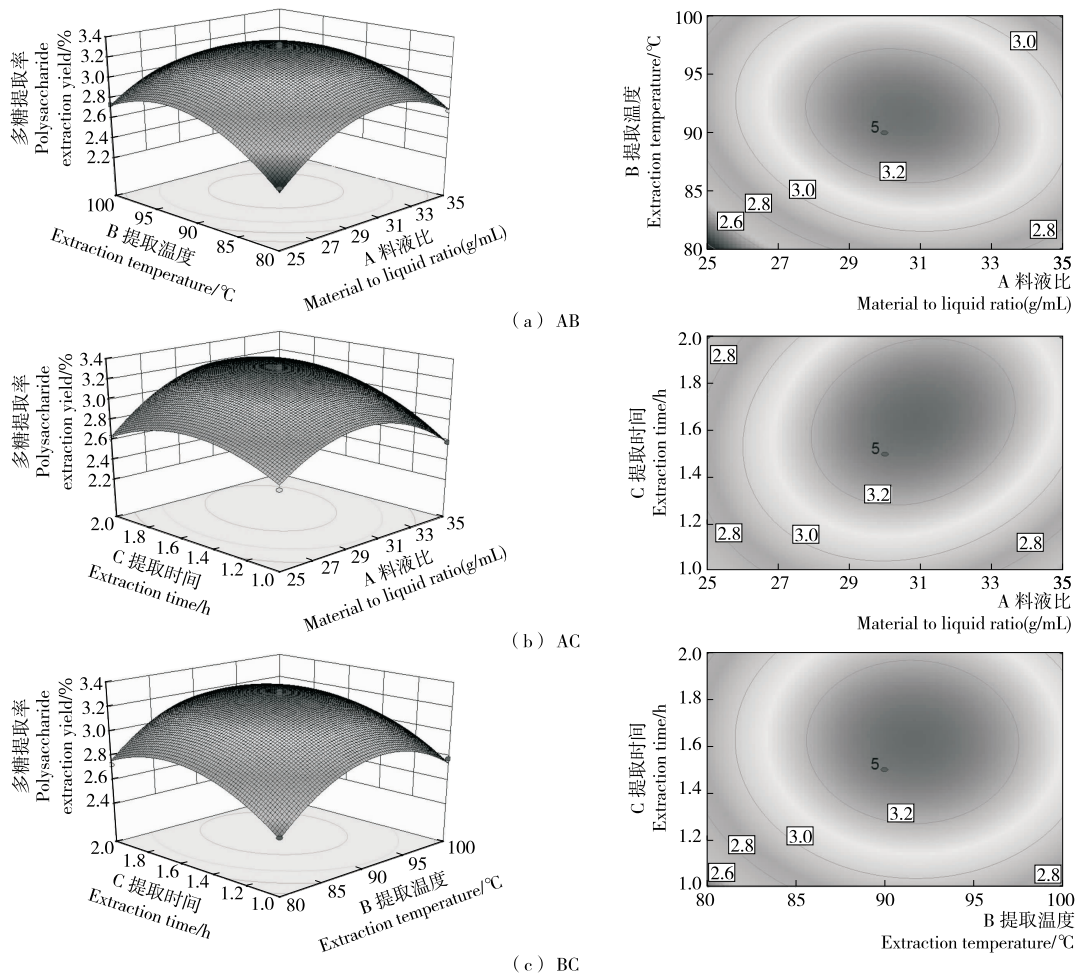


图 2 两因素的交互作用对多糖提取率的影响

Figure 2 Response surface plot of the interaction of two factors on the extraction rate of polysaccharides

2.3 多糖的抗氧化活性

2.3.1 对 ABTS 自由基的清除效果 由图 3 可知, ABTS 自由基清除率随忧通草多糖浓度的增大先迅速增大后趋于平缓。当忧通草多糖浓度为 3 mg/mL 时, ABTS 自由基清除率为 94.93%, IC_{50} 为 0.981 mg/mL。多糖对 ABTS 自由基的清除效果与 V_c 相当, 说明忧通草多糖对

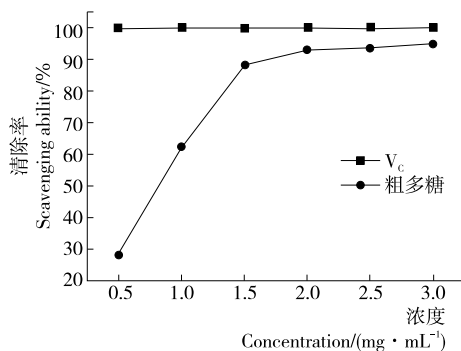


图 3 忧通草多糖对 ABTS 自由基的清除曲线

Figure 3 Scavenging ability of crude polysaccharide of *Clinacanthus nutans* on ABTS free radical

ABTS 自由基具有良好的清除效果。

2.3.2 对 DPPH 自由基的清除效果 由图 4 可知, DPPH 自由基清除率随忧通草多糖浓度的增大先迅速增大后趋于稳定, 当忧通草多糖浓度为 3 mg/mL 时, 清除率达 83.49%, IC_{50} 为 2.449 mg/mL。结合对照组 V_c 的清除效果可知, 忧通草多糖具有良好的 DPPH 自由基清除效果。

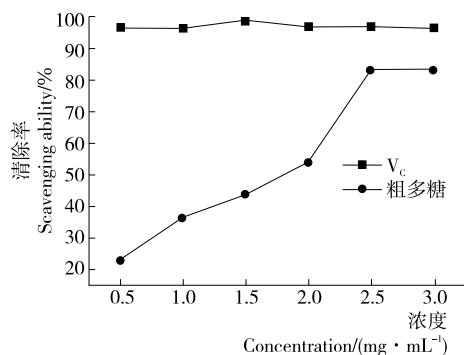


图 4 忧通草多糖对 DPPH 自由基的清除曲线

Figure 4 Clearance curve of polysaccharide of *Clinacanthus nutans* on DPPH free radical

2.3.3 对羟基自由基的清除效果 由图 5 可知,羟基自由基清除率与忧遁草多糖浓度呈正相关,当忧遁草浓度为 3 mg/mL 时,清除率达 67.20%, IC_{50} 为 1.461 mg/mL。结合对照组 V_c 的清除效果可知,忧遁草多糖具有一定的羟基自由基清除能力。

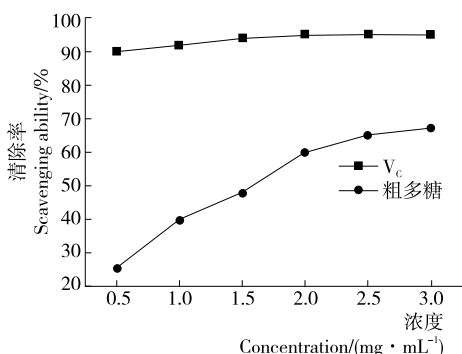


图 5 忧遁草多糖对羟基自由基的清除曲线

Figure 5 Clearance curve of polysaccharide of *Clinacanthus nutans* on OH free radical

3 结论

试验采用热水浸提法提取忧遁草多糖,并优化了忧遁草多糖的提取工艺。结果表明,忧遁草多糖的最佳提取工艺条件为料液比 1:31 (g/mL),提取温度 92 °C,提取时间 1.6 h,此条件下多糖提取率为 3.40%。抗氧化试验结果表明,忧遁草多糖具有良好的 ABTS 自由基和 DPPH 自由基清除效果,并具有一定的羟基自由基清除能力,说明忧遁草多糖可作为一种具有开发潜力的天然抗氧化剂新资源。后续可深入研究忧遁草多糖的结构及功效。

参考文献

[1] NADARAJAN S, UMAR I M, DER-JIUN O, et al. Phenolic rich extract from *Clinacanthus nutans*, attenuates hyperlipidemia-associated oxidative stress in rats [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2 016: 1-16.

[2] TU Shu-fen, WU Yang-chang, CHENG Yuan-bin, et al. Chemical constituents and bioactivities of *Clinacanthus nutans* aerial parts[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 20 382-20 390.

[3] THONGRAKARD V, TENCOMNAO T. Modulatory effects of Thai medicinal plant extract on proinflammatory cytokines-induced apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(31): 4 999-5 003.

[4] LEE S Y, MEDIANI A, NUR ASHIKIN A H, et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of the leaf and stem of selected traditional medicinal plants[J]. *International Food Research Journal*, 2014, 21(1): 165-172.

[5] 段佳辉,徐德平,钱志娟,等. 忧遁草抗氧化功效与成分的研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 205-210.

[6] HUANG Dan-min, GUO Wen-jie, GAO Jing, et al. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response[J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 17 405-17 428.

[7] YOKE K Y, TAN Jun-jie, SOEK S T, et al. *Clinacanthus nutans* extracts are antioxidant with antiproliferative effect on cultured human cancer cell lines[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2 013: 1-8.

[8] LISA M D, KIMBERLY L C. Impacts of antibiotic use in agriculture: What are the benefits and risks? [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 19: 37-44.

[9] HUANG Dan-min, LI Yun-hong, CUI Feng-jie, et al. Purification and characterization of a novel polysaccharide-peptide complex from *Clinacanthus nutans* Lindau leaves[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 137: 701-708.

[10] 岳鹏,潘志恒,孙勇民. 混料设计优化干巴菌多糖复合酶法提取工艺[J]. *保鲜与加工*, 2018, 18(5): 91-96.

[11] WANG Yuan-yuan, WANG Xue-yu, XIONG Ying, et al. Extraction optimization, separation and antioxidant activity of *Luffa Cylindrica* polysaccharides[J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2019, 116: 98-104.

[12] HU Wei-chao, ZHAO Yu-qing, YANG Yong, et al. Microwave-assisted extraction, physicochemical characterization and bioactivity of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 127-136.

[13] 杨孝辉,郭君. 响应面法优化超临界 CO₂ 流体萃取淮山多糖工艺[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 185-189, 198.

[14] 巫永华,刘恩岐,张建萍,等. 超声微波协同酶法提取黄精多糖与抗氧化特性分析[J]. *食品工业*, 2019, 40(5): 171-176.

[15] 郭淼,宋江峰,王传凯. 火龙果茎多糖的超高压提取及抗氧化活性研究[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(7): 1 371-1 376.

[16] XU Guan-yi, LIAO Ai-mei, HUANG Ji-hong, et al. Evaluation of structural, functional, and anti-oxidant potential of differentially extracted polysaccharides from potatoes peels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 778-785.

[17] 王丽霞,刘孟宗,王芳,等. 铁皮石斛多糖提取及抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(2): 85-90.

[18] 张占军,王富花,葛洪,等. 响应面法优化百合多糖超声辅助提取工艺[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(18): 40-44.

[19] SHU Xu, ZHANG Yan-fen, JIA Jin-xia, et al. Extraction, purification and properties of water-soluble polysaccharides from mushroom *Lepista nuda* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 858-869.

[20] YUAN Ye, LIU Yang, LIU Meng-di, et al. Optimization extraction and bioactivities of polysaccharide from wild, *Russula griseocarnosa* [J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25(4): 523-530.