

Optimization of Extraction Technology of Total Polyphenols in *Corhyceps* Flowers and the Antioxidant Effects

Wubiao Zhu*, Yong Hou, Xiaomei Zhuang

Department of Applied Chemistry, Zhongshan Polytechnic, Zhongshan Guangdong
Email: *530623107@qq.com

Received: Nov. 10th, 2017; accepted: Nov. 22nd, 2017; published: Nov. 29th, 2017

Abstract

In this study, the extraction technology of total polyphenols from *Corhyceps* flowers was optimized through single factor experiment and orthogonal experiment. Then, the extraction was washed by petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol. The effects of total polyphenols from different part in *Corhyceps* flowers on the scavenging of ABTS+ radicals, DPPH radicals and alpha-glucoside inhibition were also studied. The result shows that the factors effected the Gallic acid content are the ethanol extraction > extraction temperature > solid-liquid ratio > extraction time and the best craft is using solid-liquid ratio 1:25, the content of ethanol is 80%, extraction temperature is 80°C, the extraction time is 1 h. The ethyl acetate fraction of *Corhyceps* flowers, a strong ability to act as antioxidant, might be considered as a natural source of active compounds.

Keywords

Cordyceps, Total Polyphenols, Extraction

虫草花多酚浸提工艺优化及抗氧化活性研究

朱屋彪*, 侯 勇, 庄晓梅

中山职业技术学院应用化学教研室, 广东 中山
Email: *530623107@qq.com

收稿日期: 2017年11月10日; 录用日期: 2017年11月22日; 发布日期: 2017年11月29日

摘 要

本文研究虫草花多酚浸提最优工艺, 通过单因素试验和正交试验结合, 以总多酚含量为优化指标。然后*通讯作者。

用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除、总抗氧化能力检测试剂盒法、 α -葡萄糖苷酶活性抑制三种体外抗氧化测定方法进行抗氧化活性测试。试验表明,影响多酚含量的提取因素为乙醇含量 > 提取温度 > 液料比 > 浸泡时间;虫草花中总多酚提取的最佳工艺为:液料比1:25 (g/mL),乙醇含量为80%,提取温度80℃,浸泡时间为1 h。虫草花的乙酸乙酯萃取物具有显著抗氧化活性,可以成为天然抗氧化活性化合物的良好来源。

关键词

虫草花, 总多酚, 提取

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

“吃在广东”,而广东又以老火靓汤最为出名,作为食材的虫草花目前的研究报道较少。虫草花又称北虫草、蛹虫草(*Cordyceps militaris*),是人工培养的虫草子实体,属于一种真菌类(*Fungi*),是运用现代生物工程技术开发出来的,可供人们食用和药用的菌类新品种。虫草花内含有虫草素、虫草酸、多酚、多糖、腺苷等多种活性物质,具有抗肿瘤、抗炎、提高免疫力等功效,民间常用于肺炎、肾虚、腰痛等疾病的治疗。当前,就虫草花活性成分提取工艺、抗氧化性、降糖活性的研究很少。我们以总多酚含量(没食子酸)为观察指标,探讨了虫草花活性成分浸提的最优工艺,为进一步开发虫草花资源提供理论依据。

2. 实验与方法

2.1. 试材

虫草花干 500 g (广州市兴华干货,原产地广东江门新会)

2.2. 试材的处理方法

2.2.1. 试材前处理流程

将虫草花于干燥箱内 60℃ 烘干,粉碎机粉碎,过 200 目筛。准确称量 100 g 粉末,按单因素和正交实验条件用 80% 乙醇溶液浸提,转速 3000 rad/min 离心处理,收集离心所得滤液为提取液。

2.2.2. 虫草花活性成分的粗提取方法

参考景临林等人,取上述 1.2.1 最后所得的多酚提取液于 1000 mL 的圆底烧瓶中,用旋转蒸发仪将其旋干,得到虫草花 80% 醇提部分[1]。提取物加 5 倍量的蒸馏水超声 10 min 得到悬浮液,将其移置 250 mL 分液漏斗中,依次用 10 mL 的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次,合并各自萃取液并保留水相,用旋转蒸发仪分别将其旋干,得不同溶剂萃取物[2]。

2.3. 虫草花活性成分提取

2.3.1. 单因素试验设计

选取料液比、乙醇含量、提取温度和浸泡时间 4 个可能影响提取效果的因素,以总多酚含量为考察指标进行单因素试验,以确定相关因素及各因素的适宜范围,见表 1。

Table 1. The factor level of single experiment**表 1.** 单因素试验因素水平表

因素 Factor	水平 Level	其他条件 Other condition
料液比 Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40	60%, 80°C, 2 h
乙醇含量 Ethanol content/(%)	40, 50, 60, 70, 80	1:20, 80°C, 2 h
提取温度 Extraction temperature/(°C)	50, 60, 70, 80, 85	1:20, 60%, 2 h
浸泡时间 Soak time/(h)	1, 1.5, 2, 3	1:20, 60%, 80°C

2.3.2. 正交试验设计

根据单因素试验确定的范围, 选定料液比、提取温度、乙醇含、浸泡时间 4 个主要影响因素进行正交试验以考察最佳提取工艺条件, 见表 2。

Table 2. The factor level of orthogonal experiment**表 2.** 正交试验因素水平表

水平 Level	A 料液比/(g·mL ⁻¹) Solid-liquid ratio	B 乙醇含量/(%) Ethanol content	C 提取温度/(°C) Extraction temperature	D 浸泡时间/(h) Soak time
1	1:15	60	60	1
2	1:20	70	70	1.5
3	1:25	80	80	2

2.3.3. 虫草花活性成分含量计算

1) 没食子酸标准曲线的制作

参考欧阳玉祝等人文献, 准确称取 2.4 mg 没食子酸标准品于 25 mL 容量瓶中, 用移液枪移取 24 mL 蒸馏水至容量瓶中, 震荡摇匀, 配成 0.1 mg/mL 的标准液, 分别吸取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL 没食子酸标准液于 6 支试管中, 再分别滴加 5.0、4.0、3.0、2.0、1.0 和 0.0 mL 蒸馏水, 2 mL 酒石酸亚铁溶液, 2 mL pH = 7.5 的缓冲溶液, 混匀静置 20 min, 以不含没食子酸标准液的溶液代替标准溶液作空白对照, 用紫外可见分光光度计于波长 540 nm 处测各种标准溶液的吸光度[3]。

2) 虫草花多活性组分总多酚含量计算

按照标准曲线计算出虫草花中总多酚质量浓度(C, mg·mL⁻¹), 按以下公式计算样品中总多酚含量 W(mg·g⁻¹):

$$\text{总多酚含量 } W = CV/m,$$

式中: W 为虫草花中总多酚含量(mg·g⁻¹); C 为虫草花多酚质量浓度(mg·mL⁻¹); V 为体积(mL); m 为虫草花粉末质量(g)。

3) 测定方法: ① 取不同组分的浸膏 0.045 g, 用 7 mL 80%乙醇将其溶解于试管中。配制成相同浓度的虫草花萃取物。从试管中取 2 mL 上述萃取物与另一支试管中。加入 2 mL 酒石酸亚铁溶液, 2 mL pH = 7.5 的缓冲溶液, 混匀静置 20 min, 以不含没食子酸标准液的溶液代替标准溶液作空白对照, 用紫外可见分光光度计于波长 540 nm 处测各种标准溶液的吸光度。

② 取 1.2.1 流程最后得到的提取液 2 mL, 加入 2 mL 酒石酸亚铁溶液, 2 mL pH = 7.5 的缓冲溶液, 混匀静置 20 min, 以不含没食子酸标准液的溶液代替标准溶液作空白对照, 用紫外可见分光光度计于波长 540 nm 处测各组标准溶液的吸光度。

2.3.4. 虫草花不同溶剂提取部分活性成分比较

取 1.2.2 所得的不同溶剂萃取物, 对各个成分之间采用 DPPH、ABTS、 α -葡萄糖苷酶三种体外抗氧

化测定方法进行活性测试[4] [5] [6] [7]。

3. 实验结果与讨论

3.1. 虫草花活性成分提取物

按 1.2.2 所述方法, 依次 80%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取得到不同溶剂萃取物, 结果如表 3 所示, 平行测定三次结果。

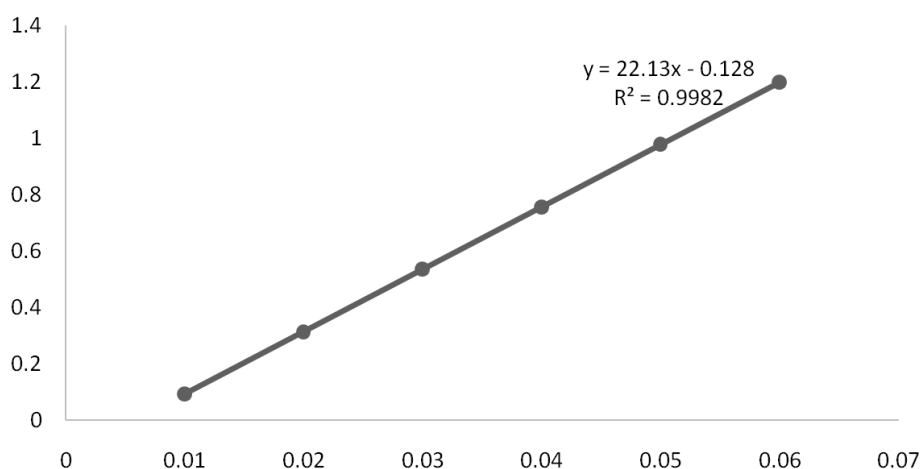
Table 3. The active ingredient extract of *Cordyceps* flower

表 3. 虫草花活性成分提取物列表

序号 Number	80%醇提取物/g 80% Ethanol extract	石油醚萃取物/g Petroleum extract	乙酸乙酯萃取物/g Ethyl acetate extract	正丁醇萃取物/g n-BuOH extract	水萃取物/g Water extract
1	8.99	2.54	0.69	0.54	4.45
2	8.89	2.53	0.70	0.54	4.40
3	9.12	2.55	0.72	0.55	4.50

3.2. 虫草花没食子酸标准曲线结果

以吸光度(A)为横坐标, 以没食子酸含量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为纵坐标绘图, 结果进行线性回归得回归方程: $Y = 22.136x - 0.1277$ ($R^2 = 0.9982$)。标准曲线图 1 表明, 没食子酸在质量浓度为 $0.01\sim 0.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 区间有良好的线性关系。



式中: Y 为吸光度; x 为没食子酸标准质量浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

Figure 1. The standard curve of the Gallic acid

图 1. 没食子酸标准曲线

3.3. 提取条件对虫草花多酚提取效果的影响

3.3.1. 料液比对总多酚提取效果的影响

浸泡时间 2 h, 乙醇含量 60%, 提取温度 80°C , 由图 2 可知, 总多酚提取率随料液比的增大而先增大后降低, 最佳提取的料液比为 1:20, 1:15, 1:25 的提取率也较高。这可能是因为料液比为 1:20 时, 溶剂对多酚的溶解已基本达到饱和, 继续增加溶剂用量, 并不能显著提高多酚的提取量。而料液比越大, 在浓缩过程中消耗的时间越长, 多酚被氧化的可能性提高, 同时也加大了浓缩时的能量消耗, 不利于总

多酚的提取，因此将正交试验中的料液比分别定为 1:15、1:20 和 1:25。

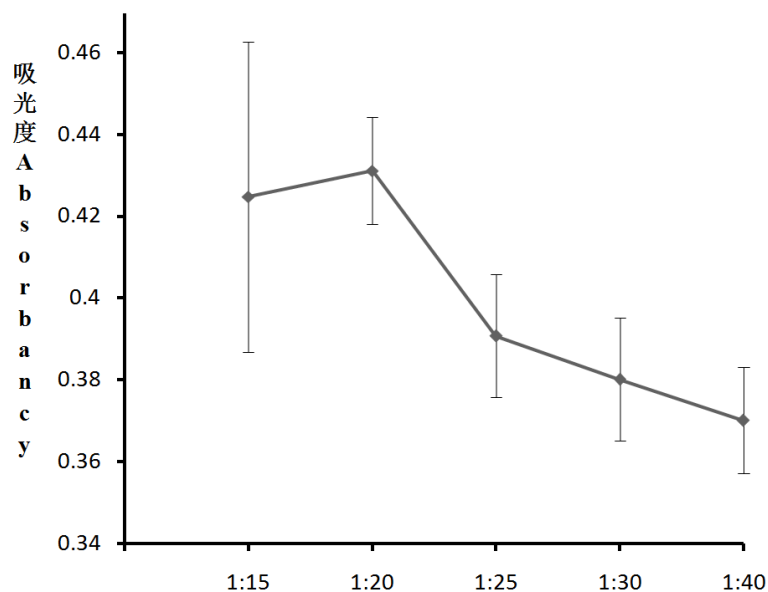


Figure 2. The effect factor of martial liquid ratio on extraction

图 2. 料液比对总多酚提取效果的影响

3.3.2. 乙醇含量对总多酚提取效果的影响

浸泡时间 2 h，料液比为 1:20，提取温度 80℃ 的提取。由图 3 可知，总多酚提取率随乙醇含量的增大而先增大后降低，最佳提取的乙醇含量为 70%，60%，80% 的提取率也较高。这可能是因为乙醇含量为 80% 时，乙醇含量过高，会将其他杂质也提取出来，不利于总多酚的提取，因此将正交试验中的乙醇含量分别定为 60%、70% 和 80%。

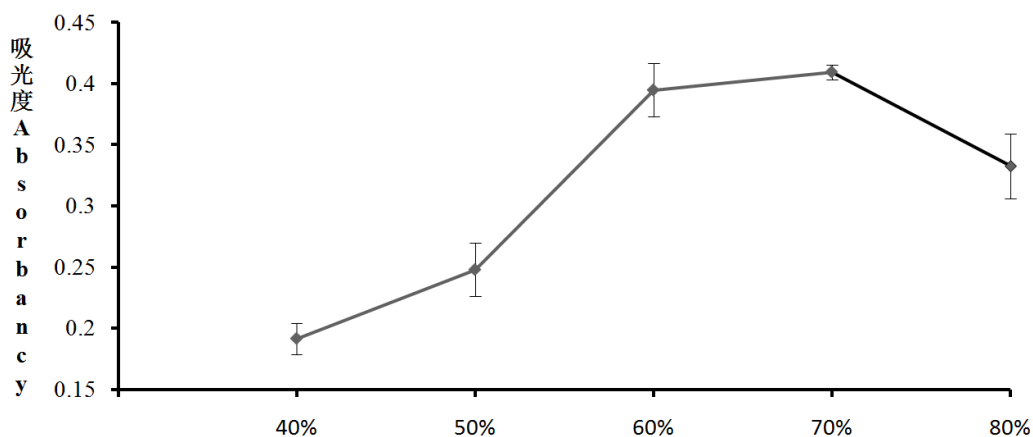


Figure 3. The effect of ethanol content on extraction

图 3. 乙醇含量对总多酚提取效果的影响

3.3.3. 提取温度对总多酚提取效果的影响

浸泡时间 2 h，乙醇含量 60%，料液比 1:20 的提取结果。由图 4 可知，总多酚提取率随温度的升高而先增大后降低，当温度超过 70℃ 后，总多酚质量浓度下降。最佳提取的提取温度为 70℃。50℃，60℃ 的提取率也较高。从中可推测影响提取率原因是：当提取温度超过 60℃ 乙醇的沸点时，溶液剧烈沸腾产

生的气泡使原料粉末黏附于容器壁上，导致原料未能充分被溶剂浸提；另外也可能是由于提取温度过高造成多酚分子的结构破坏。因此将正交试验中的提取温度分别定为 60℃、70℃和 80℃。

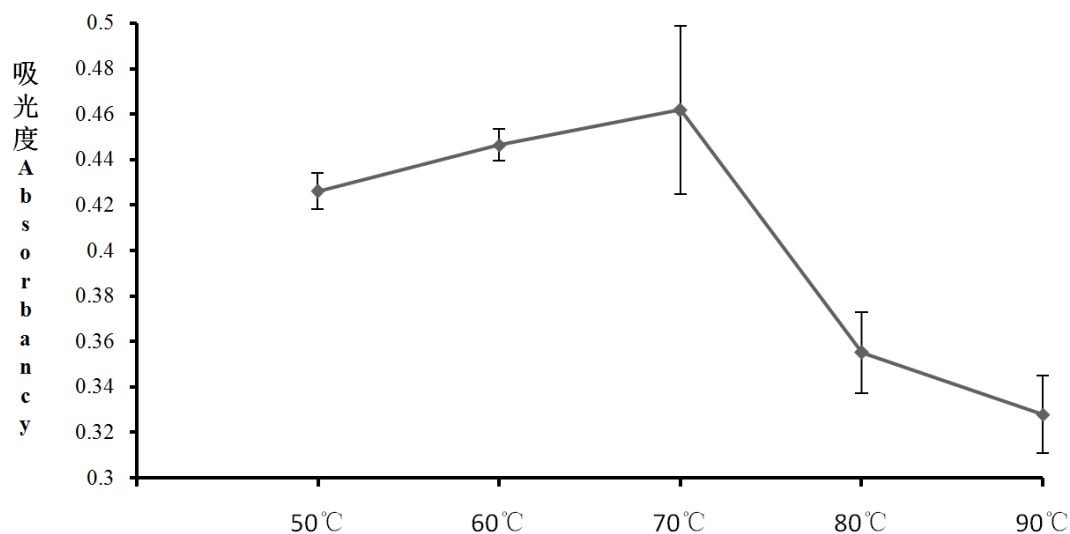


Figure 4. The effect of soaking temperature on extraction
图 4. 提取温度对总多酚提取效果的影响

3.3.4. 浸泡时间对总多酚提取效果的影响

料液比 1:20，乙醇含量 60%，提取温度 80℃的提取结果。由图 5 可知，总多酚提取率随浸泡时间的增加而先增大后降低，当浸泡时间为 1.5 小时时总多酚质量浓度最大，之后随浸泡时间的继续增加，总多酚质量浓度呈下降趋势，因此最佳提取的时间为 1.5 h。2 h 的提取率也较高。这可能是因为浸泡时间越长，多酚被氧化的可能性提高，乙醇含量也对多酚的分子结构，不利于总多酚的提取，因此将正交试验中的浸泡时间分别定为 1 h、1.5 h 和 2 h。

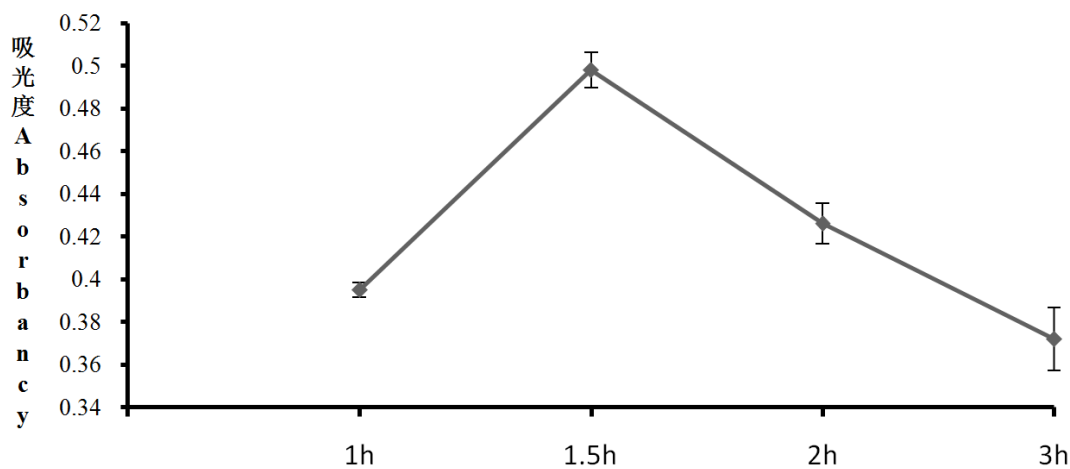


Figure 5. The effect of soaking time on extraction
图 5. 浸泡时间对总多酚提取效果的影响

3.4. 正交试验结果

正交试验结果见表 4，从表 4 分析可知：各因素对虫草花总多酚产率的影响程度不同，其影响的主

次顺序为: B(乙醇含量) > C(提取温度) > A(料液比) > D(浸泡时间)。由试验数据可以得出: 乙醇含量为显著影响因素, 极差分析最优组合是 $A_3B_3C_3D_1$, 最佳提取工艺条件为: 料液比 1:25 (g/mL), 乙醇含量为 80%, 提取温度 80℃, 浸泡时间为 1 h。

Table 4. The result of orthogonal experiment

表 4. 正交实验结果

实验号 Number	因素 Factor				总多酚质量浓度 Polyphenols content
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.4690
2	1	2	2	2	0.5601
3	1	3	3	3	0.7803
4	2	1	2	3	0.3941
5	2	2	3	1	0.6930
6	2	3	1	2	0.7622
7	3	1	3	2	0.5355
8	3	2	1	3	0.6825
9	3	3	2	1	0.7641
K_1	1.8094	1.3986	1.9137	1.9261	
K_2	1.8493	1.9356	1.7183	1.8578	
K_3	1.9821	2.3066	2.0088	1.8569	
R	0.1727	0.9080	0.2905	0.0692	

3.5. 虫草花多活性组分总多酚含量计算结果

样品中的多酚含量由没食子酸标准曲线: $Y = 22.131x - 0.1283 (R^2 = 0.99735)$ 换算得来, ① 各提取物部位多酚含量如表 5 所示: 80% 醇提取物中多酚类化合物含量最高 $4.7817 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 然后依次是水萃取物、石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物, 分别是 $3.8891 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $3.8680 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $3.4744 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。正丁醇萃取物多酚含量最低, 仅为 $2.8769 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。各活性组分总多酚含量的大小排序为: 80% 醇提取物 > 水萃取物 > 石油醚萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 正丁醇萃取物。

② 测得虫草花提取液中总多酚的平均质量浓度是 $0.8382 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

Table 5. The content of Gallic acid in the different solvent extracts

表 5. 虫草花乙醇提取物不同溶剂萃取物中总酚含量测定 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

有效部位 Effective parts	总多酚含量 Total Polyphenols content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
80% 醇提 80% Ethanol extract	4.781729
石油醚萃取物 Petroleum extract	3.867978
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	3.474362
正丁醇萃取物 n-BuOH extract	2.87691
水萃取物 Water extract	3.889065

3.6. 虫草花不同溶剂提取物活性测试计算结果

由表 6 可知, 对 DPPH 自由基的清除作用, 不同极性部位清除 DPPH 自由基的能力顺序为: 乙酸乙酯萃取物 > 正丁醇萃取物 > 石油醚萃取物 > 水萃取物 > 80% 醇提物。对 ABTS 自由基的清除作用不同极性部位清除 ABTS+· 自由基的能力顺序为: 乙酸乙酯萃取物 > 正丁醇萃取物 > 80% 醇提物 > 石油醚萃取物 > 水萃取物。对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用乙酸乙酯部分对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用最强, 然后依次是 80% 醇提物部分 > 石油醚部分 > 剩余水相部分 > 正丁醇部分。

Table 6. The active ingredients of *Cordyceps* flower in the different solvent extracts

表 6. 虫草花不同溶剂萃取物活性成分

有效部位 Effective parts	DPPH	ABTS	α -葡萄糖苷酶抑制活性 Inhibition of alpha-glucoside(%)
80%醇提取物 80% Ethanol extract	0.45698	0.07887	39.4 \pm 2.1
石油醚提取物 Petroleum extract	0.28888	0.09047	30.3 \pm 3.4
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract	0.25979	0.05584	64.2 \pm 4.6
正丁醇提取物 n-BuOH extract	0.27368	0.07045	12.7 \pm 2.1
水提取物 Water extract	0.35252	0.09381	14.6 \pm 3.4

4. 结论与讨论

由虫草花多酚提取条件的研究可知, 各因素对虫草花多酚提取得率的影响次序是: 乙醇含量 > 提取温度 > 料液比 > 浸泡时间。从成本角度考虑, 最佳提取工艺为: 乙醇含量 80%, 提取温度 80 $^{\circ}$ C, 浸泡时间 60 min, 料液比 1:25 (g/mL), 在以上最优条件下虫草花多酚提取物中多酚含量为 51.23%。

多酚类化合物大多具有酚羟基, 易溶于水、甲醇、乙醇等极性强的溶剂, 乙醇溶解性能较好, 对植物细胞的穿透能力较强, 与甲醇相比, 具有毒性小、来源方便等特点, 故试验选择乙醇作为提取溶剂。单因素及正交试验结果表明, 不同提取因素对虫草花多酚提取效果的影响很大, 各因素对其多酚提取效果的影响由大到小依次为乙醇含量、提取温度、料液比、浸泡时间。优化的最佳提取工艺为乙醇体积分数 80%, 料液比 1:25 (g/mL), 浸泡时间为 60 min, 提取温度 80 $^{\circ}$ C。在此条件下进行重复性试验, 测得多酚提取物中多酚含量为 51.23%。该方法操作简单准确度高, 环境污染小, 可作为虫草花中多酚的提取和含量测定。

该研究采用体外模型从 ABTS+· 自由基和 DPPH 自由基(DPPH·)的清除能力及 α -葡萄糖苷酶活性抑制率等角度评价其活性。虫草花中多酚类化合物对 DPPH· 和 ABTS+· 的清除率分别可达 88.73% 和 84.71%, α -葡萄糖苷酶活性的 IC₅₀ 为 60 μ g/mL, 说明虫草花中含有多酚类化合物, 具有较好的抗氧化功能, 是一种具有较大开发价值的药食同源食用菌[6] [7]。

基金项目

中山市科技局项目(2015syf0202)。

参考文献 (References)

- [1] 景临林, 马慧萍, 范小飞. 甘松不同溶剂提取物的抗氧化活性研究[J]. 化学研究与应用, 2014(10): 1592-1596.
- [2] 杨申明, 王振吉, 杨红卫, 闫菊先. 虫草花中总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2014(12): 248-253.
- [3] 欧阳玉祝, 陈小东, 唐红玉, 等. 路边青中总多酚的提取与分离研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 44-47.
- [4] Li, X., Lin, J., Gao, Y., et al. (2012) Antioxidant Activity and Mechanism of *Rhizoma cimicifugae*. *Chemistry Central*

Journal, **6**, 140. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-140>

- [5] Re, R., *et al.* (1999) Antioxidant Activity Applying a Improved Abts Radical Cation Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 9-10. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- [6] Wu, Z.Y. (1986) Cordyceps. *The Compendium of Xinhua Material Medic.* Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, 730-731.
- [7] 张丽, 李彩芳, 李晓梅. 加拿大蓬 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 河南大学学报: 医学版, 2008, 27(4): 39-41.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org