

王 华. 黄秋葵水提物的组分及体外抗氧化活性分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(7): 198-201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.049

黄秋葵水提物的组分及体外抗氧化活性分析

王 华

(河北环境工程学院, 河北秦皇岛 066102)

摘要:拟测定黄秋葵水提物主要功能成分,并系统研究其水提物的体外抗氧化作用,为黄秋葵今后的开发利用提供相应的理论基础。试验得到水提烘干与冻干 2 种样品,对其中的功能成分进行测定,通过不同自由基[2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基($ABTS^+ \cdot$)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基($DPPH \cdot$)、羟自由基($\cdot OH$)、超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)]清除能力的测定,以及铁离子还原/抗氧化能力(ferric ion reducing antioxidant power,简称 FRAP)和氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity,简称 ORAC)的测定,系统地对外提物的体外抗氧化活性进行研究。结果表明,黄秋葵水提物抗氧化能力和浓度有一定的量效关系,对 $ABTS^+ \cdot$ 、 $DPPH \cdot$ 、 $\cdot OH$ 、 $O_2^- \cdot$ 的 EC_{50} 分别为 0.1、0.2、8.3、0.9 mg/mL,FRAP 为 $(365.5 \pm 5.30) \mu\text{mol/g}$ (以 Trolox 计),ORAC 为 $180.2 \mu\text{mol/g}$ (以 Trolox 计)。由结果可知,黄秋葵具有良好的抗氧化性,有极好的开发前景。

关键词:黄秋葵;抗氧化;组分分析;水提物;自由基

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0198-03

黄秋葵 [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] 为锦葵科秋葵属一年生草本植物,目前在国内多个地区均有栽培,其资源较为丰富。黄秋葵嫩果特有黏性物质,富含蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素、多糖、黄酮类化合物等,且营养丰富,黄秋葵还可作为菜、药、花兼用,具有很高的开发利用价值和应用前景^[1-2]。目前对于黄秋葵功效研究,主要集中在其抑菌作用、抗氧化、抗疲劳、降血糖血脂、保健护胃等方面^[3-6]。

自由基作为生命活动的天然中间代谢产物,与生命体损伤、衰老和一些疾病密切相关。因此,天然抗氧化物质清除自由基的能力已经成为体外抗氧化活性研究的热点^[7-9]。已有利用黄秋葵水提物进行抗疲劳与降血糖等相关研究^[3-5],但目前未见对黄秋葵水提物体外抗氧化作用的系统研究报道。本研究以黄秋葵嫩果的水提物为基础,通过 2 种不同干燥方法获得黄秋葵水提物干品,进行系统的体外抗氧化研究,以期对黄秋葵水提物的综合利用提供理论和实践依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

黄秋葵,购自北京新发地农产品批发市场。2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)($ABTS$),Sigma;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼($DPPH$),Sigma;2,4,6-三吡啶基三嗪($TPTZ$),Sigma;6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox),Sigma;2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(简称 AAPH),Sigma;其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

2802 紫外-可见分光光度计,UNICO 公司;XH-C 旋涡振荡仪,金坛市医疗仪器厂;RE-6000 亚荣旋蒸蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HZQ-F160 全温振荡培养箱,常州诺基仪器有限公司;Epoch™ 微孔板分光光度计,美国伯腾仪器有限公司(BioTek);Infinite M200 Pro 多功能酶标仪,帝肯(上海)贸易有限公司(Tecan Group Ltd)。

1.3 黄秋葵水提物的提取工艺

黄秋葵嫩果→切片→自然晾干→加水浸泡(加热搅拌)→过滤→滤液烘干→称质量。

黄秋葵水提物提取率计算公式:

水提物得率 = (水提物质量/黄秋葵鲜质量) × 100%。

1.4 测定方法

1.4.1 多糖和总糖测定方法

1.4.1.1 标准曲线的绘制^[10] 配制 0.2 mg/mL 葡萄糖标准溶液,分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 葡萄糖标准溶液,各以水补至 2.0 mL,加入 6% 苯酚 1 mL,然后迅速加入 5 mL 浓硫酸,静置 10 min,摇匀,室温放置 20 min 后于 490 nm 测定吸光度,用 2 mL 水按同样显色操作作为空白对照,横坐标为多糖浓度(mg/mL),纵坐标为吸光度,得到标准曲线。

1.4.1.2 黄秋葵多糖含量的测定 称取 1.00 g 黄秋葵水提物,加入 100 mL 蒸馏水,超声溶解,然后加入 4 倍体积的无水乙醇,静置 2 h,离心,烘干。

将黄秋葵粗多糖加入一定体积的蒸馏水中溶解,经适当稀释后,参照“1.4.1.1”节标准曲线的制作方法进行样品中多糖含量的测定。

1.4.1.3 黄秋葵总糖含量的测定 称取 1 g 黄秋葵水提物,加入 100 mL 蒸馏水,超声溶解,定容至 100 mL,取 1 mL 样品,稀释至 100 mL,参照“1.4.1.1”节标准曲线的制作方法进行样品中总糖含量的测定。

收稿日期:2017-07-31

作者简介:王 华(1978—),男,山西长治人,博士研究生,副教授,研究方向为生物资源与天然产物工程。E-mail: mshuawang@126.com。

1.4.2 水分含量的测定 参照 GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》。

1.4.3 灰分含量的测定 参照 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》。

1.4.4 果胶含量的测定 参照 NY/T 2016—2011《水果及其制品中果胶含量的测定》。

1.5 抗氧化测定方法

1.5.1 ABTS⁺·清除能力 参考 Li 等的方法^[11],分别配制 ABTS 储备液(7.4 mmol/L)、K₂S₂O₈ 储备液(2.6 mmol/L)、Trolox 标准液(0.3 mmol/L),以及不同浓度的黄秋葵水提物水溶液。取上述 ABTS 储备液 0.2 mL 与 K₂S₂O₈ 储备液 0.2 mL 混匀,于室温黑暗处存放 12 h,稀释 40~50 倍即为 ABTS 工作液,使其在 734 nm 处的吸光度为 0.7±0.02。取 ABTS 工作液 0.8 mL 和样品 0.2 mL,混匀,振荡 10 s,静置 6 min。以蒸馏水作为空白对照,以 Trolox 标准液作为阳性对照。ABTS⁺·清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率} = [D_{734 \text{ nm}(0)} - D_{734 \text{ nm}}] / D_{734 \text{ nm}(0)} \times 100\%$$

式中: $D_{734 \text{ nm}(0)}$ 为空白对照在 734 nm 处的吸光度。

1.5.2 DPPH 自由基清除能力 参考 Li 等的方法^[11],取 1 mL DPPH 乙醇溶液(0.05 mg/mL),在 519 nm 处测吸光度(以 1.2~1.3 最佳)。取 2 mL 上述 DPPH 溶液加入试管中,加入 1 mL 不同浓度的样品液,混合,静置 30 min,测 $D_{519 \text{ nm}}$ 。以蒸馏水作为空白对照,以 Trolox 标准液作为阳性对照。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [D_{519 \text{ nm}(0)} - D_{519 \text{ nm}}] / D_{519 \text{ nm}(0)} \times 100\%$$

式中: $D_{519 \text{ nm}(0)}$ 为空白对照在 519 nm 处的吸光度。

1.5.3 ·OH 清除能力^[12] 参考文镜等的方法^[12],稍作改动。清除羟自由基能力参照水杨酸捕捉羟自由基法测定。取 9 mmol/L FeSO₄ 溶液、9 mmol/L 水杨酸溶液各 1 mL,加入不同浓度的样品溶液 1 mL 与适量蒸馏水,最后加入 1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂ 溶液后摇匀,37 °C 水浴加热 15 min,测其 $D_{593 \text{ nm}}$ 。空白对照溶液为去离子水,参比溶液为不加双氧水的体系。·OH 清除率计算公式如下:

$$\cdot \text{OH 清除率} = \{ D_{593 \text{ nm}(0)} - [D_{593 \text{ nm}(x)} - D_{593 \text{ nm}(x_0)}] \} / D_{593 \text{ nm}(0)} \times 100\%$$

式中: $D_{593 \text{ nm}(0)}$ 为空白对照在 593 nm 处的吸光度; $D_{593 \text{ nm}(x)}$ 为空白参比溶液在 593 nm 处的吸光度; $D_{593 \text{ nm}(x)}$ 为样品参比溶液在 593 nm 处的吸光度。

1.5.4 O₂⁻·清除能力 参考 Li 等的方法^[11],取适当体积($x \mu\text{L}$)样品溶液加入到石英比色皿中,再加(2 950 - x) μL Tris - HCl 缓冲液(pH 值 7.4,浓度为 0.05 mol/L,含 1 mmol/L Na₂EDTA),再加 50 μL 连苯三酚溶液(60 mmol/L),迅速颠倒混匀,开始计时,每隔 30 s 读数 1 次($D_{325 \text{ nm}}$),至 300 s 时为止。空白对照为 Tris - HCl 缓冲液。O₂⁻·清除率计算公式如下:

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率} = [\Delta D_{325 \text{ nm}(0)} - \Delta D_{325 \text{ nm}(\text{sample})}] / \Delta D_{325 \text{ nm}(0)} \times 100\%$$

式中: $\Delta D_{325 \text{ nm}(0)}$ 为空白对照时在 300 s 与 0 s 时于 325 nm 处吸光度的差值; $\Delta D_{325 \text{ nm}(\text{sample})}$ 为样品在 300 s 与 0 s 时于 325 nm 处吸光度的差值。

1.5.5 铁离子还原/抗氧化能力(ferric ion reducing antioxidant power,简称 FRAP) 参考 Benzie 等的方法^[13-14],稍作修改。取 0.3 mL 样品,加 2.7 mL 预热至 37 °C 的 FRAP 工作液,摇匀后放置 10 min,于 593 nm 处测其吸光度,以蒸馏水为空白对照。根据所得 $D_{593 \text{ nm}}$,在标准曲线上求得相应 FeSO₄ 浓度,定义为 FRAP 值(单位 $\mu\text{mol/g}$,以 Trolox 计),其值越大,抗氧化活性越强。以 Trolox 作为阳性对照。

1.5.6 氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity,简称 ORAC) 参考相关方法^[15-16],取荧光素钠溶液(80 nmol/L)100 μL 于 96 孔荧光板中,加入不同浓度样品溶液 50 μL 振荡 5 min,37 °C 温育 10 min 后迅速加入 AAPH 液(153 mmol/L)50 μL 启动反应,每隔 2 min 测定 1 次荧光值(记为 F_n ,激发波长 485 nm,发射波长 535 nm)。以 Trolox 作为阳性对照,计算 ORAC 值(单位 $\mu\text{mol/g}$,以 Trolox 计)。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵水提物的制备

将 10 kg 新鲜黄秋葵用自来水清洗后切片(5~10 mm),自然晾干称质量得 1.28 kg。取干品 500 g,料液比 1 g : 20 mL,95 °C 提取 1 h,提取 2 次,过滤合并滤液,浓缩、干燥后得到 173 g,黄秋葵水提物得率为 4.43%。

2.2 水提物主要营养成分

由表 1 可以看出,冻干水提物中功能成分多糖含量高达 12.01%,黄酮含量为 1.10%,果胶含量为 2.0%。在不同干燥条件下,除水分含量,水提物中功能成分含量无明显差异。

表 1 黄秋葵水提物各营养成分($n=3$)

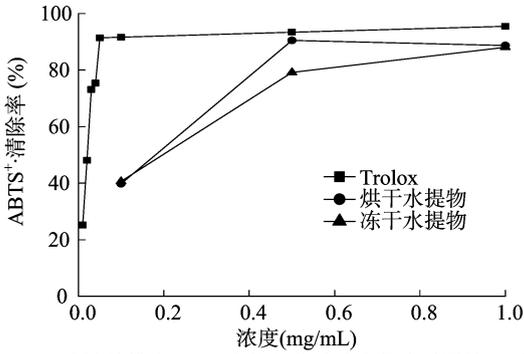
类别	水分含量 (%)	灰分含量 (%)	多糖含量 (%)	黄酮含量 (%)	果胶含量 (%)	水不溶物含量 (%)	pH 值
冻干水提物	10.9 ± 0.09	13.9 ± 0.30	12.01 ± 0.20	1.10 ± 0.13	2.0 ± 0.12	3 ± 0.20	4.0~6.0
烘干水提物	3.9 ± 0.10	15.24 ± 0.30	14.01 ± 0.20	0.96 ± 0.13	2.0 ± 0.12	5 ± 0.20	4.0~6.0

2.3 抗氧化能力

2.3.1 ABTS⁺·清除能力 由图 1 可见,当黄秋葵水提物浓度 ≥ 0.5 mg/mL 时,黄秋葵水提物的 ABTS⁺·清除能力均高于 79%,当黄秋葵水提物浓度为 0.1 mg/mL 时,黄秋葵水提物的 ABTS⁺·清除能力下降了 50%。可见黄秋葵水提物的不同干燥方式对 ABTS⁺·清除能力影响不明显,烘干处理的 EC₅₀ 约为 0.2 mg/mL。

2.3.2 DPPH·清除能力 如图 2 所示,黄秋葵水提物经烘干后,当浓度达到 0.6 mg/mL 时,DPPH·清除率达到最大值,黄秋葵烘干水提物的 EC₅₀ 约为 2.3 mg/mL;而经冻干的黄秋葵水提物其 DPPH·清除率随着浓度增大而增高,当浓度达到 1.0 mg/mL 时,DPPH·清除率达到 79.1%,黄秋葵冻干水提物的 EC₅₀ 约为 0.1 mg/mL。

2.3.3 ·OH 清除能力 如图 3 所示,黄秋葵水提物干燥



Trolox—水溶性维生素E, 在抗氧化试验中作为对照品。下图同
图1 黄秋葵水提物 ABTS⁺· 的去除率

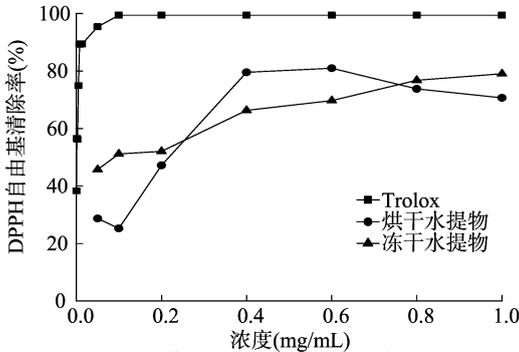


图2 黄秋葵水提物 DPPH· 去除率

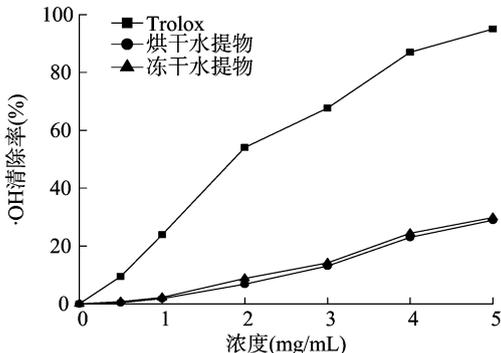


图3 黄秋葵水提物 ·OH 清除率

后,对·OH清除能力具有一定的浓度依赖关系,随着浓度增大而增强,冻干处理黄秋葵水提物的EC₅₀约为8.3 mg/mL。

2.3.4 O₂⁻·清除能力 如图4所示,黄秋葵水提物干燥后,对O₂⁻·清除能力具有明显的浓度依赖关系,随着浓度增大而增强,黄秋葵水提物EC₅₀约为0.9 mg/mL。

2.3.5 其他抗氧化活性 参考Benzie等方法^[13-14],稍作修

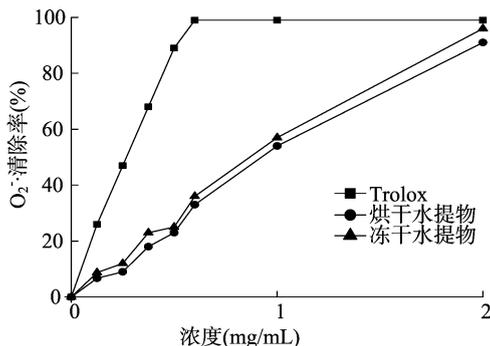


图4 黄秋葵水提物O₂⁻·清除率

改。以FeSO₄作为标准品,其标准曲线回归方程为 $y = 0.0023x + 0.319$ ($r^2 = 0.993$);以Trolox作为阳性对照,其标准曲线回归方程为 $y = 0.0059x + 0.0308$ ($r^2 = 0.998$)。根据回归方程计算,烘干水提物与冻干水提物FRAP如表2所示。在测定水提物FRAP的过程中,发现其抗氧化能力和浓度有一定量效关系,与李孟秋等的研究结果一致^[9]。

参考相关方法^[15-16],以Trolox为阳性对照,其标准曲线回归方程为 $y = 0.2766x + 15.311$ ($r^2 = 0.991$)。根据回归方程计算烘干水提物与冻干水提物的ORAC如表2所示,可见水提物总抗过氧化自由基能力ORAC高于常见蔬菜青花菜(总ORAC为168 μmol/g)。

表2 黄秋葵水提物FRAP和ORAC(n=3)

类别	ORAC (μmol/g)	FRAP (μmol/g)
烘干水提物	180.2 ± 4.29	365.5 ± 5.30
冻干水提物	204.7 ± 5.51	190.8 ± 2.29

3 结论

黄秋葵水提物具有一定的体外抗氧化性,对DPPH·、·OH、O₂⁻·清除能力和浓度有明显量效关系,其EC₅₀分别为0.1、8.3、0.9 mg/mL;在对ABTS⁺·清除能力方面,EC₅₀约为0.2 mg/mL。在总抗过氧化自由基能力方面,ORAC为180.2 μmol/g,且高于常见蔬菜青花菜(总ORAC为168 μmol/g)。

黄秋葵水提物经热风烘干或冷冻干燥,在其体外抗氧化性研究中,不同干燥方法对体外抗氧化性有一定影响,干燥方法除对DPPH·清除率与ORAC有明显影响外,对其抗氧化能力没有明显影响。在后续试验中,在选取FRAP的测定过程中,发现其抗氧化能力和浓度有一定量效关系,并且在模拟胃液和肠液代谢研究过程中具有不同的变化规律,这需要在今后进行系统的研究。

参考文献:

- [1] Savello P A, Martin F W, Hill J W. Nutrition composition of okra seed meal[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28(6): 1163-1166.
- [2] 董彩文, 梁少华. 黄秋葵的功能特性及综合开发利用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 180-182.
- [3] 张灵敏, 王玲, 贾奥, 等. 黄秋葵水提物对2型糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 355-358, 363.
- [4] Wang H, Chen G, Ren D, et al. Hypolipidemic activity of okra is mediated through inhibition of lipogenesis and upregulation of cholesterol degradation[J]. Phytotherapy Research, 2013, 28(2): 268-273.
- [5] 钟雨, 闫明珠, 张泽生, 等. 黄秋葵水提物抗运动疲劳作用研究[J]. 食品科技, 2015(7): 221-225.
- [6] Sabitha V, Ramachandran S, Naveen K R, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2011, 3(3): 397-402.
- [7] Du L Q, Shen Y X, Zhang X M, et al. Antioxidant phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of

赖红芳,潘立卫,吕贵密,等. 大孔树脂纯化翠云草中穗花杉双黄酮的工艺[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):201-204.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.050

大孔树脂纯化翠云草中穗花杉双黄酮的工艺

赖红芳,潘立卫,吕贵密,黄秀香

(河池学院化学与生物工程学院,广西宜州 546300)

摘要:为研究翠云草中穗花杉双黄酮的大孔树脂纯化工艺,利用静态和动态吸附-解吸附试验对8种大孔吸附树脂进行筛选,并优选该树脂的最佳分离纯化条件。结果表明:NKA-9大孔吸附树脂比较适用于穗花杉双黄酮的纯化,最佳纯化工艺的上样液质量浓度为0.033 24 mg/mL,上样体积流速为0.3 mL/min,上样量为35 mL,用90%乙醇在洗脱流速为0.5 mL/min、洗脱体积为35 mL下进行洗脱,分离纯化后的穗花杉双黄酮的回收率达64.26%。因此,NKA-9大孔吸附树脂能有效分离纯化翠云草中的穗花杉双黄酮。

关键词:翠云草;穗花杉双黄酮;大孔树脂;纯化工艺;回收率

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)07-0201-04

翠云草[*Selaginella uncinata* (Desv.) spring]别称蓝地柏、绿绒草,系蕨类卷柏科卷柏属(*Selaginella*)植物,其味微苦、性寒,具有清热利湿、解毒、消淤止血的功效^[1]。翠云草中含有黄酮类、氨基酸、酚类、多糖等多种对人体有益的活性物质,其中的主要成分穗花杉双黄酮(amentoflavone)具有较好的抗肿瘤和抗病毒作用^[2-3],且无显著毒性,抗衰老、抗氧化性强,还有抗炎、抗菌^[4]、血管舒张等生理活性,是极好的天然抗氧化剂,有良好的保健作用,应用前景极为广阔。有学者在研究DNA氧化损伤时发现,穗花杉双黄酮对其具有保护作用,因而穗花杉双黄酮还可作为一种潜在的基因治疗药物^[5]。

大孔吸附树脂是近几十年发展起来的一种具有多孔立体结构、人工合成的有机高分子新型分离材料^[6],其理化性质稳定,不溶于有机溶剂及酸碱,不受低分子化合物、无机盐类及强离子的干扰,吸附成效好,容易再生,使用周期长,被广泛

用于分离纯化天然产物^[7]。近年来,我国在使用大孔树脂对天然产物的分离、纯化工作已十分普遍^[8-9]。查阅文献可知,关于利用大孔吸附树脂分离纯化翠云草中穗花杉双黄酮的优化工艺目前未见报道。本试验用静态吸附-解吸法从8种大孔吸附树脂中初选出3种,再利用动态吸附-解吸的方法筛选出1种吸附-解吸效果最好的大孔树脂,并优化其工艺条件,目的在于得到较高纯度的穗花杉双黄酮,为开发以穗花杉双黄酮为主的药品及功能性食品提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于2016—2017年在河池学院化学与生物工程学院实验室进行。翠云草购买于广西玉林药材市场,经潘立卫实验师鉴定为翠云草全草;穗花杉双黄酮标准品(批号: MUST-15012505,纯度>99.5%),成都曼斯特生物科技有限公司;无水乙醇、95%乙醇、磷酸等均为分析纯;大孔树脂AB-8、HPD600、D4020、DM130、NKA-9、HP20、HPD450、D101,郑州华溢科技新材料股份有限公司;色谱纯乙腈,美国天地有限公司。

Agilent 1260型高效液相色谱仪(四元泵,VWD检测器,柱温箱,自动进样器)、Agilent 1260 series 色谱工作站、Agilent

its extracts[J]. Food Chemistry,2014,153(9):279-284.

[8] Zeng W C, Zhang Z, Jia L R. Antioxidant activity and characterization of antioxidant polysaccharides from pine needle (*Cedrus deodara*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 108(108): 58-64.

[9] 李孟秋, 翟俊乐, 田欢, 等. 黄秋葵提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(10): 65-69.

[10] DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.

[11] Li X C, Lin J, Gao Y X, et al. Antioxidant activity and mechanism of rhizoma Cimicifugae [J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 140.

[12] 文镜, 贺素华, 杨育颖, 等. 保健食品清除自由基作用的体外

测定方法和原理[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 190-195.

[13] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76.

[14] Pulido R, Bravo A L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(8): 3396-3402.

[15] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 1015-1021.

[16] Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(1): 48-54.