

邓浩, 尹青春, 张容鹄, 等. 微波辅助提取黄秋葵黄酮类化合物及抗氧化活性 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (6): 649—653.
DENG H YIN Q C, ZHANG R H, et al. Process and Antioxidant Activity of Flavonoid Extract from *Abelmoschus esculentus* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (6): 649—653.

微波辅助提取黄秋葵黄酮类化合物及抗氧化活性

邓浩^{1,2}, 尹青春³, 张容鹄^{1,2*}, 冯建成⁴, 余欢欢³

(1. 海南省农业科学院农产品加工设计研究所, 海南 海口 570100; 2. 海南省热带果蔬冷链研究
重点实验室, 海南 海口 570100; 3. 海南省食品检验检测中心, 海南 海口 570100;
4. 海南大学材料与化工学院, 海南 海口 570100)

摘要: 采用微波辅助提取法提取黄秋葵中的黄酮类化合物, 通过单因素和正交试验确定最佳条件: 体积分数 70%乙醇为提取溶剂, 温度 70℃, 料液比 1:40 (g·mL⁻¹), 时间 40 min, 黄酮提取率 2.78%, 相对标准偏差 RSD 为 0.635%, 该方法提取率较高、稳定可行; 采用 DPPH 和 ABTS 自由基法测定提取的黄酮类化合物抗氧化活性, IC₅₀ 分别为 1.21、1.06 mg·mL⁻¹, 表现为较强的抗氧化活性。

关键词: 微波; 黄秋葵; 黄酮; 提取; 抗氧化活性

中图分类号: S 662

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2018) 06—649—06

Process and Antioxidant Activity of Flavonoid Extract from *Abelmoschus esculentus*

DENG Hao^{1,2}, YIN Qing-chun³, ZHANG Rong-hu^{1,2*}, FENG Jian-cheng⁴, YU Huan-huan³

(1. Institute of Processing & Design of Agroproducts, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou, Hainan 570100, China; 2. Hainan Tropical Fruit and Vegetable Cold-chain Key Laboratory, Haikou, Hainan 570100, China; 3. Hainan Institute for Food Control, Haikou 570100; 4. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570100, China)

Abstract: A microwave-assisted processes to extract flavonoids from *Abelmoschus esculentus* was optimized by a single factor and orthogonal experiment. By using 70% ethanol as the solvent, *A. esculentus* in a solid-liquid ratio of 1:40 (g·mL⁻¹) was extracted at 70℃ for 40 minutes. The yield of flavonoids was 2.78% with a relative standard deviation of 0.635%. The resulting extract was tested for its antioxidant activity by means of DPPH and ABTS radical scavenging capabilities to show IC₅₀ at 1.21 mg·mL⁻¹ and 1.06 mg·mL⁻¹, respectively. It appeared that the current method could render a high yield on flavonoids that showed a substantial antioxidative activity.

Key words: microwave; *Abelmoschus esculentus*; flavonoids; extraction; antioxidant activity

黄秋葵 *Abelmoschus esculentus*, 又名秋葵, 羊角豆等, 原产于非洲热带地区, 现广泛在热带和亚热带地区种植, 欧美等国都把它列入 21 世纪最佳绿色食品名录之中^[1], 享有“植物伟哥”和“绿色人参”的美誉^[2]。黄秋葵富含锌和硒等微量元素, 具有防癌抗癌的功效^[3], 市场价值高、营养丰富, 被视为运动员的首选蔬菜。医学研究表明黄酮类化合物有较高的药用价值, 如抗氧化^[4]、抗皮肤老化^[5]、预防血管性痴呆^[6]等重要功效。

黄秋葵中黄酮类化合物的提取的方法主要有:

溶剂提取法、超声波辅助法、微波辅助法等。王博等^[7]采用有机溶剂提取黄秋葵中的黄酮化合物, 提取率为 3.30%; 张泽生等^[8]采用响应面实验优化黄秋葵中总黄酮的超声提取工艺, 提取率为 2.49%, 陈宝宏等^[9]利用超声波浸提法对黄秋葵花中黄酮类物质进行提取, 得率为 2.52%。目前, 使用波辅助提取法提取黄秋葵中黄酮类化合物报道较少, 并缺少较全面的抗氧化活性对比分析。本研究旨在更加高效、更节省成本地提取黄秋葵中黄酮类化合物, 并开展其抗氧化活性对比研究, 以期为

收稿日期: 2017-12-25 初稿; 2018-03-21 修改稿

作者简介: 邓浩 (1987—), 男, 硕士生, 助理研究员/讲师, 研究方向: 农产品贮藏 (E-mail: denghao410@163.com)

* 通讯作者: 张容鹄 (1970—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 农产品贮藏 (E-mail: zrh0912@126.com)

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (317187)

黄酮化合物的综合开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄秋葵：儋州宝根农业有限公司提供；无水乙醇、芦丁、石油醚、乙醚、亚硝酸钠、无水氯化铝、氢氧化钠、乙醇、碳酸钠、维生素 C、DPPH、ABTS：均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

MD6CN-H 型微波消解仪：APL 奥普乐公司；UV-2450 紫外分光光度计：日本岛津公司；HHS-4S 水浴锅：上海市南阳仪器有限公司；CPA225D 电子分析天平：德国 Sartorius 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黄酮类化合物的提取及测定 提取流程：黄秋葵→蒸馏水清洗→冷冻干燥→粉碎过筛→微波辅助提取→滤液定容→离心→测定；使用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[8]测定黄酮类化合物：以芦丁为标准品，绘制准线性方程： $y = 15.313x + 0.00007$ ， $R^2 = 0.9999$ ，按下列公式计算：

$$\text{黄秋葵黄酮类化合物提取率}/\% = \frac{Y \cdot V \cdot V_0}{v \cdot W \cdot 1000} \times 100\%$$

式中：Y 为通过标准线性方程计算出的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)；V 为反应体积 (mL)； V_0 为配制的溶液体积 (mL)；v 为取样量 (mL)；W 为提取物质量 (g)。

1.3.2 黄酮类化合物最佳提取条件的确定 采用微波提取功率 600 W，以温度、提取时间、乙醇体积分数、料液比进行单因素试验。以温度为例，黄秋葵分别在 30、40、50、60、70、80℃ 条件下，以体积分数 70% 乙醇为提取液，料液比 1:40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，提取时间 30 min，采用 1.3.1 方法测定黄酮类化合物提取率。确定水平范围后，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验，确定黄秋葵中黄酮化合物的最佳提取条件 (表 1)。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	温度 /℃	提取时间 /min	乙醇体积分数 /%	料液比/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	60	20	60	1:30
2	70	30	70	1:40
3	80	40	80	1:50

1.3.3 黄酮提取物抗氧化活性的测定 将黄秋葵中黄酮提取物配成系列浓度的样液，采用 DPPH 自由基法^[10]、ABTS 自由基法^[11-12]与维生素 C 进行抗氧化性活性的对比分析。

1.4 数据分析

数据采用 OriginPro 8.5 软件和 Microsoft Excel 2013 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 微波提取功率的确定

如图 1 所示，当提取功率为 600 W 时，黄酮类化合物提取率达到最高值 2.23%，继续增加微波功率，黄酮化合物提取率下降。王广慧^[13]也发现使用微波法提取金针菇黄酮，当功率过高时，黄酮提取率反而下降。可能是微波过高功率引起黄秋葵原料凝聚，影响黄酮类化合物溶解所致。因而后续单因素试验选取微波功率为 600 W。

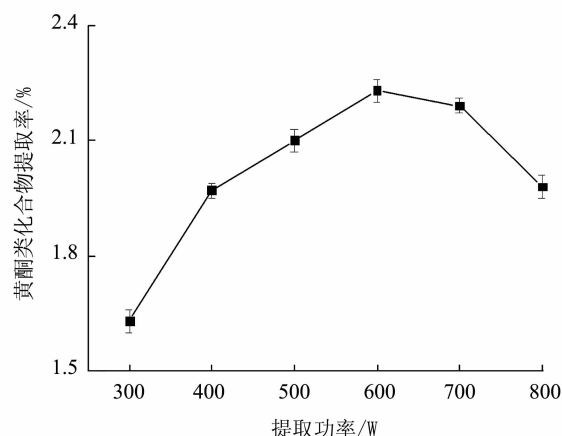


图 1 提取功率对提取率的影响

Fig. 1 Effect of microwave power on extraction yield

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数的确定 如图 2 所示，当乙醇为 70% 时，黄酮类化合物提取率达到最高值 2.02%。陈婷等^[14]也发现使用乙醇提取甜叶菊残渣中总黄酮，当乙醇超过 70%，提取率明显下降。可能是黄酮化合物在乙醇为 70% 时有最大的溶解度。因而后续单因素试验选取的乙醇体积分数为 70%。

2.2.2 提取温度的确定 如图 3 所示，当提取温度为 70℃ 时，黄酮类化合物提取率达到最高值 2.38%。清源等^[15]也发现苦荞茶中黄酮提取率在温度为 70℃ 时达到最高。温度继续升高，黄酮化合物提取率下降，可能是高温破坏了黄酮化合物的

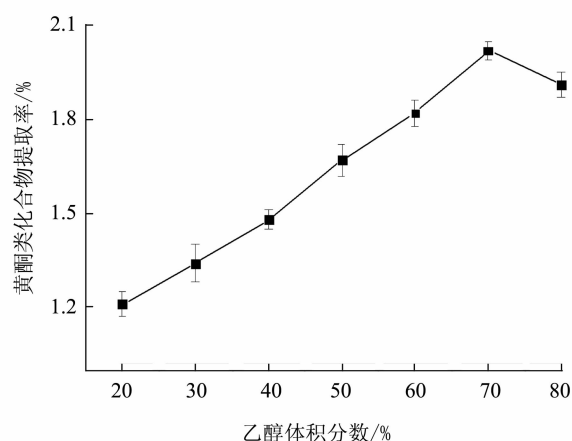


图2 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on extraction yield

稳定性,因而后续单因素试验选取的提取温度为70℃。

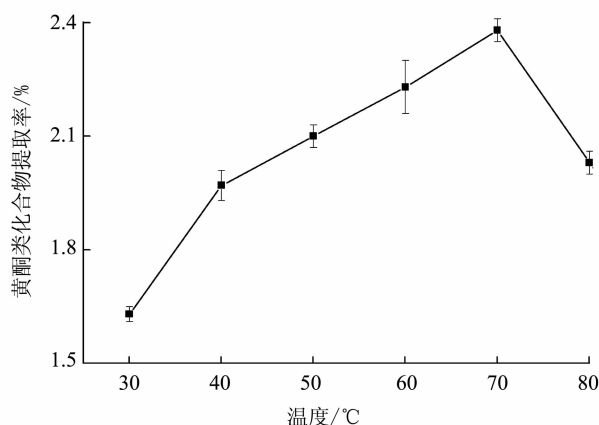


图3 提取温度对提取率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on extraction yield

2.2.3 料液比的确定 如图4所示,当液料比为1:40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)时,黄酮类化合物提取率达到最高值2.46%。继续减少液料比对黄酮提取效果影响不大,因而后续单因素试验选取的料液比为1:40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.4 提取时间的确定 如图5所示,在30 min之前,黄酮类化合物提取率随着提取时间增长而增大,当提取时间为30 min时,达到最高值2.64%。赵晨晨等^[16]也发现微波辅助提取络石藤总黄酮时,最佳提取时间为30 min。继续增加提取时间,提取率逐渐下降,可能是由于黄酮化合物在长时间提取过程中逐渐分解所致,因而后续单因素试验选取的提取时间为30 min。

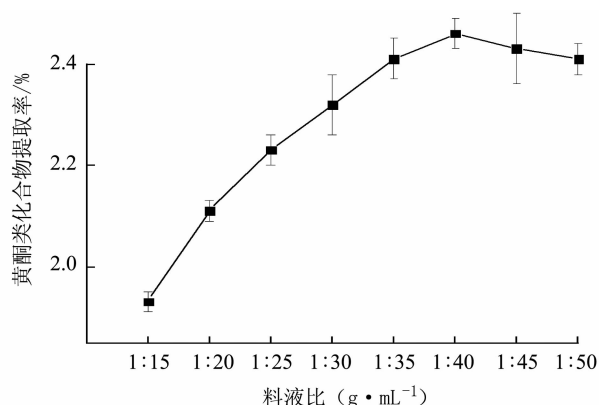


图4 液料比对提取率的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on extraction yield

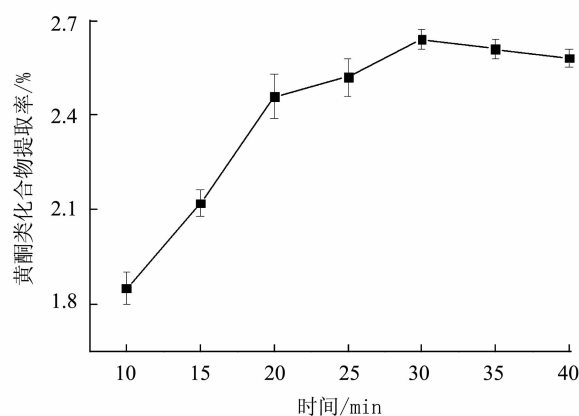


图5 提取时间对提取率的影响

Fig. 5 Effect of time on extraction yield

2.3 正交试验

选取微波功率为600 W,在单因素试验的基础上,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验来进一步优化黄酮的提取工艺参数。结果如表2所示:4个因素对黄酮提取效果影响次序为: $A > D > C > B$,即温度>料液比>乙醇体积分数>提取时间。最佳优化组合为 $A_2B_3C_2D_2$,即温度70℃、提取时间为40 min、乙醇体积分数为70%、料液比1:40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。按上述最佳提取工艺进行试验验证,黄秋葵黄酮的平均得率为2.78%,相对标准偏差RSD为0.635%,表明该提取工艺得率较高、稳定可行。

2.4 黄酮提取物抗氧化活性的测定

2.4.1 DPPH自由基清除率的测定 如图6所示,黄秋葵中黄酮提取物对DPPH自由基有较强清除能力,且随质量浓度的增加而逐渐增强。在0.8~1.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈现良好线性关系,线性方程 $y = 71.5x - 36.2$, IC_{50} 为1.21 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。1.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄秋葵黄酮提取物与0.46 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

维生素 C 的 DPPH 自由基清除率为 45%，表现出相当的还原力。

表 2 正交试验方案及其结果

Table 2 Designs and results of orthogonal experiment

因素	温度 /℃	提取时间 /min	乙醇体积 分数/%	料液比/ (g·mL ⁻¹)	黄酮类化合物 提取率/%
1	60	20	60	1:30	1.9957
2	60	30	70	1:40	2.4719
3	60	40	80	1:50	2.1644
4	70	20	70	1:50	2.5851
5	70	30	80	1:30	2.4683
6	70	40	60	1:40	2.7201
7	80	20	80	1:40	2.3788
8	80	30	60	1:50	2.0325
9	80	40	70	1:30	2.2571
k ₁	2.211	2.320	2.249	2.240	
k ₂	2.591	2.324	2.438	2.524	
k ₃	2.223	2.381	2.337	2.261	
R	0.380	0.061	0.189	0.284	

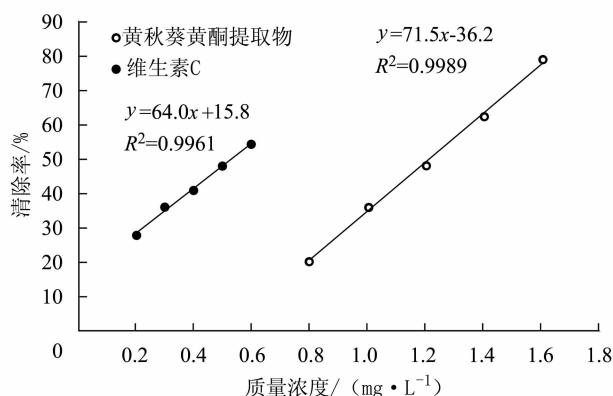


图 6 DPPH 自由基清除率维生素 C 对照

Fig. 6 DPPH free radical scavenging rate of extract vs. Vc

2.4.2 ABTS 自由基清除率的测定 如图 7 所示，黄秋葵中黄酮提取物对 ABTS 自由基也有较强清

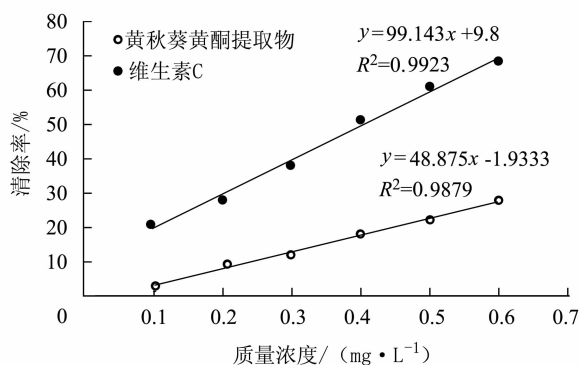


图 7 ABTS 自由基清除率维生素 C 对照

Fig. 7 ABTS free radical scavenging rate of extract vs. Vc

除能力，在 0.1~0.6 mg·mL⁻¹ 呈现良好线性关系，线性方程 $y=48.857x-1.9333$ ， IC_{50} 为 1.06 mg·mL⁻¹。0.4 mg·mL⁻¹ 黄秋葵黄酮提取物和维生素 C 的 ABTS 自由基清除率分别为 18%、51%。

3 讨论与结论

迄今已有许多有关农产品中黄酮的提取及活性研究。王秋实等^[17]研究玉米须黄酮时发现，它能对葡萄糖激酶分解葡萄糖起到促进而达到降糖作用。徐天姿等^[18]研究发现黄秋葵黄酮具有抗小鼠运动性疲劳的作用。目前黄酮类化合物的提取以醇法提取研究居多，常用的有机溶剂为甲醇、乙醇、丙酮^[19]。存在提取工艺时间长、提取成本高、提取率不稳定的问题，有待于进一步优化提取工艺。

本研究以黄秋葵为原料，黄酮类化合物提取率为评价指标，利用微波辅助乙醇提取黄酮化合物，在单因素试验基础上，运用 $L_9(3^4)$ 正交试验获得黄酮提取最佳工艺：温度 70℃、提取时间为 40 min、乙醇体积分数为 70%、料液比 1:40 (g·mL⁻¹)，黄酮化合物提取率为 2.78%，黄酮提取效果影响次序为：温度>料液比>乙醇体积分数>提取时间。整个提取工艺较稳定、快速。采用 DPPH 和 ABTS 自由基法测定提取的黄酮类提取物抗氧化活性， IC_{50} 分别为 1.21 mg·mL⁻¹ 和 1.06 mg·mL⁻¹，表现为较强的抗氧化活性，能为黄秋葵功能性食品开发提供借鉴参考。

参考文献：

- [1] 单承莺, 马世宏, 张卫明. 保健蔬菜黄秋葵的应用价值与前景 [J]. 中国野生植物资源, 2012, 31 (2): 68-71.
- [2] 许俊齐. 黄秋葵净菜加工及 MAP 保鲜关键工艺研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [3] 薛志忠, 刘思雨, 杨雅华. 黄秋葵的应用价值与开发利用研究进展 [J]. 保鲜与加工, 2013, 13 (2): 58-60.
- [4] CHENG J, CHEN X, SHENG Z, et al. Antioxidant-capacity-based models for the prediction of acrylamide reduction by flavonoids [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 90-99.
- [5] 白阳, 孙正旺, 刘春莹, 等. 甘草总黄酮的制备及其抗皮肤老化功能 [J]. 大连工业大学学报, 2015, (5): 317-319.
- [6] 吴晓光, 李玲, 苗光新, 等. 山楂叶总黄酮对血管性痴呆大鼠学习记忆的干预作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2015, (14): 3819-3822.
- [7] 王博, 黄翊鹏, 曲静然. 黄秋葵中黄酮的提取工艺研究 [J]. 齐鲁工业大学学报, 2015, 29 (3): 61-64.
- [8] 张泽生, 董晓朦, 王田心, 等. 黄秋葵中多酚和黄酮提取工艺的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2017, (1): 91-99.
- [9] 陈宝宏, 马震雷, 孙莹莹. 黄秋葵花中黄酮类物质的提取及抗

- 氧化性分析 [J]. 江苏调味副食品, 2017, (3): 20—23.
- [10] SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90 (4): 743—749.
- [11] DUDONNÉ S, VITRAC X, COUTIERE P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57 (5): 1768—74.
- [12] FANG Z, ZHANG Y, YUAN L, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113 (4): 884—888.
- [13] 王广慧. 微波辅助高压法提取金针菇黄酮条件的优化 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38 (8): 46—49.
- [14] 陈婷, 徐文斌, 洪怡蓝, 等. 响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2016, 37 (18): 52—57.
- [15] 清源. 苦荞茶中黄酮提取工艺优化及不同品牌苦荞茶黄酮含量比较 [J]. 南方农业, 2016, 10 (3): 1—5.
- [16] 赵晨晨, 承伟, 王立冬. 微波辅助提取络石藤总黄酮的工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43 (4): 718—720.
- [17] 王秋实, 李凤林. 玉米须黄酮利用肝癌细胞降糖实验研究 [J]. 吉林农业科技学院学报, 2017 (3): 10—13.
- [18] 徐天姿, 单雪峰, 孙炜, 等. 黄秋葵黄酮抗小鼠运动性疲劳的作用及其机理研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (4): 880—882.
- [19] 李筱玲, 邓寒霜. 黄酮类化合物提取分离方法研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2015, 61 (1): 77—79.

(责任编辑: 林海清)