

响应面优化黄秋葵叶多糖的提取工艺及其抗氧化活性考察

程旺开*，许月明，张冬冬
(芜湖职业技术学院，安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的:优化黄秋葵叶多糖的提取工艺条件,并对其体外抗氧化活性进行评价,为黄秋葵叶的开发提供参考。方法:在单因素试验基础上,选择超声波功率、提取温度和提取时间为考察因素,应用 Box-Behnken 中心组合进行三因素三水平设计,以多糖提取率为响应值,采用响应面法优化黄秋葵叶多糖的提取工艺。通过 DPPH·和·OH 的清除能力考察黄秋葵叶多糖的体外抗氧化活性。结果:黄秋葵叶多糖的最佳提取工艺条件为超声功率 160 W,温度 54 ℃,时间 91 min;黄秋葵叶多糖的提取率为 4.81%,与理论值偏差很小。黄秋葵叶多糖清除 DPPH·和·OH 的半抑制浓度(IC₅₀)分别为 2.65,1.47 g·L⁻¹。结论:优选的提取工艺稳定可行、提取率高,黄秋葵叶多糖具有较好的抗氧化活性,为黄秋葵的工业化生产提供参考。

[关键词] 黄秋葵叶;多糖;超声波;抗氧化活性

[中图分类号] R282 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0038-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040038

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1458.028.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 14:58

Response Surface Methodology for Optimization of Extraction and Antioxidant Activities of Polysaccharides from *Abelmoschus esculentus* Leaves

CHENG Wang-kai*, XU Yue-ming, ZHANG Dong-dong
(Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of polysaccharides from *Abelmoschus esculentus* leaves by response surface methodology and investigate its *in vitro* antioxidant activity, in order to provide reference for developing *A. esculentus* leaves. **Method:** Based on single-factor experiments, three independent factors, namely ultrasonic power, extraction temperature and extraction time, were selected as affecting factors for Box-Behnken central composite experiment design. With the polysaccharide extraction rate as the response value, the response surface analysis method was applied to optimize the polysaccharide extraction technique of *A. esculentus* leaves. DPPH· and ·OH scavenging assays were carried out to study *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *A. esculentus* leaves. **Result:** The results showed that the optimum conditions for extracting polysaccharides from *A. esculentus* leaves were ultrasonic power at 160 W, extraction temperature at 54 ℃, extraction time of 91 min. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharides was 4.81%, with a small deviation from the theoretical value. The half inhibiting concentrations (IC₅₀) to DPPH· and ·OH were 2.65, 1.47 g·L⁻¹ respectively. **Conclusion:** The optimized extraction technique is stable and feasible, with a high extraction rate. Polysaccharides from *A. esculentus* leaves have a better anti-oxidation activity, and provide reference for industrialized production of *A. esculentus*.

[Key words] *Abelmoschus esculentus* leave; polysaccharide; ultrasonic; antioxidant activity

[收稿日期] 20160427(009)

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(KJ2015A432);安徽省高校领军人才引进与培育计划项目(gxfxZD2016361);安徽省高等学校省级质量工程项目(2015ZY086)

[通讯作者] *程旺开,硕士,副教授,从事现代生物技术研究,Tel:13955380865,E-mail:ahwhcwk@163.com

黄秋葵为锦葵科一年生草本植物,又名秋葵、黄葵、羊角豆、洋辣椒等^[1]。黄秋葵原产于非洲东部地区,现广泛栽培于热带和亚热带,1990 年代初黄秋葵被引入我国内陆,在大陆南北方各地均有黄秋葵的分布与栽培^[2]。黄秋葵是菜、药、花兼用型植物,既是营养丰富的保健蔬菜,又是具有显著疗效的药用植物。其芽、叶、花、果均可食用,具有滋阴补阳的功效,被人们称为“植物伟哥”、“绿色人参”,具有较高的开发价值^[3]。

目前黄秋葵的研究主要集中于栽培、食品加工以及功能性物质提取等方面^[4-7],对黄秋葵果荚、种子及花多糖的提取、结构及功能研究也越来越多^[8-9],但对黄秋葵叶多糖的研究鲜有报道^[10]。而黄秋葵叶除少量作饲料用外,大部分作为农业废弃物被遗弃,造成资源浪费和环境污染,有开发利用的必要。

超声提取技术是利用超声波所具有的器械、空化及热学效应,对物料的细胞壁造成破坏,促进细胞内物质释放、扩散及溶解,从而提高有效成分的提取率。与常规提取法相比,超声提取法具有提取时间短、产率高等优点,是一种高效的多糖提取方法,被广泛应用于植物功能性物质的提取^[11-12]。本文以黄秋葵叶为原料,采用超声波辅助提取黄秋葵叶多糖,并通过响应面法优化提取工艺,同时考察其对二苯代苦味酰基(DPPH)自由基和羟基自由基的清除能力,以期为黄秋葵叶资源的利用提供理论依据。

1 材料

黄秋葵叶采摘自芜湖市老村种植专业合作社,经芜湖职业技术学院许月明副教授鉴定为锦葵科植物黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* 的叶,干燥后粉碎,过 40 目筛,储存于实验室备用。

DPPH(美国 Sigma 公司,批号 STBB0718);葡萄糖,浓硫酸,苯酚,乙醇,甲醇,硫酸亚铁,30% 双氧水,水杨酸(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

DG120 型中草药粉碎机(浙江省瑞安市春海药材机械厂),PTX-JA510 型 1/1 万电子天平(广州市晶博电子有限公司),KQ-SODB 型数控超声波发生器(上海精密仪器生产有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器),TDL-4 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Tu-1800pc 型分光光度计(北京普析仪器公司)。

2 方法

2.1 黄秋葵叶多糖提取流程 取黄秋葵叶粉末,

精密称定,加入蒸馏水,超声浸提,抽滤,滤液减压浓缩,加 3 倍体积无水乙醇沉淀,置 4 ℃ 冰箱中过夜,取出,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃去上清液,水溶,上清液透析 3 d。取出,冷冻干燥,得黄秋葵叶多糖。

2.2 多糖标准曲线的制定 参照苯酚-硫酸法^[13]测定多糖,取干燥至恒重的葡萄糖配制 0.1 g·L⁻¹ 的标准溶液,分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于比色管中,并补水至 2 mL,然后加入 5% 的苯酚 1.0 mL 混合均匀,再加入浓硫酸 5.0 mL 于沸水中煮沸 15 min,室温放置 30 min,以蒸馏水进行显色做空白对照,在 490 nm 波长处测吸光度 *A*,绘制多糖浓度与吸光度标准曲线,得回归方程 $y = 8.246x + 0.0365$, $R^2 = 0.9971$,其中 *x* 为多糖质量浓度,*y* 为吸光度。

2.3 样品中多糖的测定 吸取多糖提取液 2.0 mL,按标准曲线中多糖的测定方法测定 *A*,根据标准曲线求得多糖含量。黄秋葵叶多糖含量按公式(1)计算:

$$\text{黄秋葵叶多糖提取率} = \frac{\text{提取液中多糖质量}}{\text{黄秋葵叶质量}} \times 100\%$$

(1)

2.4 黄秋葵叶多糖提取单因素试验 精密称取黄秋葵叶粉末 4.0 g,倒入 250 mL 烧杯中,在其他条件不变情况下,采用不同的加水量、超声功率、超声温度和超声时间进行多糖提取,以多糖提取率为指标,考察不同因素对黄秋葵多糖提取率的影响,以确定各因素合适的提取条件。

2.5 响应面法优化黄秋葵叶多糖提取工艺试验 根据单因素试验结果,采用 Box-Behnken 设计对黄秋葵叶多糖提取条件进行优化,以超声功率、温度、时间为自变量,多糖提取率为响应值,设计 3 因素 3 水平的优化试验,试验因素与水平设计见表 1。

表 1 黄秋葵叶多糖提取工艺优先的响应面试验因素与水平
Table 1 Levels of response surface experiments of polysaccharides from *Abelmoschus esculentus* leaves

水平	A 超声功率/W	B 温度/℃	C 提取时间/min
-1	100	40	80
0	150	50	90
1	200	60	100

2.6 黄秋葵叶多糖对 DPPH·清除能力的测定^[14] 取不同浓度的黄秋葵叶多糖水溶液 1 mL 于试管中,分别加入 2×10^{-4} mol·L⁻¹ 的 DPPH·溶液 1 mL,摇匀并于暗处静置 30 min,于 517 nm 处测吸光度 *A*,按公式(2)计算黄秋葵叶多糖对 DPPH·的清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = (1 - \frac{A_x}{A_0}) \times 100\% \tag{2}$$

式中 A_x 为样品溶液的吸光度, A_0 为对照溶液的吸光度。

2.7 黄秋葵叶多糖对·OH 清除能力的测定^[15] 在试管中依次加入 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液 1 mL, 9 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 不同浓度黄秋葵叶多糖水溶液 1 mL, 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液 1 mL, 在 37 ℃ 水浴锅中静置 30 min 后, 于 510 nm 波长处测定 A , 按公式 (3) 计算黄秋葵叶多糖对·OH 的清除率:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率} = (1 - \frac{A_x - A_{x_0}}{A_0}) \times 100\% \tag{3}$$

式中 A_x 为样品溶液的吸光度, A_{x_0} 为蒸馏水代替 H₂O₂ 时样品溶液的吸光度, A_0 为蒸馏水代替样品溶液的吸光度。

3 结果与分析

3.1 黄秋葵叶多糖提取单因素试验

3.1.1 料液比对黄秋葵叶多糖提取的影响 在超声功率 150 W, 提取温度 50 ℃, 提取时间 90 min 的条件下, 考察不同料液比 (1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 g·mL⁻¹) 对多糖提取的影响。随提取液用量的增加, 多糖提取率逐渐提高, 当料液比达 1:40 时, 再增加提取液用量, 多糖提取率增加不明显, 考虑到提取溶剂少有利于降低多糖分离纯化的难度, 因此, 在后续的单因素试验及响应面优化试验中料液比均选择为 1:40。见图 1。

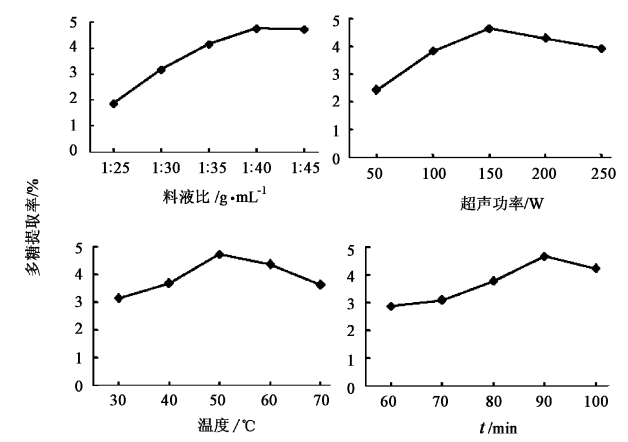


图 1 料液比、超声功率、温度、时间对黄秋葵叶多糖提取率的影响
Fig. 1 Effect of different solid-liquid ratio, ultrasonic power, temperature and time on *Abelmoschus esculentus* leaves polysaccharide yield

3.1.2 超声功率对黄秋葵叶多糖提取的影响 在料液比 1:40, 温度 50 ℃, 提取时间 90 min 的条件下, 考察不同的超声波功率 (5, 100, 150, 200, 250

W) 对黄秋葵叶多糖提取率的影响。增大超声功率有助于提高多糖提取率, 当超声功率增大到 150 W 时, 多糖提取率达最大值, 再增大超声功率, 多糖提取率反而逐渐降低。这主要是由于随着超声波功率增大, 产生的机械作用越强, 分子扩散越快, 多糖就越容易溶出, 而超声功率过大时, 机械作用和空化作用过强而造成多糖降解为寡糖, 引起多糖提取率降低^[16]。因此, 合适的超声功率为 150 W。见图 1。

3.1.3 温度对黄秋葵叶多糖提取的影响 在料液比 1:40, 超声功率 150 W, 提取时间 90 min 的条件下, 考察不同的温度 (30, 40, 50, 60, 70 ℃) 对黄秋葵叶多糖提取率的影响。随温度的上升, 多糖提取率先增加后降低, 当温度为 50 ℃ 时, 多糖提取率达最大值, 再提高温度时多糖提取率呈降低趋势, 这是由于温度升高, 分子运动速度加快有利于多糖的溶出, 但多糖在高温下也会发生降解作用。因此, 合适的提取温度为 50 ℃。见图 1。

3.1.4 时间对黄秋葵叶多糖提取的影响 在料液比 1:40, 超声功率 150 W, 温度 50 ℃ 的条件下, 考察不同的提取时间 (50, 60, 80, 90, 100 min) 对黄秋葵叶多糖提取率的影响。随着时间的延长, 多糖提取率逐渐上升, 当时间为 90 min 时, 此时多糖提取率最大, 再延长提取时间多糖提取率下降, 其原因在于长时间的超声对多糖有降解作用。因此, 合适的提取时间为 90 min。见图 1。

3.2 响应面优化提取条件

3.2.1 响应面试验设计 根据单因素试验结果, 以超声功率、温度、时间为自变量, 黄秋葵叶多糖提取率为因变量, 设计 3 因素 3 水平的优化试验, 因素编码及水平见表 1, 由 Box-Behnken 设计试验方案及试验结果见表 2。

利用 Design Expert 8.0.6 软件对试验结果进行回归分析, 得到黄秋葵叶多糖提取率与超声功率 (A), 温度 (B) 及时间 (C) 的 3 次多项回归方程 $Y = 4.73 + 0.28A + 0.39B + 0.079C - 0.13AB + 0.17AC - 0.060BC - 0.46A^2 - 0.42B^2 - 0.41C^2$

表 3 为回归方程方差分析结果, 该模型 $P < 0.0001$, 极显著, 失拟项 P 值为 0.0528, 不显著, 这表明多项回归方程模型能准确反映超声功率、温度和时间对多糖提取的影响; 该模型决定系数 $R^2 = 0.9769$, 调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9472$, 这表明 94% 以上的数据可以用本方程解释, 该模型拟合度较好, 误差较小, 可以用于黄秋葵叶多糖提取工艺试验的分析与预测。

表 2 黄秋葵叶多糖提取工艺优先的 Box-Behnken 试验分析

Table 2 Box-Behnken analysis of extraction process of polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* leaves

试验号	A 超声功率/W	B 提取温度/℃	C 提取时间/min	多糖提取率/%
1	-1	1	0	4.23
2	0	0	0	4.65
3	-1	-1	0	3.06
4	-1	0	1	3.93
5	0	1	1	4.26
6	0	0	0	4.68
7	1	1	0	4.38
8	-1	0	-1	3.63
9	1	0	-1	3.99
10	0	-1	1	3.75
11	0	1	-1	4.17
12	0	0	0	4.83
13	0	0	0	4.74
14	1	-1	0	3.72
15	0	0	0	4.74
16	1	0	1	4.44
17	0	-1	-1	3.42

表 3 黄秋葵叶多糖提取回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variances for regression equation

方差来源	<i>f</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	9	4.66	0.52	32.90	<0.00 01
残差	7	0.11	0.016		
失拟项	3	0.091	0.030	6.37	0.052 8
净误差	4	0.019	4.770 × 10 ⁻³		
总离差	16	4.77			

通过表 4 回归方程系数显著性检验,一次项超声功率 *A* 和温度 *B*,以及平方项 *A*²,*B*² 和 *C*² 对多糖提取率有极显著影响,二次项中超声功率与时间 *AC* 对多糖提取率有显著影响,其他项对多糖提取率影响不显著。从 *F* 值可以看出,在所选的各因素水平范围内,温度对多糖得率的影响最大,超声功率的影响次之,时间的影响最小。

3.2.2 响应面图分析 根据回归方程,做响应面三维图。在超声功率、温度和时间所选范围内均存在极值,即存在响应面最高点;不同因素交互作用的大小,超声功率和时间的交互作用显著,超声功率和温度、温度和时间交互作用不显著^[17]。对回归方程一阶求导,在黄秋葵叶多糖提取率得最大值时,其超声功率 163.40 W,温度 54.09 ℃,时间 91.23 min,此时黄秋葵叶多糖提取率为 4.85%。见图 2。

由于以上预测最佳条件未包含在响应面优化实验中,需进一步进行最佳条件实验验证。为考虑操

表 4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Significance test of coefficients for regression equation

系数项	回归系数	标准误差	95% 置信区间		<i>F</i>	<i>P</i>
			下限	上限		
截距	4.73	0.056	4.60	4.86	-	-
<i>A</i>	0.28	0.044	0.17	0.38	39.13	0.000 4
<i>B</i>	0.39	0.044	0.28	0.49	75.81	<0.000 1
<i>C</i>	0.079	0.044	-0.026	0.18	3.15	0.119 1
<i>AB</i>	-0.13	0.063	-0.28	0.021	4.13	0.081 6
<i>AC</i>	0.17	0.063	0.024	0.32	7.56	0.028 5
<i>BC</i>	-0.060	0.063	-0.21	0.088	0.91	0.370 7
<i>A</i> ²	-0.46	0.061	-0.60	-0.31	56.35	0.000 1
<i>B</i> ²	-0.42	0.061	-0.57	-0.28	47.51	0.000 2
<i>C</i> ²	-0.41	0.061	-0.55	-0.26	44.19	0.000 3

注:*f*均为 1。

作的方便性,在料液比 1:40 的条件下,将提取工艺条件修正为超声功率 160 W,温度 54 ℃,时间 91 min,实际测得的多糖平均得率为 4.81%,与预测值非常接近,这说明响应面设计优化多糖提取最佳条件准确可靠。

3.3 黄秋葵叶多糖的抗氧化活性

3.3.1 黄秋葵叶多糖对 DPPH·清除作用 随着多糖浓度的提高,其对 DPPH·清除效果逐渐增强,在浓度范围内,呈量效关系。线性回归分析表明,黄秋葵叶多糖浓度与其对 DPPH·清除效果关系方程为 $y = -1.525 7x^2 + 16.816x + 16.152$,相关系数 $R^2 = 0.974 3$,半清除浓度(IC₅₀)为 2.65 g·L⁻¹。说明黄秋葵叶多糖具有明显的清除 DPPH·作用。见图 3。

3.3.2 黄秋葵叶多糖对·OH 清除作用 随着多糖浓度的提高,黄秋葵叶多糖对·OH 清除效果逐渐增强,多项回归分析表明,黄秋葵叶多糖对·OH 清除作用具有一定的量效关系,其回归方程为 $y = -6.307 1x^2 + 53.615x - 15.346$,相关系数 $R^2 = 0.992 5$,半清除浓度为 IC₅₀ = 1.47 g·L⁻¹。说明黄秋葵叶多糖具有明显的清除·OH 作用。见图 3。

4 结论

利用 Design Expert8.0.6 软件,采用 Box-Behnken 建立黄秋葵叶多糖提取的 3 次多项回归方程模型,方程拟合良好。在所选的各因素水平范围内,超声功率对多糖得率的影响最大,温度的影响次之,时间的影响最小,且超声功率和温度有显著的交互作用。优化后的最佳多糖提取条件为料液比 1:40,超声功率 160 W,温度 54 ℃,时间 91 min,此时黄秋葵叶多糖提取率为 4.81%。验证结果表明,试验测定值与理论值非常接近,多项回归方程模型

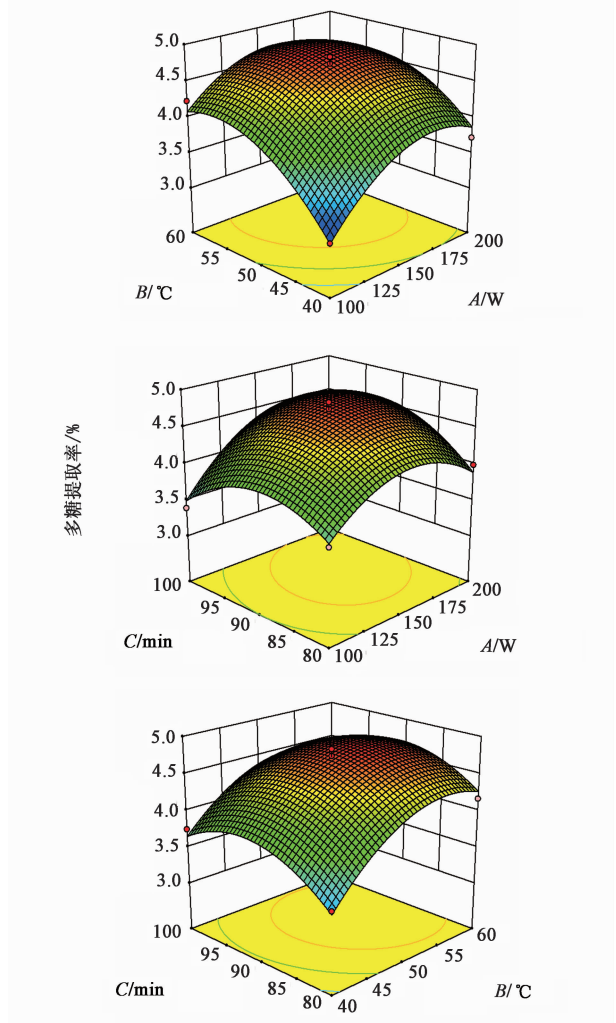


图 2 超声功率和温度、超声功率和时间、温度和时间对黄秋葵叶多糖提取的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power and temperature, ultrasonic power and time, temperature and time on extraction process of polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* leaves

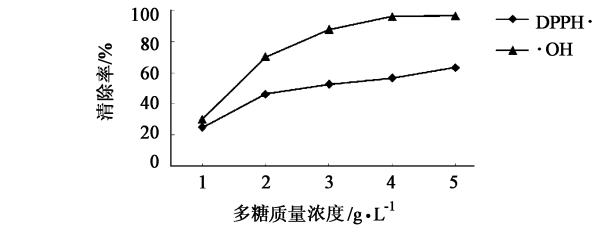


图 3 黄秋葵叶多糖对 DPPH·, ·OH 清除作用
Fig. 3 Scavenging effect of polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* leaves on DPPH and OH radicals

能较好的预测超声波辅助提取黄秋葵叶多糖的提取率。通过测定黄秋葵叶多糖对 DPPH·, ·OH 的清除能力,结果表明黄秋葵叶多糖具有明显的抗氧化活性,其清除 DPPH·, ·OH 的 IC₅₀ 分别为 2.65, 1.47 g·L⁻¹,有进一步研究和开发的必要。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 朱艳芳,马应波,刘东华.黄秋葵花提取物体外抗氧化活性的研究[J].淮北师范大学学报:自然科学版,2014,35(1):46-50.

[3] 卢降杰,苏浓,岳森.菜药花兼用型植物——黄秋葵[J].特种经济动植物,2004(8):33-34.

[4] 张洪永,王秀眉.长江及黄淮流域黄秋葵优质高效栽培技术[J].长江学报,2012(14):64-65.

[5] 黄阿根,陈学好,高云中,等.黄秋葵的成分测定与分析[J].食品科学,2007(10):451-455.

[6] 田科巍,董增,魏兆军.黄秋葵籽油脂提取工艺优化及组分分析[J].合肥工业大学学报:自然科学版,2012,33(10):1405-1408.

[7] 王萍,肖文君,胡帅,等.黄秋葵不同品系和不同组织部位的果胶和咖啡因含量比较研究[J].激光生物学报,2015,24(2):175-179.

[8] 王维婷,郭淑,刘超,等.黄秋葵生物活性物质及加工研究进展[J].山东农业科学,2015,47(11):134-136,140.

[9] Sheu S C, LAI M H. Composition analysis and immunomodulatory effect of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) extract[J]. Food Chem, 2012, 134(4):1906-1911.

[10] 白石琦.黄秋葵叶多糖的分离纯化、初步表征及其抗氧化活性研究[D].镇江:江苏大学,2013.

[11] 陈红,张波,刘秀奇,等.超声波辅助提取水溶性大显多糖及纯化工艺[J].食品科学,2011,32(6):139-142.

[12] Oni Y, Kelvin G, Lara M M, et al. Effect of extraction techniques and conditions on the physicochemical properties of the water soluble polysaccharides from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. Food Sci Technol, 2008, 43:2268-2277.

[13] 王吉标,欧阳臻,赵明,等.响应面分析法优化金蝉花多糖的提取工艺[J].天然产物研究与开发,2014,26:438-443.

[14] Lee Y L, Yen M T, Mau J L. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus* [J]. Food Chem, 2007, 104(1):1-9.

[15] 刘航,国旭丹,马雨洁等.超声波辅助提取苦荞麦多糖工艺优化及其体外抗氧化研究[J].食品科学,2013,34(14):45-50.

[16] 杨婷婷,张广文,朱玲玲.超声波提取米团花多糖[J].食品与发酵工业,2014,40(11):242-246.

[17] 鞠兴荣,税丹,何荣等.响应面分析法优化菜籽多糖酸法提取工艺的研究[J].中国粮油学报,2012,27(3):89-93.

[责任编辑 邹晓翠]