

# 红凤菜中活性物质的提取及对超氧阴离子自由基的清除作用

杨秀娟<sup>1</sup>, 赵晓燕<sup>2,\*</sup>, 马越<sup>2</sup>, 吴秋波<sup>1</sup>, 马荣山<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161; 2. 北京市蔬菜研究中心, 北京 100089)

**摘 要:** 本文研究了红凤菜不同溶剂提取物对超氧阴离子自由基的清除作用, 发现水提取物有较好的清除作用, 进一步采用正交实验设计确定水提取最佳工艺, 并就其抗氧化性与 VC、白菜、芹菜、青椒、紫甘蓝等进行了比较。实验结果表明: 红凤菜提取物对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除作用, 在浓度为  $750 \mu\text{g/ml}$  时, 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除率即可达到 73.04%, 水提取最佳工艺为: 浸提温度  $30^\circ\text{C}$ 、固液比 1:40、浸提时间为 2h。

**关键词:** 红凤菜; 超氧阴离子自由基; 清除

## Study on Extraction of Active Substance in Gynura bicolor DC and Its Scavenging Effects to Free Oxygen Radical

YANG Xiu-juan<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-yan<sup>2,\*</sup>, MA Yue<sup>2</sup>, WU Qiu-bo<sup>1</sup>, MA Rong-shan<sup>1</sup>

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

**Abstract:** In this study an active substance of Gynura bicolor DC, which could scavenge free oxygen radical, was extracted

收稿日期 2004-11-22

\*通讯作者

作者简介: 杨秀娟(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物抗氧化。

表1 红曲霉  $M_{9y}$  斜面传代 Monacolin K 产量变化

Table 1 The Monacolin K yield change of *Monascus ruber*  $M_{9y}$  from the generation to the generation

代次	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Monacolin K 产量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	103.73	103.16	102.24	101.45	102.67	103.53	102.4	100.45	101.63
平均值					102.36				
标准偏差					1.06				
变异系数					1.03%				

一株 Monacolin K 产量为  $103.73 \mu\text{g/ml}$  的诱变株  $M_{9y}$ , 其产量约是出发菌株  $M_{9x}$  的 4.1 倍,

3.2 诱变株  $M_{9y}$  经酯酶同工酶分析, 其酶带条纹数、迁移率等均发生了明显变化。

3.3 对诱变株  $M_{9y}$  进行传代稳定性试验, 结果表明: 经斜面传代八代以后, 诱变株  $M_{9y}$  的 Monacolin K 产量仍较稳定, 无明显的回复突变。

参考文献:

- [1] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 290-293.
- [2] 王立新, 莫海涛, 石红. 红曲霉固态发酵生产洛伐他汀的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 4(2): 96-99.
- [3] 马美荣, 樊游, 方京, 等. 降胆固醇红曲霉菌种的筛选[J]. 无锡轻工业大学学报, 1999, 9(3): 66-69.
- [4] 邢旺兴, 宓鹤鸣, 陈士景, 等. 中药红曲基原真菌的酯酶同工酶分析[J]. 微生物通报, 2000, (6): 437-439.
- [5] 李多伟, 尉亚辉, 王义潮, 等. 生物技术实验与仪器操作指南[M]. 西安: 西北大学出版社, 1996. 12-24.

with different solvents. It indicated that the extracts with water had better effects to the radicals than with other solvents. The experiments design was drawn by orthogonal test further. It was found that the extracting results were best when ratio of solid to liquid was 40 at 30℃ for 2 hours. The anti-oxidant activity of *Gynura bicolor* DC was compared with VC, Chinese cabbage, celery, green pepper and purple cabbage too, the results showed that the extracts with water had strong effect upon scavenging  $O_2^{\cdot-}$ , as the concentration reached 750  $\mu\text{g/ml}$ . It could scavenge 73.04% of  $O_2^{\cdot-}$ .

Key words: *Gynura bicolor* DC; oxygen free-radical; scavenging

中图分类号 TS255.36

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0078-04

红凤菜(*Gynura bicolor* DC.)为菊科多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 别名紫背天葵、红苋菜、红菜等, 生于平原及低山阴湿处或栽培于住宅附近、菜园, 在我国南方大面积生长, 全年均可采收, 资源极为丰富, 营养全面, 人们素来喜欢食用。据记载, 该植物全草有清热凉血, 活血, 止血, 解毒消肿的功效, 治咳血, 崩漏, 外伤出血, 痛经, 痢疾, 跌打损伤, 溃疡久不收敛, 根茎止渴、解暑<sup>[2]</sup>。因此, 它作为一种潜在的功能食品基料, 具有很好的开发前景。

近年来研究发现, 许多危害人体健康的疾病如癌症、衰老、心血管疾病、代谢失调、光损伤、白内障、肌肉损伤、毒物侵害<sup>[3,4]</sup>甚至疲劳<sup>[5]</sup>等都与人体的自由基有关, 如何清除自由基成为营养保健学科的一个研究热点。红凤菜对自由基的清除能力如何, 目前还没有这方面的报道, 本实验拟用水作溶剂研究提取红凤菜中的活性成分, 并对其抑制  $O_2^{\cdot-}$  自由基的活性进行检测和评价, 为进一步开发利用红凤菜提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

红凤菜 北京市农林科学院蔬菜研究中心特菜组; 焦性没食子酸(分析纯) 遵义建强化工厂; VC(分析纯) 东北制药厂。

### 1.2 仪器

紫外可见分光光度计 Shimadzu UV-240 Graphcord; 高速冷冻离心机 HITACHI 公司 旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司; 数字酸度计 CHN800 美国奥立龙公司; 高速万能粉碎机 FW100 天津市泰斯仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 红凤菜中活性物质的提取

##### 1.3.1.1 提取工艺流程

鲜红凤菜→红外线烘干→粉碎→加入一定比例的溶剂→一定温度下搅拌浸提一定时间→4000 r/min 离心 15 min→收集上清液旋转蒸发至一定体积。

##### 1.3.1.2 溶剂的选择

将干燥粉碎的红凤菜分别称取 2g, 按固液比 1:25 浸泡于水、95% 乙醇、丙酮、乙醚、石油醚、乙酸乙酯中, 置于暗处, 5 h 后离心, 旋转蒸发得提取物。

#### 1.3.1.3 浸提条件研究

研究浸提时间、温度、固液比等单因素对红凤菜中活性物质浸出率的影响。

##### (1) 浸提时间选择实验

确定固液比为 1:25, 浸提温度为 30℃ 不变的条件下, 比较不同浸提时间(1、2、3 h)对红凤菜中活性物质浸出率的影响, 以选择最佳浸提时间。

##### (2) 浸提温度选择实验

确定固液比为 1:25, 浸提时间由上一实验确定为 2 h, 浸提温度(25、30、40℃)不同, 比较不同浸提温度对其活性物质浸出率的影响, 以选择最佳浸提温度。

##### (3) 固液比选择实验

在上述实验确定的浸提时间及温度下, 选择固液比分别为 1:25、1:30、1:40, 根据其活性物质浸出率确定最佳固液比。

##### (4) 正交实验设计

#### 1.3.2 邻苯三酚自氧化法测定红凤菜提取物抗氧化能力<sup>[6~8]</sup>

(1) pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲液的配制 25 ml 0.2 mol/L Tris 与 22.5 ml 0.1 mol/L HCl 混匀。

(2) 邻苯三酚溶液的配制: 准确称取 0.0441 g 邻苯三酚用 pH4.9 的纯水溶解定容至 50 ml, 即可制得 7 mmol/L 的浓度。

(3) 红凤菜提取物抗氧化能力的测定 取 4.0 ml Tris-HCl 缓冲液, 一定体积蒸馏水, 一定提取物, 最后加入 0.3 ml 邻苯三酚溶液启动反应, 总反应体系为 9 ml。空白管用 10 mmol/L HCl 代替 0.3 ml 邻苯三酚。室温下静置 30 min 后测其吸光度变化, 样品对  $O_2^{\cdot-}$  自由基的清除率  $\eta(\%) = \{1 - [(A-B)/A_0]\} \times 100\%$  这里  $A_0$  为未加样的邻苯三酚的吸光度; A 为样品与邻苯三酚反应后的吸光度; B 为样品的吸光度。

## 2 结果与讨论

2.1 以不同溶剂提取红凤菜中活性物质, 提取率结果如表 1。

表4 方差分析表  
Table 4 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	$F_{0.1}$ 临界值	$F_{0.05}$ 临界值	显著性
A	8.5089	2	4.2545	1.0934	9.000	19.000	显著
B	100.5512	2	50.2756	12.9207	9.000	19.000	
C	1.3778	2	0.6889	0.177	9.000	19.000	
误差	7.7821	2	3.8911				
总合	118.22						

表1 各种溶剂的提取率  
Table 1 The ratio of extraction in different solvents

溶剂	石油醚	乙醚	乙酸乙酯	丙酮	95% 乙醇	水
提取率(%)	7.74	4.87	6.36	4.88	10.25	27.67

由表1可以看出:水提取得率最高,可达到27.67%。

## 2.2 各溶剂提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

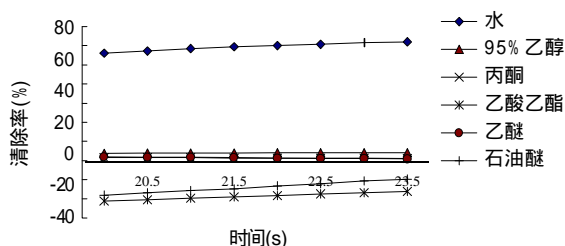


图1 红凤菜不同溶剂提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Fig.1 Free oxygen radical scavenging capacity of extracts in different solvents

邻苯三酚自氧化法测定红凤菜各提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用,以动态的方式,即每隔30s测一次A值,根据所测A值绘制的时间—A值曲线,如图1。由图可以看出水提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用最强,其它几种提取物在测量范围内对 $O_2^{\cdot-}$ 基本上没有清除作用。

## 2.3 最佳提取条件的选择

根据单因素试验确定的条件范围,因素水平见表2。

表2 正交试验方案  
Table 2 Design of orthogonal experiment

水平	A 浸提温度(°C)	B 固液比	C 浸提时间(h)
1	25	1:20	1
2	30	1:25	2
3	40	1:40	3

正交试验方案及结果见表3和表4。

由表3和表4可以看出,影响红凤菜水溶性活性物质浸提得率的因素主次顺序为 $B > C > A$ ,影响较大的是B,即浸提时的固液比。因此,红凤菜中水溶性活性物质的最佳提取工艺条件是:浸提温度30℃、固液比1:40、浸提时间2h。

## 2.4 红凤菜水提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下能发生自氧化,生成有色中

表3 正交试验结果  
Table 3 Orthogonal experiment results

试验号	1	2	3	得率(%)
1	1	1	1	21
2	1	2	3	24.5
3	1	3	2	31
4	2	1	3	25
5	2	2	2	27.5
6	2	3	1	30.5
7	3	1	2	23.5
8	3	2	1	28
9	3	3	3	32.5
$K_1$	25.5	23.17	26.5	
$K_2$	27.67	26.67	27.33	
$K_3$	28	31.33	27.33	

间物(在325nm处有最大吸峰)和 $O_2^{\cdot-}$ , $O_2^{\cdot-}$ 对自氧化又起催化作用,依据有色中间物生成量的多少,可判断 $O_2^{\cdot-}$ 生成量的多少。当有自由基清除剂存在时,有色产物的生成量减少,可测定该自由基清除剂的活性。实验研究比较了红凤菜水提取物与VC、芹菜、青椒、白菜及紫甘蓝提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果,结果见图2。

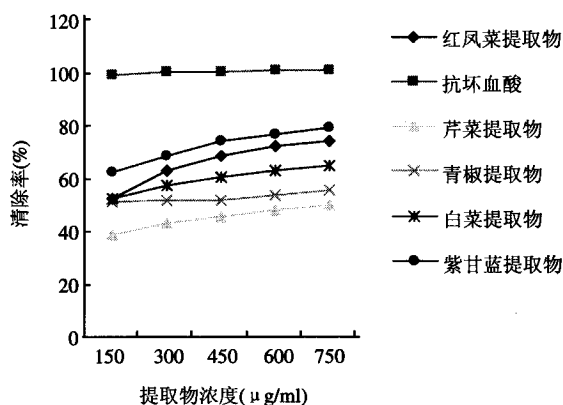


图2 红凤菜提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Fig.2 Free oxygen radical scavenging capacity of extracts in *Gynura bicolor* DC

由图2看出对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用由强到弱依次是VC>紫甘蓝>红凤菜>白菜>青椒>芹菜,VC对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用基本上达到100%,红凤菜水提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用低于相同浓度的VC和紫甘蓝,但仍有着显著的清除作用,并且清除作用随着加入量的增加而增强。当

# 固定化Neutrase中性蛋白酶的研究

刘大川<sup>1</sup>, 杨国燕<sup>2</sup>, 万楚筠<sup>1</sup>, 张 蕾<sup>1</sup>, 熊雪婷<sup>1</sup>

(1. 武汉工业学院, 湖北 武汉 430023)

2. 武汉肽类物质应用研究中心, 湖北 武汉 430023)

**摘 要:** 以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂固定化Neutrase中性蛋白酶。通过单因素实验, 分析了壳聚糖浓度、戊二醛浓度、交联时间对微球制备的影响及戊二醛加入量对酶固定的影响。由正交实验确定制备固定化酶的最佳工艺参数为: 壳聚糖浓度为3%、戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为1:2、制备微球交联时间为1h, 微球与酶振荡吸附12h, 再加入2.5%戊二醛交联, 使戊二醛最终浓度达到0.9%, 制备得固定化中性蛋白酶活力为112.69U/g。固定化蛋白酶的热稳定性和对酸碱的稳定性均较游离中性蛋白酶有所提高。

**关键词:** 壳聚糖; 中性蛋白酶; 固定化

## Studies on Immobilization of Neutrase

LIU Da-chuan<sup>1</sup>, YANG Guo-yan<sup>2</sup>, WAN Chu-yun<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, XIONG Xue-ting<sup>1</sup>

(1. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

2. Wuhan Application Research Center for Peptide Substance, Wuhan 430023, China)

收稿日期: 2004-11-22

作者简介: 刘大川(1943-), 男, 教授, 主要从事油脂和植物蛋白的科研与教学工作。

红凤菜提取物浓度为750 μg/ml时, 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率即可达到73.04%, 是同等浓度维生素C清除作用的73.18%。

超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )是氧气在生物体内的电子传递和一些生物分子的还原作用下得到一个电子而生成的, 有着很强的活性, 可直接导致细胞内的DNA损伤, 还能转化为氧化性更强的羟基自由基, 从而引发含有大量不饱和脂肪酸的细胞膜的脂质过氧化, 形成链式反应, 破坏膜结构, 造成细胞损伤<sup>[3, 4]</sup>, 因此, 寻找抗氧化剂就与人们得健康密切相关。以上实验表明红凤菜的水提取物中富集了高浓度的活性物质, 对 $O_2^{\cdot-}$ 有较强的清除作用, 可以作为天然的抗氧化剂, 并且红凤菜在我国资源丰富, 价格便宜, 应极具有开发价值, 可以作为即食方便食品、调味品、保健食品等多种产品, 但有关于红凤菜的成分的报道还很少, 有文献曾报道红凤菜含有花青素<sup>[9, 10]</sup>, 需要我们做进一步的研究, 重点在于: 红凤菜提取物的成分, 抗氧化机理、化学结构与抗氧化性以及与其它抗氧化剂的协同作用等。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第七十

七卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977. 988-989.
- [3] 赵晶, 白云. 自由基相关疾病研究进展[J]. 生物学教学, 2003, 28(4): 6-9.
- [4] 崔剑, 李兆陇, 洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2000, 40(6): 9-12.
- [5] 吴鹤群. 自由基生物学理论与运动性疲劳[J]. 三明师专学报, 2000, (1): 75-77.
- [6] 徐淑云, 等. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 502-504.
- [7] 马庆一, 张霞, 熊卫东, 等. 红薯梗中清除自由基活性成分的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 145-148.
- [8] 曾小玲. 马齿苋水提取物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133-135.
- [9] Tsai Tsun-chung, Chen Chung-wen, Yang Cheng-hsien. Two major anticyanin in General bicolor [J]. Shipin Kexue (Taipei), 1995, 22 (2): 149-160.
- [10] Yoshitama Kunihiro, Masahiko Kaneshige, Nariyuki Ishikura. A stable reddish purple anthocyanin in the leaf of Gynura aurantiacav. 'Purple Passion' [J]. Journal of Plant Research, 1994, 107: 209-214.