

原生贡寮山药萃取物抗氧化成分及抗氧化活性的研究

赵一霖¹, 蔡国珍², 娄永江^{*1}, 丁仲仲¹, 张兴龙¹

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 台湾海洋大学 生命科学院, 台湾 基隆)

摘要: 探讨了干燥、萃取方式对原生贡寮山药(*Dioscores alata*)抗氧化成分以及抗氧化活性的影响。抗氧化成分分析了总多酚质量分数;体外抗氧化的测定方法包括 DPPH 自由基清除能力与还原力。结果表明,山药皮冷冻干燥后经过乙醇萃取所得萃取物的总多酚质量分数以及抗氧化能力最高。抗氧化能力及总多酚质量分数以冷冻干燥优于热风干燥,萃取方式以 50%体积分数乙醇溶液最优,山药皮优于山药肉。HPLC 分析萃取物中主要多酚成分为绿原酸。同时对体外抗氧化活性以及总多酚含量较高的原生贡寮山药的乙醇萃取物进行抑制体内细胞 ROS 产生测试,结果显示各个样品均可以显著降低由 LPS 所诱导细胞 ROS 的产生,抑制效果跟抗氧化能力结果一致。

关键字: 原生贡寮山药;山药皮;山药肉;抗氧化;胞内活性氧分析;HPLC

中图分类号: TS 255 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)10—1101—06

Antioxidant Abilities and Compounds of Extractions from One Kind of Taiwanese Yam (*Dioscores alata*)

ZHAO Yilin¹, CAI Guozhen², LOU Yongjiang^{*1}, DING Zhongzhong¹, ZHANG Xinglong¹

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. College of Life Sciences, National Taiwan Ocean University, Jilong 20018, China)

Abstract: The effects of drying and extraction processes on the antioxidant compounds and antioxidant activities of one kind of yam (*Dioscorea alata*), were investigated. The antioxidant compounds analyzed the phenolic content. The antioxidant measurements included a ,a-diphenyl-b-picryl-hydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity and reducing power . The 50% ethanolic extracts from the freeze-dried peel had the most antioxidant compounds and the highest antioxidant activities. Generally speaking, freeze-dried yam maintained higher antioxidant activities than hot air-dried ,the peel had more than the meat, Among three extraction methods, 50% ethanolic extraction was the best. By HPLC analysis showed that the major polyphenols of the extraction was chlorogenic acid. Meanwhile tested the 50% ethanolic extracts on the inhibition of the formation of ROS, we got the same result as before.

Keywords: *Dioscores alata*, peel, meat, antioxidant activities, ROS, HPLC

收稿日期: 2014-02-11

* 通信作者: 娄永江(1965—),男,浙江嵊州人,副教授,主要从事水产品加工研究。E-mail: louyongjiang@nbu.edu.cn

山药为薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 (*Dioscorea*) 的蔓性块茎类植物, 俗称怀山或山芋。具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等多项生理功能, 是值得关注及发展成为保健食品^[1-4]。

Farombi 指出, 褐变后山药 (*D. rotundata*) 粉末的乙酸乙酯萃取物具有很好的抗氧化效果^[5-6]; 若将此乙酸乙酯萃取物进一步以 Sephadex LH-20 管柱层析配合甲醇流洗作区分, 所得的各区分物同样显示具有很好抑制脂质氧化的效果。Araghiniknam 以购自市面上的山药萃取物补充剂给予 65~82 岁的老年人服用, 经过 3 周后发现效果明显, 山药萃取物补充剂可以缓解血清中脂质过氧化, 降低三酸甘油酯的含量, 增加高密度脂蛋白 (HDL) 的含量, 减少低密度脂蛋白 (LDL) 造成的氧化损伤。Hu 等以热水萃取、乙醇沉淀、Sephadex G-100 纯化所得的山药多糖 (相对分子质量 8.1×10^4), 能降低维生素 C-NADPH 及 Fe^{2+} -cysteine 诱发小鼠脑、肝脏和肾微粒体 (microsome) 脂质过氧化物的生成, 同时山药多糖对 hypoxanthine / xanthine oxidase 反应系统生成的超氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 及 Fenton 反应系统生成的氢氧自由基 ($\text{HO}^{\cdot}$) 也一样具有清除能力。现代许多疾病均与氧化压力有关, 如老化、癌症、骨质疏松以及发炎等^[7]。山药可以当做是一种天然的抗氧化剂, 并能抵抗环境中的化学物质所造成的氧化伤害与疾病。发炎反应容易引起免疫相关的细胞产生趋化作用, 进而造成活性氧 (ROS) 的产生。

目前对山药提取物的研究, 主要集中在山药多糖上, 认为多糖是其主要活性成分^[8-9], 而对山药提取物中酚类物质及其抗氧化性方面研究尚未见报道。作者采取不同干燥方法及萃取方式分别探讨了原生贡寮山药 (*Dioscorea alata*) 山药皮与山药肉的抗氧化性及抗氧化成分, 望进一步评估山药作为功能性产品的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

原生贡寮山药: 产自台湾省贡寮市山药园, 采后厚纸包装置于 4℃ 冰箱中; 磷酸氢二钠、六氰合铁酸钾、碳酸氢钠、没食子酸、磷酸二氢钾等: 均为分析纯试剂; 二苯代苦味酰基自由基 (DPPH $\cdot$)、福林酚试剂、绿原酸: 购自 Sigma 公司; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (low glucose) 培养

基, 胎牛血清 (FCS): 购自 Gibco 公司。

CR-21 型高速离心机: 日立建机株式会社产品; UV-160-A 型分光光度计: 日本岛津公司产品; Bichi RE111 型减压浓缩机: Model 107905, Boekel Scientific Inc 产品; FACScan 流式细胞仪: 美国碧迪医疗器械有限公司产品; 高效液相色谱仪: 日本岛津公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 山药粉末的制备 清洗干净, 表面晾干后的山药适量, 表面削皮得到厚度约为 0.2 cm 的山药皮以及去皮的山药 (后称山药肉, 切成 2 cm 左右厚的小块状), 分别浸入 90℃ 热水中 30 s 热烫处理。热烫后每个样品分成两份分别进行热风干燥以及冷冻干燥后破碎过 80 目筛网, 粉末于封口袋密封后备用。

1.2.2 萃取物的制备 将预先制得的山药皮、肉粉末分别用体积分数 50% 的乙醇, 25、100℃ 去离子水, 以 200 r/min 搅拌避光萃取 1 h, 减压浓缩后冷冻干燥。得到粉末密封后储存于 -20℃ 冰柜中备用。

1.2.3 体外抗氧化实验

1) 总多酚类化合物测试 参考 Sato 的方法^[10], 首先取 400 μL 不同浓度值萃取物及没食子酸 (3.125~100 $\mu\text{g/mL}$) 作为对照组, 加入 400 μL 福林酚试剂充分振荡后静置 3 min, 再加入 40 μL 质量分数 10% NaCO_3 溶液, 经充分振荡后静置于暗室 1 h 以分光光度计检测于 700 nm 的吸光值。以不同浓度的没食子酸替代样品进行反应, 制作标准回归曲线, 每毫升萃取液中等同于含有没食子酸的毫克数, 吸光值越高表示总酚类化合物越多。

2) DPPH 自由基清除能力 参考 Yamaguchi and others 的方法^[11], 取样品液 0.05 mL, 加入 0.5 mL 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液 (溶于体积分数 95% 的乙醇), 混匀后在室温下静置避光反应 40 min 后在 517 nm 处测吸光值 A_i , 未添加样品的控制组吸光值 A_0 , 维生素 C 为标准品。

清除率按下式计算:

$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = (1 - (\text{样品吸光值 } A_i) / (\text{未添加样品的控制组吸光值 } A_0)) \times 100$

3) 还原力测定 参考 Yen and chen 的方法^[12], 取 150 μL 不同质量浓度萃取物以及没食子酸 (0.001 95~0.062 5 mg/mL) 做对照组, 加入等体积的磷酸钠缓冲溶液以及 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 充分震荡后静

置14 min,在700 nm下检测吸光值,以不同质量浓度的没食子酸反应制定还原力标准曲线,还原力以相同吸光值的没食子酸浓度表示,吸光值越高待变萃取物的还原能力越强。

1.2.4 高效液相色谱分析多酚类物质 柱温 30 ℃,流量 1 mL/min,进样量为 20 μ L,检测波长是 280 nm,Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm,*D* 5 μ m),洗脱液 A:乙腈 B:体积分数 1% 乙酸,洗脱梯度:0~7 min *v*(A):*v*(B)=1:9,8~12 min *v*(A):*v*(B)=3:7,13~18 min *v*(A):*v*(B)=1:1,19~25 min *v*(A):*v*(B)=1:9,标准品绿原酸。

1.2.5 胞内活性氧分析 参考 Prabhu 等的方法^[13],取每毫升 1×10⁶ 个细胞 (含体积分数 10% FCS 的 DMEM) 以有或者无样品与最终质量浓度在 1 μ g/mL 的脂多糖(LPS)在 37 ℃(体积分数 5% CO₂)的恒温培养箱内共同培养 18 h 后,再加入荧光染料 DCFH-DA 于培养液(不含 serum)中,使最终浓度为 20 μ mol/L。非极性物质 DCFH-DA 渗入细胞内,经细胞内 cellular esterase 作用可成为非荧光极性物质 DCFH,待其进入细胞后遭到细胞内部 H₂O₂ 等氧化,使其成为荧光物质 DCF,间接可量化细胞内 ROS 生成量。细胞与 DCFH-DA 于 37 ℃反应 30 min 后,将细胞液吸到 15 mL 离心管中,以 400 *g* 离心 10 min,弃上清液,细胞用 PBS 清洗两次,加入 1 mL PBS 悬浮细胞,在流式细胞仪中进行分析。分析

时,读取被水解成 DCF 所激发的荧光,收取 10 000 个细胞作为检品。

1.3 统计分析

利用 Spss 软件进行统计分析,实验结果数据以(平均值±标准差)表示,利用单因子变异数分析法,当 *p*<0.05 表示有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 山药总多酚类化合物质量分数分析与体外试管抗氧化能力

表 1 为比较原生贡寮山药皮与山药肉的总多酚含量。可以发现,不同干燥方式、萃取方式山药皮萃取物的总多酚质量分数远高于山药肉质量分数,山药皮萃取物总多酚质量分数为山药肉总多酚质量分数的 3~20 倍。干燥方式以冷冻干燥更好地保留了山药中的多酚成分;萃取物以体积分数 50%乙醇萃取最优。

表 2、表 3 为比较原生贡寮山药皮与山药肉的抗氧化能力,可以发现无论哪一种萃取方式的山药皮萃取物的 DPPH 自由基清除能力、还原力均远远高于山药肉萃取物。干燥方式也均以冷冻干燥优于热风干燥;DPPH 自由基清除能力跟还原力测试以乙醇萃取优于常温水萃取和热水萃取;热水萃取物的抗氧化能力均低于其余萃取物的抗氧化能力。

表 1 原生贡寮山药的总多酚质量分数

Table 1 Total phenolic content of Dioscorea alata

mg(以 10 g 山药干燥粉末计)

萃取方式	冷冻干燥		热风干燥	
	山药皮	山药肉	山药皮	山药肉
体积分数 50%乙醇	42.96±0.75 ^a	12.84±0.00 ^a	29.57±0.20 ^a	9.60±0.00 ^a
25 ℃水	34.63±0.32 ^b	9.75±0.05 ^b	23.37±0.15 ^b	7.09±0.00 ^b
100 ℃热水	22.61±0.26 ^c	1.69±0.15 ^c	19.53±0.15 ^c	0.94±0.04 ^c

结果表示为标准值±方差值;*:同一栏中不同上标值代表具有显著性差异(*p*<0.05)。

表 2 原生贡寮山药的 DPPH 清除能力

Table 2 Reducing power of Dioscorea alata

%

萃取方式	冷冻干燥		热风干燥	
	山药皮	山药肉	山药皮	山药肉
体积分数 50%乙醇	45.87±0.43 ^a	6.10±0.65 ^b	31.22±0.26 ^a	1.76±0.07 ^a
25 ℃水	37.65±0.34 ^b	7.22±0.24 ^a	16.96±0.53 ^b	1.14±0.10 ^b
100 ℃热水	8.45±0.02 ^c	0.76±0.04 ^c	3.88±0.08 ^c	0.66±0.01 ^c

结果表示为标准值±方差值;*:同一栏中不同上标值代表具有显著性差(*p*<0.05)。

表 3 原生贡寮山药的还原力

Table 3 Reducing power of *Dioscorea alata*

mg(以 10 g 干燥山药粉末计)

萃取方式	冷冻干燥		热风干燥	
	山药皮	山药肉	山药皮	山药肉
体积分数 50%乙醇	2.75±0.01 ^a	0.63±0.01 ^a	1.19±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a
25 ℃水	1.90±0.01 ^b	0.61±0.01 ^b	0.97±0.02 ^b	0.33±0.02 ^b
100 ℃热水	1.11±0.01 ^c	0.19±0.00 ^c	1.04±0.00 ^c	0.19±0.01 ^c

结果表示为标准值±方差值;*:同一栏中不同上标值代表具有显著性差异($p<0.05$)。

实验结果显示,加热处理会显著降低山药的抗氧化能力,Hsu 等^[14]也指出冷冻干燥的山药粉末通常比热风干燥保留了更多的抗氧化活性。冷冻干燥的山药皮热水萃取物较温水萃取物抗氧化能力与总多酚质量分数显著降低:DPPH 降低了 78%,还原力降低了 45%,总多酚质量分数降低了 34%。热风干燥的山药皮较冷冻干燥山药皮的抗氧化能力与总多酚质量分数也显著降低,其中热风干燥的 DPPH 清除能力为冷冻干燥的 DPPH 自由基清除能力的 45%~68%。总多酚质量分数,热风干燥较冷冻干燥的山药皮温水萃取物降低 32%,热水萃取降低 15%,乙醇萃取降低 31%。

原生贡寮山药皮的抗氧化能力高于山药肉部分。萃取方式以体积分数 50%乙醇的萃取物的抗氧化能力最强,这与黄等人的研究结果相同^[15]。在 Hou 的研究报告中指出山药肉部分主要抗氧化能力的活性物质包括粘质、酚类化合物、储存蛋白^[16-17];但尚未有报道指出山药皮具有的抗氧化活性物质到底是什么。实验发现,山药皮比山药肉的总多酚质量分数高很多,因此推测山药皮具有较高的还原力以及 DPPH 自由基清除能力可能由于山药皮具有较高的总多酚质量分数,此推断有待于进一步论证。

2.2 HPLC 分析山药萃取物多酚物质

图 1 为 12 种样品(不同山药部位,不同干燥方式,萃取方式处理后共 12 个样品中具有代表性的 4 个图谱,经全波长扫描后确定检测波长为 280 nm。结果显示在绿原酸为主要检出酚酸(比对绿原酸标准品),保留时间为 11.64~11.67 min,标准品绿原酸保留时间为 11.66 min,其余多酚类集中在 5 min 以内,极性极强,萃取物中绿原酸质量分数为 0.85~11.91 mg/g。图 1 可见,经冷冻干燥处理后的山药皮乙醇萃取物高于热风干燥处理的山药皮乙醇萃取物,萃取方式以乙醇萃取优于热水萃取,干燥方式

以冷冻干燥优于热风干燥。且绿原酸为山药肉中主要多酚类物质,绿原酸质量分数占总多酚质量分数的 44%~87%。山药皮中,绿原酸占总多酚类物质的 34%~59%。HPLC 分析绿原酸质量分数以及细胞 ROS 实验分析结论与体外试管抗氧活能力以及总多酚质量分数一致,初步证明山药中粗提取物中主要的抗氧化成分为多酚类物质——绿原酸,但是绿原酸的抗氧化性质待进一步论证。

2.3 山药乙醇萃取物对 RAW264.7 细胞产生胞内活性氧分析(ROS)的影响

图 2 为原生贡寮山药乙醇萃取物抑制由 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 ROS 的影响,结果显示较 LPS 诱导组相比,添加原生贡寮山药乙醇萃取的样品低浓度下即可显著降低细胞产生 ROS 的活性。即原生贡寮山药乙醇萃取物对于在 LPS 刺激下 RAW264.7 细胞所产生的 ROS 具有良好的清除结果,所以认定此萃取物良好的抗氧化能力可能与其具有 ROS 清除能力有很大关系。RAW264.7 细胞在山药皮的抑制能力优于山药肉,干燥方式以冷冻干燥的萃取物抑制能力优于热风干燥,此结果与体外试管结论一致。

3 结 语

山药皮较山药肉具有较少的蛋白质跟较多的总多酚质量分数,所以山药皮具有较高的还原力与 DPPH 自由基清除能力可能与山药皮具有较高的总多酚质量分数有关。冷冻干燥比热风干燥保留了较高的山药抗氧化能力以及总多酚质量分数是由于热处理影响了酚类物质的稳定性与抗氧化能力。山药皮的体积分数 50%乙醇,热水和水萃取液的总多酚质量分数、还原力及 DPPH 自由基清除能力皆远高于山药肉的萃取液。在 3 种萃取方式的山药萃取

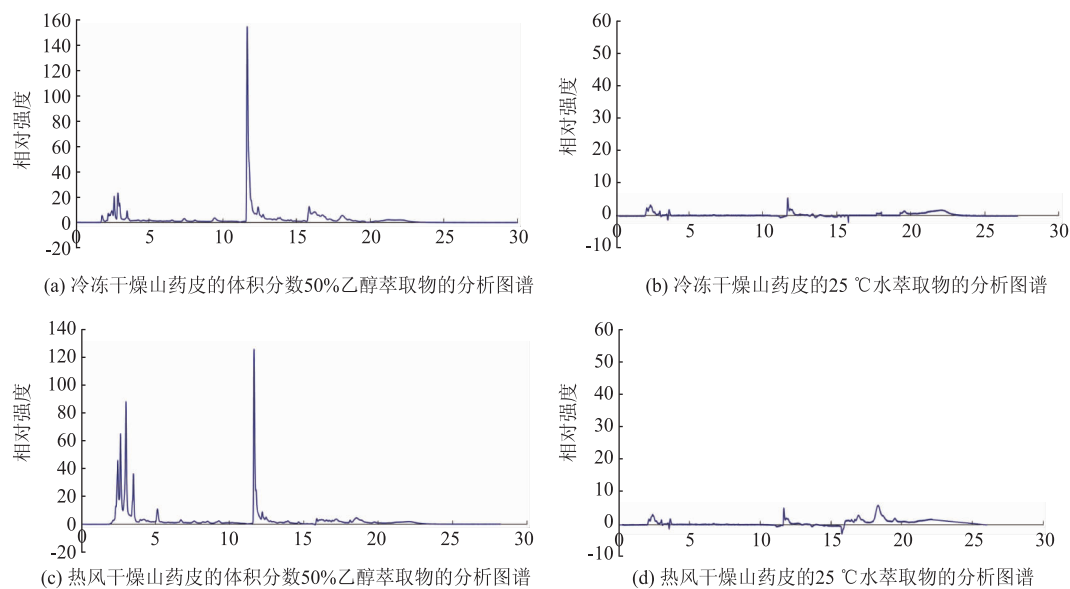


图1 部分原生贡寮山药的萃取物的HPLC分析图谱

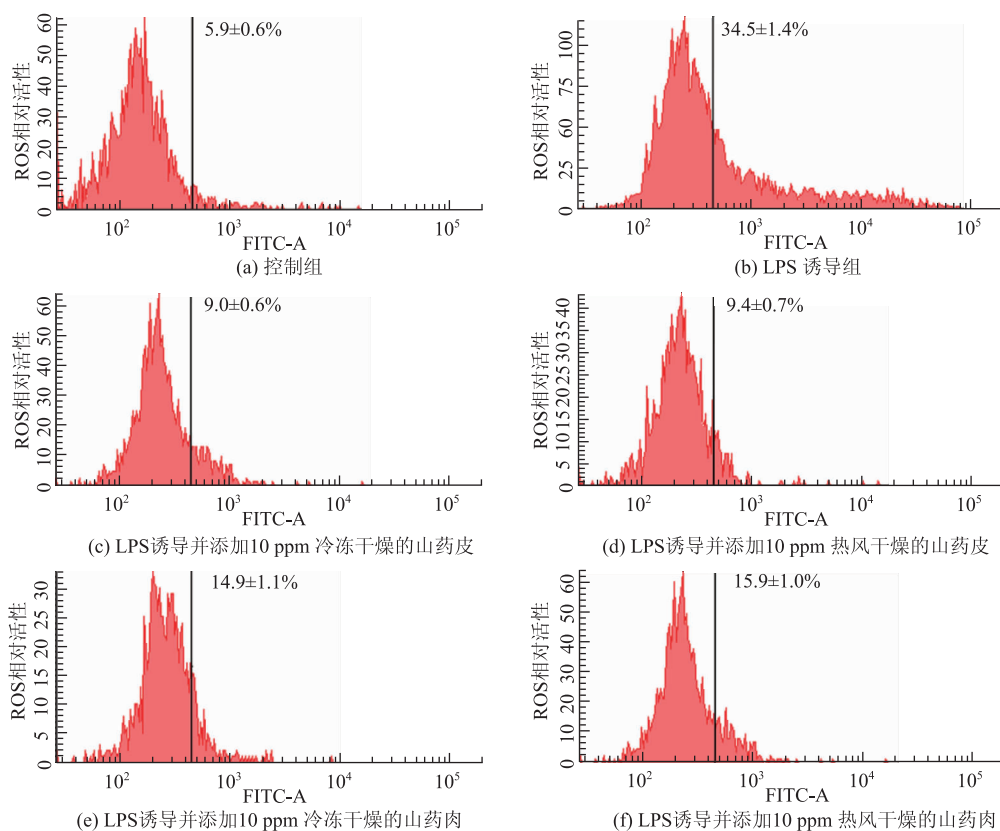
Fig. 1 Part of HPLC chromatogram of extraction from *Dioscorea alata*

图2 原生贡寮山药的乙醇萃取物对抑制小鼠RAW264.7细胞产生ROS能力的影响

Fig. 2 Effect of 50% ethanolic extraction from *Dioscorea alata* on the ROS scavenging in murine RAW 264.7 macrophage

液的抗氧化能力体积分数50%乙醇的萃取方式最优。体外抗氧化分析,HPLC分析绿原酸实验以及萃

取物降低由LPS所诱发RAW 264.7细胞产生ROS的活性实验结论一致。

参考文献:

- [1] 王洪新,王远辉. 山药多糖研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(3):321-327.
WANG Hongxin,WANG Yuanhui. Investigative progress of Chinese yam (*Rhizoma dioscorea*) polysaccharide [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(3):321-327.(in Chinese)
- [2] 孙宇婧,韩涛,李丽萍,等. 山药糖蛋白体外抗氧化活性研究[J]. 园艺学报,2010,37(6):1009-1014.
SUN Yujing,HAN Tao,LI Liping,et al. Antioxidant activity in vitro of glycoprotein from Chinese yam [J]. **Acta Horticulturae Sinica**,2010,37(6):1009-1014.(in Chinese)
- [3] 赵国华,李志孝,陈宗道. 山药多糖 RDPS-I 的结构分析及抗肿瘤活性[J]. 药学报,2003,38(1):37-41.
ZHAO Guohua,LI Zhixiao,CHEN Zongdao. Structural analysis and antitumor activity of RDPS-I polysaccharide from Chinese yam[J]. **Acta Pharmaceutical Sinica**,2003,38(1):37-41.(in Chinese)
- [4] Rosser A. The day of the yam[J]. **Nursing Times**,1985,81(18):47.
- [5] Farombi E O,Britton G,Emerole G O. Evaluation of the antioxidant activity and partial characterisation of extracts from browned yam flour diet[J]. **Food Research International**,2000,33(6):493-499.
- [6] Araghiniknam M,Chung S,Nelson-White T,et al. Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone(DHEA) in older humans[J]. **Life Sciences**,1996,59(11):147-157.
- [7] Epstein F H,Diaz M N,Frei B,Vita J A,et al. Antioxidants and atherosclerotic heart disease [J]. **New England Journal of Medicine**,1997,337(6):408-416.
- [8] 张忠泉,陈百泉,许启泰. 山药多糖对大鼠血糖及胰岛释放影响的研究[J]. 上海中医药杂志,2003,37(10):52-53.
ZHANG Zhongquan,CHEN Baiquan,XU Qitai. Effect of polysaccharides of rhizoma dioscoreae oppositae on blood glucose and insular function in diabetic rats[J]. **Shang Hai Journal Of Traditional Chinese Medicine**,2003,37(10):52-53.(in Chinese)
- [9] 徐小伟,李振宇,苗敬芝. 超声结合酶法提取山药多糖及抗氧化活性研究[J]. 农业机械,2013,6:79-81.
XU Xiaowei,LI Zhenyu,MIAO Jingzhi. Ultrasound combined with enzymatic extraction of yam polysaccharide and the study of antioxidant activity[J]. **Farm Machinery**,2013,6:79-81.(in Chinese)
- [10] Sato M,Ramarathnam N,Suzuki Y,et al. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1996,44(1):37-41.
- [11] Yamaguchi T,Takamura H,Matoba T,et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. **Bioscience,Biotechnology, and Biochemistry**,1998,62(6):1201-1204.
- [12] YEN G C,CHEN H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,1995,43(1):27-32.
- [13] Prabhu K,Zamamiri-Davis F,Stewart J,et al. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages;role of nuclear factor- κ B in up-regulation[J]. **Biochem J**,2002,366:203-209.
- [14] Hsu C L,Chen W,Weng Y M,et al. Chemical composition,physical properties,and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods[J]. **Food Chemistry**,2003,83(1):85-92.
- [15] 马婷婷,田呈瑞,李龙柱,等. 响应曲面法优化黄参茎叶多酚的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(11):1218-1226.
MA Tingting,TIAN Chengrui,LI Longzhu,et al. Response surface methodology for optimization extraction process of sphallerocarpus gracilis stem leaves polyphenol and determination of antioxidant activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(11):1218-1226.(in Chinese)
- [16] HOU W C,LEE M H,CHEN H J,et al. Antioxidant activities of dioscorin,the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2001,49(10):4956-4960.
- [17] HOU W C,Hsu F L,LEE M H. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro [J]. **Planta Medica**,2002,68(12):1072-1076.