

不同采摘期对莼菜多酚含量及抗氧化活性的影响

田婧², 朱子冬², 李欣², 蒋圆婷², 邹月¹, 梁寒峭^{2*}, 周万海^{1*}¹宜宾学院生命科学与食品工程学院 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000;²北京城市学院生物医药学部, 北京 100083

摘要:通过研究不同采摘时期莼菜多酚的含量及其抗氧化能力, 确定采摘莼菜的最佳季节。采用紫外分光光度法测定莼菜多酚含量, 选用 DPPH 法、ABTS 法、FRAP 法对提取物进行体外抗氧化活性研究。结果表明: 6 月份采摘期多酚含量最高为 28.045 ± 1.654 mg/g, 10 月份次之为 12.796 ± 2.492 mg/g, 8 月份多酚含量最低为 16.342 ± 1.198 mg/g, 不同采摘时期的莼菜提取物均具有抗氧化活性。本研究可为莼菜不同采摘期的工艺优化和产品质量监督提供必要的数据库和行业指导。

关键词:莼菜; 采摘期; 多酚含量; 抗氧化

中图分类号: S32

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0092-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.013

Study on the content determination of polyphenols and antioxidant activity of *Brasenia schreberi* in different picking period

TIAN Jing², ZHU Zi-dong², LI Xin², JIANG Yuan-ting², ZOU Yue¹, LIANG Han-qiao^{2*}, ZHOU Wan-hai^{1*}¹College of Life Sciences & Food Engineering, Key Lab of Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, Yibin University, Yibin 644000, China;²Dean of Biomedical School, Beijing City University, Beijing 100094, China

Abstract: The best season for picking *Brasenia schreberi* was determined by studying the content of polyphenols and antioxidant capacity of *B. schreberi* at different picking periods. Ultraviolet spectrophotometry was used to determine the content of polyphenols in *B. schreberi*. DPPH, ABTS and FRAP methods were used to study the *in vitro* antioxidant activity of the extracts. The results showed that the highest polyphenol content in June was 28.045 ± 1.654 mg/g, followed by 12.796 ± 2.492 mg/g in October, and the lowest was 16.342 ± 1.198 mg/g in August. *B. schreberi* in different picking periods The extracts all have antioxidant activity. This research can provide necessary data foundation and industry guidance for the process optimization and product quality supervision of *B. schreberi* in different picking periods.

Key words: *Brasenia schreberi*; picking periods; content of polyphenols; antioxidant activity

莼菜 (*Brasenia schreberi*), 属睡莲科莼属的多年水生草本植物, 列入中国国家 I 级重点保护野生植物 (国务院 1999 年 8 月 4 日批准)^[1]。多酚是分子中具有多个羟基酚类植物成分的总称, 许多实验研究资料均显示, 植物多酚具有较强的抗氧化作用, 以及明显的抑菌、抗癌、抗老化和抑制胆固醇上升等功效, 摄取一定量的植物多酚能够有效地预防和抑制

疾病的发生, 被称为“第七类营养素”^[2,3]。在中国莼菜的应用价值主要集中在医用和食用价值。在医用价值方面, 莼菜具有清热、利水、消肿、解毒的功效^[4]。在食用价值方面, 其含有碳水化合物、蛋白质, 多种维生素、氨基酸和矿物质^[5,6]。

在我国, 对于莼菜不同采摘时期的多酚含量和抗氧化活性是有所不同的, 本项目将以莼菜主产区四川省样品为研究对象, 对其三个不同生育期随机取样, 再通过分光光度计测定不同时期莼菜乙醇提取部位的总多酚含量和抗氧化活性, 研究其总多酚含量与抗氧化活性在不同时期的变化过程, 为相关企业的科学采摘、加工工艺控制和健康食品开发提

收稿日期: 2021-03-22 接受日期: 2021-04-08

基金项目: 国家自然科学基金 (21808004); 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室 2018 年度开放基金 (2018XLZ010)

* 通信作者 Tel: 86-10-82470945; E-mail: lhqbesw@126.com, wan-haizhou@126.com

供基础的技术支持,并可以对本行业的工艺优化和产品质量监督提供必要的数据库和行业指导。

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

莼菜又名蓴菜、马蹄菜、湖菜等,属睡莲科蓴属的多年水生草本植物。本项目主要采用四川凉山产的雷波马湖莼菜。

没食子酸标准品(百灵威科技有限公司,210917);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、三吡啶三吡嗪(TPTZ)和Folin-Ciocalteu试剂:美国Sigma;总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(ABTS法和FRAP法:南京建成科技有限公司);维生素C、乙醇等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

电热鼓风干燥箱(CS101-3E,北京中兴伟业仪器有限公司);数控超声波清洗器(KQ5200DB,昆山市超声仪器有限公司);低速离心机(DM0412,美国赛洛捷克公司);旋转蒸发器(N-1100,上海创萌生物科技有限公司);循环水式多用真空泵(SHB-III,上海沪析实业有限公司);紫外可见分光光度计(TU-1800,普析通用)。

2 实验方法

2.1 莼菜原料的处理

莼菜茎、叶分离。将莼菜叶放入烘箱中,在85℃温度下烘烤10 min,再在40℃温度下烘烤24~48 h,进行杀青处理。用研钵将杀青后的莼菜叶研磨至粉末状,放入自封袋内保存。

2.2 样品的制备

称取2.00 g莼菜样品于50 mL离心管中,用乙醇溶剂浸泡。用超声波清洗器在60℃的条件下超声60 min,用离心机分两次在5 000 rpm的条件下离心10 min,将上清液转移至棕色样品瓶内。将棕色样品瓶内的上清液倒入至鸡心瓶中,在40~60℃的条件下,利用旋转蒸发器除去相应溶剂,以无水乙醇作为新的溶剂复溶。将复溶后的样品溶液定容至50 mL,并转移至棕色样品瓶内保存。

2.3 多酚含量测定的标准曲线

采用Folin-Ciocalteu(FC)比色法^[7]:精确吸取标准溶液0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60和0.70 mL于平底比色管中,加入5 mL 10% Folin-Ciocalteu试剂,摇匀,反应3~8 min内,加入4 mL 7.5% Na₂CO₃溶液,用去离子水定容至10 mL,充分摇匀后,室温下放置60 min。在740 nm波长条件下用分

光光度计测定吸光度。以吸光度作纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 7.8149x + 0.036$ ($R^2 = 0.9993$),式中 y 表示波长740 nm处的吸光度; x 表示没食子酸的质量浓度。

2.4 样品中多酚含量的测定

分别吸取莼菜乙醇和组分样品0.2 mL和0.04 mL于10 mL比色管中,按“2.3”标准曲线制备项下操作,测定其吸光度。按以下公式计算莼菜中多酚相当于没食子酸的含量。

$$\text{总酚含量(mg/g)} = \frac{C_1}{k \times C_2}$$

式中 C_1 为依据标准曲线计算出待测液中多酚的含量(mg/mL); k 为组分实验测定用体积与母液体积的比值; C_2 为莼菜样品母液浓度(即为0.04 g/mL)。

2.5 抗氧化活性

参考Liang等^[8]、Chen等^[9]的方法,建立阳性对照药物的标准曲线,样品的抗氧化结果分别以阳性药物等量抗氧化能力和EC₅₀(半数有效浓度)值表示。Vc标准溶液的DPPH标准曲线: $y = 2563.9x - 1.1782$, $R^2 = 0.9984$; Trolox标准溶液的ABTS自由基标准曲线: $y = 107.5x + 1.8618$, $R^2 = 0.9962$; FeSO₄标准溶液的FRAP标准曲线: $y = 0.1342x - 0.0159$, $R^2 = 0.9954$ 。

2.5.1 清除DPPH自由基活性的测定

用无水乙醇配制浓度分别为0.005、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2 mg/g的莼菜提取物溶液,配制同样质量浓度的Vc对照样品溶液。取2 mL系列浓度的莼菜提取溶液,加入2 mL浓度为3.94 mg/L DPPH乙醇溶液(现配现用),避光反应30 min,在波长517 nm处测定吸光度As,以相同体积的水代替样品为空白对照A₀,相同体积的水代替DPPH乙醇溶液反应作为样品对照Ac,计算样品DPPH自由基清除率,DPPH自由基清除率 = $[1 - (A_s - A_c) / A_0] \times 100\%$ 。最终以V_c(mM)等量抗氧化能力VCEAC表示。

2.5.2 清除ABTS自由基能力的测定

ABTS自由基清除实验参考文献方法,略有改动^[10]。将莼菜提取物稀释为0.078125、0.15625、0.3125、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/g,配制同样质量浓度的V_c作为对照样品溶液。将5 mL的7 mmol/L ABTS溶液和88 μL的140 mmol/L K₂S₂O₈混合。在室温避光条件下反应16 h后即

可得到 ABTS 自由基储备液,当天使用。以无水乙醇为对照测定吸光度 A_0 ,空白以相同体积水代替样品反应,计算不同浓度标准溶液 ABTS 自由基清除率。取 0.3 mL 样品溶液,加入 2.7 mL ABTS 溶液,充分振摇后,在室温下避光反应 30 min,在 734 nm 波长下测其吸光度 A_1 ,ABST 自由基清除率 = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$ 。最终以 V_c (mg / 100 mL) 等量抗氧化能力 VCEAC 表示。

2.5.3 总抗氧化能力的测定

参考文献^[11],将莼菜提取物配制为 0.156 25、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/g 待测液。取 2.5 mL 10 mmol/L 的 TPTZ 工作液(用 40 mmol/L HCl 溶解),2.5 mL 20 mmol/L 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 25 mL 0.3 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 3.6)配制为 FRAP 溶液。取 1 mL $FeSO_4$ 标准液,加

入 FRAP 工作液 3 mL,混匀,37 °C 水浴反应 30 min,于 593 nm 处读取吸光度,计算不同浓度标准溶液总抗氧化能力,最终结果以 $FeSO_4$ 当量浓度(mM)表示。

2.6 统计学相关分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据结果以“平均值 ± 标准差”(n = 3)表示。

3 结果与分析

3.1 不同采摘时期莼菜中的总酚含量

由表 1 和图 1 可见,莼菜中总酚含量呈现骤然下降又上升的趋势,其中 6 月份总酚酸含量最高,达到 28.045 ± 1.654 mg/g,10 月份次之,为 16.342 ± 1.198 mg/g。8 月份总多酚含量最低,为 12.796 ± 2.492 mg/g。

表 1 不同采摘时期莼菜总多酚含量的变化

Table 1 Changes of total polyphenols content of *B. schreberi* in different picking period

指标 Index	采摘时期 Picking period		
	2019. 6. 10	2019. 8. 10	2019. 10. 10
总酚含量 Total polyphenols(mg/g)	28.045 ± 1.654	12.796 ± 2.492	16.342 ± 1.198

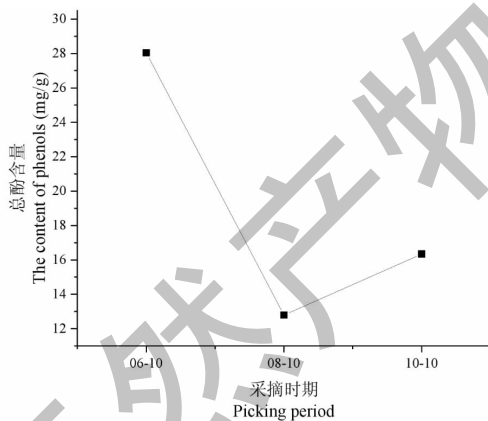


图 1 不同采摘时期莼菜总多酚含量的变化

Fig. 1 Changes of total polyphenols content of *B. schreberi* in different picking period

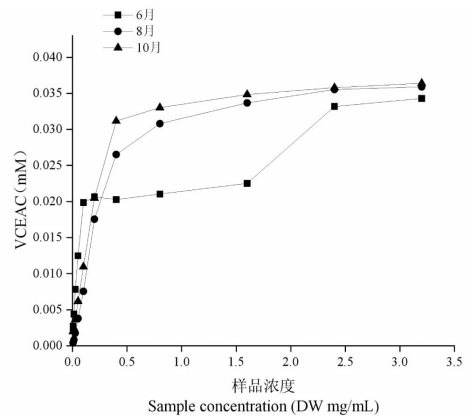


图 2 莼菜不同采摘期 DPPH 自由基清除能力

Fig. 2 DPPH free radical scavenging ability of extract from different picking period of *B. schreberi*

3.2 抗氧化活性实验结果

3.2.1 DPPH 自由基清除能力

不同采摘时期的莼菜提取物清除 DPPH 自由基的能力见图 2。清除 DPPH 自由基能力比较,在样品浓度大于 0.2 mg/mL 时,10 月采摘的莼菜其 DPPH 自由基清除能力最强。当样品浓度为 0.8 mg/mL 时,6 月抗氧化能力最高,8 月抗氧化能力最弱。

3.2.2 ABTS 自由基清除能力

将 Vc 作为标准物质,每 100 mL 莼菜提取物清除 ABTS 自由基的能力用 Vc 当量浓度来表示。由图 3 可知低浓度时三个采摘时间的莼菜 ABTS 自由基清除能力差别不大,但随样品浓度的增加 10 月采摘的莼菜 ABTS 自由基清除能力高于 6 月和 8 月。

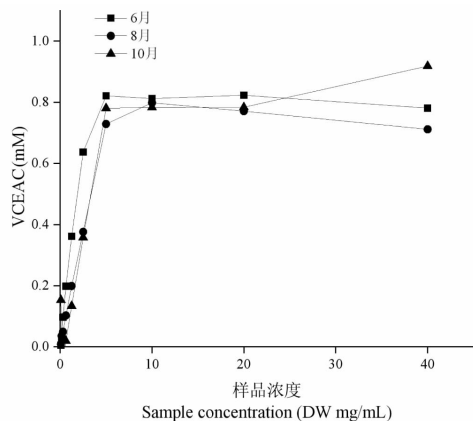


图3 莼菜不同采摘期 ABTS 自由基清除能力

Fig. 3 ABTS radical scavenging activity of extract from different picking period of *B. schreberi*

3.2.3 总抗氧化能力

不同采摘时期的莼菜提取物,总抗氧化能力随着样品浓度的增加而不断升高。由图4可以看出,在所有浓度下,6月采摘莼菜的总抗氧化能力始终明显高于8月和10月采摘的莼菜。

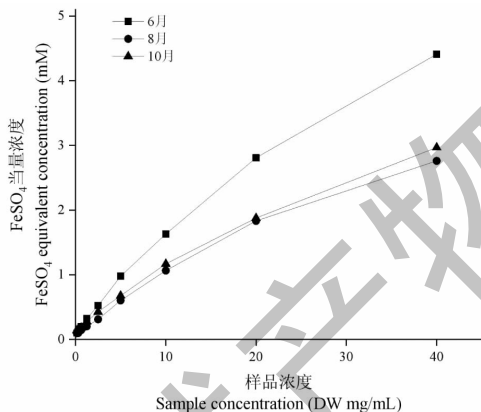


图4 莼菜不同采摘期总抗氧化能力

Fig. 4 FRAP value of extract from different picking period of *B. schreberi*

4 讨论与结论

植物多酚(polyphenols)是一类广泛存在于植物体内的具有多个酚羟基化合物的次生代谢产物,主要分布于植物的根、皮、叶中^[12]。莼菜所含有的营养物质多酚,富含于莼菜的外部胶质中^[13]。本实验对莼菜中的多酚物质采用的提取方法是溶剂萃取法,相比较于热回流提取、微波辅助提取等方法,最适用于多酚类的提取方法仍是溶剂萃取法^[14-16]。本实验结果表明,莼菜总多酚含量在6月份的采摘批次中最高。

莼菜作为国家公布的首批药食同源食物,含有丰富的营养,具有较强的抗氧化能力,本文采用DP-PH 自由基法、ABTS 自由基法、FRAP 法可以确定抗氧化能力^[17,18]。本研究可为行业的工艺优化和产品质量监督提供必要的数据库和行业指导。

参考文献

- Li Y, Ke HJ, Jiao DC, et al. Nutritional value of *Brasenia schreberi* and its application research progress [J]. J Changjiang Veg(长江蔬菜), 2018, 46(18): 36-39.
- Zheng XN, Li J, Mu JL, et al. Advances on the improvement of gastrointestinal function by plant polyphenols [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2020, 46(23): 309-315.
- Yu M, Wang CY, Wang X. Application of metabolomics in detection and analysis of plant polyphenols [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2020, 46(13): 280-285.
- Wang RB, Zhou SB, Qin YD, et al. Herbal Textual Research of *Brasenia schreberi* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40: 488-491.
- Wu HM, Lu ZF, Zhang Z, et al. Study on the determination and comparison of commodity components and mass fraction in four major regions of *Brasenia schreberi* [J]. J Southwest Univ: Nat Sci(西南大学学报: 自科版), 2017, 39(5): 76-82.
- Yu ZP, Xie L, Long Q, et al. Research progress on comprehensive application value of water shield [J]. Guizhou Agr Mech(贵州农机化), 2019, 327(3): 6-9.
- Chen JG, Li X, Li JX, et al. Determination of total polyphenol content in Xisha Noni juice [J]. J Anhui Agr Sci(安徽农业科学), 2014, 42: 10127-10128.
- Liang HQ, Cheng C, Zhang L, et al. Screening of antioxidant components in Noni fermented Juice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1479-1483.
- Chen JG, Liang HQ, Li X, et al. Analysis of different polar polyphenols and antioxidant activity of Xisha Noni Juice [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2015, 41(2): 163-166.
- Han C, Su LJ, Liu X, et al. Antibacterial and antioxidant effects of different polar solvent extracts from *Cichorium intybus* L. [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2019, 30: 1825-1828.
- Mohan A, Nickerson MT, Ghosh S. Oxidative stability of flaxseed oil: effect of hydrophilic, hydrophobic and intermediate polarity antioxidants [J]. Food Chem, 2018, 266: 524-533.
- Dong K, Leng Y, He FT, et al. Research progress of polyphenols

- nol and extraction methods in plant [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2019,40:326-330.
- 13 Sun YX, Mao SF, Chen YN, et al. Effect of ultrasonic treatment on the separation, physical properties of mucilage from *Brasenia schreberi* [J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业),2020,46(2):55-60.
- 14 Chen L, Li YM, Chen KX, et al. Research progress in extraction and isolation of plant polyphenols [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2013,44:1501-1507.
- 15 Chen JY, Zeng J, Li CM. Separation and purification of phenols from Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seeds and their structural analysis [J]. *Food Sci*(食品科学),2015,36(16):31-37.
- 16 Kuang H, Chi C, Lu CS, et al. Optimization of ethanol extraction process for polyphenols from red raspberry [J]. *Food Sci*(食品科学),2016,37(10):88-93.
- 17 Wang XY, Du GR, Li H. Progress of analytical methods for antioxidant capacity in vitro [J]. *J Food Sci Biotechnol*(食品与生物技术学报),2012,31(3):247-252.
- 18 Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*,2015,16:9236-9282.
-
- (上接第 91 页)
- 23 Chen KK, Qiang Y. Optimization of ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Polygonatum sibiricum* Red. using reponse surface methodology and its antibacterial activity [J]. *J Shaanxi Norm Univ; Nat Sci*(陕西师范大学学报:自然科学版),2018,46(1):91-96.
- 24 Huang M, Yu FL, Tan XJ, et al. Optimized extraction of functional ingredients from *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. by Box-Behnken design [J]. *Fujian J Agr Sci*(福建农业学报),2018,33:1119-1124.
- 25 Chen HQ, Yang AP, Ren JJ, et al. Study on antioxidant activities of total phenolic acid in *Sedum aizoon* L [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*(中医药导报),2013,19(11):78-79.
- 26 Lithgow GJ, Walker GA. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan [J]. *Mech Ageing Dev*,2002,123:765-771.
- 27 Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Aging Cell*,2006,5(1):59-68.
- 28 Kim YS, Seo HW, Lee MH, et al. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Arch Pharm Res*,2014,37:245-252.