

杜娟,罗秋水,杜华英,等. 香水百合中总黄酮提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):320-322.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.099

香水百合中总黄酮提取及抗氧化性

杜娟,罗秋水,杜华英,熊建华,王文君,吴国强

(江西农业大学食品科学与工程学院/南昌市农产品加工及质量控制重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:通过正交试验法对香水百合中总黄酮的提取工艺进行优化,利用分光光度法测定其提取率。以维生素 C 为阳性对照,分别测定其抗氧化能力、对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基的清除能力及还原力。结果表明,香水百合的最佳提取工艺为提取温度 60 ℃、提取时间 1.5 h、料液比 1 g : 30 mL、乙醇浓度 70%,在最佳提取条件下,香水百合中总黄酮的提取率可达 11.23%。香水百合总黄酮具有一定的抗氧化性,其 FRAP 值为 261.01 g/mL;在一定质量浓度范围内对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除率有良好线性关系,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 29.54、17.32 g/mL。在一定浓度范围内,香水百合的还原力呈线性增加趋势。由结果可知,香水百合具有一定的抗氧化性,但其抗氧化能力弱于维生素 C。

关键词:香水百合;总黄酮;抗氧化性;清除活性
中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0320-03

香水百合(*Lilium casa blanca*)是多年生鳞茎类球根草本植物,主要用于观赏^[1]。目前,对于香水百合的研究多集中于其挥发性成分^[2]。黄酮类化合物广泛存在于植物体内,目前已知的黄酮类化合物单体有 8 000 多种。该类化合物具有较强的抗氧化性,能清除机体代谢过程产生的多种自由基,且具有抗癌杀菌等功效,是一类极具开发前景的化合物^[3]。目前,尚未有香水百合中总黄酮抗氧化性的研究报道。本研究利用 70% 甲醇溶液提取香水百合中的总黄酮,对其提取工艺进行优化,并测定其抗氧化性,以期对香水百合的进一步研究与开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜香水百合(市售)。芸香苷标准品(西陇化工股份有限公司);2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、甲醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等,以上试剂均为国产分析纯;试验用水为二次蒸馏水。

XY-200 型粉碎机(永康市松青五金工具厂);723 型可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(宁波新芝生物科技股份有限公司);水浴锅、干燥箱、电子天平等。

1.2 试验方法

1.2.1 香水百合总黄酮含量的测定 采用硝酸铝显色法对

香水百合中总黄酮的含量进行测定^[4],准确称取 205 mg 干燥至恒质量的芸香苷粉末,用 70% 甲醇溶解得芸香苷储备液,使用时用 70% 甲醇稀释至 0.205 mg/mL。准确移取芸香苷稀释液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL,分别放置于 50 mL 容量瓶中,加入 70% 甲醇溶液至总体积 6.00 mL,再分别加入 5% 亚硝酸钠 2.00 mL,振荡均匀,放置 6 min,然后加入 10% 氯化铝 1.00 mL 振荡均匀,放置 6 min,最后加 4% 氢氧化钠 20.00 mL,摇匀,用水定容,放置 15 min,在 510 nm 处测定吸光度。以吸光度对芸香苷对照品含量绘制标准曲线,回归方程: $y = 0.010 3x + 0.068$,线性范围为 0~24.6 g/mL,相关系数 0.995。

1.2.2 香水百合总黄酮提取工艺的确定 取约 0.5 g 干燥至恒质量后打碎的香水百合粉末,置于烧瓶中,根据试验设计分别在提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度的 4 个因素下,每个因素设立 3 个水平试验,设计 L₉(3⁴)表进行正交试验,优化香水百合中总黄酮提取工艺,因素水平设计见表 1。每 1 处理平行 2 次。

表 1 香水百合总黄酮提取正交试验因素水平设计

| 水平 | 因素 | | | |
|----|---------------|---------------|-------------------|---------------|
| | A:提取温度 (℃) | B:提取时间 (h) | C:料液比 (g : mL) | D:乙醇浓度 (%) |
| 1 | 40 | 1.5 | 1 : 30 | 60 |
| 2 | 50 | 2.0 | 1 : 40 | 70 |
| 3 | 60 | 2.5 | 1 : 50 | 80 |

1.2.3 香水百合总黄酮抗氧化能力的测定

1.2.3.1 总抗氧化能力的测定 采用血浆铁离子还原能力(FRAP)法测定香水百合总黄酮提取物的铁离子还原能力^[5]。在试管中加入 3.0 mL 新鲜配制的 FRAP 试剂,随后加入 0.1 mL 不同浓度的提取液,混匀,在 37 ℃ 下保持 40 min,冷却,在波长 593 nm 处测定紫外吸光度。采用维生素 C 作标准对照,样品的铁离子还原能力以达到 1 mmol/L 硫酸亚铁溶液同样的吸光度时所需样品浓度表示,即为其 FRAP 值。

收稿日期:2015-11-04
基金项目:江西省教育厅科技计划(编号:GJJ13281)。
作者简介:杜娟(1986—),女,江西南昌人,博士,讲师,主要从事食品安全检测研究。Tel:(0791)83813420;E-mail:dujuanjulia@163.com。
通信作者:吴国强,博士,讲师,主要从事天然产物分离与检测研究。Tel:(0791)83813420;E-mail:wgoing-651@163.com。

1.2.3.2 清除 DPPH 自由基能力的测定 参考文献[6]的方法测定香水百合总黄酮提取物清除 DPPH 自由基能力。将浓度为 2.0×10^{-4} mol/L DPPH 乙醇溶液 2 mL 和提取液 2 mL 在试管中混匀,避光于 25 ℃ 下保持 30 min,于 517 nm 处测定吸光度 $D_{517\text{ nm}}$ 。用乙醇作为空白对照。同时采用维生素 C 作标准对照,DPPH 自由基清除率由下式计算:

$$S_a = [1 - (D_i - D_j) / D_0] \times 100\%。$$
 (1)

式中: S_a 表示 DPPH 自由基清除率(%); D_i 表示 2 mL DDPH 溶液和 2 mL 样品溶液混合后的吸光度; D_j 表示 2 mL 样品溶液和 2 mL 乙醇溶剂混合液的吸光度; D_0 表示 2 mL DDPH 溶液和 2 mL 乙醇溶剂混合液的吸光度。

1.2.3.3 清除 ABTS 自由基能力的测定^[7] 将 2 mL 不同浓度提取液加入 2 mL 一定浓度 ABTS 溶液中,反应 15 min 后,于 734 nm 处测定其吸光度,同时采用维生素 C 作标准对照,以 2 mL ABTS 溶液加入 2 mL 蒸馏水作为空白对照,ABTS 自由基清除率 K 由式(2)计算:

$$K = (D_0 - D) / D_0 \times 100\%。$$
 (2)

式中: K 表示 ABTS 自由基清除率(%); D_0 表示 2 mL ABTS 溶液和 2 mL 蒸馏水混合后的吸光度; D 表示 2 mL ABTS 溶液和 2 mL 样品溶液混合后的吸光度。

1.2.3.4 还原力的测定 参照普鲁士兰法测定香水百合总黄酮提取物的还原力^[8]。在 10.0 mL 试管中分别加入不同浓度的提取液 1.0 mL,磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH 值为 6.6) 0.5 mL、0.3% 铁氰化钾溶液 1.5 mL,在 50 ℃ 水浴 20 min 后快速冷却,再加入 1.0 mL 10% 三氯乙酸溶液(TCA),混匀后以 3 000 r/min 离心 10 min,取 2.0 mL 上清液,加入 0.5 mL 0.3% 三氯化铁溶液,充分混匀,静置 10 min 后,定容至 100 mL,于 700 nm 下测定吸光度,以蒸馏水作参比溶液。

2 结果与分析

2.1 香水百合总黄酮提取工艺的测定

由表 2、表 3 可见,影响提取率因素的主次顺序为料液比 > 提取时间 > 提取温度 > 乙醇浓度,提取温度、提取时间、料液比和乙醇浓度 4 个因素对得率的影响均是明显的。由表 4 可知,A、B、C、D 因素各水平之间差异极显著($P < 0.01$),同时 A、B、C、D 4 个因素中, A_3 、 B_1 、 C_1 、 D_2 水平得率最高,因此以得率为指标,提取的最佳水平组合是 $A_3B_1C_1D_2$,即提取温度 60 ℃,提取时间 1.5 h,料液比 1 g : 30 mL,乙醇浓度 70%。在最优条件下平行提取 2 次进行验证试验,得出平均提取率为 11.23%,优于正交试验中任何 1 组。

2.2 香水百合总黄酮抗氧化活性的测定

2.2.1 总抗氧化能力测定结果 抗氧化剂具有还原性,酸性条件下可将铁离子还原成亚铁离子,与 TPTZ 结合后表现出明显的蓝色,并在 593 nm 处有最大吸光度,随抗氧化剂的浓度不同,溶液表现出不同的吸光度,可作为样品中总抗氧化能力的测定指标^[9]。一般以 FRAP 值表示样品的总抗氧化性,即样品的吸光度达到 1 mmol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 同样吸光度时的浓度。FRAP 值越小,则样品的抗氧化性越强。分别测定不同浓度硫酸亚铁溶液的吸光度,得到线性方程为 $y = 0.7375x + 0.0083$,相关系数为 0.9997;分别取不同浓度的样品及维生素 C 与 FRAP 试剂反应,得到吸光度随浓度的关

表 2 香水百合总黄酮提取 4 因素 3 水平正交试验结果

| 处理号 | 因素 | | | | 提取率(%) | |
|-------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|
| | A:提取温度 | B:提取时间 | C:料液比 | D:乙醇浓度 | 重复 I | 重复 II |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10.45 | 10.30 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 8.71 | 8.85 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 5.56 | 5.61 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 9.40 | 9.54 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 5.45 | 5.64 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 9.09 | 9.17 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 9.85 | 9.78 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 9.37 | 9.40 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 10.01 | 10.00 |
| k_1 | 8.246 7 | 9.886 7 | 9.630 0 | 8.641 7 | | |
| k_2 | 8.048 3 | 7.903 3 | 9.418 3 | 9.241 7 | | |
| k_3 | 9.735 0 | 8.240 0 | 6.981 7 | 8.146 7 | | |
| R | 1.686 7 | 1.983 3 | 2.648 3 | 1.095 0 | | |

表 3 香水百合总黄酮提取正交试验方差分析结果

| 变异来源 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|------|----------|-----|----------|----------------|---------|
| A | 10.198 6 | 2 | 5.099 3 | 815.166 1 ** | 0.000 1 |
| B | 13.516 9 | 2 | 6.758 5 | 1 080.394 3 ** | 0.000 1 |
| C | 25.991 6 | 2 | 12.995 8 | 2 077.484 0 ** | 0.000 1 |
| D | 3.608 1 | 2 | 1.804 0 | 288.391 7 ** | 0.000 1 |
| 误差 | 0.137 0 | 9 | 0.015 0 | | |

注: $F_{0.05(2,9)} = 4.26$, $F_{0.01(2,9)} = 8.02$ 。“*”表示差异显著($P < 0.05$),“**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

表 4 香水百合总黄酮提取 4 因素 Duncan's 多重比较结果

| 因素 | 水平 | $\alpha = 0.05$ | $\alpha = 0.01$ |
|--------|----|-----------------|-----------------|
| A:提取温度 | 3 | a | A |
| | 1 | b | B |
| | 2 | c | C |
| B:提取时间 | 1 | a | A |
| | 3 | b | B |
| | 2 | c | C |
| C:料液比 | 1 | a | A |
| | 2 | b | B |
| | 3 | c | C |
| D:乙醇浓度 | 2 | a | A |
| | 1 | b | B |
| | 3 | c | C |

注:同一因素条件下,不同小写、大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。

系(图 1)。与 1 mmol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的吸光度相比较,得到维生素 C、样品的 FRAP 值分别为 81.08、261.01 g/mL。

2.2.2 清除 DPPH 自由基能力测定结果 DPPH 是种以氮为中心的单电子有机合成的自由基,后者乙醇溶液呈紫色,最大吸收波长为 517 nm。当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时,其提供 1 个电子与 DPPH 自由基的孤电子配对,吸收消失或减弱,导致溶液颜色变浅,由紫色变为黄色,在 517 nm 处的吸光度变小,其减小程度与自由基清除程度呈线性关系^[10]。因此,该法可以用来表征某种物质对自由基的清除能力,自由基清除剂的清除能力越强,对应吸光度越小,一般以 DPPH 自由基清除率为 50% 的样品浓度(IC_{50})来衡量样品对 DPPH 自由基清除能力。由图 2 可见,维生素 C 在 0 ~ 10 g/mL、样品在 0 ~ 52 g/mL 的浓度区间内,自由基的清除率随样品的浓度呈线性增长的关系,维生素 C、样品的 IC_{50} 分别为 7.39、

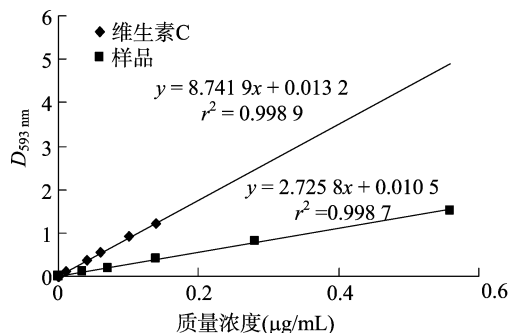


图1 提取液维生素 C 的 FRAP 值的测定结果

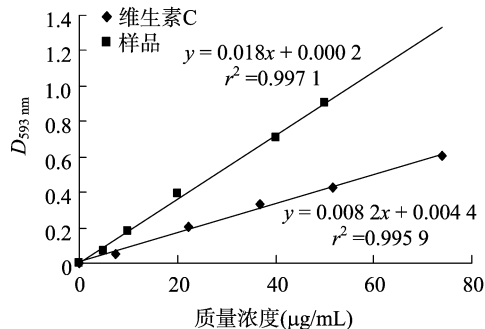


图4 提取液及维生素 C 的还原力

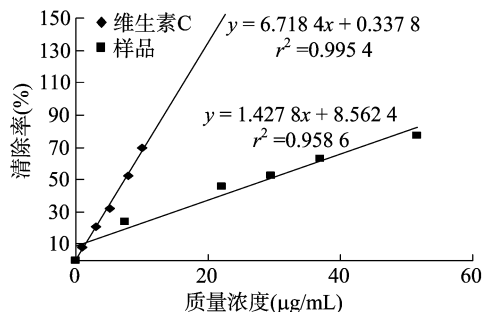


图2 提取液及维生素 C 对 DPPH 自由基的清除作用

29.54 g/mL。结果表明,样品具有一定的清除 DPPH 自由基的能力,但弱于维生素 C。

2.2.3 清除 ABTS 自由基测定结果 ABTS 自由基水溶液呈绿色,当 ABTS 溶液中加入自由基清除剂时,其孤电子被配对,吸收消失或减弱,导致溶液颜色变浅,在 734 nm 处的吸光度变小,其变化程度与自由基清除程度呈线性关系^[11]。由图 3 可见,维生素 C 在 0~7 g/mL、样品在 0~22 g/mL 浓度区间内,试样浓度与自由基清除率存在着良好的线性关系。维生素 C 和样品的 IC₅₀ 分别为 4.68、17.32 g/mL。结果表明,香水百合总黄酮提取物可以作为良好的 ABTS 自由基清除率,但其清除能力弱于维生素 C。

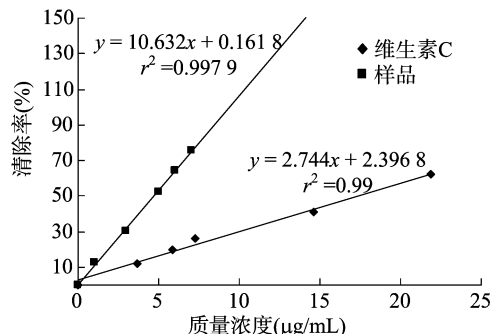


图3 提取液及维生素 C 对 ABTS 自由基的清除作用

2.2.4 还原力测定结果 抗氧化剂具有还原性,能将铁氰化钾还原成亚铁氰化钾,随后亚铁氰化钾与 Fe³⁺ 作用,再次生成铁氰化钾,以 700 nm 波长处检测普鲁士蓝的吸光度表示还原力的大小,吸光度越高,待测物的还原力越强,抗氧化性越强^[12]。由图 4 可见,维生素 C 在 0~50 g/mL、样品在 0~74 g/mL 的浓度区间内,随着待测物质量浓度的增大,反应体系的吸光度也线性增大,说明在所选浓度范围内,维生素 C 和样品都具有一定的还原力,且维生素 C 的增长趋势强于样

品,说明样品的还原力弱于维生素 C。

3 结论

由正交试验结果分析可得,香水百合中总黄酮提取的最佳条件:提取温度 60 ℃,提取时间 1.5 h,料液比 1 g : 30 mL,乙醇浓度 70%。在该条件下对香水百合中总黄酮进行提取,提取率可达 11.23%。抗氧化性试验结果表明,香水百合中总黄酮提取物具有较强的铁离子还原能力,对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基都有一定的清除作用,且具有一定的还原力,但其各项能力均弱于维生素 C。以上试验结果表明,香水百合中总黄酮的含量较高,且已表现出较强的抗氧化作用,有望作为一种新型的天然抗氧化剂被开发利用。

参考文献:

- [1] 朱 屹,潘远智,赵 莉. 氮、磷、钾、钙对香水百合生长及叶片营养成分含量的影响[J]. 草业学报,2012,21(5):274-284.
- [2] 张辉秀,胡增辉,冷平生,等. 不同品种百合花挥发性成分定性定量分析[J]. 中国农业科学,2013,46(4):790-799.
- [3] Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001,391(1):79-89.
- [4] 陈向明,徐 涛,查甫本. 山核桃外果皮黄酮提取与纯化[J]. 农业机械学报,2011,42(12):177-181.
- [5] 卢 静. 林檎叶化学成分分离及其提取物的抗菌、抗氧化活性研究[D]. 重庆:重庆大学,2014:31-33.
- [6] 郭雪峰,岳永德,汤 锋,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(7):1578-1582.
- [7] 刘 薇,邱 乐,杨 婧,等. ABTS 与邻二氮菲-Fe³⁺ 法测定保健食品抗氧化能力比较分析[J]. 食品工业,2013,34(3):120-124.
- [8] 罗秋水,上官新晨,蒋 艳,等. 紫红薯糖蛋白体外抗氧化活性研究[J]. 江西农业大学学报,2012,34(4):809-813.
- [9] 胡 芳,赵智慧,刘孟军. 金丝小枣类黄酮提取最佳条件及抗氧化研究[J]. 中国食品学报,2012,12(4):77-83.
- [10] 李铨军,崔胜云. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理[J]. 食品科学,2011,32(1):86-90.
- [11] 朱玉昌,焦必宁. ABTS 法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):77-80.
- [12] 罗秋水,杜华英,熊建华,等. 葛根异黄酮类化合物提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报,2015,15(2):104-110.