

文章编号: 1673 1689(2011)03-0371-05

费约果叶片总黄酮提取工艺 优化及其抗氧化活性研究

振柱, 黄仁华*, 王丹

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010)

摘要: 对费约果叶片总黄酮的提取工艺和抗氧化活性进行了研究。结果表明: 费约果叶片总黄酮最佳提取工艺为温度 50 ℃、料液比 1: 30(g: mL)、提取时间 50 min 和甲醇体积分数 70%。根据最佳提取工艺, 重复 3 次得到总黄酮量分别 46.89、44.51、48.27 mg/g, 具有稳定性和可操作性; 另外, 通过半抑制浓度 IC_{50} 衡量费约果叶片总黄酮提取物抗氧化活性, 其抗脂质过氧化能力 (IC_{50} 0.275 mg/mL) 和 DPPH·自由基的清除能力 (IC_{50} 0.798 mg/mL) 均优于抗坏血酸 (IC_{50} 0.643、 IC_{50} 0.917 mg/mL), 而超氧阴离子自由基的清除能力 (IC_{50} 0.774 mg/mL) 和羟自由基的清除能力 (IC_{50} 0.278 mg/mL) 均弱于抗坏血酸 (IC_{50} 0.537、 IC_{50} 0.275 mg/mL)。

关键词: 费约果; 总黄酮; 提取; 抗氧化

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activities of the Total Flavonoids from *Feijoa sellowiana* Leaves

DING Zhen-zhu, HUANG Ren-hua*, WANG Dan

(College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621002, China)

Abstract: This manuscript optimized the extraction technologies and investigated the antioxidant activities of the total flavonoids from *Feijoa sellowiana* leaves. The results determined that the optimum parameters of extraction process as follows: the extraction temperature 40 ℃, the ratio of sample to extraction solution 1:30, the extraction time 50 min and the concentration methyl alcohol 70%. With the optimum extraction parameters, the total flavonoids contents with three reiterations achieved at 46.89 mg/gFW, 44.51 mg/gFW and 48.27mg/gFW, respectively. In addition, half-inhibitory concentration IC_{50} was used to evaluate antioxidant activities of total flavonoids from Feijoa leaves. The capability of inhibiting lipid peroxidation (IC_{50} 0.275 mg/mL) and scavenging effects on DPPH freedom radical (IC_{50} 0.798 mg/mL) of total flavonoids extracts were stronger than the corresponding values of ascorbic acid (IC_{50} 0.643 mg/mL and IC_{50} 0.917 mg/mL). However, the scavenging effects on superoxide anion (IC_{50} 0.774 mg/mL) and hydroxyl freedom radical (IC_{50} 0.278 mg/mL) were weaker than that of ascorbic acid (IC_{50} 0.537 mg/mL and IC_{50} 0.275 mg/mL).

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 四川省科技厅重点项目 (07zs2106); 西南科技大学博士基金项目 (08zx7104)。

* 通信作者: 黄仁华 (1979-), 男, 湖北钟祥人, 农学博士, 副教授, 主要从事植物化学成分结构与功能开发方面的研究。Email: huangrenhua@swust.edu.cn

Key words: *Feijoa sellowiana*, total flavonoids, extraction technology, antioxidant activities

费约果 (*Feijoa sellowiana* Berg) 系桃金娘科多年生亚热带常绿灌木果树, 原产于南美洲的巴西和乌拉圭, 2004 年由西南科技大学从新西兰引种至我国四川绵阳地区^[1], 经过近几年驯化引种研究, 已逐步进入推广种植阶段。费约果叶片中含有大量的生物活性物质, 包括维生素、黄酮、豆甾醇、 β -胡萝卜素、对羟基苯乙醇等等, 是一种理想的绿色药用资源^[2]。本研究以费约果叶片为原料, 采用正交试验设计优化总黄酮提取工艺并分析提取物浓度与抗脂质过氧化、DPPH $\cdot$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 等自由基清除率的关系, 为进一步推广费约果的种植和发掘天然抗氧化活性成分以及提高费约果的经济利用价值提供一定的科学依据。

1 材料与 方法

1.1 材料与试剂

试验用费约果叶片于 2009 年 3 月中旬采自西南科技大学西山校区费约果栽培园中。三吡啶三𠔁嗪 (Tripyridyl triazine, TPTZ)、1, 1'-二苯基苦基苯𠔁 (DPPH) 及芦丁购自 Sigma 公司, 其他药品均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计 UV-1900: 日本岛津产品; 台式高速冷冻离心机: 美国 Beckman 产品; KQ5200B 型超声波清洗机: 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂生产; 恒温水浴锅: 上海亚荣生化仪器厂生产; 循环水式多用真空泵 SHB-III: 郑州长城科工贸有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 费约果叶片总黄酮提取工艺优化的正交试验 影响植物组织类黄酮提取的因素很多, 根据前人研究结果结合单因素实验 (实验结果未列出), 结果发现最主要的因素包括提取温度、料液比、提取时间和甲醇体积分数, 而且各因素之间存在着交互作用, 据以此本实验采用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验, 以费约果叶片提取物中总黄酮的含量确定最佳提取工艺, 试验设计的影响因素及水平条件见表 1 所示。

1.3.2 费约果叶片总黄酮提取 根据 Kim 的方法结合超声波提取叶片中的总黄酮^[3]。准确称取新鲜费约果叶片 1.0 g 用于总黄酮的提取, 将新鲜的样品表面水分晾干后放在冰浴上研磨, 直至研磨到没有肉眼可见的块状叶片后将匀浆转入离心管中,

按照正交试验设计进行超声波提取, 提取后 4 $^{\circ}C$ 条件下 4 000 r/min 离心 10 min 收取上清液, 转移至 50 mL 蒸发瓶中, 在 40 $^{\circ}C$ 条件下旋转蒸发提取液中的甲醇, 直至蒸干。用 4 mL 重蒸去离子水溶解残留物并转移至 10 mL 离心管中, 4 $^{\circ}C$ 条件下 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液贮存于-20 $^{\circ}C$ 冰箱中备用。

表 1 费约果叶片总黄酮提取正交试验因素设计

Tab. 1 Orthogonal experiment design for extracting flavonoids from Feijoa leaves

水平 编号	A 提取 温度/ $^{\circ}C$	B 料液比/ (g: mL)	C 提取 时间/min	D 甲醇 体积分数/%
1	50	1: 30	40	60
2	60	1: 40	50	70
3	70	1: 50	60	80

1.3.3 费约果叶片总黄酮含量测定 根据 Kim 等方法测定总黄酮含量^[3-4], 取提取液 0.1 mL 放入 10 mL 试管中, 接着加入 1.9 mL 重蒸去离子水混合均匀后, 立即往试管中加入 0.15 mL 质量分数为 5% $NaNO_2$ 充分震荡, 5 min 后加入 0.15 mL 质量分数为 10% $AlCl_3$ 反应 1 min 后, 加入 1 mL 1 mol/L $NaOH$ 混合均匀, 室温放置反应 3~5 min, 当反应液颜色变至粉红色, 在 510 nm 条件下用分光光度计测定 OD 值。用芦丁 (Rutin) 作标准曲线, 叶片总黄酮含量用等量芦丁表示。

1.3.4 抗脂质过氧化能力的测定 分别于样品管中依次加入 1 mL 卵磷脂溶液 (将 300 mg 卵磷脂溶于 30 mL 10 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液的溶液中, 冰浴振荡)、1 mL 0.4 mmol/L 硫酸亚铁、1 mL 样品, 混匀。避光于 37 $^{\circ}C$ 水浴 60 min, 加入 2 mL 三氯乙酸 (TCA)-硫代巴比妥酸 (TBA)-HCl 混合液 (15 g TCA, 0.37 g TBA, 2.1 mL 浓盐酸依次放入 100 mL 水中), 90~100 $^{\circ}C$ 水浴 15 min, 迅速冷却, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液在 535 nm 测吸光度 A_1 。空白管以 1 mL 重蒸水代替 1 mL 样品, 操作方法同样品管, 可测得空白管的吸光度 A_2 , 参比管中以 1 mL 重蒸水代替 1 mL 卵磷脂。根据其线性回归方程求出吸光度为 0.5 时所需样品的有效浓度 (IC_{50}), 抗坏血酸为阳性对照^[5]。

抑制率 (%) = $[(A_2 - A_1) / A_2] \times 100$

1.3.5 对 DPPH $\cdot$ 自由基清除率的测定 准确移

取不同浓度费约果叶片总黄酮提取液 2 mL 于 10 mL 试管中,加入 2 mL DPPH·溶液(8 mg DPPH·用体积分数 80% 无水乙醇溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶),充分混匀,室温静置,30 min 后用分光光度计在 517 nm 下测定其吸光度 A_1 (以体积分数 80% 无水乙醇溶液为参比);同时测定 2 mL DPPH·溶液与 2 mL 体积分数 80% 无水乙醇溶液混合液的吸光度 A_2 ,以及不同浓度 2 mL 提取液与 2 mL 80% 无水乙醇溶液混合液的吸光度 A_3 。平行测定 3 次,取平均值后根据以下公式计算清除率。根据其线性回归方程求出吸光度为 0.5 时所需样品的有效浓度(IC_{50}),抗坏血酸为阳性对照^[6]。

清除率% = $[1 - (A_1 - A_3) / A_2] \times 100\%$

1.3.6 对超氧阴离子自由基清除率的测定 先将 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(PH 8.2),3 mmol/L 邻苯三酚溶液(用 10 mmol/L HCl 配制),置 25℃ 水浴预热 15 min。然后取 Tris-HCl 缓冲液 4.0 mL 于试管中,加入不同浓度供试液 1.7 mL,3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL,以加入邻苯三酚的瞬间开始计时,以水为空白,测定反应开始第 100 秒时,325 nm 波长处吸光度 A_1 。对照组 A_2 使用无水乙醇代替供试液,对照组(A_3)使用 10 mmol/L HCl 溶液代替邻苯三酚溶液。每个浓度梯度平行测定 3 次,求平均值。并根据其线性回归方程求出吸光度为 0.5 时所需样品的有效浓度(IC_{50})。同时,以抗坏血酸作为阳性对照^[7]。

清除率% = $[A_2 - (A_1 - A_3)] / A_2 \times 100\%$

1.3.7 对羟自由基清除率的测定 取 1 mL 9 mmol/L 硫酸亚铁与 1 mL 10 mmol/L 水杨酸于 10 mL 试管充分混合后,分别加入不同浓度费约果叶片总黄酮提取液 1 mL,加 1 mL 过氧化氢(8.8 mmol/L)启动反应,37℃ 反应 30 min,以蒸馏水作参比,在 510 nm 下测吸光度 A_1 。对照组 A_2 用无水乙醇代替供试液。对照组 A_3 用纯净水代替过氧化氢(8.8 mmol/L)。每个浓度梯度平行测定 3 次,求平均值。并根据其线性回归方程求出吸光度为 0.5 时所需样品的有效浓度(IC_{50}),以抗坏血酸作为阳性对照^[8]。

清除率% = $[A_2 - (A_1 - A_3)] / A_2 \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 费约果叶片总黄酮提取正交试验

以提取温度、料液比、提取时间、甲醇浓度为因素的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果见表 2 所示,每个处理提取 3 次。从表中极差分析可以看出,提取温度显著

影响着费约果叶片总黄酮的提取效果,表现最为明显,其次为料液比,影响最小的因素为甲醇浓度,即各因素对费约果叶片总黄酮提取效果的主次顺序为提取温度> 料液比> 提取时间> 甲醇体积分数,进一步分析可以发现提取工艺的最优方案为 $A_1B_1C_2D_2$,即提取温度 50℃、料液比 1:30(g:mL)、提取时间 50 min 和甲醇体积分数 70% 为最佳提取工艺组合。根据最佳提取工艺组合进行 3 次重复试验,得到的费约果叶片总黄酮提取物量分别为:46.89 mg/g、44.51 mg/g、48.27 mg/g,均要高于正交表中所有试验结果,且具有较好的重现性和可操作性。

表 2 费约果叶片总黄酮提取正交试验结果

Tab.2 Results of orthogonal experiment for extracting total flavonoids from Feijoa leaves

编号	提取温度/℃	料液比/(g:mL)	提取时间/min	甲醇体积分数/%	总黄酮提取量/(mg/g)
1	1	1	1	1	39.64
2	1	2	2	2	39.86
3	1	3	3	3	37.92
4	2	1	2	3	33.89
5	2	2	3	1	35.16
6	2	3	1	2	32.25
7	3	1	3	2	36.52
8	3	2	1	3	33.99
9	3	3	2	1	28.88
K1	39.18	36.68	35.29	34.56	
K2	33.77	36.34	34.21	36.21	
K3	33.13	33.01	36.53	35.26	
R	6.01	3.67	2.33	1.65	

2.2 费约果叶片总黄酮提取物抗氧化活性

费约果叶片总黄酮提取物对 Fe^{2+} 引发的卵磷脂脂质体过氧化的抑制作用见图 3(a) 所示,当总黄酮提取物质量浓度为 0.2 mg/mL 时,抑制率为 43%,质量浓度为 0.4 mg/mL 时抑制率为 69%,再增加提取物质量浓度,抑制率增长缓慢。用半抑制浓度 IC_{50} 衡量,费约果叶片总黄酮提取物抗脂质过氧化能力(IC_{50} 0.275 mg/mL)要显著优于抗坏血酸(IC_{50} 0.643 mg/mL)。

图 3(b) 反映了费约果叶片总黄酮提取物清除 DPPH·能力与浓度的变化关系,从图中可以看出,随着提取产物总黄酮质量浓度的增加,DPPH·的清除率也随之增加,且在低浓度范围内(0.5~1.0

mg/ mL) 增长较快。另外, 质量浓度为 0. 5 mg/ mL 时, 费约果叶片总黄酮提取物对 DPPH $\cdot$ 的清除率与抗坏血酸相当, 而较高质量浓度下费约果叶片总黄酮提取物对 DPPH $\cdot$ 的清除率高于抗坏血酸。用半抑制浓度 IC_{50} 衡量, 费约果叶片总黄酮提取物对 DPPH $\cdot$ 的清除能力(IC_{50} 0. 798 mg/ mL) 要优于抗坏血酸(IC_{50} 0. 917 mg/ mL)。

从图 3 (c) 和图 3 (d) 中可以看出, 费约果叶片总黄酮提取物对超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$ 和羟自由基

($\cdot OH$) 的清除率均随着浓度的增加而增强。但在相同浓度条件下, 费约果叶片总黄酮提取物对超氧自由基和羟自由基清除率均显著低于抗坏血酸。用半抑制浓度 IC_{50} 衡量, 费约果叶片总黄酮提取物对超氧阴离子自由基的清除能力(IC_{50} 0. 774 mg/ mL) 和对羟自由基的清除率(IC_{50} 0. 278 mg/ mL) 均要弱于抗坏血酸(IC_{50} 0. 537 mg/ mL) 和(IC_{50} 0. 064 mg/ mL)。

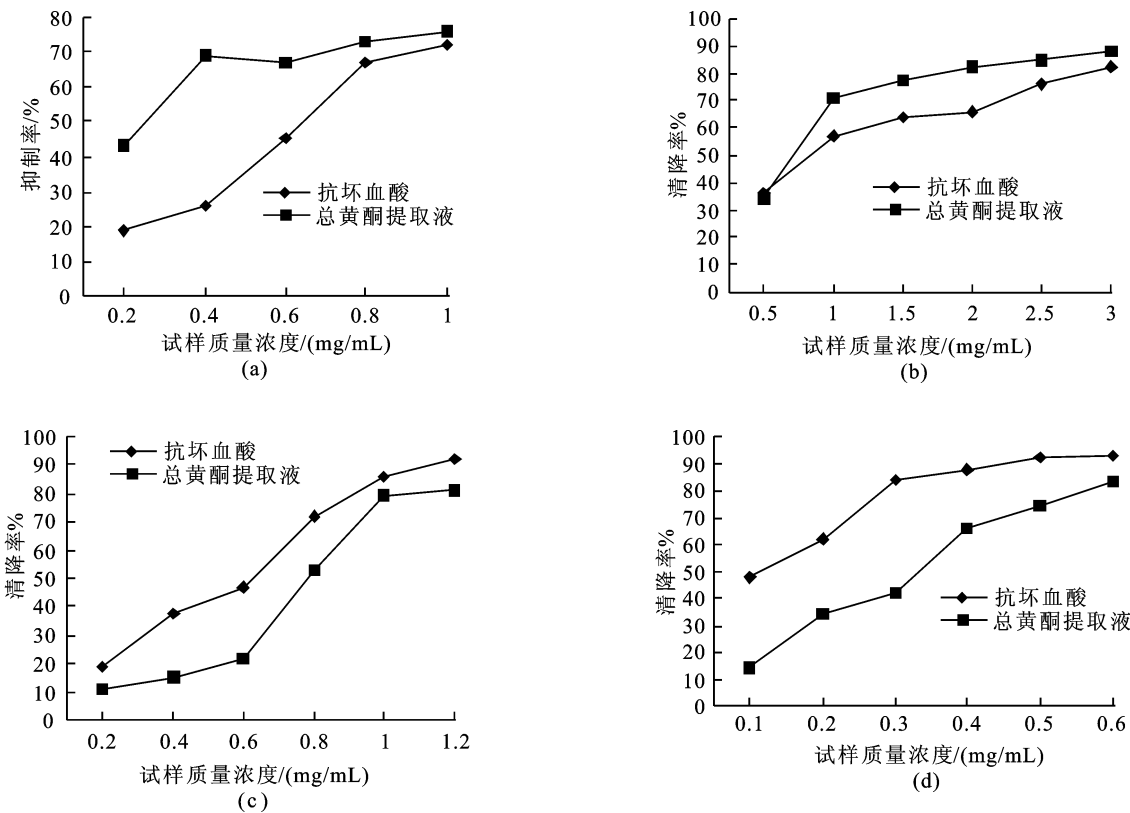


图 1 费约果叶片总黄酮不同浓度提取物抗脂质能力(a)、清除 DPPH $\cdot$ 能力(b)、清除 $O_2^{\cdot -}$ (c)和清除 $\cdot OH$ (d)能力
Fig. 1 Capability of total flavonoids with various concentrations from Feijao leaves on inhibiting lipid peroxidation, scavenging DPPH $\cdot$, $O_2^{\cdot -}$ and $\cdot OH$

3 结 语

通过对费约果叶片总黄酮提取工艺的单因素试验(预实验结果未列出)和正交试验分析, 确定了费约果叶片总黄酮提取的最佳工艺为提取温度 50 $^{\circ}C$ 、料液比 1: 30(g: mL)、提取时间 50 min 和甲醇体积分数 70%。

抗氧化活性实验结果显示, 费约果叶片总黄酮提取物对脂质过氧化具有较强的抑制效果, 且显著高于抗坏血酸, 其原因可能是费约果叶片中黄酮提取成分中具有能螯合铁离子的有效物质, 表现出了较强的抗脂质过氧化^[9]; 另一方面, 费约果叶片总黄酮提取物在清除 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 等离子方面要弱于抗坏血酸, 可能与黄酮有效成分的结构有关, 有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 王丹, 刘仁道, 任少雄. 实用、观赏兼用果树新种类费约果引种的气候适应性分析[J]. 中国南方果树, 2007, 6: 39– 41.
WANG Dan, LIU Rerr dao, REN Shaø xiong. Analysis on the climate adaptability of feijoa fruit[J]. **South China Fruits**, 2007, 6: 39– 41. (in Chinese)
- [2] Paola B, Luigi M, Marco M, et al. Feijoa sellowiana derived natural flavone exerts anti cancer action displaying HDAC inhibitory activities[J]. **Int J Biochem Cell B**, 2007, 39: 1902– 1914.
- [3] Kim D O, Jeong S W, Lee C Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums[J]. **Food Chem**, 2003, 81: 321– 32.
- [4] 李云志, 曾凡骏, 李帆元. 宝枫叶总黄酮的提取研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 27– 30(49).
LI Yurr zhi, ZENG Fair jun, LI Fan. The extraction of flavonoids from the leaves of acer truncatum bunge[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(1): 27– 30(49). (in Chinese)
- [5] 李颖畅, 孟宪军. 蓝莓叶黄酮提取物抗氧化活性的研究[J]. 营养学报, 2008, 30(4): 427– 429.
LI Ying chang, MENG Xiar jun. Studies on antioxidant activity of flavonoids from leaves of blueberry[J]. **Acta Nutrimen ta Sinica**, 2008, 30(4): 427– 429. (in Chinese)
- [6] Sreenivasan S, Ibrahim D, Kassim M J N M. Free radical Scavenging Activity and Total Phenolic Compounds of *Gracilaria Changii*[J]. **Int J Natur Eng Sci**, 2007, 1 (3): 115– 117.
- [7] 余芳丽, 余萍, 户勋, 方一泓. 凤眼莲总黄酮最佳提取条件的探讨[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 52– 54.
YU Fang li, YU Ping, HU Xun, FANG Yi hong. Study on the optimum conditions of extracting total flavonoids from water hyacinth[J]. **Biotechnology**, 2008, 18(2): 52– 54. (in Chinese)
- [8] 马利华, 贺菊萍, 秦卫东, 刘鸿源. 槐花提取物抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 75– 77.
MA Li hua, HE Ju ping, QIN Wei dong, WANG Ping. Study on antioxidant activities of pogadatree flower (Robinia Pseudocacia L.) Extracts[J]. **Food Science**, 2007, 28(9): 75– 77. (in Chinese)
- [9] Ock Sook Yi. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system [J]. **J Am Oil Chem Soc**, 1997, 74: 1301 – 1306.