

覆盆子黄酮抗氧化活性研究

朱会霞

(衡水学院, 河北衡水 053000)

摘要: 经分离提取后, 对覆盆子黄酮提取物的体外抗氧化活性进行了研究, 结果表明, 覆盆子黄酮提取物对 OH[·]、H₂O₂、DPPH 均有不同程度的清除作用, 清除率强弱顺序为: 纯化后的覆盆子黄酮>覆盆子黄酮二次萃取物>覆盆子黄酮粗提物; 覆盆子黄酮提取物对花生油的自动氧化也有明显的抑制作用, 0.2%覆盆子黄酮提取物在油脂中的添加量好于 0.02%的 BHT。

关键词: 覆盆子; 黄酮; 抗氧化; 活性

文章编号: 1673-9078(2012)10-1302-1305

Study on the Antioxidant Activity of Raspberry Flavones

ZHU Hui-xia

(Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: The anti-oxidation study for Raspberry flavones had shown that Raspberry flavones could clear up OH[·], H₂O₂ and DPPH in vitro. The strength of order of clearance as follow: the flavones after purifying > the flavones after second extraction > the flavones after crude extract. The flavones after purifying could obviously hold back oxidation of peanut oil. The anti-oxidation effect of 0.2% flavones in peanut was better than 0.02% BHT.

Key words: raspberry; flavones; anti-oxidation; activity

覆盆子干果为药食两用果实, 味甘, 略带涩味, 含有的黄酮、有机酸、糖类、维生素、鞣花酸、β-谷甾醇及微量元素等具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫机能、减肥之功效^[1]有助阳缩尿、补肾固精功能, 用于治疗阳萎、肾虚遗精、尿频和遗尿等病症^[2], 因此, 覆盆子具有很强的药用及保健作用。

国内外学者进行研究证实黄酮类化合物具有抗肿瘤^[3]、抗自由基、抗病毒等多种药理作用, 近年来对植物中黄酮抗氧化研究有相关报道, 但未见覆盆子黄酮抗氧化的相关报道。

本试验以纯化后的覆盆子黄酮为研究对象, 对其抗氧化活性进行探讨, 旨在为覆盆子的开发研究及覆盆子黄酮在食品中的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

覆盆子干果(一级品), 购于衡水市中医院药店, 粉碎过 60 目筛, 50 °C 烘干备用。

工业乙醇(纯度 95%)、甲醇、乙酸(分析纯, 北京市化学试剂公司); 正丁醇(分析纯, 济南万茂商

贸有限公司); 石油醚(分析纯, 天津捷兴鸿达化工有限公司); DPPHA(浓度 ≥ 85%, Fluka 公司); AB-8 树脂(化学纯, 南大合成树脂有限公司); TLC Silica gel 60 F254 (25 Aluminium sheets 20×20cm, Merck KGaA Germany)。

1.2 实验仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(大连三杰科技发展有限公司); 7230G 紫外可见分光光度计(上海天普分析仪器有限公司); HWS-5A 数显水浴锅(北京东方精瑞科技发展有限公司); RE201D 旋转薄膜蒸发器(上海博彩仪器有限公司); SHZ-D 真空泵(上海博彩仪器有限公司); JL-60DTH 超声波清洗仪(上海天普分析仪器有限公司); DHG 干燥箱(上海博彩仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 覆盆子黄酮提取

1.3.1.1 覆盆子总黄酮提取

将覆盆子乙醇提取液加入至真空旋转薄膜蒸发器中, 50 °C 蒸发至成膏状物, 加入等体积的纯净水, 超声溶出后, 转移至分液漏斗中, 加入等体积的石油醚进行脱脂处理, 反复三次, 取水相。

1.3.1.2 覆盆子黄酮二次萃取物

经上步得到的覆盆子黄酮粗提液经真空旋蒸得到膏状固体物, 加纯净水超声溶解, 石油醚萃取三次,

收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 河北省科技厅资助项目(11215645)

作者简介: 朱会霞(1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程, 食品等方面的研究

取上水层, 乙酸乙脂萃取三次, 真空旋蒸得到黄色粉末。

1.3.1.3 覆盆子黄酮纯化物

经上步得到的覆盆子黄酮萃取物粉末, 用 70% 乙醇超声溶解, 经 AB-8 树脂柱进行纯化, 纯化后真空旋蒸得到的黄色粉末状物。

1.3.2 覆盆子黄酮提取物体外抗氧化实验

1.3.2.1 覆盆子黄酮对氢氧基清除率的测定^[4]

将覆盆子黄酮样品配置成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液, 取 7 支试管, 依次加入 1 mL 浓度为 0.75 mmol/L 的邻菲罗啉溶液, 15 mL 浓度为 150 mmol/L 的磷酸缓冲液, 充分混匀, 加入 1 mL 浓度为 0.75 mmol/L 的硫酸亚铁, 立即混匀, 然后向 5 支试管中加入一定量的覆盆子黄酮提取液, 混匀, 另外两支试管中不添加覆盆子黄酮提取液, 一支中添加 1 mL 0.01% 双氧水, 一支中不添加, 用纯净水定容至 10 mL, 37 °C 恒温培养箱中保温培养 1 h, 于 536 nm 下测定吸光度值。重复 5 次, 计算公式如 (1):

$$z = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: Z-氢氧基清除率%; A_1 -添加覆盆子黄酮样品吸光度值; A_2 -添加双氧水空白吸光度值; A_3 -未添加双氧水空白吸光度值。

1.3.2.2 覆盆子黄酮对 DPPH 自由基清除能力的测定^[5]

制备 DPPH 溶液: 精确称取 0.01 g DPPH 样品, 用无水乙醇溶解并定容至 250 mL 容量瓶中, 即得到浓度为 0.04 mg/mL 的 DPPH 溶液。

将不同浓度的覆盆子黄酮提取液与 DPPH 等体积混合, 摇匀, 放置于黑暗中 30 min 后, 于 515 nm 下测定吸光度值 (A_i)。将不同浓度的覆盆子黄酮提取液与无水乙醇进行等体积混合于试管中, 摇匀, 放置于黑暗处 30 min 后于 515 nm 下测定吸光度值为 (A_j)。取蒸馏水与 DPPH 溶液等体积相混合于试管中测定其吸光度值 (A_4)。以蒸馏水与无水乙醇混合液作为空白对照, 按以下公式进行计算, 得到 DPPH 自由基清除率。利用 SAS8.0 软件进行分析, 得出 IC₅₀ 值, 计算公式如 (2)。

$$W = \frac{A_4 - A_i + A_j}{A_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中: W-DPPH 自由基清除率%; A_4 -DPPH 自由基吸光度值; A_i -不同浓度覆盆子黄酮与 DPPH 作用后吸光度值; A_j -不同浓度覆盆子黄酮吸光度值。

1.3.2.3 覆盆子黄酮对 H₂O₂ 清除率的测定^[6]

将覆盆子黄酮提取物配置成一定浓度的溶液, 取

8 支试管, 分别加入 5 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 2.8 mL (H₂O₂ 用 150 mmol/L 的磷酸缓冲液配置), 分别加入一定量的覆盆子黄酮提取物溶液, 混匀, 用纯净水定容至 10 mL, 对照不添加提取物, 于室温下放置 10 min, 在 230 nm 下测定吸光度值, 重复 5 次。计算公式如 (3):

$$H_2O_2 \text{清除率} (\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.2.4 覆盆子黄酮对花生油抗氧化能力试验^[7]

按照 GB/T 5538-1995 油脂过氧化值进行测定。

样品处理: 取花生油样品放入敞口的烧杯中, 按照一定量将覆盆子黄酮加入其中, 混匀后, 将油样放入 60 °C 烘箱中进行强氧化, 每 24 h 搅拌一次, 定期测定过氧化值 (POV)。

POV (过氧化值) 测定: 称取 1~3 g 油样加入具塞得碘量瓶中, 加入冰乙酸-三氯甲烷液体 30 mL, 溶解, 加入饱和碘化钾溶液 1 mL, 摇匀, 黑暗处放置 3 min, 加入蒸馏水定容至 100 mL, 立即用浓度为 0.002 mol/L 的硫代硫酸钠溶液进行滴定至淡黄色。然后加入 0.5% 的淀粉指示剂 1 mL, 摇匀后再用 0.002 mol/L 的硫代硫酸钠溶液滴定至蓝色消失为终点, 记录数据, 计算 POV 值, 公式如 (4):

$$Q = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.1269}{2M} \times 100 \times 78.8 \quad (4)$$

式中: Q-POV (过氧化值 mmol/kg); V_1 -油样消耗硫代硫酸钠溶液的体积; V_2 -空白消耗硫代硫酸钠溶液的体积; C-硫代硫酸钠溶液浓度 (0.002 mol/L); M-测定油样质量; 0.1269-硫代硫酸钠溶液 1 mL 相当于碘的克数; 78.8-转换因子; 2-过氧化值单位 mmol/kg 与 2 meq/kg 转换系数。

1.3.2.5 覆盆子黄酮提取物还原能力的测定

将覆盆子黄酮提取物配制成不同浓度的乙醇溶液, 各取溶液 1.00 mL, 加入浓度为 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=6.6) 2.0 mL, 再加入 10 mg/mL 的铁氰化钾溶液 2.00 mL, 混匀, 于 50 °C 水浴下作用 20 min 后加入 100 mg/mL 的三氯乙酸 2.00 mL, 混匀后于 3000 rpm 下离心 10 min, 用移液枪取上清液 2.0 mL 和浓度为 0.1% (m/V) 的氯化铁水溶液 0.4 mL 混合, 室温反应 10 min 后于 700 nm 下测定吸光度值 (以溶剂代替样品做空白) 实验重复三次, 求得吸光度平均值。

2 结果与讨论

2.1 覆盆子黄酮对氢氧基清除率的测定

自由基化学性质比较活泼, 容易和体内的其它一些基团反应, 从而造成体内细胞损伤, 引发一些疾病。

羟基自由基的化学性质最为活泼, 极易和一些分子基团发生反应, 因此, 氢氧基的清除也是机体抵御疾病较有效的手段之一。

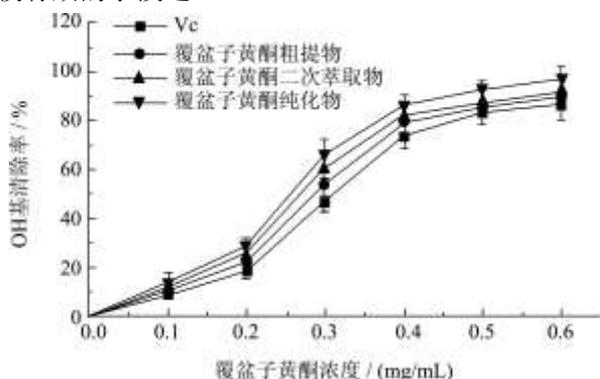


图1 覆盆子黄酮对 OH 基的清除率

Fig.1 The clearance rate for OH of raspberry flavones

覆盆子黄酮粗提物、覆盆子黄酮二次萃取物、纯化后的覆盆子黄酮及 Vc 对氢氧基的清除效果如图 1 所示, 随着几种物质浓度的增加, 对氢氧基的清除作用明显增强, 四者都呈现量效关系, 相同浓度下, 几者对氢氧基清除效果为: 纯化后的覆盆子黄酮>覆盆子黄酮二次萃取物>覆盆子黄酮粗提物>Vc, 说明覆盆子黄酮清除氢氧基的能力高于 Vc, 当浓度达到 0.6 mg/mL 时, 纯化后的覆盆子黄酮对氢氧基的清除率可达到 100%。

2.2 覆盆子黄酮对 H₂O₂ 清除率的测定

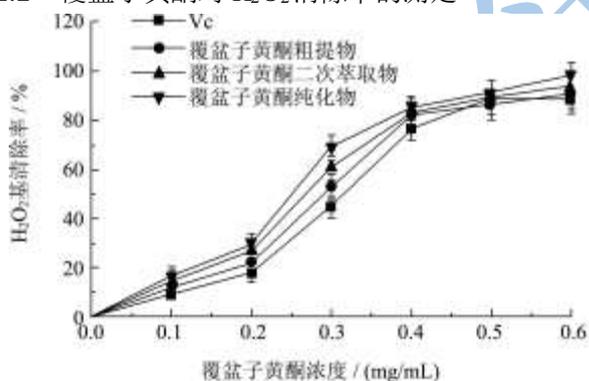


图2 覆盆子黄酮对 H₂O₂ 的清除率

Fig.2 The clearance rate for H₂O₂ of raspberry flavones

由图 2 可知, 随浓度的增加, 几种物质对 H₂O₂ 的清除率显著增加, 当物质浓度低于 0.5 mg/mL 时, 对覆盆子黄酮粗提物、覆盆子黄酮二次萃取物、覆盆子黄酮纯化物对 H₂O₂ 清除率都高于 Vc, 四者中覆盆子黄酮纯化物最高, 也表明随覆盆子黄酮纯度的增加, 对 H₂O₂ 的清除率增高, 覆盆子黄酮对 H₂O₂ 的清除起着关键性的作用。当浓度高于 0.5 mg/mL 时, 覆盆子黄酮二次萃取物清除 H₂O₂ 趋势有所下降, 低于 Vc 对 H₂O₂ 的清除率, 具体原因有待于进一步分析。

2.3 覆盆子黄酮对 DPPH 自由基清除率的测定

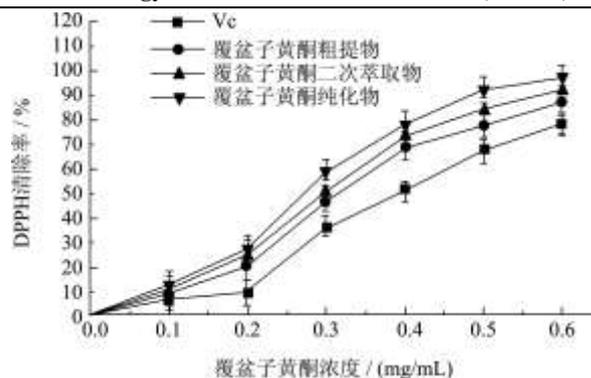


图3 覆盆子黄酮对 DPPH 的清除率研究

Fig.3 The clearance rate for DPPH of raspberry flavones

DPPH 是一种稳定性较好的自由基, 含有 3 个苯环, 一般呈紫色, 在 517 nm 处有最大吸收波长, 当有清除剂时, DPPH 中的单电子配对而使其颜色变淡, 吸光度值变小, 如果被测物能够较好的清除它, 表明该种物质能够降低氧自由基, 烷基自由基等的有效浓度, 阻断脂质的过氧化反应, 因此, 对 DPPH 清除率的高低是天然抗氧化剂筛选的指标之一。覆盆子黄酮及 Vc 对 DPPH 自由基清除效果如图 3 所示。相比之下, 覆盆子黄酮对 DPPH 的清除率都高于 Vc, 对 DPPH 清除率顺序为: 覆盆子纯化黄酮>覆盆子二次萃取黄酮>覆盆子黄酮粗提物>Vc。

2.4 覆盆子黄酮油脂抗氧化性研究

BHT 是油脂中最为常用的抗氧化剂, 抗氧化效果非常明显, 为考察覆盆子黄酮的抗氧化能力, 分别添加覆盆子黄酮和 BHT, 结果如图 4 所示。

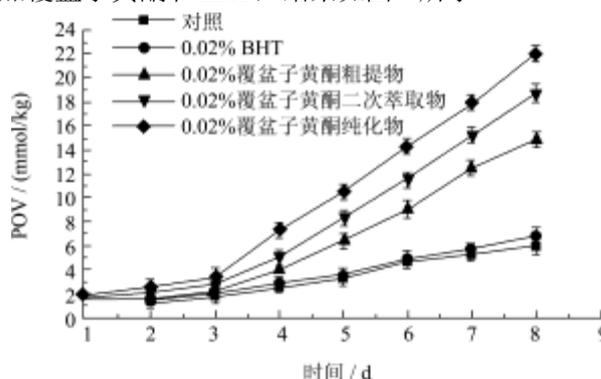


图4 覆盆子黄酮油脂抗氧化特性

Fig.4 The antioxidant of raspberry flavones to fat

由图 4 可以看出, 覆盆子黄酮添加到花生油中, 可以延缓油脂氧化, 具有很强的抗氧化活性, 抗氧化作用好于 BHT。

2.5 覆盆子黄酮提取物还原能力测定结果

Fe³⁺是很强的氧化剂, 测定物质的还原力就是测定该物质将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺的能力, 此方法间接的测定被测物清除自由基能力, 是一种快速、简洁的方法, 测定结果如图 5 所示。

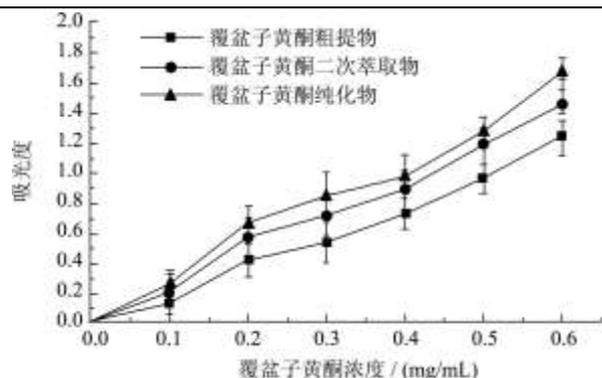


图5 覆盆子黄酮还原能力测定

Fig.5 The reducing power of raspberry flavones to fat

由图5可知,覆盆子黄酮的还原能力与提取物的浓度呈一定的线性关系,几种物质的还原能力大小为:覆盆子纯化黄酮>覆盆子黄酮二次萃取物>覆盆子黄酮粗提物,随物质浓度的增加,还原能力不断增加。

3 结论

生物体内诸多物质如蛋白质、脂肪等可以和自由基作用,从而破坏生物体内细胞结构和功能,引发生物体多种疾病的产生,如动脉粥样硬化、糖尿病、癌症等,因此抗自由基、抗氧化活性成分的研究非常活跃。对覆盆子黄酮提取物体外抗氧化研究表明,覆盆子黄酮对体外的羟基、 H_2O_2 、DPPH均有不同程度的清除作用,清除率强弱顺序为:纯化后的覆盆子黄

酮>覆盆子黄酮二次萃取物>覆盆子黄酮粗提物;覆盆子黄酮提取物对花生油的自动氧化也有明显的抑制作用,0.2%覆盆子黄酮提取物在油脂中的添加量好于0.02%的BHT,表明覆盆子黄酮有较好的体外抗氧化能力。

参考文献

- [1] 陈永存.覆盆子的营养功效及产品开发[J].农产品资源,2007,10:42-45
- [2] Kazuhiro O. Labdane type diterpene glycosides from *Rubus foliolosus* [J]. Chem. Pharm. Bull, 1991, 39 (9): 2443-2445
- [3] Kurowska E A, Mantley J A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet induced hypercholesterolemia [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2879-2886
- [4] 韩飞,周孟良,钱健亚,等.抗氧化剂抗氧化活性测定方法及其评价[J].粮油食品科技,2007,17(6):54-57
- [5] 黄莉娟,胡蝶,张萍,等.柑橘的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2012,28(4):399-401
- [6] 王川,钟伟,倪青,等.夏枯草黄酮对猪油抗氧化作用的研究[J].现代食品科技,2010,26(12):1319-1321
- [7] Wang C P. Determination of Hydroxyl Radical and Antioxidant Activity of Chinese Herbs by fluorospectroscopy [J]. Journal of Dezhou University, 2007, 23(4): 40-42