

荷叶不同极性部位抗氧化活性及酸水解对有效部位抗氧化活性的影响

江慎华^{1, 2, 3}, 周勇^{1, 2}, 肖通奋¹, 廖亮¹, 曲文娟^{1, 3}, 汪名春^{1, 2}, 杜先锋^{1, 2}, 马海乐^{1, 3}

(1. 九江学院生命科学学院, 江西九江 332000) (2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 茶叶生物化学与生物技术教育部重点实验室, 安徽合肥 230036) (3. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏省农产品物理加工重点实验室, 江苏镇江 212013)

摘要: 为了确定荷叶抗氧化活性的有效部位以及进一步提高该有效部位抗氧化活性, 本文采用系统溶剂法对荷叶抗氧化活性进行了测定和分析, 进而采用盐酸对该有效部位进行了水解处理。结果表明, 在不同极性部位中, 弱极性部位-乙酸乙酯相超氧阴离子、羟自由基清除能力及总抗氧化力最强, 为荷叶抗氧化活性的有效部位。采用盐酸水解能显著提高该有效部位抗氧化能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。与水解前相比, 该有效部位水解后总还原力、DPPH 清除率、FRAP 抗氧化能力 (OD_{593})、总抗氧化力 (OD_{695}) 和羟自由基清除率增幅分别为 48.52%、58.22%、64.3%、22.15% 和 100.48%, 超氧阴离子清除率从 $(42.43 \pm 1.23)\%$ 提高到 $(44.97 \pm 0.22)\%$ 。结果证明, 荷叶抗氧化活性物质主要是存在于有效部位-乙酸乙酯相的弱极性化合物; 酸水解是进一步提高其抗氧化活性的有效手段。本文为后续对荷叶抗氧化功能食品研究与开发提供了依据。

关键词: 荷叶; 抗氧化; 有效部位; 酸水解

文章编号: 1673-9078(2014)12-92-99

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.016

Antioxidant Activity of Lotus Leaf Fractions with Different Polarities and the Effect of Acid Hydrolysis on the Effective Fraction

JIANG Shen-hua^{1,2,3}, ZHOU Yong^{1,2}, XIAO Tong-fen¹, LIAO Liang¹, QU Wen-juan^{1,3}, WANG Ming-chun^{1,2}, DU Xian-feng^{1,2}, MA Hai-le^{1,3}

(1. College of Life Science, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China) (2. College of Tea and Food Science & Technology, Anhui Agricultural University, Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Hefei 230036, China) (3. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu Provincial Key Lab of Physical Processing of Agricultural Products, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The aim of this study was to identify and further improve the antioxidant activity of the effective fraction in lotus leaves. Lotus leaf fractions were prepared by systematic solvent extraction, and antioxidant activity was measured to identify the effective antioxidant fraction, which was then hydrolyzed by using hydrochloric acid. The results showed that among all fractions with different polarities, the low-polar fraction (ethyl acetate fraction) showed the strongest antioxidant activity in terms of percentage of hydroxyl radicals and superoxide anions scavenged and total antioxidant capacity. Therefore, this fraction was identified as the effective antioxidant fraction of lotus leaf. The antioxidant capacity of the effective fraction was significantly improved by hydrochloric acid hydrolysis ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). Compared with the effective fraction before hydrolysis, the total reducing power, percentage of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenged, ferric-reducing antioxidant power (FRAP, OD_{593}), total antioxidant power (OD_{695nm}), and percentage of hydroxyl radicals scavenged of the post-hydrolytic fraction showed an improvement by 48.5%, 58.22%, 64.3%, 22.15%, and 100.48%, respectively. The percentage of superoxide anion radicals scavenged showed an improvement from $42.43\% \pm 1.23\%$ to $44.97\% \pm 0.22\%$. The results demonstrated that the active antioxidants of lotus leaf comprised of mainly low-polar compounds in the effective fraction (ethyl acetate fraction), and hydrochloric acid hydrolysis was an effective approach to improve the antioxidant capacity of this fraction. This study provides a basis for further research and development of functional foods by using lotus leaf.

Key words: lotus leaf; antioxidant activity; effective fraction; acid hydrolysis

基金项目: 国家自然科学基金(31360371); 江西省自然科学基金(20132BAB204030); 江西省科技支撑计划(20123BBF60150); 江西省教育厅科技项目(GJJ12620); 江苏省农产品物理加工重点实验室开放课题(JAPP2010-5); 江西省卫生厅中医药科研计划课题(2013A017); 江苏省青年自然科学基金(BK2012287)

作者简介: 江慎华(1973-), 男, 副教授, 博士(后), 硕士生导师, 主要研究方法为: 天然产物、食品营养学和功能性食品研究

通讯作者: 杜先锋(1965-), 男, 教授, 博士, 博士生导师; 马海乐(1963-), 男, 教授, 博士, 博士生导师

机体在正常的有氧呼吸过程中会产生很多活性氧与自由基, 若这些物质未得到及时清除, 人体即处于氧化应激状态, 容易产生很多疾病^[1]。化学合成抗氧化剂因具有潜在的毒、副作用, 寻找植物源天然抗氧化剂成为该领域研究热点^[2]。

荷叶, 为睡莲科植物莲(*Nelumbo Nucifera Gaertn*)的叶片, 被国家列入第二批“既是食品又是药品”名单, 具有抗氧化、降血脂、止血、减肥、保肝等多种功能活性^[3-6]。国内外很多学者对荷叶抗氧化活性展开了研究^[7-13]。Jiang et al^[7]、江慎华等^[8]、周勇等^[3]、Wu et al^[9]、Choe et al^[10]、Lin et al^[11]发现荷叶提取物具有很强的抗氧化活性。Huang et al^[12]和王劫等^[13]发现, 荷叶作为食品添加剂能提高猪肉、羊肉或鸡肉的氧化稳定性及品质。尽管这些学者发现荷叶具有相应的抗氧化功能^[7-13]。但是, 荷叶抗氧化功能的主要成分集中在哪个部位? 其抗氧化活性的有效部位是哪个? 这些问题目前仍不清楚, 从而限制了全面阐明荷叶抗氧化活性的物质基础及相应功能食品的研究与开发。本实验室前期依据抗氧化活性对国家公布的87种“既是食品又是药品”原料筛选后发现, 荷叶抗氧化能力位居前列^[7]。同时, 荷叶在我国种植广泛、产量丰富, 具有较好的原料优势, 但其利用率却不高^[12]。

系统溶剂法是采用极性逐渐增大的有机溶剂对原料依次萃取获得不同极性部位, 也就是将原料化学成分根据极性的大小进行划分, 再以生物活性为“眼睛”而“顺藤摸瓜”, 追踪得到有效部位。后续对该有效部位进行分离, 最终能阐明功能活性的物质基础^[14]。该方法是生物活性为基础进行分离, 功效成分不易丢失, 后续试验能阐明功能活性的物质基础。Jiang et al^[15]、Gao et al^[16]采用这种法确定了香椿抗氧化及诃子抑制 α -葡萄糖苷酶活性的有效部位。

黄酮和多酚类化合物是植物抗氧化活性的主要物质基础^[17-18]。天然黄酮类化合物多数以苷类形式存在, 而黄酮苷元比糖苷具有更强的生理活性^[19]。采用盐酸等酸类对黄酮苷类化合物进行酸水解是进一步提高其抗氧化活性的有效手段^[17-19]。实验室在前期研究中也发现, 荷叶中黄酮类化合物含量较高^[7-8]。但是, 酸水解是否能进一步提高其有效部位抗氧化能力? 目前尚未见相关报道。

因此, 本文在实验室及前人研究基础上, 首先采

用系统溶剂法将荷叶提取物划分为四个极性部位, 通过评价这四个部位及粗提物抗氧化活性的强弱确定有效部位; 其次采用盐酸对有效部位进行水解, 以进一步提高该部位抗氧化活性。本文研究结果以期为后续阐明荷叶抗氧化物质基础、开发相关抗氧化功能食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与化学试剂

1.1.1 化学试剂

三吡啶三吡嗪(TPTZ, 2,4,6-tris-2-pyridyl-s-triazine)、1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)、氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium Blue chloride, NBT)、菲洛嗪[(3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt, Ferrozine]购自Sigma公司, 其余化学试剂均为分析纯或优级纯。

1.1.2 试验材料

荷叶, 购自江西九江黄庆仁栈华氏大药房, 产地湖北, 湖北金贵中药饮片有限公司包装。荷叶粉碎过60目筛后置冰箱中备用。测定其水分含量为9.94%。

1.2 主要仪器、设备

紫外可见分光光度计, TU-1901, 北京普析通用仪器有限责任公司; 离心机, DL-5C, 上海安亭科学仪器厂; pH计, PB-10, Sartorius 仪器有限公司; 万分之一天平, BS224S, Sartorius 仪器有限公司; 三频恒温数控超声波清洗器, KQ-300GVDV, 昆山市超声仪器有限公司; 冷冻干燥机, LGJ-10, 巩义市予华仪器有限责任公司; 真空干燥箱, DZF-300, 郑州长城科工贸有限公司; 恒温振荡器, SHA-B, 常州国华电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 采用系统溶剂法对荷叶抗氧化活性物质进行提取与分离

采用Jiang et al^[15]系统溶剂法对荷叶抗氧化活性物质的提取及处理流程如图1所示。称取420 g原料粉末, 以甲醇为提取液, 采用料液比1:10(m/V, g/mL)、

60 °C水浴提取 50 min, 共提取三次, 提取液合并定容后取出其中 1/10 体积作为粗提液, 剩余 9/10 部分浓缩至合适浓度后采用极性逐渐增大的有机溶剂正己烷、乙酸乙酯和正丁醇依次梯度萃取获得相应的极性部位, 最后剩余水相, 这四个极性部位连同粗提液浓缩后真空干燥以除去溶剂获得浸膏, 浸膏超声辅助与水充分混合后置-70 °C冰箱冷冻过夜后冷冻干燥, 分别获得荷叶粗提物、正己烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相干粉, 置干燥器中供后续测定分析。

1.3.2 抗氧化活性的测定

1.3.2.1 总还原力测定

采用江慎华等^[20]与Pan et al^[21]方法, 略有修改。取 0.5 mL 样液于试管中, 依次加入 1.25 mL 磷酸缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 6.6) 和 1.25 mL 1% 铁氰化钾溶液 (K₃Fe(CN)₆), 50 °C 水浴 20 min 后快速冷却, 再加入 1.25 mL 10% 三氯醋酸溶液、4.5 mL 蒸馏水和 0.85 mL 0.1% FeCl₃ 溶液, 混合均匀、静置 10 min 后, 于 700 nm 处测定吸光度值 (OD 值)。

1.3.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定

采用江慎华等^[20]与Pan et al^[21]方法, 略有修改。取 1.0 mL 提取液于试管中, 加入 2.0 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液, 振荡摇匀。对照样为 1.0 mL 甲醇加 2.0 mL DPPH 溶液混合均匀, 常温避光反应 60 min 后, 于 517 nm 测定吸光度值。

$$\text{DPPH 自由基抑制率} / \% = \frac{(\text{OD}_{517 \text{ 对照}} - \text{OD}_{517 \text{ 样品}})}{\text{OD}_{517 \text{ 对照}}} \times 100$$

注: OD_{517 对照}-517 nm 下对照样品的吸光度值; OD_{517 样品}-517 nm 下不同浓度样品的吸光度值。

1.3.2.3 FRAP 法抗氧化能力的测定

采用江慎华等^[20]与Wijngaard et al^[22]方法, 略有修改。取 300 μL 样液于试管中, 再加入 3.0 mL FRAP 工作液, 37 °C 水浴中反应 50 min 后, 593 nm 处测定吸光度值。FRAP 工作液配制方法: 由①0.3 mol/L pH 3.6 乙酸钠缓冲液 (取 3.1 g 三水乙酸钠和 16 mL 乙酸用蒸馏水定容至 1000 mL)、②10 mmol/L TPTZ 溶液 (采用 40 mmol/L 优级纯盐酸为溶剂配制) 和③20 mmol/L FeCl₃ 以体积比 10:1:1 混匀, 现用现配。

1.3.2.4 超氧阴离子清除能力的测定

采用江慎华等^[20]与Duan et al^[23]方法, 略有修改。向试管中先后依次加入 2.7 mL 14.5 mmol/L 蛋氨酸、0.1 mL 3 mmol/L EDTA、0.1 mL 1.95 mmol/L NBT、1.0 mL 样液和 0.1 mL 60 μmol/L 核黄素, 混合均匀 (蛋氨酸、核黄素、EDTA 和 NBT 均采用 0.05 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液配制), 反应溶液在 25 °C 环境中由 2 个放置在试管架两边 20 W 荧光灯、均匀一致地照射 20 min 后, 于

560 nm 处测定吸光度值。

$$\text{超氧阴离子清除率} / \% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100$$

注: A_{对照}-对照样品的吸光度值; A_{样品}-不同浓度样品的吸光度值。

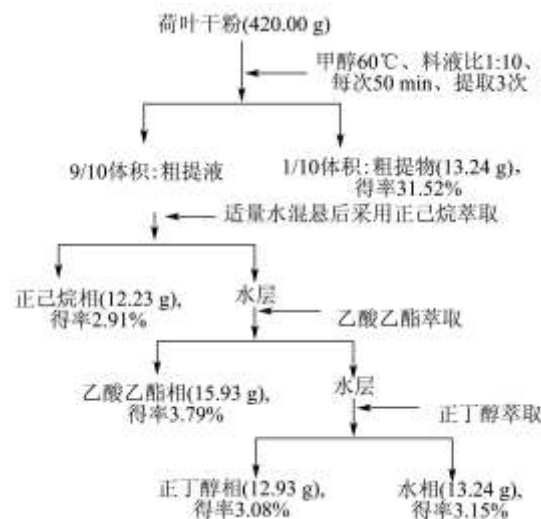


图 1 系统溶剂法处理流程图

Fig.1 The systematic scheme for solvent extraction

1.3.2.5 总抗氧化能力的测定

采用江慎华等^[20]与Pan et al^[21]方法, 略有修改。配制硫酸、磷酸钠和钼酸铵混合溶液 (各试剂终浓度为 0.6 mol/L 硫酸、28 mmol/L 磷酸钠和 4 mmol/L 钼酸铵)。取 0.4 mL 样液于试管中, 再加入 4.0 mL 上述混合溶液, 振荡均匀, 95 °C 水浴 90 min 后冷却, 695 nm 处测定吸光度值。

1.3.2.6 羟自由基清除能力的测定

采用江慎华等^[20]与Yang et al^[24]方法, 略有修改。取 0.5 mL 2 mmol/L FeSO₄ 加入试管, 依次加入 1 mL 6 mmol/L 水杨酸, 3 mL 样液, 0.5 mL 0.01% H₂O₂, 振荡均匀, 37 °C 水浴 1 h 后, 于 510 nm 处测定吸光度值。

$$\text{羟自由基的清除率} / \% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100$$

注: A_{对照}-对照样品的吸光度值; A_{样品}-不同浓度样品的吸光度值。

1.3.3 酸水解处理对荷叶有效部位抗氧化活性的影响

1.3.3.1 酸水解处理方法

采用沈勇根等^[19]方法, 略有修改。称取 0.05 g 荷叶有效部位粉末两份, 实验组加入 35 mL 甲醇、6 mL 25% 盐酸。对照组加入 35 mL 甲醇, 6 mL 蒸馏水, 混合均匀。实验组与对照组于 85 °C 水浴回流 2 h 后迅速冷却, 真空浓缩至干后采用甲醇定容。

1.3.3.2 采用 1.3.2 中方法评价酸水解处理对荷叶有效部位抗氧化活性的影响。

1.3.4 数据分析

试验均三次重复, 结果以平均值±标准偏差表示。采用 Excel (2003) 和 DPS (7.05) 软件对试验数据进行整理及统计分析。

2 结果与讨论

2.1 荷叶不同极性部位抗氧化活性的测定结果与分析

结果与分析

Pan et al^[21]采用总还原力、DPPH 自由基清除率、总抗氧化力为指标对密蒙花抗氧化活性的评价获得了满意的结果。Duan et al^[23]、Wijngaard et al^[22]和 Yang et al^[24]分别以超氧阴离子清除率、FRAP 法抗氧化能力和羟自由基清除率为指标对各自样品抗氧化能力进行评价, 均获得了良好的效果。本试验采用以上六种方法对荷叶不同极性部位抗氧化能力及酸水解对有效部位抗氧化能力的影响进行了评价, 测定结果如图 2~10 所示。

2.1.1 不同极性部位超氧阴离子清除能力

清除超氧阴离子实验原理为, 通过光照核黄素产生超氧阴离子, 然后还原 NBT 生成蓝色甲臍, 其在 560 nm 有最大吸收。样品在 560 nm 处吸光度值越小, 超氧阴离子清除能力越强^[19]。

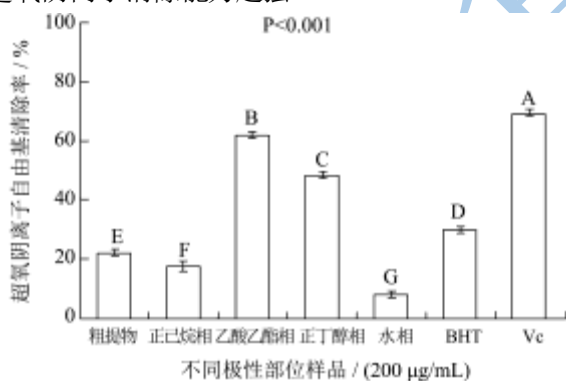


图 2 荷叶不同极性部位清除超氧阴离子能力

Fig.2 Percentage of superoxide anion radicals scavenged by lotus leaf fractions with different polarity

各样品 (200 μg/mL) 清除超氧阴离子自由基结果如图 2 所示。在不同极性部位样品中, 乙酸乙酯相清除率最高 ((62.14±0.74)%), 为最低清除率水相的 7.88 倍, 是清除超氧阴离子自由基的有效部位。各样品对超氧阴离子自由基清除率从高到低的排列次序依次为: 乙酸乙酯相 ((62.14±0.74)%) > 正丁醇相 ((48.52±0.48)%) > 粗提物 ((21.91±0.67)%) > 正己烷

相 ((17.79±1.75)%) > 水相 ((7.89±0.94)%) (P<0.001)。其中, 乙酸乙酯相和正丁醇相均高于同浓度的阳性对照 BHT。Li et al^[25]采用类似的系统溶剂法研究灵香草时也发现其乙酸乙酯部位清除超氧阴离子能力最强。

2.1.2 不同极性部位总抗氧化力

总抗氧化力的测定原理: 在酸性条件下, 样品中抗氧化物质可将 Mo⁶⁺还原成 Mo⁵⁺, Mo⁵⁺与磷酸形成磷酸-Mo⁵⁺绿色复合物, 该复合物在 695 nm 处有最大吸收, OD 值越大说明样品的抗氧化活性越高^[19]。

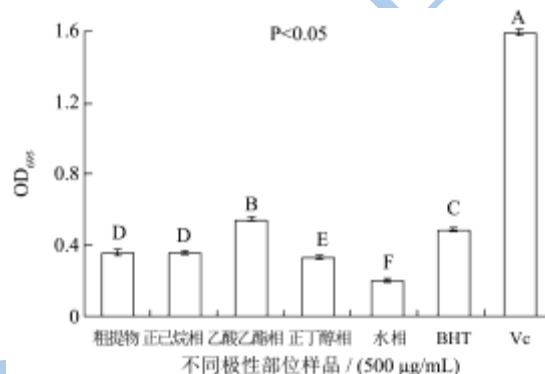


图 3 荷叶不同极性部位总抗氧化力

Fig.3 Total antioxidant power of lotus leaf fractions with different polarity

采用该方法对荷叶不同极性部位 (500 μg/mL) 总抗氧化力测定结果如图 3 所示。荷叶各极性部位及粗提物均显示出较好的总抗氧化能力, 仍以乙酸乙酯相能力最强, OD₆₉₅ 达 0.538±0.003, 为总抗氧化力的有效部位。水相总抗氧化力最弱 (P<0.05)。有效部位 OD₆₉₅ 尽管低于 Vc, 但却仍高于另一阳性对照 BHT (P<0.05)。有效部位与阳性对照的比较结果与超氧阴离子清除率中的比较结果相同。

2.1.3 不同极性部位羟自由基清除能力

清除羟自由基实验原理为: 通过 Fenton 反应 (Fe²⁺+H₂O₂→Fe³⁺+OH+ OH) 产生羟自由基, 而水杨酸通过吸收羟自由基形成有色物质, 加入清除剂后可减少有色物质的生成。OD 值越低表示清除率越高^[19]。

荷叶不同极性部位及粗提物 (500 μg/mL) 对羟自由基清除能力如图 4 所示。在五种不同样品中, 仍以乙酸乙酯相羟自由基清除率最高, 达 (90.55±1.22)% , 为清除羟自由基的有效部位。然后依次为正丁醇相、粗提物和水相, 正己烷相清除率最低 ((68.78±1.76)%)。与上述图 2-3 不同的是, 和阳性对照相比, 尽管乙酸乙酯相稍低于 Vc ((91.54±1.97)%) , 但却无显著性差异 (P>0.05)。Yu et al^[26]在研究中也发现瞿麦不同极性部位样品中, 也以乙酸乙酯部位对羟自由基清除能力最强, 为有效部位。

由荷叶不同极性部位与粗提物抗氧化能力(超氧阴离子清除率、总抗氧化、羟自由基清除能力)测定结果(图 2~4)及其从大到小排列顺序(表 1)可见,在荷叶粗提物及不同极性部位中,乙酸乙酯相对超氧阴离子、羟自由基清除能力和总抗氧化力均最强,表明乙酸乙酯相为荷叶抗氧化活性的有效部位。该有效部位抗氧化活性均强于阳性对照 BHT ($P<0.05$ 或 $P<0.001$),尽管低于阳性对照 Vc,但是,由于 Vc 为高纯度的分析纯,而荷叶有效部位仅为多种化合物构成的低纯度混合物,如将有效部位纯度进一步提高,其抗氧化能力有望能与 Vc 相媲美。相关分离、纯化工作正在进行中。

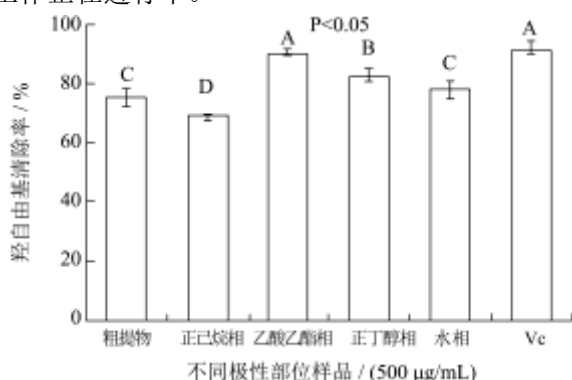


图 4 荷叶不同极性部位羟自由基清除能力

Fig.4 Percentage of hydroxyl radicals scavenged by lotus leaf fractions with different polarity

表 1 荷叶不同极性部分及粗提物抗氧化能力比较

Table 1 Comparison of antioxidant activity by different fractions and crude extract of lotus

超氧阴离子清除率	乙酸乙酯相>正丁醇相>粗提物 >正己烷相>水相
总抗氧化	乙酸乙酯相>正己烷相>粗提物 >正丁醇相>水相
羟自由基清除能力	乙酸乙酯相>正丁醇相>水相> 粗提物>正己烷相

Jiang et al^[15]、江慎华等^[27-28]、Chen et al^[29]在研究中均发现乙酸乙酯相为各自原料香椿、丁香、诃子和紫葳花抗氧化活性的有效部位。但是,Chua et al^[30]在研究土肉桂抗氧化活性时却发现,正丁醇相而非乙酸乙酯相为抗氧化有效部位。其中的原因在于不同原料所含的主要有效成分—总黄酮和总多酚在正己烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相中分布不同,一般均以总多酚含量最高的极性部位为有效部位。Jiang et al^[15]、江慎华等^[27]和 Chen et al^[29]研究结果均验证了这一点。在不同的抗氧化评价方法中,各样品抗氧化能力从大到小的排列顺序也稍有差别,各种原料均以乙

酸乙酯相抗氧化能力最强,但最弱的要么为极性最强的水相,要么为极性最弱的正己烷相,其它极性样品或粗提物抗氧化能力位于这两者之间。沈勇根等^[9]、Chen et al^[29]和 Chua et al^[30]也发现了类似的研究结果,各自样品除了有效部位不变外,不同极性部位和粗提物抗氧化活性在不同评价方法中排列顺序也有所变化,可能的原因在于不同的评价方法测定原理不同所致。

2.2 酸水解处理对荷叶有效部位抗氧化能力的影响

以上研究结果表明,乙酸乙酯部位是荷叶抗氧化活性的有效部位。实验室前期基础^[3]及相关学者^[1]研究结果表明,总黄酮是荷叶抗氧化活性的主要物质基础,而酸水解是进一步提高黄酮类化合物抗氧化活性的一种手段^[9]。

于是,本文采用盐酸对该有效部位进行水解处理,酸水解对荷叶有效部位抗氧化能力的影响结果如图 5-10 所示。

2.2.1 酸水解处理对有效部位总还原力的影响

总还原力的测定原理:样品把赤血盐($K_3Fe(CN)_6$)还原成黄血盐($K_4Fe(CN)_6$),黄血盐再与 Fe^{3+} 作用,生成的普鲁士蓝在 700 nm 处有最大吸收。吸光值愈高,试样还原力愈强^[7]。

酸水解处理对荷叶有效部位总还原力的影响结果如图 5 所示。水解处理后,有效部位总还原力得到显著性提高($P<0.001$), OD_{700} 值从水解前的 0.54 ± 0.024 提高到 0.802 ± 0.025 ,并显著高于阳性对照芦丁($P<0.001$),酸水解将荷叶有效部位总还原力提高了 48.5%。

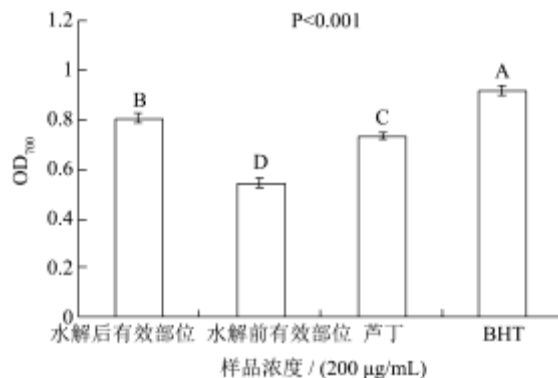


图 5 酸水解对有效部位总还原力的影响

Fig.5 Effect of acid hydrolysis on reducing power of the effective fraction

2.2.2 酸水解处理对有效部位 DPPH 清除率的

影响

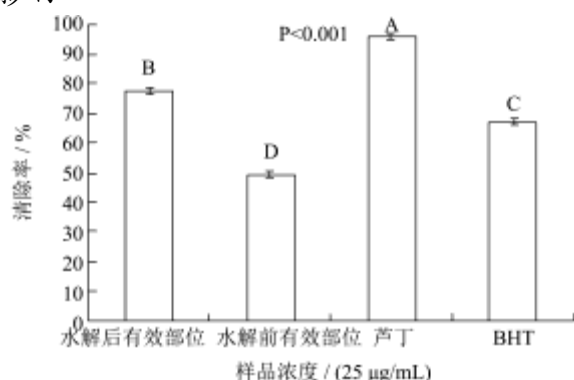


图 6 酸水解对荷叶有效部位 DPPH 清除率的影响

Fig.6 Effect of acid hydrolysis on the percentage of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenged by the effective fraction

DPPH是一种在 517 nm 下有最大吸收并能稳定存在的自由基。试样与 DPPH 结合会降低其吸光值，由此来判断样品清除能力。吸光值愈低，样品清除能力愈强^[7]。酸水解处理对荷叶有效部位 DPPH 清除能力的影响如图 6 所示。由该图可见，有效部位清除率从水解前的(48.9±0.6)%提高到水解后的(77.37±0.35)%，清除率得到了显著性增强 (P<0.001)，由水解前低于阳性对照 BHT 到水解后显著性高于 BHT (P<0.001)，水解后清除率为水解前的 1.58 倍。

2.2.3 酸水解处理对有效部位 FRAP 抗氧化能力的影响

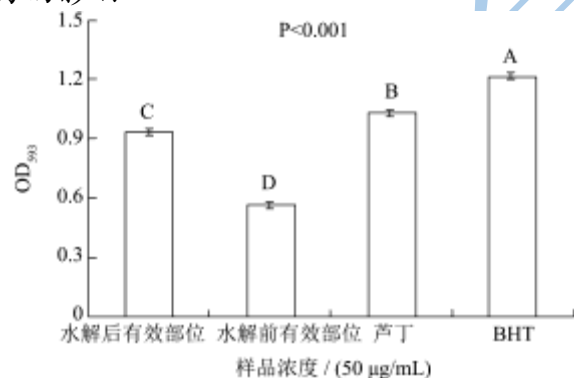


图 7 酸水解对有效部位 FRAP 抗氧化能力的影响

Fig.7 Effect of acid hydrolysis on ferric reducing ability of plasma (FRAP) values of the effective fraction

FRAP 法抗氧化能力的测定原理是：酸性条件下抗氧化剂还原 Fe³⁺-TPTZ，产生在 593 nm 有最大吸收的蓝色 Fe²⁺-TPTZ 化合物^[7]。酸水解处理对荷叶有效部位 FRAP 抗氧化能力的影响如图 7 所示。经过酸水解后，荷叶有效部位 OD₅₉₃ 从水解前 0.569±0.003 提高到 0.935±0.011，OD₅₉₃ 增幅达 64.3%。酸水解处理使得荷叶有效部位 FRAP 法抗氧化能力也得到极显著提高 (P<0.001)。

2.2.4 酸水解处理对有效部位超氧阴离子清除率的影响

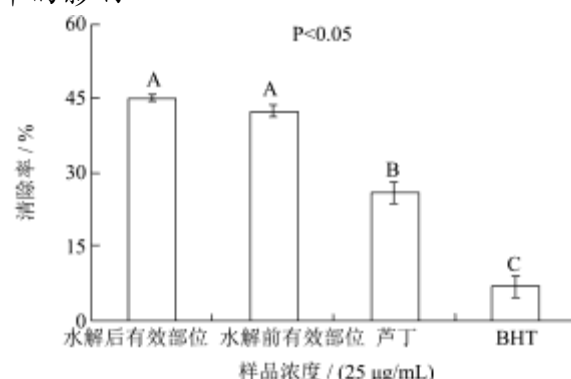


图 8 酸水解对有效部位清除超氧阴离子清除率的影响

Fig.8 Effect of acid hydrolysis on the percentage of superoxide anion radicals scavenged by the effective fraction

酸水解处理对荷叶有效部位超氧阴离子清除率的影响如图 8 所示。由该图可见，处理后有效部位超氧阴离子清除率从(42.43±1.23)%提高到(44.97±0.22)%。此处，尽管清除能力得到了提高，但没有显著性差异 (P>0.05)。荷叶有效部位酸水解前后清除率都显著高于阳性对照芦丁 ((25.8±2.24)%) 和 BHT ((6.41±2.57)%) (P<0.001)。

2.2.5 酸水解处理对有效部位总抗氧化力的影响

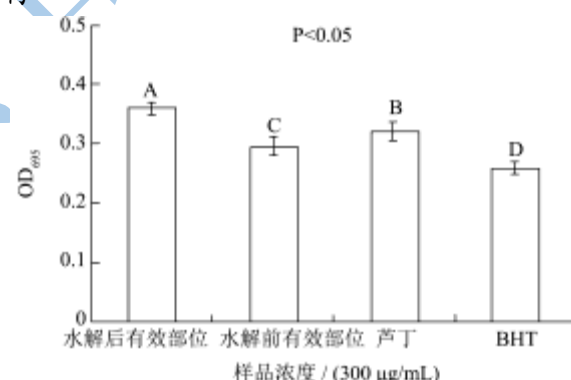


图 9 酸水解对有效部位总抗氧化力的影响

Fig.9 Effect of acid hydrolysis on total antioxidant power of the effective fraction

酸水解处理对荷叶有效部位总抗氧化力的影响如图 9 所示。水解处理后有效部位总抗氧化力得到较大幅度升高，OD₆₉₅ 从水解前的 0.289±0.015 显著性提高到 0.364±0.01 (P<0.05)，增加幅度达 22.1%。有效部位水解后总抗氧化力显著高于 2 个阳性对照 BHT 和芦丁 (P<0.05)。

2.2.6 酸水解处理对有效部位羟自由基清除率的影响

酸水解处理对荷叶有效部位羟自由基清除能力的影响如图 10 所示。样品经水解处理后羟自由基清除率

也得到显著性提高 ($P < 0.001$), 清除率从水解前的 (35.52 ± 1.87)% 升高到 (72.63 ± 0.65)%, 水解后清除率是水解前的 2.04 倍, 从水解前低于阳性对照银杏叶提取物 (GBE) 到水解后高于该阳性对照 ($P < 0.001$)。

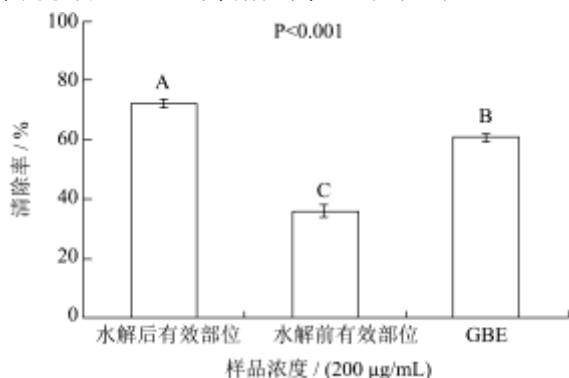


图 10 酸水解对有效部位羟自由基清除率的影响

Fig.10 Effect of acid hydrolysis on the percentage of hydroxyl radicals scavenged by the effective fraction

由图 5~10 可知, 酸水解处理能进一步增强荷叶有效部位抗氧化活性。Bouaziz et al^[31]与沈勇根等^[9]在研究中也分别发现酸水解能提高橄榄提取物和丁香有效部位抗氧化能力。其中主要的原因可能是酸水解处理过程中荷叶有效部位中的黄酮苷类化合物所含的糖苷键发生水解、断裂, 生成了相应的黄酮苷元, 而有报道称苷元比糖苷具有更强的抗氧化活性^[19, 32]。

3 结论

3.1 荷叶抗氧化活性物质主要位于乙酸乙酯弱极性部位, 该部位是其抗氧化性的有效部位。抗氧化能力最强的乙酸乙酯相与能力最弱的其它部位相比, 结果如下: 超氧阴离子清除率为水相的 7.88 倍, 总抗氧化能力为水相 2.86 倍, 羟自由基清除率为正己烷相的 1.32 倍。

3.2 酸水解处理能进一步显著性提高荷叶有效部位抗氧化活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。与水解前相比, 该有效部位水解后总还原力、DPPH 清除率、FRAP 抗氧化能力 (OD593)、总抗氧化力 (OD695) 和羟自由基清除率增幅分别为 48.52%、58.22%、64.3%、22.15% 和 100.48%, 超氧阴离子清除率从 (42.43 ± 1.23)% 提高到 (44.97 ± 0.22)%。

参考文献

[1] Prior R L, Wu X. Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health [J]. American Journal of Biomedical Sciences, 2013, 5(2): 126-139

[2] İnanç T, Maskan M. Testing the antioxidant effect of essential oils and BHT on corn oil at frying temperatures: a response

surface methodology [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2013, 90(12): 1845-1850

- [3] 周勇, 杜先锋, 江慎华, 等. 荷叶活性物质超声微波辅助提取比较及人工胃液处理对其抗氧化活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 106-109
- ZHOU Yong, DU Xian-feng, JIANG Shen-hua, et al. Comparison of ultrasound and microwave-assisted extractions of bioactive components from lotus leaf and effect of the artificial gastric juice immersion on the antioxidant activities [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(17): 106-109
- [4] Ma C, Wang J, Chu H, et al. Purification and characterization of aporphine alkaloids from leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn and their effects on glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(3): 3481-3494
- [5] Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, et al. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 106(2): 238-244
- [6] Huang B, Ban X, He J, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves [J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 873-878
- [7] Jiang S H, Li H Q, Ma H L, et al. Antioxidant activities of selected Chinese medicinal and edible plants [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011, 62(5): 441-444
- [8] 江慎华, 马海乐, 王昌禄, 等. 荷叶活性物质提取工艺与抗氧化活性研究 [J]. 农业机械学报, 2010, 41(7): 141-146
- JIANG Shen-hua, MA Hai-le, WANG Chang-lu, et al. Extracting technology and antioxidant activity of bioactive components from lotus leaf [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2010, 41(7): 141-146
- [9] Wu M, Wang L, Weng C, et al. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2003, 31(5): 687-698
- [10] Choe J, Jang A, Choi J, et al. Antioxidant activities of lotus leaves (*Nelumbo nucifera*) and barley leaves (*Hordeum vulgare*) extracts [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(3): 831-836
- [11] Lin H, Kuo Y, Lin Y, et al. Antioxidative effect and active components from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 6623-6629
- [12] Huang B, He J, Ban X, et al. Antioxidant activity of bovine

- and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf [J]. *Meat Science*, 2011, 87(1): 46-53
- [13] 王劫,陈俊鹏,陈鹏,等.日粮添加荷叶提取物对黄羽肉鸡抗氧化功能及肌肉品质的影响[J].*中国畜牧兽医*,2011, 38(2): 17-20
- WANG Jie, CHEN Jun-peng, CHEN Peng, et al. Effects of dietary supplementation of lotus leaves extract on antioxidant ability and meat quality of yellow broilers [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(2): 17-20
- [14] 冀春茹,王浴铭,刘延泽,等主编.中药化学实验技术与实验[M].郑州:河南科学技术出版社,1986
- JI Chun-ru, WANG Yu-ming, LIU Yan-ze, et al. The experimental technology and experiments of chemistry of Chinese traditional medicine [J]. Zhouzhou: Henan Science and Technology Press, 1986
- [15] Jiang S H, Wang C L, Chen Z Q, et al. Antioxidant properties of the extract and subfractions from old leaves of *Toona sinensis* [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2009, 33(3): 425-441
- [16] Gao H, Huang Y N, Xu P Y, et al. Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(2): 628-634
- [17] 江慎华,周勇,肖通奋,等.酸水解处理对荷叶抗氧化活性的影响. *食品工业科技*,2012,3(18):147-151
- JIANG Shen-hua, ZHOU Yong, XIAO Tong-fen, et al. Effect of hydrochloric acid hydrolysis on antioxidant property of lotus leaf [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 3(18): 147-151
- [18] Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees [J]. *Food Chemistry*,2007, 104(3): 1106-1114
- [19] 沈勇根,蔡志鹏,江慎华,等.丁香非挥发性成分抗氧化活性[J].*农业机械学报*,2012,43(10):131-137
- SHEN Yong-gen, CAI Zhi-peng, JIANG Shen-hua, et al. Antioxidant activity of non-volatiles from clove [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2012, 43(10): 131-137
- [20] 江慎华,蔡志鹏,廖亮,等.丁香抗氧化活性物质提取及人工胃肠液对其活性的影响[J].*农业机械学报*,2012,43(7): 149-155
- JIANG Shen-hua, CAI Zhi-peng, LIAO Liang, et al. Extraction of antioxidants from clove and effect of artificial gastrointestinal juice immersion on its antioxidant properties [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2012, 43(7): 149-155
- [21] Pan Y, He C, Wang H et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(2): 497-502
- [22] Wijngaard H H, R  ble C, Brunton N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 202-207
- [23] Duan X W, Jiang Y M, Su X G, et al. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(4): 1365-1371
- [24] Yang G M, Wang D, Tang W, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of oxytropis falcata fractions and its possible anti-inflammatory mechanism [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2010, 8(4): 285-292
- [25] Li H Y, Hao Z B, Huang X L, et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 970-974
- [26] Yu J O, Liao Z X, Lei J C, et al. Antioxidant and cytotoxic activities of various fractions of ethanol extract of *Dianthus superbus* [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(3): 1215-1219
- [27] 江慎华,王书源,马海乐,等.丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究[J].*农业机械学报*,2010,1:132-138
- JIANG Shen-hua, WANG Shu-yuan, MA Hai-le, et al. Extracting technology and antioxidant activity of bioactive components from clove [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2010, 1: 132-138
- [28] 江慎华,肖敏,江春霞,等.生物活性追踪法对丁香抗低密度脂蛋白氧化修饰的研究[J].*现代食品科技*,2013,29(9): 2063-2067
- JIANG Shen-hua, XIAO Min, JIANG Chun-xia, et al. Oxidation modification of clove anti-low-density-lipoprotein by bio-assay guided method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2063-2067
- [29] Chen F A, Wu A B, Shieh P, et al. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa* [J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(1): 14-18
- [30] Chua M T, Tung Y T, Chang S T. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1918-1925
- [31] Bouaziz M, Graye R J, Simmonds M S J, et al. Identification

and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(2): 236-241

[32] Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10):572-584

