

陈皮提取物中黄酮类化合物及 抗氧化的研究

王卫东¹, 赵志鸿¹, 张小俊¹, 陈复生²

(1 河南省医学科学研究所, 河南 郑州 450052 2 河南工业大学, 河南 郑州 450052)

摘要: 研究陈皮中提取的黄酮类化合物及抗氧化性。通过测定陈皮提取物中黄酮含量及主要抗氧化黄酮类化合物成分——川陈皮素, 研究了陈皮黄酮类提取物的总抗氧化能力及抑制有机自由基(DPH)、羟自由基的能力。结果表明: 陈皮提取物中川陈皮素含量为 0.134%, 陈皮提取物黄酮类化合物其总抗氧化能力、抑制有机自由基(DPH)、羟自由基与提取物黄酮类化合物浓度有很强的量效关系, 陈皮中提取的黄酮类化合物具有较强抗氧化活性。

关键词: 陈皮, 黄酮类化合物, 抗氧化

中图分类号: TS201 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)09-0098-04

黄酮类化合物具有抗氧化、消除自由基的能力。陈皮中含有丰富的黄酮物质, 具有多种生物活性, 特别是抗氧化活性^[1]。近年来研究发现, 桔皮中所特有的多甲氧基类黄酮成分还有明显的抑制肿瘤的作用^[2]。本实验对陈皮中提取的黄酮类化合物不仅测定了总黄酮含量, 还测定了其中含有的多甲氧基类黄酮——川陈皮素的含量。并通过测定提取物的总抗氧化能力、及对 DPH 有机自由基、羟自由基清除作用测定其抗氧化活性, 为进一步研究陈皮中提取的黄酮类化合物及其开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2007-02-05

作者简介: 王卫东(1965-), 男, 副研究员, 主要从事营养保健食品研究与开发方面的工作。

基金项目: 河南省科技攻关项目 部分内容(0324290039)。

陈皮 购于郑州仟禧堂药店; 芦丁标准品 Fluka 进口分装; 四氢呋喃(色谱纯) 天津市科密欧化学试剂开发中心; 乙腈(色谱纯) 天津市四友生物医学技术有限公司; 2,2-二苯-1-苦肟基(DPPH) Fluka 公司; 测试试剂盒 南京建成生物工程研究所; D101 型大孔树脂 河北沧州宝恩化工有限公司; 其他试剂为分析纯。

TU-1800PC 型紫外可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; 721 分光光度计 上海第三分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制^[3] 准确称取芦丁标准试剂 0.0302g 用 30% 乙醇溶解, 并完全转入 100mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇定容, 分别取上述芦丁标准溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mL 于 25mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇补至 12.5mL, 加入 0.7mL 1% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 放置 5min, 加入 0.7mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液。摇匀, 6min 后加入 5mL 1mol/L NaOH 溶液, 摇匀, 用 30% 乙醇稀释定容至刻度, 10min 后于波长 500nm 处比色测定(以零管为空白)。

1.2.2 陈皮黄酮的提取制备^[4] 陈皮黄酮的提取工艺为: 脱脂→乙醇浸提→浓缩→精制→干燥。采用石油醚对陈皮进行脱脂处理, 脱脂时间 2.5h。提取时间 1h, 水浴温度 52℃, 乙醇浓度 73%, 液料比 8, 提取次数一次, 选用 D101 型大孔树脂精制。

1.2.3 黄酮含量的测定 准确称取陈皮提取物用 30% 甲醇溶解, 定容至 250mL 容量瓶中充分混合。准确量取 1mL, 定容于 25mL 容量瓶中, 按 1.2.1 测定其在 500nm 处的吸光度。然后在芦丁标准曲线上查出相应的类黄酮含量。样品中类黄酮含量按以下公式计算:

$$X = \frac{Y \times 25 \times 250}{1000 \times 1 \times m} \times 100\%$$

[19] Steinkraus K H, Cullen R R, Pederson C S et al Handbook of indigenous fermented foods[M]. New York: Marcel Dekker, 1983.

[20] Dung N T P, Ronbouts FM, Nout M J R. Development of

defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2005(6): 429-441.

式中: x —样品中类黄酮含量, %; y —芦丁标准曲线上相应的浓度, g/L; m —样品质量, g

1.2.4 川陈皮素含量的测定^[5]

1.2.4.1 试剂的配制

对照品溶液的配制: 取川陈皮素对照品约 3mg 精确称定 (实称 3.20mg), 置 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精确吸取此溶液 1.00mL 置 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 滤膜滤过, 弃去初滤液, 收集续滤液, 得川陈皮素对照品溶液, 浓度 0.032mg/mL。

试品溶液的配制: 取陈皮乙醇提取物约 100mg 精密称定 (实称 101.50mg), 置 25mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 放置过夜, 稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 滤膜滤过, 弃去初滤液, 收集续滤液, 即得供试品溶液。

1.2.4.2 色谱条件 RP-HPLC 法, 德国 CenturySIL C₁₈ BDS 柱 (150mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m), 室温, 流动相: 四氢呋喃-乙腈-甲醇-水 (15:5:25:55), 流速: 0.6mL/min, 检测波长: 328nm。

1.2.4.3 测定方法 吸取对照品溶液 5 μ L, 2次进样; 吸取试品溶液 10 μ L, 3次进样, 于 1.2.4.2 色谱条件下测定。

1.2.5 总抗氧化能力的测定^[6] 准确称取已制备的陈皮黄酮提取物, 用蒸馏水溶解, 配成陈皮提取物浓度为 10mg/L 的溶液, 溶液用蒸馏水稀释成 0.5、1、2、4、5、8mg/L 测定液备用。采用 Fe³⁺ 还原试剂盒法, 具体操作参考南京建成生物工程研究所提供的总抗氧化能力的测定试剂盒说明书。总抗氧化能力计算按下式:

$$\text{总抗氧化能力 (u/mL)} = \frac{\text{测定管 OD} - \text{对照管 OD}}{0.01 \times 30} \times \frac{\text{反应体积 (mL)}}{\text{取样量 (mL)}} \times \text{样品稀释倍数}$$

单位定义为: 在 37℃ 下, 每分钟每 mL 测定液使反应体系吸光度增加 0.01 为一个总抗氧化能力单位 (u/mL)。

1.2.6 对有机自由基的清除作用的研究^[6] 陈皮提取物溶液用蒸馏水制成 50、100、150、200、400、600mg/L 测定液备用, 同时配制 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液。分别取各浓度提取物测定溶液 2.00mL, 加入 DPPH 乙醇溶液 2.00mL, 摇匀后放置 30min 以溶剂为对照, 分别测定在 517nm 处的吸光度值 A_i 。然后取各浓度提取物溶液 2.00mL, 与 2.00mL 乙醇溶液混合后在 517nm 处的吸光度值 A_0 。再测 2.00mL DPPH 乙醇溶液于 2.00mL 溶剂混合后在 517nm 处的吸光度值 A_c 。自由基的清除能力用抑制率 K 表示。计算按下式:

$$K = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

1.2.7 对羟自由基的清除作用的研究^[7] 准确称取陈皮提取物 100mg 溶于 100mL 蒸馏水中, 制成 1000mg/L 陈皮提取物溶液。用蒸馏水将该溶液稀释成 10、50、100、200、400、600mg/L 测定液备用。15mL 试管中依次加入 2mmol/L 的水杨酸 2mL, 摇

匀, 与 37℃ 水浴中加热 15min 取出, 于 510nm 处测吸光度 A_1 , 再加入一定浓度的陈皮提取物溶液 1mL, 摇匀。水浴继续加热 15min 后取出, 于 510nm 处测吸光度 A_2 。自由基的清除能力用清除率表示, 计算按下式:

$$\text{清除率} = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100\%$$

(A_1 —对照吸光度值; A_2 —测定吸光度值)

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的确定

表 1 芦丁标准液浓度与吸光度值

芦丁标准浓度 (mg/L)	0	12.10	24.30	48.60	72.80	97.10
吸光度 A	0	0.132	0.253	0.508	0.729	0.972

用 CurveExpert 1.3 软件处理以上数据, 以芦丁标准液浓度为横坐标绘制出芦丁标准曲线:

$$y = 0.0099x + 0.0095$$

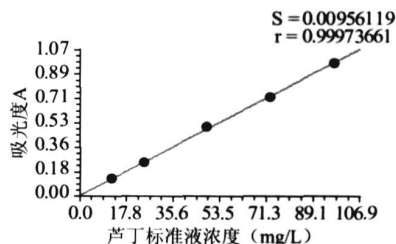


图 1 芦丁标准曲线

2.2 陈皮提取物黄酮含量的测定

准确称取陈皮提取物 1.215g 按 1.2.3 操作, 测得吸光度三次, 测得吸光度平均值为 0.482, 于标准曲线查得浓度为 47.5mg/L。通过 1.2.3 中的公式计算出制备的陈皮提取物中黄酮含量为 24.43%。

2.3 川陈皮素含量的测定

川陈皮素, 又称蜜橘黄素 (Nobiletin), 是从芸香科植物橘皮的干燥成熟果皮中提取出来的一种多甲氧基黄酮类化合物。近年来, 人们的注意力已转向对柑桔属中多甲氧基黄酮的研究^[2], 因为它有许多特殊的作用。多甲氧基黄酮可做为柑桔分类的标识物, 柑桔中的多甲氧基黄酮具有重要的药理学作用。柑桔中的多甲氧基黄酮较常见的是川陈皮素、七甲氧基黄酮。

本课题组左锦静通过显色反应、紫外-可见吸收光谱以及质谱分析等实验结果分析^[8], 推断出陈皮抗氧化剂具有强抗氧化能力, 其中起主要作用的是黄酮类化合物, 对于陈皮抗氧化剂来说, 起抗氧化作用的组分主要是川陈皮素 (Nobiletin) 和七甲氧基黄酮 (Heptanethoxyflavone) 等。

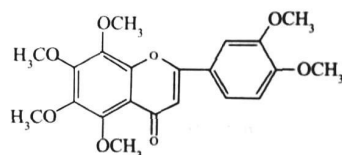


图 2 川陈皮素结构式

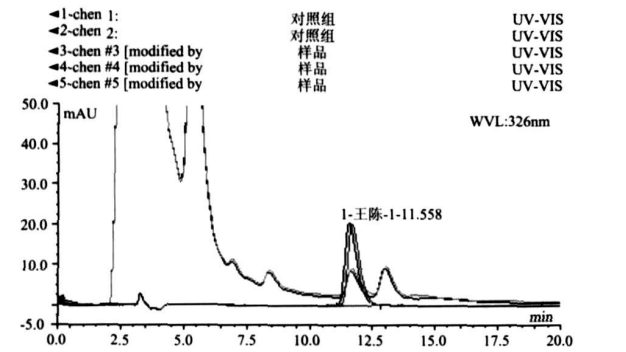


图 3 川陈皮素测定色谱图

表 2 川陈皮素色谱测定数据

名称	RetTime (min)	Area (mAU·min)	Amount (μg)	均值 (μg)
对照品 1	11.558	11.4957	0.16	
对照品 2	11.675	11.2227	0.16	0.16
样品 1	11.683	4.0024	0.0564	
样品 2	11.633	3.7926	0.0534	0.0544
样品 3	11.650	3.7839	0.0533	

由表 2 数据计算陈皮提取物中川陈皮素含量为 0.134%。

川陈皮素是从植物中分离出的黄酮化合物, 已经证明它有多种重要的生物活性, 如抗血栓形成等, 此类化合物具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 曾有用柑桔黄酮为原料制备的报道^[2]。

2.4 总抗氧化能力的测定

对实验数据按 1.2.5 中公式计算和处理结果如表 3 所示。

表 3 总抗氧化能力

提取物浓度 (mg/L)	黄酮浓度 (mg/L)	总抗氧化能力 (u/mL)
0.5	0.122	3.294
1	0.244	6.588
2	0.488	13.176
4	0.976	26.352
5	1.270	32.341
8	1.952	52.703

从表 3 可以看出, 陈皮提取物的总抗氧化能力较强, 表现出明显的量效关系, 以提取物浓度为横坐标, 总抗氧化能力为纵坐标, 用 CurveExpert 1.3 软件处理数据得线性方程为: $y = 26.6569x - 0.0361$, 相关系数为: 0.9992。以陈皮提取物中的黄酮含量计, 在实验范围内, 黄酮含量与总抗氧化能力呈线性相关。

2.5 对有机自由基的清除作用

对实验数据按 1.2.6 公式计算和处理结果如表 4 所示。

从表 4 及图 5 可看出陈皮黄酮提取物有较强地清除有机自由基能力, 黄酮浓度为 24.4mg/L 时, 对有机自由基抑制率达到 41.74%。

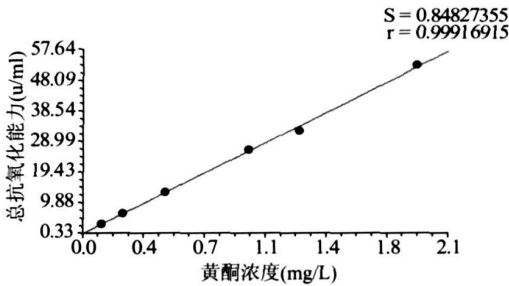


图 4 陈皮提取物浓度与总抗氧化能力线性关系图

表 4 对有机自由基的清除作用

提取物浓度 (mg/L)	黄酮浓度 (mg/L)	抑制率 (%)
50	12.2	28.17
100	24.4	41.74
150	36.6	51.57
200	48.8	69.65
400	97.6	77.13
600	146.4	93.34

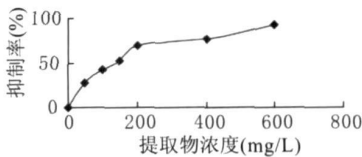


图 5 陈皮提取物对有机自由基的作用

2.6 对羟自由基的清除作用实验

按照 1.2.7 中公式计算处理数据, 陈皮提取物对羟自由基的清除作用实验结果见表 5。

表 5 对羟自由基的清除作用

提取物浓度 (mg/L)	黄酮浓度 (mg/L)	抑制率 (%)
10	2.44	8.72
50	12.2	15.20
100	24.4	18.62
200	48.8	28.31
400	97.6	35.41
600	146.4	51.23

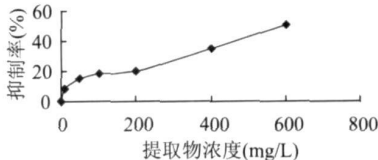


图 6 提取物对羟自由基的清除作用

羟自由基对生物组织具有较强的危害, 是一种氧化能力很强的自由基。它可以发生电子转移, 参与夺氢反应和羟基化等反应, 可以使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类发生氧化, 使它们遭受损伤和破坏。羟自由基与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关, 因此对清除 OH· 的研究, 开发保健品市场具有十分重要的实际意义。

3 结论

实验结果显示: 本实验提取制备的陈皮黄酮类化合物, 总黄酮含量较高, 达 24.43%。多甲氧基类黄 (下转第 103 页)

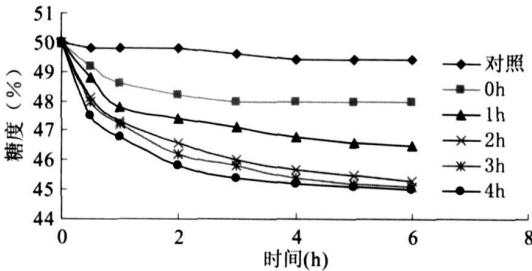


图 5 α-淀粉酶处理时间对板栗果脯渗糖的影响

增加, 栗仁褐变程度增加, 软化度增加, 透明度先增加后减少。褐变增加可能是由于酶水解产生的还原糖羰基反应的结果; 软化度的增加主要是交叉融冻处理和 α-淀粉酶将淀粉水解综合作用的结果; 透明度的先增加主要是淀粉水解后使得果脯透明度加强, 后期又减少可能是褐变的程度增加影响了果脯的透明度。综合其三个因素, α-淀粉酶处理 2h 的效果最佳。

表 1 α-淀粉酶处理时间工艺对板栗品质的影响

处理时间 (h)	褐变	软化度	透明度
对照	80	20	40
0	70	70	50
1	65	75	70
2	60	80	80
3	55	80	70
4	50	80	65

3 结论

3.1 交叉融冻处理能明显改善淀粉酶在果脯中的作用效果。为淀粉酶在果脯中的应用提供了有效的途径。

3.2 α-淀粉酶处理能明显改善板栗果脯的软化度和透明度, 但同时也会使得果脯褐变程度增加。

3.3 综合以上各方面的实验, 我们得出经交叉融冻处理后的淀粉酶在低糖板栗果脯加工中的最佳酶处理时间为 2h。

参考文献:

[1] S Pereira- Lorenzo a, A M Ramos- Cabrera et al Chemical composition of chestnut cultivars from Spain [J] . Scientia Horticulturae, 2006, 107: 306~ 314.

[2] J De La Montan a M igueza M Miguez Bema rdeza et al Composition of varieties of chestnuts from Galicia (Spain) [J] . Food Chem istry, 2004, 84: 401~ 404.

[3] Choo Effects of Molecular Structural Changes of Chestnut Starch on Starch and its Gels Properties [J] . Korean Journal of Food Science and Technology, 1995, 27 (6): 1017~ 1027.

[4] 李志西, 张莉, 等 . 板栗淀粉特性研究 [J] . 西北农业大学学报, 2000(8): 21~ 26.

[5] 徐志祥, 董海洲, 高绘菊 . 改善板栗果脯软化度的关键技术研究 [J] . 食品工业与发酵, 2004(9): 59~ 61.

[6] 陆道礼, 等 . 低糖板栗脯加工工艺研究 [J] . 江苏农业科学, 2004(6): 131~ 133.

[7] Hameet K, Sodhi Kanupriya Shama. Production of a thermostable α- amylase from Bacillus sp. PS- 7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production process [J] . Biochemistry, 2005, 40: 525 ~ 534.

[8] Jinsen Xu. The effect of low- temperature storage on the activity of polyphenol oxidase in Castanea henryi chestnuts [J] . Postharvest Biology and Technology, 2005, 38: 91~ 98.

[9] 张水华, 等 . 食品分析 [M] . 中国轻工业出版社, 2004: 136~ 141.

[10] 黄伟坤, 等 . 食品检验与分析 [M] . 中国轻工业出版社, 2000: 54~ 55.

[11] 高海生, 等 . 板栗贮藏与加工 [M] . 金盾出版社, 2004: 70~ 72.

[12] 袁秀红 . 板栗仁褐变因素及控制方法研究 [D] . 中国农业大学, 2004.

[13] 郭森, 王传凯 . 低糖果脯保藏性的研究 [J] . 食品工业科技, 2004(9): 75~ 78.

(上接第 100 页)

酮——川陈皮素的含量达 0.134%。具有较强的抗氧化能力。总抗氧化能力 (T-AOC) 有明显的量效关系, 具有较强的抑制有机自由基 DPPH 和羟自由基的抗氧化活性。实验制备的陈皮黄酮提取物, 如若作为保健食品功能因子必将取得良好的效果。

参考文献:

[1] 贾冬英, 姚开, 吕远平, 等 . 柑桔类黄酮抗氧化活性研究进展 [J] . 广州食品工业科技, 2002, 18(4): 66~ 68.

[2] 唐传核 . 植物功能性食品 [M] . 北京: 化学工业出版社, 2004: 197~ 200.

[3] 陈运中 . 苦荞麦黄酮含量的测定 [J] . 食品科学, 1998

19(3): 54~ 55.

[4] 左锦静, 陈复生, 姚永志 . 陈皮中黄酮类化合物的最佳提取工艺 [J] . 食品研究与开发, 2005, 26(3): 61~ 64.

[5] 钱士辉, 朱玲英, 陈廉 . RP-HPLC 法测定陈皮药材中川陈皮素的含量 [J] . 南京中医药大学学报, 1998, 14 (4): 219 ~ 220.

[6] 严建刚, 张名位, 杨公明, 等 . 芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究 [J] . 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2005, 33(1): 131~ 134.

[7] 左锦静 . 陈皮甘草抗氧化活性成份提取及抗氧化作用研究 [D] . 河南工业大学硕士学位论文, 2005.