

豆腐柴叶总黄酮不同溶剂级 分抗氧化活性分析

熊双丽^{1,2}, 马楠¹, 廖婷婷¹, 薛朝云³

(1.西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010;

2.四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心, 四川绵阳 621010;

3.江油市春雨生态农业科技有限公司, 四川江油 621700)

摘要:采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、羟自由基、超氧阴离子、还原力、总抗等体外抗氧化活性模型和抗氧化活性综合评价指数,分析四川江油地区不同溶剂萃取的豆腐柴黄酮级分(乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、氯仿、水)的抗氧化活性。结果显示,不同浓度乙醇提取总黄酮的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除活性最高。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除率、羟基自由基清除率、ABTS阳离子自由基清除率、总抗和还原力皆随乙醇浓度的升高而呈现先增强后减弱的趋势,超氧阴离子自由基清除率却随乙醇浓度增加一直降低。综合评价指数显示不同浓度乙醇抗氧化活性依次为75%醇提取物>65%醇提取物>55%醇提取物>85%醇提取物>95%醇提取物。乙酸乙酯层萃取物的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除率、总抗、还原力及ABTS阳离子自由基清除率要优于其它各萃取层。正丁醇层萃取物的超氧阴离子自由基清除率要优于其它各萃取层。乙酸乙酯层抗氧化活性最佳。豆腐柴叶总黄酮有较好的抗氧化活性,可作为抗氧化剂或者健康食品原料开发。

关键词:豆腐柴,黄酮,分级分离,抗氧化

Antioxidant activity of flavone with different solvent extracts from *Premna microphylla* Turcz leaves

XIONG Shuang-li^{1,2}, MA Nan¹, LIAO Ting-ting¹, XUE Chao-yun³

(1.School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2.Engineering Research Center for Biomass Resource Utilization
and Modification of Sichuan Province, Mianyang 621010, China;

3.Jiangyou Chunyu Ecological Agricultural Science and Technology Company, Jiangyou 621700, China)

Abstract: The article mainly evaluated the antioxidant ability of total flavonoids in various extracts(ethyl alcohol, ethyl acetate, normal butyl alcohol, chloroform fraction and water) from *Premna microphylla* Turcz leaves in Jiangyou area including DPPH radical, ABTS⁺· radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical scavenging effect, reducing power, ferrous ions chelating activities and total antioxidant capacity(FRAP). The free radical scavenging activity of total flavonoids extracted by different concentrations of ethanol was highest in DPPH. The free radical scavenging activity (DPPH radical, ·OH, ABTS⁺·), total antioxidant capacity (FRAP) and reducing power were dependent on the concentration of alcohol increasing first and then decreasing, while the superoxide anion radical scavenging activity was contrary to the increase of alcohol concentration. The comprehensive evaluation index (APC) of tested samples was decreased in the following order: 75% ethanol extract > 65% ethanol extract > 55% ethanol extract > 85% ethanol extract > 95% ethanol extract. The DPPH radical scavenging activity, FRAP value and reducing power were higher than those of other solvent extracts. The superoxide anion radical scavenging rate of ethyl acetate extract was stronger than those of other solvent extracts. The antioxidant capacity of ethyl acetate extract was strongest according to the APC results. The flavone from leaves of *Premna microphylla* Turcz has strong antioxidant activity and can be used as antioxidant or raw materials of healthy food.

Key words: *Premna microphylla* Turcz; flavone; fractionation; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)18-0019-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.004

收稿日期: 2017-02-23

作者简介: 熊双丽(1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能性食品加工与安全, E-mail: 372364129@qq.com。

基金项目: 四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心专职科研创新团队建设基金项目(14tdgc04); 四川省科技厅项目(2017NFP0179)。

豆腐柴 (*Premna microphylla* Turcz) 主要分布于我国浙江、安徽、四川、贵州等地的山林地区。其叶因含有丰富的果胶、黄酮和蛋白质等营养成分,除了被应用于制作口感松软、入口滑腻的“观音豆腐”外,对其黄酮、果胶和蛋白质类的物质研究亦成为目前的研究重点和趋势。根据中央三碳链的氧化程度、B-环连接位置(2-或3-位)以及三碳链是否构成环状等特征将黄酮分为黄酮醇、二氢黄酮、黄酮、黄烷醇、花青素、查耳酮等,各类物质生物利用度和活性差异较大^[1-2]。豆腐柴总黄酮也具有较好的抗氧化活性^[3]。目前,对其分离主要采用溶剂和色谱等分离方法^[4-5]。在长期对豆腐柴研究的过程中,发现江油豆腐柴不仅黄酮含量高,而且具有很好的自由基清除活性^[6]。本论文在前期豆腐柴总黄酮提取工艺与抗氧化活性研究的基础上,用不同溶剂分级分离黄酮类化合物,运用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、ABTS 阳离子自由基($ABTS^+ \cdot$)、羟基自由基($\cdot OH$)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)、还原力、总抗氧化能力体外抗氧化活性模型和抗氧化活性综合评价指数(APC)分析豆腐柴抗氧化活性,为进一步探讨豆腐柴黄酮的构效关系和开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

豆腐柴 四川江油春雨生态农业有限公司; 2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS), 2,4,6-三(2-吡啶)-1,3,5-三嗪(TPTZ)和 DPPH SIGMA ALDRICH 公司; 芦丁对照品 中海威(北京)基因科技有限公司; 抗坏血酸 天津欧博凯化工有限公司; 乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、三氯甲烷、氢氧化钠、硝酸铝等 均为分析纯。

紫外-可见分光光度计 日本 HITACHI 公司; 真空冷冻干燥机 美国 Thermosavant 公司; 旋转蒸发仪 巩义市瑞德仪器设备有限公司; SHB-III 型循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 豆腐柴叶黄酮类化合物不同溶剂萃取级分的制备 豆腐柴叶经干燥粉碎过 60 目筛预处理之后,用不同浓度乙醇(55%、65%、75%、85%、95%)进行萃取(料液比 1:37 g/mL、提取温度 81 °C、提取时间 3.4 h^[6]),分别分析各提取物抗氧化活性。然后,以最佳乙醇浓度和最佳提取工艺提取豆腐柴叶总黄酮^[6],将提取液于 45 °C 真空减压浓缩至无醇味后用石油醚萃取除去色素类部分,水相再加入 3 倍体积乙醇,低温静置过夜,离心(4500 r/min, 15 min)后将上清液减压浓缩除去乙醇后依次用氯仿、乙酸乙酯及正丁醇对豆腐柴叶总黄酮进行分级萃取,得到极性不同的各级分(水层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层),分别旋转蒸发除去有机溶剂后真空冷冻干燥后进行抗氧化活性分析。

1.2.2 豆腐柴叶不同溶剂萃取级分的抗氧化活性分析

1.2.2.1 DPPH 自由基和 $\cdot OH$ 清除活性测定 DPPH

自由基清除活性测定^[6-7]。 $\cdot OH$ 清除活性测定^[7]。

1.2.2.2 超氧阴离子自由基清除活性 $O_2^{\cdot -}$ 清除活性测定参照参考文献[8]并加以修改:向 25 mL 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.2, 0.1 mol/L) 4.5 mL,然后加入 3.2 mL 去离子水,在 25 °C 条件下水浴 20 min。加入 1.0 mL 不同浓度的样品摇匀,再加入 3.0 mol/L 的邻苯三酚 0.3 mL,摇匀,启动反应立即倾入比色皿中,在 0~4 min 内,每 30 s 在波长 325 nm 处测定一次吸光值。进行线性回归分析,求其斜率得到样品邻苯三酚自氧化速率 V_i 。实验以 10 mmol/L 盐酸溶液代替邻苯三酚调零,以去离子水代替样品做对照组求得邻苯三酚自氧化速率 V_0 。按式(1)计算各级分 $O_2^{\cdot -}$ 清除率(S):

$$S(\%) = [(V_0 - V_i)/V_0] \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.2.3 总抗氧化能力 总抗氧化能力采用 FRAP 法^[9-10],并略作修改。样品的抗氧化活性以达到同样吸光值所需的硫酸亚铁毫摩尔数表示。标准曲线绘制:比色管中依次加入浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、1.0 mol/L 的硫酸亚铁溶液各 60 μL ,加入 6.0 mL FRAP 工作液(现配现用,0.3 mol/L pH3.6 醋酸盐缓冲溶液、10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L $FeCl_3$ 溶液按照 10:1:1 混合而成,预热至 37 °C),混匀后 37 °C 水浴准确反应 10 min,593 nm 波长处测定吸光值(A),由吸光值(y)和硫酸亚铁浓度(x)做回归直线得 $y = 0.2735x - 0.0133$,相关系数 $R^2 = 0.9992$ 。

黄酮类化合物不同溶剂萃取级分的总抗氧化能力测定:取不同浓度不同级分的黄酮样品替代硫酸亚铁溶液,按照上述方法测定吸光值(A_i),根据标准曲线计算样品的 FRAP 值。计算公式为(2):

$$FRAP(\text{mmol/L}) = (A_i + 0.0133)/0.2735 \quad \text{式(2)}$$

1.2.2.4 还原力测定 还原力测定采用铁氰化钾法^[11]。

1.2.2.5 ABTS 阳离子自由基清除率的测定 黄酮类化合物不同溶剂萃取级分 $ABTS^+ \cdot$ 清除率参考文献^[10],并略作修改。取 7.4 mmol/L ABTS 储备液和 2.6 mmol/L 过硫酸钾储备液各 0.2 mL,混合后于黑暗条件下放置 14 h。用 75% 乙醇稀释,并用 75% 乙醇调零,在 734 nm 处调整吸光值为 0.700 ± 0.005 得 $ABTS^+ \cdot$ 工作液。取 0.1 mL 不同浓度样液与 $ABTS^+ \cdot$ 工作液 3.9 mL 混匀,在 25 °C 水浴反应 6 min 后于 734 nm 处测定吸光值 A_i 。以去离子水代替 $ABTS^+ \cdot$ 工作液测定吸光值 A_0 。按式(3)计算 $ABTS^+ \cdot$ 清除率(S):

$$S(\%) = (1 - A_i/A_0) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.2.6 抗氧化活性综合评价 采用抗氧化活性综合指数法(APC)评价黄酮类化合物不同溶剂萃取级分的总体抗氧化活性^[12-13]。综合上述 6 种抗氧化活性评价指标,按式(4)计算 APC 指数。

$APC = \Sigma(\text{各样品各抗氧化指标能力分值}/\text{每种方法测定的最大值} \times \text{使用的方法总数}) \times 100$ 式(4)

1.3 数据分析

所有样品均设 3 个重复,测定结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 Excel 2013 和 SPSS 13.0 软件进行

表1 不同浓度乙醇提取物的总黄酮抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of total flavonoids extracted with different concentrations of ethanol

样品		DPPH· 清除率(%)	·OH 清除率 (%)	O ₂ ⁻ ·清除率 (%)	FRAP 值 (mmol/L)	还原力 (A ₇₀₀)	ABTS ⁺ · 清除率(%)
乙醇浓度 (%)	55	91.93 ± 0.13 ^b	54.48 ± 0.09 ^c	62.42 ± 0.64 ^b	0.662 ± 0.004 ^c	0.356 ± 0.017 ^b	57.93 ± 0.29 ^c
	65	95.43 ± 0.20 ^a	64.93 ± 0.24 ^b	57.11 ± 0.79 ^c	0.763 ± 0.004 ^b	0.368 ± 0.012 ^b	59.29 ± 0.07 ^d
	75	91.22 ± 0.20 ^c	62.06 ± 0.12 ^c	57.01 ± 0.32 ^c	0.667 ± 0.017 ^c	0.397 ± 0.022 ^b	69.25 ± 0.47 ^a
	85	92.02 ± 0.26 ^b	52.72 ± 0.31 ^f	55.73 ± 0.32 ^c	0.660 ± 0.006 ^c	0.352 ± 0.030 ^b	64.90 ± 0.13 ^b
	95	92.36 ± 0.13 ^b	56.28 ± 0.30 ^d	53.18 ± 0.96 ^d	0.640 ± 0.013 ^d	0.299 ± 0.011 ^c	61.25 ± 0.47 ^c
V _c		95.78 ± 0.04 ^a	79.67 ± 0.13 ^a	99.56 ± 0.03 ^a	1.219 ± 0.009 ^a	0.635 ± 0.010 ^a	46.14 ± 0.12 ^f

注:同列小写字母不同表示差异显著($p < 0.05$);DPPH 自由基清除率、·OH 清除率和 FRAP 值测定样品浓度0.5 mg/mL,ABTS⁺·清除率测定样品浓度1 mg/mL,O₂⁻·清除率测定样品浓度为2 mg/mL,还原力测定样品浓度0.2 mg/mL;表2、表3同。

表2 不同浓度乙醇提取总黄酮抗氧化活性综合评价及排序

Table 2 Comprehensive evaluation and ranking of antioxidant activity of total flavonoids extracted with different concentrations of ethanol

样品		APC 指数						APC 综合指数	APC 综合 指数排名
		DPPH·	·OH	O ₂ ⁻ ·	FRAP	还原力	ABTS ⁺ ·		
乙醇浓度 (%)	55	95.98	68.38	62.58	54.13	56.06	83.65	70.13	4
	65	99.63	81.50	57.25	62.39	57.95	85.62	74.06	3
	75	95.24	77.90	57.15	55.36	62.52	100	74.69	2
	85	96.07	66.17	55.87	53.97	55.43	93.72	70.21	5
	95	96.43	70.64	53.31	52.33	47.09	88.45	68.04	6
V _c		100	100	100	100	100	71.10	95.18	1

数据处理和方差分析。样品间的差异显著性采用单因素方差分析(One Way ANOVA) Duncan 新复极差法分析。 $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对总黄酮抗氧化活性的影响

一般情况下,植物中黄酮类化合物存在多种不同极性成分,乙醇浓度对总黄酮的提取率和抗氧化活性影响较大^[14]。为探究江油地区豆腐柴黄酮的抗氧化活性和构效关系,首先分析了不同浓度乙醇萃取黄酮的抗氧化活性。

运用 DPPH·、·OH、O₂⁻·、ABTS⁺·、FRAP 和还原力体系,评价不同浓度乙醇提取黄酮的抗氧化活性(见表1)。各浓度萃取总黄酮的 DPPH 自由基清除活性最高,达到 90% 以上,·OH 清除率、O₂⁻·和 ABTS⁺·清除能力相当,60% 左右。DPPH 自由基清除率、·OH 清除率和 ABTS⁺·清除率随乙醇浓度升高呈先升高后降低的趋势,O₂⁻·清除率随乙醇浓度增加一直降低。总抗氧化能力(FRAP)和还原力皆随乙醇浓度增加先增加后降低。与曹稳根等^[3]采用乙醇提取安徽皖南地区野生豆腐柴总黄酮抗氧化活性相比,DPPH 自由基、·OH、O₂⁻·和 ABTS⁺·清除能力均较高,可能不同地区和样品采集时间有一定关系,有待进一步研究。

DPPH 自由基和 ABTS⁺·为醇溶性体系,·OH 和 O₂⁻·体系为水溶性体系,FRAP 和还原力反应了受试物的还原性,也就是黄酮类羟基和羧基等结构的多少。总体来看,DPPH 自由基和 ABTS⁺·清除活性优于·OH 和 O₂⁻·,这可能与黄酮不同结构类型密切相

关。为综合评价不同浓度萃取黄酮的抗氧化活性,论文进一步采用 APC 评分法进行比较(表2)。从综合评分来看,抗氧化活性表现为:75% 醇提取物 > 65% 醇提取物 > 55% 醇提取物 > 85% 醇提取物 > 95% 醇提取物。尽管 75% 乙醇提取物与 65% 乙醇提取物(74.06 分)相比优势不明显,但在前期研究中发现,75% 乙醇萃取总黄酮得率显著优于 65% 乙醇^[6]。故综合考虑总黄酮得率和抗氧化活性,选择 75% 乙醇浓度进行萃取,再分析不同溶剂萃取级分的抗氧化活性。

2.2 不同溶剂萃取级分的 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力

DPPH 自由基体系根据抗氧化剂提供的电子配对,使其颜色褪去或者消失,从而测定物质的抗氧化活性^[15-16]。如图1所示,不同溶剂萃取级分对 DPPH 自由基的清除率在 0~0.5 mg/mL 浓度范围内随总黄酮浓度的增加而逐渐增强,乙酸乙酯层和正丁醇层萃取物对 DPPH 自由基的清除率差异不大,且要远优于氯仿层和水层萃取物,与曹稳根^[3]等报道的 AB-8 大孔吸附树脂分离得到的豆腐柴黄酮活性规律一致。在浓度为 0.5 mg/mL 时,乙酸乙酯层和正丁醇层的 DPPH 自由基清除率分别高达 92.57% ± 0.06% 和 91.82% ± 0.26%,接近于 V_c 95.78% ± 0.04%,表现出较强的 DPPH 清除活性,而且都远远高于氯仿层与水层萃取物。

如图2所示,各萃取级分对·OH 的清除率在 0~0.5 mg/mL 浓度范围内随待测物浓度的增大而增高,其中氯仿层和乙酸乙酯层在达到 0.1 mg/mL 后清除率变得较为稳定,正丁醇层和水层清除率仍缓慢

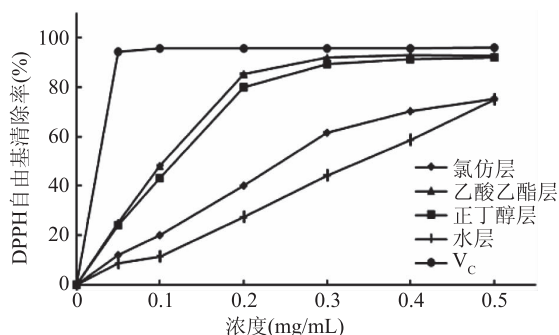


图1 各萃取级分对DPPH自由基的清除率

Fig.1 Scavenging rate of each extraction fraction against DPPH·

增加。乙酸乙酯层、正丁醇层及水层·OH清除率较低,约50%。氯仿层·OH清除率较其它三个级分高,当浓度为0.1 mg/mL时,其羟基自由基清除率为 $63.54\% \pm 0.23\%$,甚至高于 V_c $58.58\% \pm 0.31\%$,随着浓度的进一步上升,氯仿层萃取物对·OH得清除率不再有明显变化,开始低于 V_c ,这可能与氯仿层黄酮类化合物的结构有关,有待进一步研究分析。

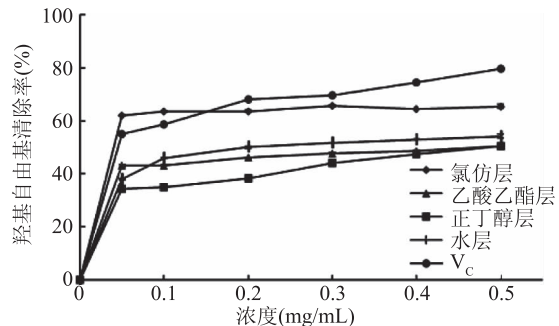


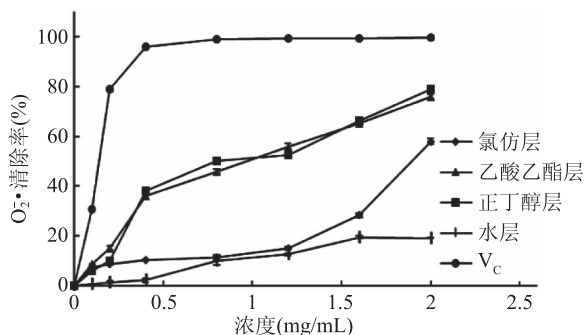
图2 各萃取级分对羟基自由基的清除率

Fig.2 Scavenging rate of extraction fraction against ·OH

2.3 不同溶剂萃取级分的超氧阴离子自由基清除能力和总抗氧化能力

$O_2^{\cdot-}$ 是细胞中线粒体转移电子时产生的一类自由基,几乎是所有氧自由基的第一个自由基,对细胞具有非常强的氧化毒性,与人体衰老和癌症的发生密切相关^[17]。如图3所示,各萃取层对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率在0~2.0 mg/mL浓度范围内总体呈上升趋势。清除效果最佳的是乙酸乙酯层和正丁醇层,其次为氯仿层,水层最弱。 V_c 明显优于乙酸乙酯层的 $75.89\% \pm 0.84\%$ 和正丁醇层的 $78.79\% \pm 0.55\%$ 。氯仿层和水层在低浓度时 $O_2^{\cdot-}$ 清除率相近,但浓度达1.5 mg/mL后,氯仿层清除率大幅度上升,而水层增长缓慢。值得注意的是,在低浓度情况下,正丁醇层和乙酸乙酯层具有很好的清除活性。

2,4,6-三吡啶基三嗪(triaryl-triazine, TPTZ)可与受试物作用,被还原为 Fe^{2+} 并呈现出蓝色,于593 nm有最大吸收峰,通过吸光值大小转化为 Fe^{2+} 当量即可比较抗氧化能力^[17]。该值反映测试样品还原力,抗氧化能力与FRAP值呈正相关。由图4所示,在0~0.5 mg/mL浓度范围内, V_c 和各萃取层萃取物FRAP值随浓度的增大而增加,当浓度大于

图3 各萃取级分对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率Fig.3 Scavenging rate of various extraction fraction against $O_2^{\cdot-}$

0.35 mg/mL时,各级分总抗氧化能力从大至小分别为乙酸乙酯层、正丁醇层、氯仿层、水层。

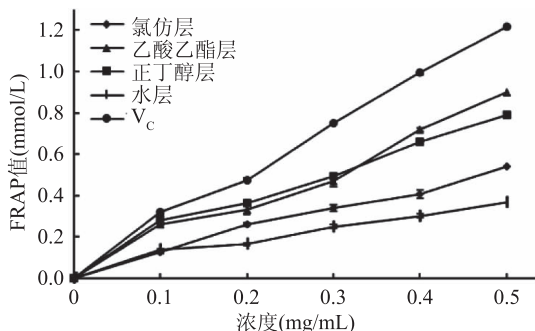


图4 各萃取级分的FRAP值

Fig.4 The FRAP value of various extraction fraction

2.4 不同溶剂萃取级分的还原力和ABTS阳离子自由基清除能力

铁氰化钾还原体系测定还原力,可表征待测物自身发生氧化的能力,是评价抗氧化活性的重要指标^[11,19],还原能力越强则抗氧化能力也越强。如图5所示,在0~0.25 mg/mL浓度范围内,各萃取层还原力随浓度的增加而增长,总体呈现线性关系。除水层以外,其它各萃取级分的还原力均大于李保同等报道的银杏叶黄酮的还原力^[20]。各层萃取还原力规律同DPPH。

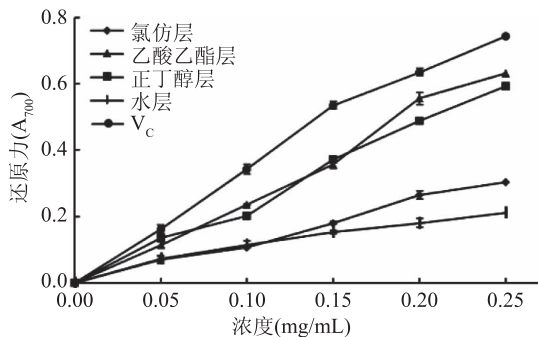


图5 各萃取层还原力

Fig.5 Reducing power of extraction fraction

$ABTS^{\cdot+}$ 是一种亚稳态离子,易溶于乙醇,于734 nm处有吸收峰。根据受试物的干预对其吸光值的影响,可判断天然产物的抗氧化活性^[21]。如图6所示,各萃取层在0~1.0 mg/mL浓度范围内清除率

表3 不同溶剂萃取级分的抗氧化活性

Table 3 Antioxidant activity of flavonoids in various extracts

样品	DPPH·清除率(%)	·OH清除率(%)	O ₂ ⁻ 清除率(%)	FRAP值(mmol/L)	还原力(A ₇₀₀)	ABTS ⁺ ·清除率(%)
氯仿层	75.38 ± 0.18 ^d	65.45 ± 0.81 ^b	57.97 ± 1.18 ^d	0.540 ± 0.009 ^d	0.265 ± 0.005 ^d	75.21 ± 0.35 ^c
乙酸乙酯层	92.57 ± 0.06 ^b	50.56 ± 0.63 ^d	75.89 ± 0.84 ^c	0.902 ± 0.017 ^b	0.556 ± 0.012 ^b	96.22 ± 0.24 ^a
正丁醇层	91.82 ± 0.26 ^c	50.50 ± 0.82 ^d	78.79 ± 0.55 ^b	0.788 ± 0.018 ^c	0.488 ± 0.008 ^c	88.79 ± 0.43 ^b
水层	74.91 ± 0.33 ^d	54.22 ± 0.79 ^c	19.20 ± 0.37 ^e	0.368 ± 0.028 ^e	0.181 ± 0.006 ^e	48.62 ± 0.41 ^d
V _c	95.78 ± 0.04 ^a	79.67 ± 0.13 ^a	99.56 ± 0.03 ^a	1.219 ± 0.009 ^a	0.635 ± 0.010 ^a	46.14 ± 0.12 ^e

表4 不同溶剂萃取级分抗氧化活性综合评价及排序

Table 4 Comprehensive evaluation and ranking of antioxidant activity of flavonoids in various extracts

样品	APC 指数						APC 综合指数	APC 综合指数排名
	DPPH·	·OH	O ₂ ⁻ ·	FRAP	还原力	ABTS ⁺ ·		
氯仿层	78.70	82.15	58.20	44.29	41.68	78.17	63.87	4
乙酸乙酯层	96.64	63.46	76.20	74.00	87.56	100	82.98	2
正丁醇层	95.86	63.39	79.11	64.70	76.85	92.28	78.70	3
水层	78.21	68.06	19.27	30.19	28.50	50.53	45.79	5
V _c	100	100	100	100	100	47.96	91.33	1

随浓度的增加而增大。乙酸乙酯层的清除率最好,其次是正丁醇层,再次是氯仿层,水层最差。其中,乙酸乙酯层、正丁醇层、氯仿层萃取物的 ABTS⁺·清除均显著高于 V_c。豆腐柴叶总黄酮各萃取层对 ABTS⁺·的清除效果都优于 V_c,这与其它抗氧化活性评价指标呈现出了明显的相反趋势,其机制有待进一步研究。

不大,甚至要优于 V_c,说明豆腐柴叶仍是非常好的抗氧化剂原料。在各萃取层中,乙酸乙酯层萃取产物要优于其它萃取层,这主要归结于其在 DPPH 自由基清除能力、总抗氧化能力、还原力及 ABTS⁺·清除能力上的优势。正丁醇层萃取物和氯仿层萃取物对 O₂⁻·和·OH 表现出了非常好的清除能力,所以也具有很好的抗氧化活性。水层抗氧化活性较弱。

3 结论

不同乙醇浓度萃取得到的豆腐柴叶总黄酮的抗氧化活性存在显著性差异,APC 能很好地评价天然产物的总体抗氧化活性。当乙醇浓度为 55% 时,O₂⁻·清除率要显著高于其它乙醇浓度的提取产物;当乙醇浓度为 65% 时,DPPH 自由基清除率、·OH 清除率以及总抗氧化能力 FRAP 值较高;当乙醇浓度为 75% 时,还原力和 ABTS⁺·清除率较高。根据 APC 综合评价,乙醇浓度为 75% 时的提取产物抗氧化活性较好。豆腐柴叶总黄酮各萃取层产物抗氧化活性存在明显差异,乙酸乙酯层萃取物的 DPPH 自由基清除率、FRAP 值、还原力及 ABTS⁺·清除率要显著优于其它各萃取层;氯仿层萃取物的·OH 清除率要优于其它萃取层;正丁醇层萃取物的 O₂⁻·清除率要优于其它各萃取层。根据 APC 综合评价,乙酸乙酯层抗氧化活性最佳。因此,豆腐柴叶总黄酮有较好的抗氧化活性。鉴于不同萃取溶剂级分的抗氧化表现形式不同,要进一步分析其构效关系,需要对各级分结构进行深入分析。

参考文献

[1] Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology[J]. Nutrition Research, 2004, 24: 851-874.
[2] Muhammad A, Tel-Cayan G, Öztürk M, et al. Biologically active flavonoids from Dodonaea viscosa and their structure-activity relationships[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 78:

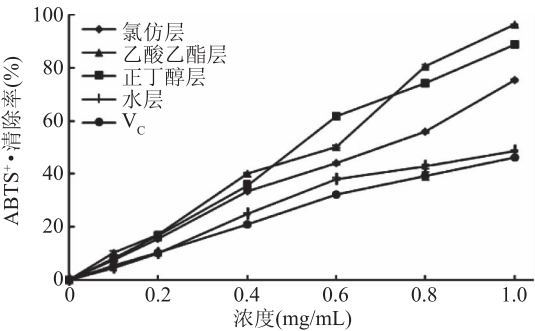


图6 各萃取层对 ABTS⁺·的清除率

Fig6 Scavenging rate of extraction fraction against ABTS⁺·

2.5 不同溶剂萃取级分抗氧化活性的综合评价

为综合比较不同溶剂萃取级分抗氧化活性,本文还分别对各抗氧化指标进行了比较分析(表3)和抗氧化活性综合评价及排序(表4)。如表3所示,乙酸乙酯层萃取物的 DPPH 自由基清除率、FRAP 值、还原力及 ABTS⁺·清除率要显著优于其它各萃取层。其中,DPPH 自由基清除率为 92.57% ± 0.06%,与 V_c 接近 95.78% ± 0.04%。FRAP 值和还原力均不如 V_c,但 ABTS⁺·清除率 96.22% ± 0.24% 是 V_c 的两倍。氯仿层萃取物的·OH 清除率为各萃取层中的最佳,清除率达到了 65.45% ± 0.81%。正丁醇层萃取物的 O₂⁻·清除率要优于其它各萃取层,达到了 78.79% ± 0.55%。

综合评分显示,各萃取层的抗氧化活性均低于 V_c,但部分萃取层产物在单项指标得分上与 V_c 差距

66-72.

- [3]曹稳根,段红,翟科峰,等.野生豆腐柴总黄酮抗氧化活性研究[J].滁州学院学报,2016,18(5):40-43.
- [4]Han H B, Li H, Hao R L, et al. One - step column chromatographic extraction with gradient elution followed by automatic separation of volatiles, flavonoids and polysaccharides from *Citrus grandis* [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 542-548.
- [5]朱玲玲.白鹃梅中黄酮类物质的分离纯化和生物活性研究[D].广州:暨南大学,2016.
- [6]胡予,李旭升,马楠,等.豆腐柴总黄酮的提取、纯化及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,20:268-273.
- [7]Luo Y H, Li X R, He Isolation J, et al. characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 30-35.
- [8]许树军,朱琪,于子惠,等.橙皮苷及橙皮素清除超氧阴离子自由基能力的研究[J].中国医药学报,2015,43(1):56-58.
- [9]Benzie Iris F F, Strain J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [10]袁佐云,朱运平,俞伟祖,等.蒸煮与发酵对全谷物粉甲醇提取物抗氧化活性的影响[J].中国食品学报,2016,16(2):25-32.
- [11]Tan L H, Zhang D, Wang G. Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical [J]. Industrial Crops and Products, 2016, 80: 123-130.
- [12]Seeram N P, Aviram M, Zhang Y, et al. Comparison of

(上接第 18 页)

[15] 谢强,林玉桓,苗淑萍,等. 香芹酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35 (23): 54-58.

[16] Gianluca Picariello, Giuseppe Iacomino, Gianfranco Mamone, et al. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins[J]. Food Chemistry, 2013 (139): 203-212.

[17] Hosoya K-I, Kim K-J, Lee V H. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers[J]. Pharmaceutical Research, 1996, 13 (6): 885-890.

[18] 尤青, 马增春, 谭洪玲, 等. 人参水提物在 Caco-2 模型的吸收特征[J]. 中国药理学通报, 2013, 29 (12): 1711-1716.

[19] Ranaldi G, Conaalvo R, Sambuy Y, et al. Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum supplemented and serum-free media[J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17 (5-6): 76-767.

[20] 鲁健章, 孙丽华, 周彦钢. 凯氏定氮法测定鱼蛋白质含量的干扰因素分析[J]. 食品科学, 2010, 31 (19): 453-456.

[21] Samaranayaka A G, Kitts D D, Li-Chan E C. Antioxidative

antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(4): 1415-1422.

[13] 张华, 周志钦, 席万鹏. 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-70.

[14] 程悦, 王志宇, 王冬梅, 等. 不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 142-144

[15] Sivasothy Y, Sulaiman S F, Ooi K L. Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff[J]. Food Control, 2013, 30: 714-720.

[16] Wang Y Q, Gao Y J, Ding H. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 152-158.

[17] Giese E C, Gascona J, Anzelmo G, et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botrysosphaeran and some other-D-glucans[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 125-130.

[18] 曾伟. 苜蓿黄酮的纯化分离及抗氧化活性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.

[19] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013(6): 50-51.

[20] 李保同. 银杏叶总黄酮的提取纯化及其抗氧化性能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.

[21] Re R, Nicoletta P, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Australian TAFE Teacher, 1999, 26(10): 1231-1237.

and angiotensin- I - converting enzyme inhibitory potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(3) :1535-1542.

[22] Ningning Xie, BoWang, Liangping Jiang, et al. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption [J]. Food Research International, 2015(76) :518-526.

[23] 李东平. 酶解水牛乳蛋白制备降血压肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.

[24] 莫李立, 王素军, 杨本坤. 阿魏酸在 Caco-2 细胞模型的通透性及其在大鼠体内吸收特性研究[J]. 中草药, 2012, 43(5) :947-951.

[25] Parrot S, Degraeve P, Curia C, et al. *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. Die Nahrung, 2003, 47(2) :87.