

火龙果花中黄酮类化合物抗氧化活性研究

李国胜, 姚秋桂, 张伟敏

(海南大学 食品学院, 海南 海口 570228)

摘要:为了寻找安全的天然抗氧化剂,以火龙果花为研究对象,以乙醇作为提取溶剂,对火龙果花进行加热回流提取,以体外抗氧化试验为活性评价手段,测定其中的总黄酮含量,利用 DPPH 法、水杨酸法、邻苯三酚法、硫氰酸铁法、普鲁士蓝法从 5 个方面测定样品的抗氧化活性,以化学合成的脂溶性抗氧化剂 TBHQ 为阳性对照品。研究不同浓度下火龙果花中黄酮类化合物的抗氧化活性。结果表明:火龙果花总黄酮含量为 2.62 mg/mL,黄酮类化合物对 DPPH· 的清除能力与特丁基对苯二酚(TBHQ)相当,清除·OH 的 IC_{50} 为 0.57 mg/mL,清除超氧阴离子的 IC_{50} 为 1.41 mg/mL,抑制脂质过氧化的 IC_{50} 为 1.80 mg/mL,还原力相对较弱。研究表明火龙果花中黄酮类化合物具有较强的抗氧化活性,可作为天然抗氧化剂推广应用。

关键词:火龙果花;黄酮;抗氧化;自由基

中图分类号:S 667.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0121-05

火龙果(*Hylocereus undatus*)属仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus*(Berger)Britt. et Rose),又称红

龙果、青龙果、仙蜜果、仙人掌果、芝麻果等,有红火龙果、白火龙果和黄火龙果 3 种类型,我国的火龙果种植主要分布在广东、广西、贵州、台湾、海南、福建等省份。火龙果具有很高的经济价值,是集水果、蔬菜、花卉、医药和保健于一体的热带草本植物。

火龙果 5—10 月开花,火龙果花硕大,因其夜晚开放固有“夜仙子”的美称,每个花季每株平均生花蕾

第一作者简介:李国胜(1977-),男,陕西西安人,硕士研究生,讲师,研究方向为天然产物与食品加工。E-mail:13637694043@163.com。
基金项目:海南省自然科学基金资助项目(314087)。
收稿日期:2015-09-28

Characterizing a Novel Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308 for Potential Biological Control in Pathogenic Bacterium

ZHANG Xuehua^{1,2}, LI Linling¹, CHENG Hua¹, AI Yuanhang¹, WANG Hui¹, CHENG Shuiyuan^{2,3}

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratory, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023; 3. College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

Abstract: Taking *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308 as materials, with the method of confront culture, the antibiosis effect on *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani*, *Stachybotrys chartarum*, *Cryphonectria parasitica*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* was studied. The results showed that CMN1308 had stronger antibiosis effect on the seven major pathogens of chestnut. Among this, CMN1308 had a best biocontrol to *P. expansum*, the inhibition zone diameter was 27.1 mm. The further study on the stability of antimicrobial components in CMN1308 showed, the growth of *P. expansum* hyphal was limited by the antimicrobial components isolated from CMN1308, which also had a good stability to hot temperature, alkali and UV, but sensitive to acid. The results suggested that antibiotic effect and inducible resistance were the major mechanism of CMN1308 on chestnut pathogenic. The finding of this study would help to optimize the practical use of CMN1308 in the biological control of chestnut or other fruit rot caused by pathogenic fungi.

Keywords: *C. mollissima*; biological control; antifungal spectrum; stability

2.7 朵^[1]。火龙果花的药用成分种类丰富,主要为玉芙蓉、黄酮和黄酮醇、多糖、三萜类等化合物,具有明目、消炎、清火、润肺、止咳、增强免疫力、降血压、抗癌、预防便秘、治疗高尿酸症等功效,同时还有美容、养颜、延缓衰老的作用。目前火龙果花的应用主要用来加工成各种成品,如入菜干花、花茶、花粉和花蜜^[2]。国内有关火龙果花的研究主要集中在干制^[3]、保健饮料制作^[4]、营养成分分析^[5]、活性成分的提取^[6]等方面。大量研究表明黄酮类化合物具有抗氧化性,它可作为金属螯合剂和还原剂、活性氧的清除剂、终止自由基连锁反应、终止单线态氧的形成。孙静^[7]探讨黄酮类化合物结构和抗氧化活性关系发现,黄酮类化合物中的羟基位置、数量以及糖苷的空间位阻均可影响其抗氧化活性的强弱。

随着人们生活质量的提高,越来越关注食品安全问题,对合成抗氧化剂的食用安全性产生了质疑,寻找安全的天然抗氧化剂成为了食品添加剂的一个重要研究方向。虽然国内外对火龙果的研究很多,但关于火龙果花中黄酮类化合物的抗氧化活性研究尚鲜见报道。课题组以火龙果花为原料,采用5种抗氧化评价方法测定其黄酮类化合物的抗氧化性能,以期为火龙果花中黄酮类化合物的利用提供理论基础,带动火龙果种植加工产业的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 供试火龙果花取自红皮白肉品种。

1.1.2 供试试剂 石油醚;无水乙醇(99.7%,洛阳市化学试剂厂);无水三氯化铝(99.0%,天津市大茂化学试剂厂);DPPH(99.0%,西亚试剂);绿矾(99.0%,天津市福晨化学试剂厂);水杨酸(99.5%,广州化学试剂厂);双氧水(30%,广州化学试剂厂);邻苯三酚(国药集团化学试剂有限公司);Tris(99.9%);TBHQ(西亚试剂);亚油酸(97%,上海伊卡生物技术有限公司);PBS缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司);三氯化铁(99.0%,西陇化工股份有限公司);硫氰酸铵(98.5%,天津市福晨化学试剂厂);氯化亚铁(99.7%,天津市大茂化学试剂厂);浓盐酸(36%~38%,广州化学试剂厂);铁氰化钾(99.5%,天津市福晨化学试剂厂);三氯乙酸(99.0%,天津市大茂化学试剂厂)均为分析纯。

1.1.3 供试仪器 HH-4 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司);YHG 型远红外快速恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂);722 紫外可见分光光度计(上海奥普勒仪器有限公司);GL-20G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);索

氏抽提装置。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮的提取与含量测定 将火龙果花在 50℃ 下烘干,粉碎后过 50 目筛,石油醚抽提后挥干备用。称取 1.0 g 干品置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 30 mL 70% 的乙醇溶液,在 50℃ 条件下,加热回流提取 1 h 后,将提取液 3 000 r/min 离心 5 min 后取上清液,备用。取 5.00 mL 待测液于 25 mL 容量瓶中,加入 1% AlCl_3 溶液 3 mL,以 10% (v/v)乙醇定容,摇匀,静置 20 min 后,以蒸馏水做参比,在 410.0 nm 处测量吸光度,根据回归方程 $A=0.002\ 4C+0.058\ 8$, $R^2=0.992\ 0$,得到总黄酮含量为 2.62 mg/mL。

1.2.2 样品制备 抗氧化活性样品的制备:分别取提取液于 10 mL 的具塞试管中,用无水乙醇稀释至刻度,配制成浓度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 待测样液,备用。阳性对照特丁基对苯二酚(TBHQ)溶液的制备:分别称取 TBHQ 试剂 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mg 至 10 mL 的具塞试管中,用无水乙醇稀释至刻度,配制成浓度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 溶液,摇匀,备用。

1.2.3 黄酮类化合物抗氧化活性测定 DPPH 法测定抗氧化活性^[8]:取 10 mL 容量瓶编号,各加入 2.0 mL 不同浓度样品溶液,分别加入 2.0 mL 浓度为 0.3 mmol/L 的 DPPH 溶液,混合摇匀,避光反应 3 min 后,于 517 nm 测定吸光度 A_1 。以 2.0 mL 无水乙醇代替 DPPH 的吸光度为 A_2 ,以 2.0 mL 的乙醇代替样品溶液的吸光度为 A_0 ,以 TBHQ 作为阳性对照,以无水乙醇作参比液。DPPH·清除率为:清除率(%)=[1-(A_1-A_2)/ A_0]×100。清除羟基自由基的能力测定^[9]:将 7.5 mmol/L FeSO_4 、7.5 mol/L 水杨酸-乙醇溶液和 7.5 mmol/L H_2O_2 溶液按 1:1:1 混匀,作为检测储备液备用。分别移取 2 mL 各浓度样液于 10 mL 容量瓶中,加入 4 mL 储备液,用蒸馏水定容至 10 mL。用蒸馏水作参比溶液,测定 526 nm 处的吸光度为 A_1 ,以蒸馏水代替试样的吸光度为 A_0 ,不加储备液,直接测定样液在 526 nm 处的吸光度为 A_2 ,以 TBHQ 作为对照。羟自由基清除率公式为:清除率(%)=[$A_0-(A_1-A_2)$]/ A_0 ×100。清除超氧阴离子能力的测定:在 10 mL 容量瓶中,加入 25℃ 水浴锅中水浴 20 min 后取出的 4.0 mL pH 8.2、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液,分别加入 0.5 mL 不同浓度的样品溶液和 0.5 mL 25℃ 预热的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液(以 10 mmol/L 的盐酸溶液配制),混匀,在 25℃ 水浴中反应 5 min,在波长 420 nm 处测定吸光度 A_1 ,以 0.5 mL 10 mmol/L 盐酸代替邻苯三酚溶液,测得吸光度为 A_2 ,

以 0.5 mL 蒸馏水代替样品溶液,测得吸光度 A_0 。以 TBHQ 作为对照。对超氧阴离子自由基清除能力为:清除率(%)=[$A_0 - (A_1 - A_2)$]/ $A_0 \times 100$ 。抑制脂质过氧化的测定:取 4 mL 各浓度样液分别加入具塞试管中,加入 4.1 mL 2.5% 亚油酸(80% 乙醇溶液配制),8 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.864)和 3.9 mL 蒸馏水,置于 40℃ 恒温水浴锅中。取培养液 0.1 mL,按顺序加入 9.7 mL 80% 乙醇、0.1 mL 30% 硫氰酸铵、0.1 mL 0.02 mol/L 氯化亚铁,最后加入 0.1 mL 3.5% 的盐酸,混合均匀后,在室温下静置 3 min,于波长 500 nm 下测吸光值 A_1 ,每个样品重复 3 次, A_0 为以 80% 乙醇溶液代替样品测得的吸光度值^[10]。以 TBHQ 为参照抗氧化试剂,亚油酸过氧化抑制率为:抑制率(%)=(1- A_1/A_0) \times 100。还原能力测定^[11]:用移液管吸取 2.50 mL 样品溶液,再加入 0.2 mol/L pH 6.6 磷酸盐缓冲液 2.50 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.50 mL 于试管中,混匀。之后在 50℃ 水浴中,放置 20 min。然后加入 2.5 mL 浓度为 10% 三氯乙酸溶液,混合摇匀,以 3 000 r/min 离心 10 min 后,量取上清液 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.1% 氯化铁溶液 0.1 mL,混匀,静置 10 min。在 700 nm 处测定吸光度为 A_1 ,以蒸馏水代替试样作为空白对照,其吸光度为 A_0 ,以 TBHQ 作为阳性对照。该值越大说明还原力越强。还原力= $A_1 - A_0$ 。

1.3 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件和 One-Way ANOVA 方法对数据分别进行统计学分析和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 黄酮、TBHQ 对 DPPH· 清除能力的影响

由图 1 可以看出,黄酮类化合物对 DPPH· 的清除率随着浓度的增加而增强。由表 1 和表 2 可知,回归方程均具有统计学上极显著的意义,是有效的。经过检验 2 个离回归均方可知 $F=4.59 < F_{0.05(3,3)}$,检验回归系数可知 $t=0.68 < t_{0.05(6)}$,检验截距差异性可知 $|t|=2.37 < t_{0.05(6)}$,故 2 条直线差异不显著,因此可认为黄酮类化合物对

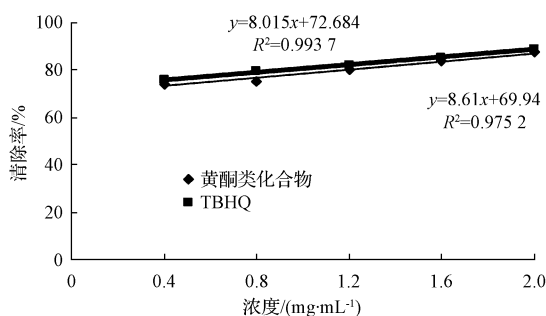


图 1 黄酮、TBHQ 清除 DPPH· 的能力

DPPH· 的清除能力与 TBHQ 相当。说明火龙果花中黄酮类化合物对 DPPH· 有明显的清除作用。抗氧化剂的酚羟基越多,与自由基反应越快,TBHQ 含有多个酚羟基,可提供多个氢离子与 DPPH· 结合起到抗氧化的作用,黄酮类化合物抗氧化作用与 TBHQ 相当,应该是火龙果花中的黄酮类化合物含有多个酚羟基的结果。

表 1 黄酮类化合物清除 DPPH· 能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	118.61	1	118.61	117.44 **	34.12
离回归	3.02	3	1.01		
总变异	121.63	4			

表 2 TBHQ 清除 DPPH· 能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	102.78	1	102.78	467.18 **	34.12
离回归	0.65	3	0.22		
总变异	103.43	4			

2.2 黄酮、TBHQ 对羟基自由基(·OH)清除能力

由方差分析可知,2 条回归直线都是有效的,检验离回归均方可知 $F=3.03 < F_{0.05(3,3)}$,检验回归系数可知 $t=0.73 < t_{0.05(6)}$,检验截距差异性可知 $|t|=2.28 < t_{0.05(6)}$,故 2 条直线差异不显著。由图 2 可以看出,黄酮类化合物对 ·OH 具有一定的清除作用,IC₅₀ 为 0.57 mg/mL。在试验的浓度范围内,随样品浓度的增大,黄酮类化合物和 TBHQ 对 ·OH 的清除率均增强。这很可能是由于二者的苯酚结构具有供氢的能力,能够还原具有高度氧化性的自由基,从而终止自由基连锁反应,达到清除或抑制自由基的作用。

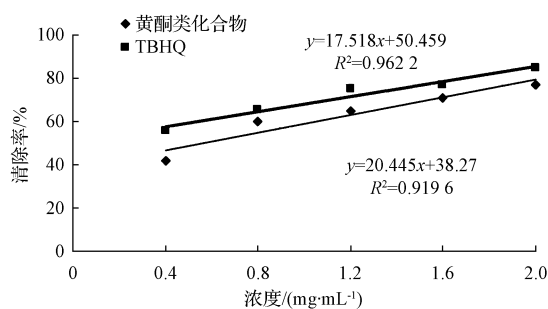


图 2 黄酮、TBHQ 清除 ·OH 的能力

表 3 黄酮类化合物清除 ·OH 能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	668.80	1	668.80	34.32 **	34.12
离回归	58.47	3	19.49		
总变异	727.27	4			

表 4 TBHQ 清除·OH 能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	491.01	1	491.01	76.36 **	34.12
离回归	19.29	3	6.43		
总变异	510.30	4			

2.3 黄酮、TBHQ 对超氧阴离子清除能力

利用方差分析进行检验,检验离回归均方可知 $F=2.81 < F_{0.05(3,3)}$, t 检验得到 $t=10.56 > t_{0.05(6)}$,即离回归均方差异不显著,回归系数差异显著,故 2 条直线不可合并。由图 3 可知,黄酮类化合物和 TBHQ 对超氧阴离子自由基具有一定的清除作用,黄酮类化合物的 IC_{50} 为 1.41 mg/mL, TBHQ 的 IC_{50} 为 0.42 mg/mL,在一定范围(0.4~2.0 mg/mL)内,随着浓度的增大,黄酮类化合物和 TBHQ 对超氧阴离子的清除率均增大,当浓度达到 2.0 mg/mL 时二者的清除能力已经基本接近,且黄酮类化合物对超氧阴离子的清除率表现出明显的量效关系。

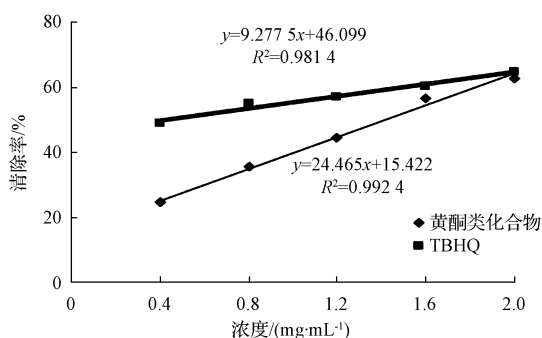


图 3 黄酮、TBHQ 清除超氧阴离子的能力

表 5 黄酮类化合物清除超氧阴离子能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	957.66	1	957.66	392.48 **	34.12
离回归	7.33	3	2.44		
总变异	964.99	4			

表 6 TBHQ 清除超氧阴离子能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	137.72	1	137.72	158.30 **	34.12
离回归	2.61	3	0.87		
总变异	140.33	4			

2.4 黄酮、TBHQ 对脂质过氧化抑制能力

由方差分析可知,2 个回归方程都是有效的,经 t 检验可知 2 个回归系数差异显著。由图 4 可知,黄酮类化合物的 IC_{50} 为 1.80 mg/mL, TBHQ 的 IC_{50} 为 1.17 mg/mL。在一定范围(0.4~2.0 mg/mL)内,随着浓度的增大,黄酮类化合物和 TBHQ 对亚油酸过氧化的抑制率逐渐增大,但二者的差异呈增大趋势,可能是在允许添加范围

内, TBHQ 添加量的增加可以显著提高其对油脂的抗氧化化保护作用^[12]。

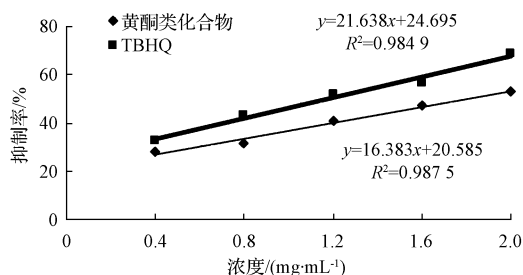


图 4 黄酮、TBHQ 抑制脂质过氧化的能力

表 7 黄酮类化合物抑制脂质过氧化能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	429.44	1	429.44	237.26 **	34.12
离回归	5.44	3	1.81		
总变异	434.88	4			

表 8 TBHQ 抑制脂质过氧化能力的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.01}
回归	749.12	1	749.12	195.59 **	34.12
离回归	11.49	3	3.83		
总变异	760.61	4			

2.5 黄酮、TBHQ 的还原能力

从图 5 可以看出,在试验浓度范围(0.4~2.0 mg/mL)内,黄酮类化合物的还原能力随其浓度的增加而增强,但随着浓度的升高,增长趋势放缓。由于黄酮类化合物不是单体化合物,纯度不高,故表现出的还原力较弱, TBHQ 的还原力约是相同浓度下黄酮类化合物的 1.80~3.35 倍。

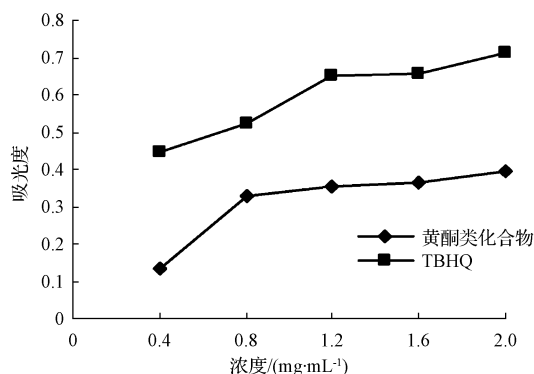


图 5 黄酮、TBHQ 的还原能力

3 结论与讨论

火龙果花富含黄酮类化合物,很多功能都与黄酮类化合物的抗氧化作用相关。该试验通过 5 种途径综合评价火龙果花中黄酮类化合物的抗氧化性能,选用人工合成的抗氧化剂 TBHQ 作阳性对照,试验表明黄酮类化

合物清除 DPPH· 和 ·OH 的能力均可认为与 TBHQ 相当;清除超氧阴离子的能力虽比 TBHQ 弱,但随着浓度的增大,清除超氧阴离子的能力越来越接近 TBHQ,黄酮类化合物清除超氧阴离子的 IC_{50} 为 1.41 mg/mL, TBHQ 的 IC_{50} 为 0.42 mg/mL;黄酮类化合物抑制脂质过氧化的 IC_{50} 为 1.80 mg/mL, TBHQ 的 IC_{50} 为 1.17 mg/mL,随着样品浓度的升高,黄酮类抑制脂质过氧化的能力逐渐偏离 TBHQ;相比之下,黄酮类化合物的还原力相对较差。综上所述,火龙果花中黄酮类化合物具有较强的抗氧化能力。

该试验抗氧化能力评价方法的选择是基于检测机制的原理不同,主要原理是^[13]:在特定条件下,样品对检测体系中自由基的清除能力可以评价被测物的抗氧化性能;在特定条件下,通过测定样品抑制脂类物质氧化的能力可以评价被测物的抗氧化性能;在特定条件下,测定样品的还原能力可以评价被测物的抗氧化性能。这些方法虽然在不同的条件下能评价被测物的抗氧化性能,但是无法全面评价抗氧化剂的抗氧化活性;并且不同的测定方法对结果的解释依据不同,使得分析结果之间无可比性。总之,要科学、全面地评价天然抗氧化剂的抗氧化活性,需要多种评价方法相互结合、相互验证。该试验设计存在一定的局限性,试验只做了体外抗氧化活性的测定,对人体效果并非等同,并不是抗氧化能力越强对人体越好。黄酮类化合物只有在安全剂量范围内对人体才是安全的,摄入过量会产生毒副作用。因此在将火龙果花中黄酮类化合物作为天然抗氧化剂

应用于食品添加剂、保健食品时,要加强对人体黄酮类化合物摄入量的研究和安全性评价。

参考文献

- [1] 陈春仁. 火龙果的高产栽培技术[J]. 北京农业, 2015(3):17.
- [2] 马蔚红,陆军迎,高松峰. 火龙果西番莲蛋黄果优质高效栽培技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002:1-38.
- [3] 夏杏洲,胡雪琼,湛素华. 霸王花(火龙果花)干制工艺的研究[J]. 食品研究与开发,2006,127(6):80-82.
- [4] 夏杏洲,钟日初,郭茵薇. 火龙果花保健饮料的研制[J]. 广州食品工业科技,2004,20(4):69-71.
- [5] 蔡永强,郑伟,王彬. 火龙果花营养成分分析[J]. 西南农业学报,2010,23(1):283-286.
- [6] 高慧颖,王琦,陈源,等. 微波辅助提取火龙果花多糖的工艺研究[J]. 福建农业学报,2014,29(9):909-912.
- [7] 孙静. 河北香菊中黄酮类化合物抗氧化活性研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2010.
- [8] 邱书梅. 药食两用植物提取物及抗氧化性能的研究[D]. 青岛:青岛大学,2014:18-19.
- [9] 赵平,任鹏,张月萍. 原花青素抗氧化活性测定方法比较[J]. 现代化工,2012,32(5):120.
- [10] 王琪,田迪英,杨荣华. 果蔬抗氧化活性测定方法的比较[J]. 食品与发酵工业,2008(5):166-167.
- [11] 刘清,李玉,姚惠源. 大麦提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2007,28(2):131-136.
- [12] 刘翠芳. 加热体系中特丁基对苯二酚(TBHQ)的迁移与转化规律及其抗氧化机理研究[D]. 郑州:河南工业大学,2013:26-27.
- [13] SOLDATI F. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and from ginseng drug-preparation[J]. *Planta Med*, 1980,39(4):348.

Study on the Antioxidative Activity of Flavonoids From Pitaya Flower

LI Guosheng, YAO Qiugui, ZHANG Weimin

(College of Food Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

Abstract: In order to find safe natural antioxidant, taking pitaya flower as the research object, with ethanol as extraction solvent, heating reflux extraction of pitaya flower for *in vitro* antioxidant activity evaluation method, total flavonoids content was determined, antioxidant activity of samples was determined from five aspects, using the method of DPPH, salicylic acid, adjacent phenyl phenol method, ferric thiocyanate method, Prussian blue method, with chemical synthetic fat-soluble antioxidants TBHQ as positive reference substance, the pitaya flower under different concentrations of antioxidant activity of flavonoids was researched. The results showed the pitaya flower flavonoids content was 2.62 mg/mL, removal ability of flavonoids on DPPH· was similar with TBHQ, IC_{50} of clearing ·OH was 0.57 mg/mL, IC_{50} of removing superoxide anion was 1.41 mg/mL, IC_{50} of inhibiting of lipid peroxidation was 1.80 mg/mL, reducing power was relatively weak. Studies showed that flavonoids pitaya flower had strong antioxidant activity, as the application of natural antioxidants.

Keywords: pitaya flower; flavonoids; antioxidation; free radicals