

龙牙百合叶总黄酮提取工艺及抗氧化性研究

薛梅¹, 李晓英¹, 周卫平²

(1. 重庆文理学院 林学与生命科学学院, 重庆 402160; 2. 重庆文理学院 体育学院, 重庆 402160)

摘要:以龙牙百合叶片为研究对象,采用优化超声波法提取龙牙百合叶片总黄酮,对黄酮进行了抗氧化活性分析,并在单因素试验的基础上采用正交实验法,研究了乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度对总黄酮提取效果的影响,并确定了最佳工艺条件,对其体外抗氧化活性进行了初步研究。结果表明:最佳工艺条件为提取温度 50 ℃,乙醇浓度 80%,料液比 1:5 g·mL⁻¹,提取时间 30 min。此条件下,百合叶总黄酮含量为 12.691 mg·g⁻¹。抗氧化试验结果表明,龙牙百合叶总黄酮提取液对 DPPH· 的清除效果优于相同浓度下维生素 C 溶液,并呈显著差异。

关键词:龙牙百合叶;总黄酮;超声波法;抗氧化

中图分类号:Q 946.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0127-04

百合(*Lilium*)属百合科百合属多年生宿根草本植物。以药食两用闻名于世,在世界上大约有 90 余种,大约有 47 种原产于我国^[1]。龙牙百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)是目前栽培面积较大的食用百合品种之一,主产于湖南、四川、重庆等地^[2]。

黄酮类化合物又名生物类黄酮(bioflavonoid),广泛存在于果蔬、中草药中,是一类极具开发前景的天然有机抗氧化剂。能清除机体代谢过程中产生的多种自由基,具有抗菌消炎、抗过敏、抗病毒、扩张血管、抑制脂质过氧化、抗血小板凝聚、降低毛细血管渗透性和脆性的作用^[3]。

目前针对龙牙百合黄酮类化合物提取的相关研究主要集中在食用百合的花和鳞茎部位^[4-6],针对叶片研究的相关报道相对较少。该研究以龙牙百合叶为研究对象,在水浴、索式、超声波 3 种提取方法和乙醇、乙酸乙酯、甲醇、水等提取试剂进行筛选的基础上,确定超声辅助提取方法、乙醇为提取剂,通过单因素试验和正交实验,筛选出龙牙百合叶总黄酮最佳提取工艺,并对其体外抗氧化活性进行初步研究,以期龙牙百合的综合开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

龙牙百合购于重庆江津百合种植基地;将龙牙百合叶

60 ℃恒温烘干,再粉碎过 60 目筛,密封冷藏待用。亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇等药品均为分析纯;芦丁标准品 HPLC≥98%(中国食品药品检定研究院)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 精密称取 5.0 mg 芦丁标准品置于 25 mL 容量瓶,加 70%乙醇至刻度,摇匀,得到 0.2 mg·mL⁻¹ 芦丁溶液,精密量取 0、1、2、3、4、5、6 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,各加水 6 mL,再加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀放置 6 min,加 4%氢氧化钠溶液 10 mL,加水至刻度,摇匀放置 15 min,以不加标准品的溶液为空白对照,在 510 nm 波长处测定吸光度,以浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,制作标准曲线。

1.2.2 样品总黄酮的测定 称取百合叶片粉末 2.5 g,抽滤得到提取物,旋转蒸发后溶解定容。根据芦丁标准曲线制作方法,测定总黄酮含量。

1.2.3 总黄酮提取条件筛选的单因素试验 超声温度的筛选:在料液(百合叶与乙醇溶液,下同)比为 1:40 g·mL⁻¹,乙醇浓度为 70%,提取时间为 30 min 条件下,分别比较不同提取温度(40、50、60、70、80 ℃)对百合叶片总黄酮提取量的影响。乙醇浓度的筛选:在料液比为 1:40 g·mL⁻¹,提取时间为 30 min,提取温度为 40 ℃的条件下,分别比较不同乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)对百合叶片总黄酮提取量的影响。料液比的筛选:在提取温度为 40 ℃,乙醇浓度为 80%,提取时间为 30 min 的条件下,分别比较不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g·mL⁻¹)对百合叶片总黄酮提取量的影响。提取时间的筛选:在提取温度为 40 ℃,乙醇浓度为 80%,料液比为 1:10 g·mL⁻¹的条件下,分别比较不同提取时间(10、20、30、40、50 min)对

第一作者简介:薛梅(1973-),女,硕士,实验师,现主要从事植物生理及植物种质资源开发与利用等研究工作。E-mail: xuemei.1998@163.com.

责任作者:李晓英(1973-),女,硕士,副教授,现主要从事生物活性物质的提取与检测等研究工作。E-mail: lxyl2@126.com.

基金项目:重庆市教委科研资助项目(KJ1401129)。

收稿日期:2016-01-29

百合叶片总黄酮提取量的影响。

1.2.4 优化总黄酮提取条件的正交实验 根据单因素试验结果,选定提取温度(F1)、乙醇浓度(F2)、料液比(F3)、提取时间(F4)为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验(表1)。通过测定总黄酮提取量,优选最佳提取工艺条件。

表1 正交实验的因素及水平

Table 1 Factor and level of orthogonal experiment

| 水平 Level | F1(提取温度) Extraction temperature/℃ | F2(乙醇浓度) Ethanol concentration/% | F3(料液比) Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹) | F4(提取时间) Extraction time/min |
|-------------|---|--|---|------------------------------------|
| 1 | 30 | 70 | 1:5 | 30 |
| 2 | 40 | 80 | 1:10 | 40 |
| 3 | 50 | 90 | 1:15 | 50 |

1.2.5 方法重现性试验 根据正交实验得出结果,确定最佳提取方法和条件后,同时做5个平行样品,计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.6 抗氧化性研究 根据最优提取条件提取百合叶总黄酮,按比例稀释成不同浓度的百合叶总黄酮溶液进行 DPPH·清除能力试验。分别取稀释后不同浓度的百合叶提取液(0.010 0、0.012 5、0.016 7、0.025 0、0.050 0 mg·mL⁻¹)2 mL及0.2 mmol·L⁻¹ DPPH·溶液2 mL,加入同一具塞试管中,摇匀在室温下密闭静置30 min,用纯溶剂作参比于517 nm波长下测定吸光度,根据公式计算百合叶黄酮提取液对 DPPH·的清除率。以同样的方法,测定与百合叶总黄酮溶液相同浓度梯度的维生素C溶液对 DPPH·清除率,作为对照。DPPH·清除率(%)=[1-(A₁-A₂)/A₀]×100,其中A₁为加提取液后 DPPH·溶液的吸光度,A₂为提取液的吸光度,A₀为未加提取液时 DPPH·溶液的吸光度。

1.3 数据分析

采用 Excel 及 SPSS 13.0 软件对数据进行处理并做差异性分析。

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线

以芦丁标准品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线如图1。标准曲线方程为 $y=10.206x+0.0075$,相关系数 $R^2=0.9989$ 。

2.2 提取温度对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

在料液比为1:40 g·mL⁻¹,乙醇浓度为70%,提取时间为30 min条件下,以不同水浴超声温度提取百合叶黄酮。从图2可以看出,温度为40℃时总黄酮提取量最高,与其它温度呈显著差异,温度超过40℃,总黄酮提取率下降,从50~80℃不存在显著性差异。温度的升高,可以在一定程度上加快溶质的扩散和溶剂的渗透,但过高的温度也可能会导致黄酮类物质的分解,从而使总黄酮减少。提取温度可初步定为40℃。

2.3 乙醇浓度对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

由图3可知,在料液比为1:40 g·mL⁻¹,提取时间

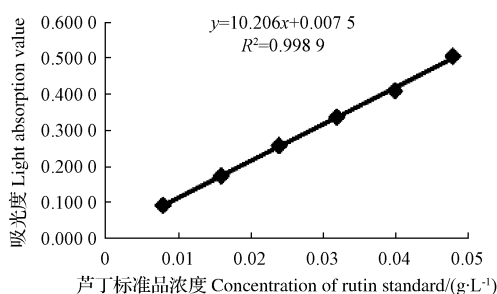
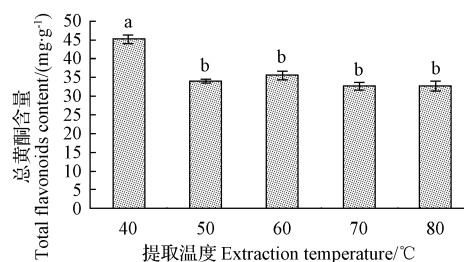


图1 芦丁样品标准曲线

Fig. 1 Rutin standard curve



注:不同字母表示在0.05水平上的显著性差异。下同。

Note: The different letters indicate significant difference at the 0.05 level. The same below.

图2 提取温度对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on content of total flavonoids extracting from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves

为30 min,提取温度为40℃下,总黄酮含量随着乙醇浓度的升高呈现逐渐升高的趋势。在乙醇浓度70%~90%时,总黄酮提取量无明显差异。乙醇浓度为80%总黄酮含量误差最小,故百合叶片提取总黄酮最佳乙醇浓度初步确定为80%。

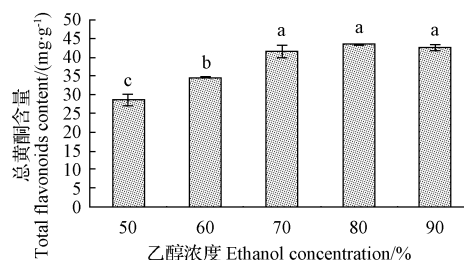


图3 乙醇浓度对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on content of total flavonoids extracting from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves

2.4 料液比对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

由图4可知,在提取温度为40℃,乙醇浓度为80%,提取时间为30 min,不同料液比的条件下,随着溶剂量的增大,百合叶总黄酮提取量呈降低趋势,料液比在1:10 g·mL⁻¹条件下,黄酮含量最高,所以最佳料液

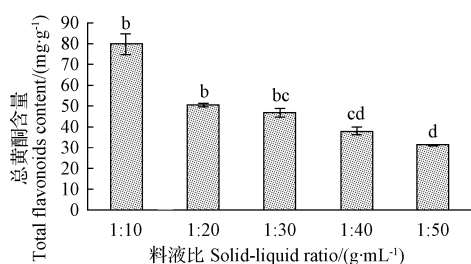


图4 料液比对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on content of total flavonoids extracting from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves

比初定为 $1:10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 提取时间对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

由图5可知,在提取温度为 40°C ,乙醇浓度为 80% ,料液比为 $1:10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 条件下,在 40 min 总黄酮提取量最高,总黄酮含量与其它提取时间差异显著。故百合叶总黄酮提取的最佳时间初步确定在 40 min 。

表2

正交实验结果

Table 2

Results of orthogonal experiment

| 试验号 Test No. | F1(提取温度) Extraction temperature | F2(乙醇浓度) Ethanol concentration | F3(料液比) Solid-liquid ratio | F4(提取时间) Extraction time | 总黄酮含量 Total flavonoids content/(mg · g ⁻¹) |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 15.863 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 13.313 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 11.338 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 10.925 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 9.200 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10.988 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 9.025 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 17.150 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 14.850 |
| K1 | 9.003 | 7.958 | 9.778 | 8.869 | |
| K2 | 6.914 | 8.814 | 6.686 | 7.406 | |
| K3 | 9.117 | 8.261 | 6.569 | 8.758 | |
| R | 2.203 | 0.856 | 3.208 | 1.464 | |

表3 方差分析结果

Table 3 The result of variance analysis

| 因素 Factor | 平方和 Sum of square | 自由度 df | 均方 Mean square | F值 F value | P值 Sig. |
|--------------|----------------------|-----------|-------------------|---------------|------------|
| F1 | 27.686 | 2 | 13.843 | 4.368 | 0.028 |
| F2 | 3.388 | 2 | 1.694 | 0.534 | 0.595 |
| F3 | 47.896 | 2 | 23.948 | 7.556 | 0.004 |
| F4 | 11.956 | 2 | 5.978 | 1.886 | 0.180 |

大,4个因素对百合总黄酮含量提取的主次影响顺序为 $F3(\text{料液比}) > F1(\text{提取温度}) > F4(\text{提取时间}) > F2(\text{乙醇浓度})$,最优水平为 $A_3B_2C_1D_1$,即提取温度为 50°C ,乙醇浓度为 80% ,料液比为 $1:5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,提取时间为 30 min 提取效果最好。

2.7 重现性试验

根据最优提取方法,同时做5个平行样品进行验证试验,测得总黄酮平均含量为 $12.691 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,相对标准偏差(RSD)为 2.63% ,提取物总黄酮含量高于所有正交实验结果,这表明提取工艺稳定合理,重现性较好。

2.8 不同浓度百合叶总黄酮提取液与维生素C的体外抗氧化能力比较

从图6可以看出,百合叶总黄酮提取液和维生素C

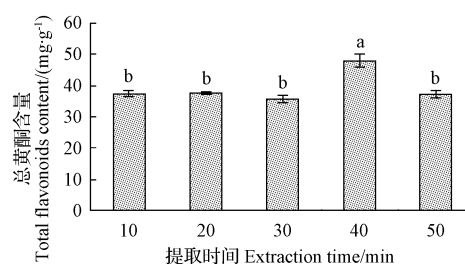


图5 提取时间对龙牙百合叶总黄酮提取量的影响

Fig.5 Effect of extraction time on content of total flavonoids extracting from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves

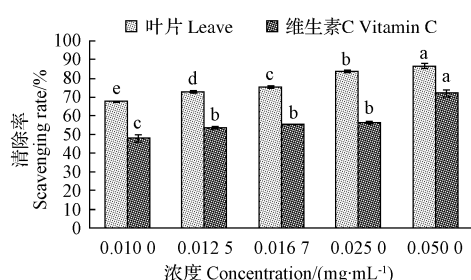
2.6 正交实验结果

由表2,3可以看出, $F3(\text{料液比})$ 和 $F1(\text{提取温度})$ 对龙牙百合叶片总黄酮的提取量有着显著的影响($P < 0.05$),其它因素对总黄酮提取影响不显著。 R 值越大,极差越大,说明该因素的水平变动对试验结果的影响越

对 $\text{DPPH} \cdot$ 的清除效果均随样品浓度的升高而增加,其中百合叶总黄酮不同浓度提取液对 $\text{DPPH} \cdot$ 的清除率间均呈显著性差异,维生素C溶液对 $\text{DPPH} \cdot$ 的清除效果在浓度 $0.010 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.0125 \sim 0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以及 $0.050 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈显著差异,在 0.0125 、 0.0167 、 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度间差异不显著。龙牙百合叶总黄酮提取液对 $\text{DPPH} \cdot$ 的清除率始终优于相同浓度下的维生素C溶液,经方差分析,百合叶总黄酮提取液与维生素C在相同浓度下,对 $\text{DPPH} \cdot$ 的清除效果呈显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

该研究以龙牙百合叶为原料,采用超声波辅助乙醇溶剂法提取龙牙百合叶中有效成分黄酮,在单因素试验的基础上,进行正交实验,确定最佳提取工艺。其结论为影响百合叶总黄酮提取的主次影响顺序为料液比 $>$ 提取温度 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇浓度,最佳提取条件为:提取温度为 50°C ,乙醇浓度为 80% ,料液比为 $1:5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,提取时间为 30 min 。在优化的工艺条件下,总黄酮的含量可达到 $12.691 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。牛立新等^[4]报道了从百合鳞



注:同一指标不同字母表示在 0.05 水平上的显著性差异。

Note: The different letters indicate significant difference at 0.05 level of the same index.

图 6 百合叶总黄酮提取液与维生素 C 对 DPPH·清除率的比较

Fig. 6 Comparison of effect of *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves total flavonoids extraction and vitamin C on removing DPPH·

茎提取总黄酮提取率为 0.59%。另外,有大量从天然植物中提取黄酮类化合物的报道,如银杏叶总黄酮含量约为 2.5%~5.0%^[7-8],从银杏叶提取总黄酮制成成药,已经在临床取得确切疗效,相关的保健饮品在市场反响良好。李月等^[9]从蓝莓叶中,利用超声波提取法,总黄酮提取率为 8.0%,说明百合叶黄酮含量不高。体外抗氧化试验研究中,以清除 DPPH·较为常见的天然抗氧化剂维生素 C 为对照,试验结果表明,龙牙百合叶的总黄酮提取液与维生素 C 在相同浓度下,对 DPPH·的清除能力显著优于相同浓度的维生素 C 溶液,在百合叶总黄酮提取液浓度为 0.010 0 mg·mL⁻¹时清除率即可达到 68.4%,而维生素 C 低于 50%,说明百合叶黄酮具有出较好的清除 DPPH·的能力。龙牙百合作为一种优质

食用百合,栽培范围广,已经是湖南、江西、重庆地区农民增收的重要途径。但传统采后处理一般局限在鳞茎的开发和利用上,针对叶片的次生代谢相关产物提取工艺研究还比较少。该研究中,龙牙百合叶片总黄酮提取率为 12.691 mg·g⁻¹,含量较低,但龙牙百合叶所含黄酮具有较理想的抗自由基氧化效果,这说明,天然植物中提取的黄酮类化合物,由于其来源、种类、组分不同,以及各类化合物之间相互作用不同,可能会导致其抗氧化能力不同。该试验对龙牙百合叶片的总黄酮提取工艺和体外抗氧化能力进行了初步研究,对龙牙百合的综合开发和利用提供了新的思路 and 理论依据,为百合科植物的化学成分和药理作用提供理论参考。

参考文献

- [1] 张宏达. 种子植物系统学[M]. 北京:科学出版社,2004:598-604.
- [2] 陈立德,刘新桃,蒋盛岩,等. 龙牙百合花氨基酸含量的柱前衍生 OPA-HPLC 法测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10832-10833,10836.
- [3] 张德权,台建祥,付勤. 生物类黄酮的研究及应用概况[J]. 食品与发酵工业,1999,25(6):52-57.
- [4] 牛立新,李章念,李红卷,等. 超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J]. 中药材,2007,30(1):85-88.
- [5] 李登昌,陈毓. 香水百合花中总黄酮含量的测定[J]. 安徽农业科学,2013,41(15):6900-6901.
- [6] 许丽璇. 微波提取百合总黄酮及抗氧化性研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(8):2069-2071.
- [7] 胡春,丁霄霖. 黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化研究[J]. 食品与发酵工业,1996(3):46.
- [8] 柏桂英,柏小强,宋豫军,等. 银杏叶总黄酮的提取及保健饮料研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2000(15):12.
- [9] 李月,刘戈,胡佳. 超声波法提取蓝莓叶总黄酮的工艺优化[J]. 化学与生物工程,2015(5):48-51.

Study on Extraction Technology and Antioxidant Property of Total Flavonoids From *Lilium brownii* var. *viridulum* Leaves

XUE Mei¹, LI Xiaoying¹, ZHOU Weiping²

(1. College of Forestry and Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160; 2. College of Physical Education, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160)

Abstract: Extraction technology by ultrasonic method and antioxidant activity of total flavonoids from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves were studied. Basing on the single factor experiment, orthogonal experiment was used to study the effect of ethanol concentration, material-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the quantity of flavonoids extracting from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves. Antioxidant activity of flavonoids extraction *in vitro* was researched preliminarily. The results showed that the optimum extracting conditions of total flavonoids from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves were extraction temperature 50 °C, ethanol concentration 80%, solid-liquid ratio 1 : 5 g·mL⁻¹, extraction time 30 minutes, the total flavonoids content was 12.691 mg·g⁻¹. The results of antioxidant test showed that the DPPH· eliminating ability of total flavonoids extraction from *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves was better than the same concentration of vitamin C, and showed a very significant difference.

Keywords: *Lilium brownii* var. *viridulum* leaves; total flavonoid; ultrasonic method; antioxidant activity