

芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究^{*}

严建刚^{1,2}, 张名位¹, 杨公明², 池建伟¹

(1 广东省农业科学院 生物技术研究所 农业部功能食品重点开发实验室, 广东 广州 510640;

2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用响应面分析法(RSA)研究了提取溶剂、时间和料液比等芹菜黄酮提取条件, 比较了提取物粗品的体外抗氧化作用。结果表明, 芹菜黄酮提取的最佳工艺条件为: 以芹菜干粉为原料, 以体积分数40%乙醇为溶剂, 料液比1:15(*m*:*v*), 提取时间2.5 h, 提取温度80℃。在此最优工艺条件下提取3次, 芹菜黄酮提取物粗品得率为5.18%, 粗品中黄酮含量为43 g/kg。芹菜黄酮提取物粗品表现出较强的清除羟自由基和1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基的能力, 其 IC_{50} 值分别为10.1和8 mg/L(以黄酮计), 其抗氧化能力略低于槲皮素而强于维生素C。

[关键词] 芹菜; 黄酮; 提取条件; 抗氧化作用; 响应面

[中图分类号] S636.301

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)01-0131-05

黄酮类化合物的生理作用一直受到人们的关注。早在20世纪30年代, 就有学者发现黄酮类化合物具有维生素C样的活性。Pratt^[1]研究认为, 黄酮类化合物具有一级抗氧化剂的作用。20世纪80年代以来, 对黄酮类化合物的研究逐渐转向其清除自由基、抗衰老及对老年性疾病的防治功效上^[2,3]。随着全球人口老龄化的加剧, 老年性疾病的防治和抗氧化、抗衰老研究已引起广泛关注, 评价和筛选富含黄酮类化合物的植物资源已成为农学、医学和食品科学研究的热点之一。

芹菜(*Apium graveolens* L.)属伞形花科1年生或2年生草本植物, 异名药芹、旱芹^[4]。已有研究^[5]证实, 芹菜含有丰富的黄酮类化合物, 主要成分为水蓼素及7-甲基水蓼素。医学试验证明, 这2种黄酮类化合物是治疗高血压的有效成分。在药理上, 芹菜还具有降压、安神、降血糖、血脂, 软化血管, 增强免疫力等功效^[6]。目前, 对芹菜中黄酮类化合物的研究多集中于黄酮含量分析上, 而对其提取工艺研究报道较少, 对其抗氧化活性的研究尚未见报道。本研究采用响应面分析法(RSA)优化芹菜黄酮的提取工艺条件, 并探讨了芹菜黄酮粗提物清除羟自由基和1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基的能力, 旨在为利用芹菜开发天然抗氧化功效因子提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料 供试芹菜品种为衡阳旱芹, 由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。将新鲜芹菜洗净、切碎, 于60℃烘干, 粉碎, 过孔径0.45 mm筛备用。

试剂 芦丁、槲皮素、抗坏血酸、体积分数95%乙醇、无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠均为国产分析纯; DPPH为Sigma公司产品; 活性氧和总抗氧化能力测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 芹菜黄酮提取条件的RSA响应面法设计

根据Box-Behnken的中心组合设计原理^[7], 以影响芹菜黄酮提取的乙醇体积分数、时间和料液比3个因素为自变量, 以提取液中黄酮含量(g/kg)为响应值, 作3因素3水平的响应面分析试验, 共15个试验点, 其中3个点为中心试验, 用以估计误差。试验因素和水平见表1。

表1 RSA试验的因素水平取值表

Table 1 Factors and levels of RSA experiments

水平 Levels	乙醇体积分数/% Ethanol concentration	料液比(<i>m</i> : <i>v</i>) Ratio of solid to liquid	提取时间/h Extracting time
-1	40	1:10	1
0	50	1:15	2
1	60	1:20	3

* [收稿日期] 2003-12-22

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目(010133)

[作者简介] 严建刚(1978-), 男, 河南沁阳人, 在读硕士生, 主要从事功能食品研究。

[通讯作者] 张名位(1967-), 男, 湖北荆州人, 研究员, 博士, 主要从事生物活性物质研究。

1.3 芹菜黄酮提取物粗品的制备

取芹菜干粉100 g,用体积分数40%乙醇1:15(m/V)料液比于80℃提取3次,第1次2.5 h,后2次各1 h,合并3次提取液并过滤,滤液真空浓缩后用石油醚脱脂,脱脂后的浓缩液用正丁醇萃取3次,合并萃取液并浓缩干燥,得芹菜黄酮提取物粗品,称重,计算得率。

黄酮提取物粗品得率/% = (提取物粗品重/芹菜干粉重) × 100%。

1.4 黄酮含量的测定

采用NaNO₂-Al(NO₃)₃比色法,将2 mL不同提取条件下的芹菜黄酮提取液置于具塞试管中,按文献[8]方法操作,在波长510 nm处比色,以芦丁为标样,按上述方法测定吸光值,建立回归方程为:Y = 1.11X - 0.0017,相关系数r = 0.9999。测定重复3次。

1.5 总抗氧化能力的测定

芹菜黄酮测定液的配制:准确称取已制备的芹菜黄酮提取物粗品,用蒸馏水溶解,配成提取物粗品浓度为12 mg/L的溶液(黄酮含量为0.5 mg/L),溶液用蒸馏水稀释成3.6, 4.0, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4 mg/L测定液备用。

测定方法: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活性氧测定试剂盒说明书。

总抗氧化能力/(u · mL⁻¹) = $\frac{\text{测定管OD} - \text{对照管OD}}{0.01 \times 30} \times \frac{\text{反应液体积(mL)}}{\text{取样量(mL)}} \times \text{样品稀释倍数}$

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为一个抗氧化能力单位(u/mL)。

1.6 抑制羟自由基试验

芹菜黄酮测定液的配制:准确称取7.44 g黄酮提取物粗品配制成7.44 g/L(黄酮含量320 mg/L)溶液,用蒸馏水将该溶液稀释成4, 8, 16, 32, 64, 128和160 mg/L(以黄酮计)测定液备用。以维生素C和槲皮素为对照品。

测定方法:采用Fenton反应试剂盒法,具体操作参考南京建成生物工程研究所提供的活性氧测定试剂盒说明书。

抑制率/% = $\frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{对照管OD值}} \times 100\%$ 。

1.7 抑制DPPH自由基试验^[9]

芹菜黄酮测定液的配制:准确称取黄酮提取物

粗品配制成黄酮含量为32 mg/L的溶液,用蒸馏水将该溶液稀释成2, 4, 8, 10, 16 mg/L测定液备用。以维生素C和槲皮素为对照品。

测定方法:取测定液2 mL及2 × 10⁻⁴ mol/L DPPH 2 mL加入同一具塞试管中,摇匀,30 min后用无水乙醇作参比测定其吸光度A_i,同时测定2 mL 2 × 10⁻⁴ mol/L DPPH溶液与2 mL无水乙醇混合液的吸光度A_c,以及2 mL测定液与2 mL无水乙醇混合液的吸光度A_j,根据下式计算测定液对DPPH的抑制率:

抑制率/% = {1 - (A_i - A_j)/A_c} × 100%

式中,A_c为未加测定液时DPPH的吸光度;A_j为测定液在测定波长下的吸光度;A_i为加测定液后DPPH的吸光度。

2 结果与分析

2.1 芹菜黄酮提取条件试验结果

RSA 试验设计与结果及方差分析结果见表2和表3。由表3可知,乙醇体积分数和提取时间对提取液中黄酮含量的影响达极显著水平(P < 0.01),料液比达显著水平(P < 0.05)。乙醇体积分数与提取时间之间存在交互作用,并达显著水平(P < 0.05),提取时间二次项影响达极显著水平(P < 0.01)。由F值可知,各因素对提取液中黄酮含量的影响大小顺序为乙醇体积分数 > 提取时间 > 提取时间的二次项 > 料液比 > 乙醇体积分数与提取时间的交互项。结合统计分析认为,芹菜黄酮提取最优工艺条件为:乙醇体积分数40%,料液比1:15,提取时间2.5 h。在此最优条件下,采用1.3的方法,芹菜黄酮提取物粗品得率为5.18%,粗品中黄酮含量为43 g/kg。由于各因素对提取液中黄酮含量的影响不是简单的线性关系,为了进一步明确各因子对响应值Y的影响,采用SAS统计软件对表2数据进行多元回归分析,得到回归方程为:

$$Y = 0.23 - 0.353X_1 + 0.135X_2 + 0.155X_3 - 0.050X_1^2 + 0.003X_1X_2 - 0.143X_1X_3 - 0.085X_2^2 - 0.038X_2X_3 - 0.210X_3^2$$

经方差分析可知,用该回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其变量与自变量间的多元回归关系极显著(P < 0.01),复相关系数r = 0.9790,表明该方程对试验拟合度好,可对不同提取条件下的黄酮含量进行预测。

表2 RSA 试验的因素、水平组合和响应值

Table 2 Factor-levels and response values of RSA experiments

序号 No.	乙醇体积分数/% Ethanol concentration X_1	料液比(m/V) Ratio of solid to liquid X_2	提取时间/h Extracting time X_3	黄酮含量/($g \cdot kg^{-1}$) Flavone content Y
1	- 1	- 1	0	2.37
2	- 1	0	- 1	2.08
3	- 1	0	1	2.80
4	- 1	1	0	2.58
5	0	- 1	- 1	1.75
6	0	- 1	1	2.01
7	0	1	- 1	2.08
8	0	1	1	2.19
9	1	- 1	0	1.68
10	1	0	- 1	1.57
11	1	0	1	1.72
12	1	1	0	2.04
13	0	0	0	2.29
14	0	0	0	2.29
15	0	0	0	2.33

表3 RSA 试验的方差分析结果

Table 3 Variance analysis of RSA test

方差来源 Sources	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方 Mean squares	F 值 F values	P
X_1	1	0.994	0.994	101.5**	0.0001
X_2	1	0.146	0.146	14.9*	0.012
X_3	1	0.192	0.192	19.6**	0.006
X_1X_1	1	0.009	0.009	0.96	0.373
X_1X_2	1	0.005	0.005	0.57	0.483
X_1X_3	1	0.081	0.081	8.29*	0.035
X_2X_2	1	0.027	0.027	2.75	0.158
X_2X_3	1	0.006	0.006	0.57	0.483
X_3X_3	1	0.164	0.164	16.69**	0.009
回归 Regression	9	1.609	0.179	18.25**	0.0026
残差 Error	5	0.049	0.0098		
总离差 Corrected total	14	1.658			

注: * 和 ** 分别代表5% 和1% 显著水平。

Note: * and ** stands for 5% and 1% significant level respectively.

2.2 芹菜黄酮提取物粗品的抗氧化作用

2.2.1 总抗氧化能力 从表4 可以看出, 提取物粗品的总抗氧化能力较强, 表现出明显的量效依赖关系。以测定液中的黄酮含量计, 在试验范围内, 黄酮含量与总抗氧化能力呈线性相关, 线性方程为 $y = 18.02x + 0.5073$, 相关系数为0.9968, 达极显著差异水平($P < 0.01$)。

2.2.2 清除羟自由基能力 由表5 知, 芹菜提取物粗品在 $FeSO_4-H_2O_2$ 体系中具有较好的清除 $\cdot OH$ 自由基能力, 黄酮浓度在4~160 mg/L 时, 与清除

$\cdot OH$ 自由基具有良好的量效关系, 其 IC_{50} 值为10.1 mg/L 。当浓度超过160 mg/L 时, 清除 $\cdot OH$ 自由基的能力下降。槲皮素也表现出在高于一定剂量浓度时, 其清除 $\cdot OH$ 自由基能力下降的特征, 其 IC_{50} 值为29 mg/L 。维生素C 在试验剂量范围内表现出良好的清除 $\cdot OH$ 自由基能力, 随着浓度的增大, 抑制能力逐渐增强, 其 IC_{50} 值为19 mg/L 。黄酮类化合物在铁离子及氧存在时会自动氧化生成超氧化物或过氧化氢, 表现出促氧化作用。这可能是芹菜黄酮提取物粗品和槲皮素在 $FeSO_4-H_2O_2$ 体系中浓度超过某

一值时,清除·OH 自由基能力下降的原因。

表4 芹菜黄酮提取物粗品的总抗氧化能力

Table 4 Total antioxidative capacity of celery flavone crude extracts

测定液中粗品浓度/(mg·L ⁻¹) Crude extract concentration of solution	测定液中黄酮含量/(mg·L ⁻¹) Flavone content of solution	总抗氧化能力/(u·mL ⁻¹) Total antioxidative capacity
3.6	0.155	3.29
4.0	0.172	3.62
4.8	0.206	4.21
5.2	0.224	4.52
5.6	0.241	4.86
6.0	0.258	5.24
6.4	0.275	5.40

表5 芹菜黄酮提取物粗品清除羟自由基的能力

Table 5 Scavenging hydroxyl free radical capacity of celery flavone crude extracts

物质	剂量/(mg·L ⁻¹) Dose	抑制率/% Inhibition rate
提取物粗品 (黄酮计) Crude extract (flavone content)	4	5.27
	8	33.3
	16	72.7
	32	84.6
	64	89.9
	128	91.2
	160	91.2
维生素C Vitamin C	320	89.7
	5	5.3
	10	21.9
	20	52.9
	50	94.0
槲皮素 Quercetin	75	94.0
	100	94.9
	5	15.4
	10	26.7
	20	33.6
槲皮素 Quercetin	50	79.5
	75	40.1
	100	23.4

2.2.3 清除DPPH 自由基能力 由表6可知,芹菜黄酮提取物粗品在试验浓度范围内与清除DPPH 自由基呈现出良好的量效关系,随浓度的增大,抑制能力逐渐增强。维生素C、槲皮素与清除DPPH 自由基呈显著的线性相关,相关系数分别为0.999和0.996。芹菜黄酮提取物粗品(以黄酮计)、维生素C和槲皮素的IC₅₀值分别为8.0,9.1和5mg/L。芹菜黄酮提取物粗品清除DPPH 自由基能力稍强于维生素C,而弱于槲皮素。这一结果与Cao等^[10]利用ORAC法测定指出一些类黄酮如槲皮素、黄芩甙等,

比抗坏血酸、谷胱甘肽、生育酚有更强的抗氧化活性的研究结果一致。

表6 芹菜黄酮提取物粗品清除DPPH 自由基的能力

Table 6 Scavenging DPPH free radical capacity of celery flavone crude extracts

物质	剂量/(mg·L ⁻¹) Dose	抑制率/% Inhibition rate
提取物粗品 (黄酮计) Crude extract (flavone content)	2	18.7
	4	25.3
	8	50.1
	10	62.5
	16	75.3
	2	9.77
	4	21.1
维生素C Vitamin C	8	43.7
	10	57.1
	16	88.9
	2	22.4
槲皮素 Quercetin	4	40.9
	8	77.9
	10	90.8
	16	98.7

总体看来,芹菜黄酮提取物粗品清除羟自由基和DPPH 自由基的能力均较强,二者之间差异不大;槲皮素、维生素C 清除DPPH 自由基能力强于其清除·OH 自由基的能力。在这2种自由基体系中,芹菜黄酮提取物粗品清除自由基的能力均强于维生素C。

3 讨论

响应面分析法由Box及其合作者于20世纪50年代提出并逐步完善,它以回归方程作为函数估算的工具,将多因子试验中因素与试验结果的关系用多项式拟合,将因子与试验结果的关系函数化,因此,可对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化。它克服了正交试验只能给出最佳因素水平组合,而无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷。目前,对植物中黄酮的提取条件研究多采用正交设计法,但正交设计只能处理离散的水平值,在实际应用中难免会有诸多局限性。本研究将响应面分析法应用于芹菜黄酮的提取中,优化出其最佳提取溶剂浓度、提取时间和料液比等条件,为利用芹菜开发天然抗氧化功能因子打下了基础。

已有不少报道指出,一些被证实是抗氧化剂的自然产物在一定试验体系中会显示出促氧化作用。

Cao 等^[11]用 $\text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ 作为羟自由基生成剂, 研究类黄酮的结构与清除羟自由基之间的相关性, 发现在一些类黄酮浓度达到一定阈值时, 继续增加其浓度抑制率反而会有所下降。沈生荣等^[12]用ESR法检测了 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 存在时茶多酚的抗氧化和促氧化作用, 证明茶多酚与 $\cdot\text{OH}$ 共存时, 浓度达到 0.4 g/L 时促氧化作用增强, 而低于该浓度时, 则清除能力随浓度升高而增强。本研究采用不同的 $\cdot\text{OH}$ 自由

基生成体系, 试验结果表明, 芹菜黄酮提取物粗品中黄酮浓度在 $4 \sim 160 \text{ mg/L}$ 时, 与清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有良好的量效关系; 当浓度超过 160 mg/L 时, 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力会下降, 其 IC_{50} 值为 10.1 mg/L 。槲皮素也表现出类似特征, 而且下降更为明显。考虑到黄酮类化合物超剂量时, 其清除自由基能力下降, 毒副作用加强, 因此对芹菜黄酮的抗氧化功效和应用还需要更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Dan E Pratt Lipid antioxidants in plant tissue[J]. Food Sci, 1965, 30: 737- 741.
- [2] 李小洁, 赵保路, 句海松. 沙棘总黄酮对活性氧自由基的清除作用[J]. 中国药理学通报, 1990, 6(2): 35- 39.
- [3] Rafat H S. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2489- 2491.
- [4] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国蔬菜品种志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 758.
- [5] 刘仲则. 中草药黄酮类化合物心血管活性成分概述[J]. 中草药, 1987, 18(3): 34- 42.
- [6] 陈建初, 董绍华, 叶兴乾, 等. 芹菜黄酮及其在主要榨汁过程中的变化[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(3): 279- 282.
- [7] Barry D, O sawa T, Nam iki M A. Epimerization of lactose to free lactulose in heated modes milk solutions[J]. Dairy Res, 1985, 12: 409- 417.
- [8] 元晓梅, 蒋明蔚, 胡正芝, 等. 聚酰胺吸附- 硝酸铝显色法测定山楂及山楂制品中的总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业, 1996, (4): 27- 31.
- [9] 张尊听, 贺云, 刘谦光, 等. 分光光度法测定太白山20种中草药的抗氧化活性[J]. 分析实验室, 2002, 21(2): 50- 51.
- [10] Cao G, Sofic E, Prior R L. Antioxidant capacity of tea and common vegetable[J]. Agric Food Chem, 1996, 44(11): 3426- 3431.
- [11] Cao G, Sofic E, Prior R L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1997, 22(5): 749- 760.
- [12] 沈生荣, 杨贤强, 赵保路, 等. 茶多酚复合体及(-)-EGCG对氧自由基的清除作用[J]. 茶叶科学, 1992, 12(1): 59- 64.

Extraction conditions of celery flavone and its antioxidative activity

YAN Jian-gang^{1,2}, ZHANG Ming-wei¹, YANG Gong-ming², CHI Jian-wei¹

(1 Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture, Biotech Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2 College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The conditions of leaching flavones from celery was studied by response surface analysis and the antioxidative effect of celery flavone extract was compared in vitro. The results showed that the optimal leaching conditions were 40% ethanol, ratio of solid to liquid 1:15, extracting time 2.5 h, temperature 80 °C. Under this condition, 5.18% extract yield was gained with 4.3% flavone. Celery extract had strong activity of scavenging hydroxyl free radical of Fenton reaction and DPPH·, whose IC_{50} values were 10.1 mg/L and 8 mg/L respectively, and its activity was weaker than quercetin while stronger than vitamin C compared with vitamin C and quercetin.

Key words: celery; flavones; extraction conditions; response surface; antioxidation