

蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用

陈乃富

(皖西学院生物系, 六安 237012)

摘 要 用体积分数为 70% 的乙醇提取蕨菜黄酮类化合物, 得到粗黄酮, 经聚酰胺纯化, 得到精制黄酮。定量测定黄酮含量, 并对蕨菜黄酮类化合物抗氧化性进行了研究。结果表明, 蕨菜总黄酮含量为干重的 7.28%, 粗黄酮中黄酮含量为 27.03%, 精制黄酮中的黄酮含量为 41.52%。蕨菜黄酮类化合物有较强的清除自由基能力, 能显著阻断亚油酸、猪油的自氧化作用, 表现出很强的抗氧化活性。

关键词 蕨菜, 黄酮, 提取, 抗氧化

蕨菜别名拳头菜、龙爪菜、如意菜等。它是采自蕨科蕨属中的蕨(*Pteridium aquilinum* L.) 的幼嫩叶, 因其生长在山林野地, 少受污染, 加之富含对人体有益的多种营养成分, 近年来已成为深受人们喜爱的山野菜。蕨菜还具有清热化痰、利尿安神等功效, 经常食用蕨菜会有一定的保健作用^[1]。黄酮类化合物具有抗溃疡、抗过敏、抗菌、抗炎、抗氧化、抗衰老、降血脂、治疗心脑血管疾病等药用保健功能^[2], 也是一类具有广阔开发前景的天然抗氧化剂。文中对蕨菜黄酮的提取、纯化及含量测定、抗氧化作用等方面进行了研究, 为蕨菜的保健功能研究, 更为蕨菜的深度加工与开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采摘蕨菜长出地面 15~20 cm 高的幼嫩叶(嫩叶拳卷期)为试验材料, 采摘地点为六安市郊区的丘陵林地。

1.2 仪器与试剂

TU-1201 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司), 101AS-2 型不锈钢数显电热鼓风干燥箱(上海浦东跃欣科学仪器厂), HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司), 硫代巴比妥酸(TBA, Merck),

亚油酸(上海化学试剂公司), 氮蓝四唑(NBT, Sigma), 芦丁(上海化学试剂公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 蕨菜黄酮的提取与纯化

1.3.1 蕨菜总黄酮的提取^[3~5]

新鲜蕨菜 70℃ 烘至 8 成干, 然后剪成 2~3 mm 碎段, 再在 103℃ 烘干后研成粉末状。准确称取一定质量蕨菜干粉用索氏提取法(乙醚为抽提剂, 45℃ 水浴)脱脂及除脂溶性色素, 当乙醚抽提液无色时挥尽蕨菜粉中乙醚, 将蕨菜干粉放在烧瓶中加入体积分数 70% 乙醇(下同)回流提取蕨菜总黄酮。第 1 次浸提蕨菜干粉质量: 70% 乙醇体积 = 1:5 (g: mL), 以后每次浸提的比例为 1:3 (g: mL), 每次浸提约 2 h, 浸提温度为 90℃, 直到乙醇浸提液基本无色, 共浸提 10 次。合并所有浸提液并适当浓缩, 定容至一定体积, 按体积比 1:1 加入石油醚, 再次脱脂, 弃上层石油醚, 将下层乙醇浸提液定容至蕨菜干粉质量与乙醇体积比为 1:20 (g: mL), 此为蕨菜总黄酮提取液, 简称为粗黄酮液。

取一定体积粗黄酮液在水浴中进行减压浓缩成浆状并于 103℃ 烘干, 粉碎得到粗黄酮粉, 计算粗黄酮粉得率。

1.3.2 蕨菜黄酮的初步纯化^[6~8]

称取粗黄酮粉 1.30 g, 加水约 100 mL,

经水浴加热溶解后上聚酰胺柱(聚酰胺事先已 105℃ 活化 1h,装柱 30cm 高,柱内径为 2.5 cm)。上柱充分吸附后,先用蒸馏水洗至无色,然后用体积分数 95% 乙醇洗脱,洗脱速度约为 1.5 mL/min,洗脱至无色时为止,收集洗脱液在 90℃ 水浴上蒸干后于 103℃ 烘 2 h,得粉末状精制黄酮粉,可计算其得率。

1.4 黄酮含量测定

按照徐雅琴等方法^[9]进行,采用分光光度法测定总黄酮含量,即利用黄酮类化合物与铝盐生成红色络合物,以芦丁为标准品(本文芦丁以 70% 乙醇配制)在 510 nm 处测定吸光度。标准曲线的回归方程: $C = 0.487A + 0.0097$ (C 为芦丁浓度 mg/mL, A 为吸光度),相关系数 $r = 0.9998$ 。

1.5 蕨菜黄酮类化合物的抗氧化性测定

1.5.1 蕨菜黄酮类化合物及芦丁的清除 O_2 自由基能力测定

采用 NBT(氮蓝四唑)光还原法来测定黄酮类物质清除 O_2 自由基能力。NBT 反应液按衣海青等方法^[10]配制,各取 3 mL NBT 反应液,分别加入 1 mL 70% 乙醇配制的蕨菜黄酮液及芦丁液,然后将 NBT 反应液(该液中加 1 mL 70% 乙醇)含黄酮的 NBT 反应液同时在 40W 日光灯下 15 cm 处光照 15 min,于 610nm 处测定吸光度。从而计算出黄酮类化合物对 NBT 光还原的抑制率。按照抑制 NBT 光还原 50% 定义为一个“类似 SOD 活性单位”,并以此来衡量黄酮类化合物的清除自由基能力。

1.5.2 蕨菜黄酮类化合物在猪油中的抗氧化作用

猪油由市售板油在烧杯中用文火熬炼而成。称取粗黄酮粉 0.01、0.05、0.20 g 和精制黄酮粉 0.01 g,各用 4 mL 无水乙醇溶解后分别加到 50.00 g 温热猪油中,搅匀,以不加蕨菜黄酮粉,仅在 50.00 g 猪油中加入 4 mL 无水乙醇为对照样,在 $(70 \pm 1)^\circ\text{C}$ 烘箱中强化保存,定时搅拌,于不同时间取样测定猪油的过氧化值(POV 值),并以此来表示猪油

的氧化速度,进而衡量蕨菜黄酮类化合物的抗氧化活性。过氧化值的测定按 GB5009.37—1985 方法进行。样品的过氧化值(POV)计算^[11]:

$$POV = \frac{(V_1 - V_2) \times M}{m} \times 1000$$

式中:POV 为样品的过氧化值,mmol/kg;

V_1 为试样消耗硫代硫酸钠标准溶液体积, mL;

V_2 为空白试验消耗硫代硫酸钠标准溶液体积, mL;

M 为硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度, mol/L;

m 为样质量, g。

1.5.3 蕨菜黄酮类化合物抑制亚油酸过氧化作用的测定

用无水乙醇配制 0.5% 的亚油酸乙醇液。称取粗黄酮粉 0.01、0.05 g,精制黄酮粉 0.01 g,各用 4 mL 无水乙醇溶解,然后分别加到 50 mL 0.5% 亚油酸乙醇液中混匀,以不加黄酮粉而仅在 50 mL 0.5% 亚油酸乙醇液中加入 4 mL 无水乙醇的为对照样,在 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下保存,定期取样按黄雪松等方法^[12]中的 TBA 法(硫代巴比妥酸法)测定其吸光度。

2 结果与讨论

2.1 黄酮含量及黄酮粉得率

2.1.1 蕨菜干粉中的总黄酮含量

取一定体积的蕨菜总黄酮提取液(粗黄酮液)测定其中黄酮含量,进而计算出蕨菜干粉的总黄酮含量为 7.28%。这比柚皮粉^[3]、银杏干叶^[4,5]、黑刺蒺藜干粉^[7]、穗醋栗叶片干粉^[9]中的总黄酮含量高的多,至少都高出 2 倍以上。

2.1.2 粗黄酮粉、精制黄酮粉得率及其黄酮含量

由蕨菜干粉得到粗黄酮粉的得率为 25.92%,经测定粗黄酮粉中的黄酮含量为 27.03%;由粗黄酮粉经聚酰胺初步纯化后的

精制黄酮粉相对于蕨菜干粉的得率为 5.10% , 相对于粗黄酮粉的得率为 19.67% , 精制黄酮粉中的黄酮含量为 41.52%。

由上述结果看出, 蕨菜中黄酮类物质含量很高, 提取的粗黄酮粉得率已达蕨菜干重的 1/4 以上, 虽未经纯化但其黄酮含量已达 27% 以上。经过初步纯化的精制黄酮粉得率也达蕨菜干重的 5% 以上。这些都说明, 蕨菜是获取黄酮类物质的很好来源。

2.2 初步纯化的效果

经聚酰胺纯化后, 黄酮粉中的黄酮含量由纯化前的 27.03% 提高到了纯化后的 41.52% , 这说明纯化有一定效果, 但比文献 [6] 中报告的蒲公英黄酮类化合物纯化后黄酮含量达 67.4% 要低, 这说明聚酰胺对不同的黄酮提取物的纯化效果有差异。结合黄酮粉得率及黄酮含量计算纯化后的黄酮回收率为 30.22% , 约 70% 的黄酮类物质在纯化过程中损失掉了。如何进一步提高蕨菜黄酮粉中的黄酮含量, 提高纯化过程中的黄酮回收率, 尚需进一步研究。

2.3 蕨菜黄酮类化合物的抗氧化活性

2.3.1 清除 O_2^- 自由基的能力

用 NBT 光还原法测定蕨菜黄酮类化合物与芦丁清除自由基能力的结果显示, 当 NBT 光还原的抑制率在 20% ~ 60% 范围内时, 芦丁的含量与抑制率间呈高度相关, 芦丁的抑制曲线为 $y = 37.09x + 0.0775$, 相关系数 $r = 0.9924$, y 为抑制百分率, x 为反应体系中芦丁毫克数。经测定, 1mg 芦丁清除自由基能力相当于 87.82 个类似 SOD 活性单位; 1mg 蕨菜粗黄酮粉相当于 24.71 个类似 SOD 活性单位; 1mg 精制黄酮粉相当于 48.06 个类似 SOD 活性单位。

NBT 光还原反应是个自由基反应, NBT 光还原是测定 SOD 酶活性的常用方法之一, SOD 可以清除 O_2^- 自由基而抑制 NBT 光还原。黄酮类化合物是具有酚羟基的一类还原性化合物, 是人们一直关注的天然自由基清除剂, 酚羟基可作为供氢体, 使自由基还原,

从而抑制 NBT 光还原^[10]。从测定结果看, 清除自由基能力较强的为芦丁, 精制黄酮粉次之, 粗黄酮粉较之精制黄酮粉又弱一些。可以初步看出, 蕨菜黄酮粉中的黄酮含量越高, 清除自由基的能力越强。

2.3.2 蕨菜黄酮类化合物在猪油中的抗氧化性分析

各样品的 POV 值随时间变化情况如图 1 所示。由图 1 看出, 相对于对照样, 在猪油中添加不同质量的黄酮粉, 均可显著抑制猪油的自动氧化, 表现出较强的抗氧化性, 即使是最小的添加量(0.01 g)。总体看, 添加量越大抗氧化效果越好。更值得注意的是, 添加黄酮粉后在开始阶段, 相对对照样而言, 各样品的 POV 值皆下降, 表现出明显的降低猪油中过氧化值的作用, 这与文献 [11] 中用氯化亚锡来降低 POV 值效果相似, 即蕨菜黄酮粉添加到猪油后, 不仅抑制猪油的自动氧化, 而且能很好地去掉猪油中已有的过氧化物, 从而降低 POV 值。

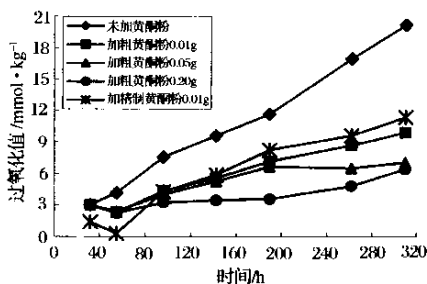


图1 不同蕨菜黄酮粉添加量与抗氧化性关系

从图 1 中还可看出, 精制黄酮粉在短时间内抑制并清除猪油中过氧化物的能力较强, 但随着时间延长, 与相同添加量的粗黄酮粉相比, 表现出抗氧化活性减弱, 这其中机制尚需进一步探讨。

2.3.3 蕨菜黄酮类化合物抑制亚油酸的过氧化作用

硫代巴比妥酸法(TBA法)是基于不饱和脂肪酸通过自由基反应, 产生过氧化自由基, 进而氧化生成环氧化物, 后者生成丙二

醛、丙二醛与 TBA 作用生成 TBA 染料,最大吸收波长为 532 nm。因此,TBA 染料生成的多少就反映在 532 nm 处的吸光度值大小上,是衡量自由基链反应进程的标志。抗氧化剂

会抑制自由基链反应的进行,最终表现出 TBA 染料生成得少,吸光度值小。2 次测定的吸光值结果如表 1 所示。

表 1 不同蕨菜黄酮粉添加量与抗氧化性关系

50 mL 亚油酸中添加量	0.01 g 粗黄酮粉	0.05 g 粗黄酮粉	0.01 g 精制黄酮粉	不加黄酮粉的对照样
A ₁ (育温 78 h 测)	0.029	0.032	0.030	0.059
A ₂ (育温 142 h 测)	0.053	0.040	0.051	0.059

由表 1 看出,添加蕨菜黄酮粉的较不添加的对照样吸光度值低,尤其是在育温 78 h 测定值能很好说明蕨菜黄酮类化合物能显著抑制亚油酸的过氧化,由育温 142 h 吸光度值看出,黄酮粉添加量大的抑制亚油酸的自动氧化时间要更长些。

3 结 论

蕨菜中总黄酮含量比银杏叶等要高,为蕨菜干重的 7.28%。用 70% 乙醇浸提可得到约为蕨菜干重 1/4 的粗黄酮粉,其黄酮含量为 27.03%,经聚酰胺纯化后的黄酮含量有所提高,但会有大量的黄酮类物质损失。蕨菜是获取黄酮类化合物的良好来源。

蕨菜黄酮类化合物表现出较强的清除自由基能力,具有显著的阻断亚油酸、猪油过氧化作用,表现出很强的抗氧化能力,而且还能去除油脂中已有的过氧化物,降低油脂的过氧化值。抗氧化作用测定结果均表明,一定浓度范围内,蕨菜黄酮类化合物用量越大,其抗氧化性越强。

蕨菜黄酮类化合物是一具有很大开发价值的天然抗氧化剂。

参 考 文 献

- 1 戴宝合主编. 野生植物栽培学. 北京:中国农业出版社,1997.136~139
- 2 沙世炎. 中草药有效成分分析. 北京:人民卫生出版社,1982.212
- 3 杨 洋,苇小英. 食品与发酵工业,2002,28(6):9~11
- 4 田呈瑞,李 昀. 西北植物学报,2001,21(3):556~561
- 5 张迪清,何照范著. 银杏叶资源化学研究. 北京:中国轻工业出版社,1999.57~67
- 6 陈景耀,龚祝南,宰学明等. 中国野生植物资源,2001,20(3):22~23
- 7 王常青. 食品工业科技,1999,20(5):14~15
- 8 张存莉,马柏林,傅建熙等. 西北林学院学报,2000,15(10):57~59
- 9 徐雅琴,孙艳梅,付 红等. 天然产物研究与开发,2001,13(2):21~23
- 10 衣海青,王建华. 植物生理学通讯,1996,32(4):276~278
- 11 杨继生,倪永全. 化学世界,2000(10):526~532
- 12 黄雪松,王建华,路福绥. 食品工业科技,1997,(4):16~17

Study on the Extraction of Flavonoid Compound in *Pteridium aquilinum* (L.) and It's Antioxidant Property

Chen Naifu

(Department of Biology, West Anhui University, Liuan, 237012)

ABSTRACT Raw flavonoid was extracted from *Pteridium aquilinum* (L.) by using 70% alcohol, followed by purification with polyamide to obtain refined flavonoid. The amount of pure flavonoid was quantified and its antioxidant property was studied in this research. Results show that the total flavonoid content in *Pteridium aquilinum* (L.) is 7.28% of the dry weight while pure flavonoid content represents 27.03% of raw flavonoid and 41.52% of refined flavonoid. Study also shows that the flavonoid in *Pteridium aquilinum* (L.) has strong capacity for scavenging free radicals, and can effectively inhibit linoleic acid and lard autoxidation, therefore exhibiting high antioxidant activity.

Key words *Pteridium aquilinum* (L.), flavonoid, extraction, antioxidant