苦荞叶提取物抗氧化性及其协同效应的研究*

曹艳萍
(榆林学院 化学系, 陕西 榆林 719000)

[摘 要] 从苦荞叶中提取抗氧化性物质, 用光度法测定提取物中总黄酮的含量及对羟自由基(·OH)和超氧阴离子(O_2^-·)的清除作用, 并采用碘量法研究了苦荞叶提取物对脂质过氧化的抑制作用及与其他物质的协同作用。结果表明, 苦荞叶中总黄酮含量为 57 g/kg; 苦荞叶提取物具有很强的抗氧化活性, 可有效延缓油脂脂质过氧化反应; 随着苦荞叶提取物添加量的增加, 抗氧化作用增强, 最有效的添加量为 2 g/kg; V_C、V_E 和柠檬酸对苦荞叶提取物有一定的协同作用, 增效次序为 V_C > V_E > 柠檬酸; 苦荞叶提取物对羟自由基和超氧阴离子均有较强的清除能力。

[关键词] 苦荞叶; 黄酮; 抗氧化作用; 协同效应
[中图分类号] S517.01; S517.099 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)08-0144-05

脂质过氧化是影响食品质量的一个重要原因, 能显著影响许多食品的稳定性和营养价值[1]。氧自由基经常被认为是不饱和脂肪酸过氧化的诱因, 其中羟自由基(·OH)激发了过氧化反应[2], 通过添加抗氧化剂可以防止食用油脂的氧化酸败。近年来, 研究发现丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)等合成抗氧化物有较大的毒副作用[3~5], 现已被限制或停止使用。因此, 从药食两用植物中筛选高效低毒且经济的、抗氧化性强的天然抗氧化剂成为人们关注的焦点。大量研究表明: 黄酮类化合物是优良的自由基清除剂和抗氧化剂[6], 其抗氧化能力的强弱取决于黄酮的类型和结构[7], 在许多情况下, 也取决于其亲脂、亲水性能[8]。

荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)属双子叶蓼科荞麦植物, 主要种植的有苦荞和甜荞, 药理和化学成分的研究表明, 其有效成分主要是芦丁、槲皮素等黄酮类物质。Watanabe 等[9]和 Przybylski 等[10]均研究发现, 甜荞种子的醇提物表现出较高的抗氧化性。苦荞是中国特有的荞麦品种, 其黄酮类化合物的含量远高于甜荞, 特别是苦荞叶黄酮含量更高, 且荞麦黄酮所表现出的生理功能大多是基于抗氧化作用[11]。荞麦在我国分布较广, 但种植集中, 西北地区占国内总产量的 50% 以上, 仅陕北地区常年种植面积就达 6.6 万 hm^2 左右[12]。特别是陕北定、靖地区栽培历史悠久, 农家品种资源丰富, 由于气候、土壤条件适宜, 很少使用化肥、农药, 生产的荞麦是典型的绿色食品。而定、靖山区种植的苦荞, 其种子多用于饲料, 荞秸(叶、杆)多作为柴火烧掉, 如能加以开发利用, 其经济效益将会非常可观。

本研究以陕西定边苦荞叶为原料, 以甲醇为溶剂提取苦荞叶中的黄酮类抗氧化物质, 通过光度法测定提取物对羟自由基(·OH)和超氧阴离子(O_2^-·)的清除能力, 用葵花油为底物, 以碘量法测定了提取物对脂质过氧化的抑制作用, 并对常用助剂的协同抗氧化性进行了研究, 确定了最佳使用条件。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材 料 苦荞叶采自陕西定边; 猪油为市售新鲜板油, 文火熬制, 过滤后备用; 葵花油为定边清真油脂厂生产。槲皮素、芦丁由中国药品生物制品检定所生产。特丁基对苯二酚(TBHQ)、抗坏血酸(Vc)、邻苯三酚(PG)、柠檬酸(CA)、体积分数 95% 乙醇、冰醋酸、碘化钾、三氯甲烷等均为分析纯。

仪 器 电子分析天平、旋转蒸发仪、751GD 紫外可见分光光度计、TU-1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)、电热恒温水浴锅、真空干燥器。

* [收稿日期] 2005-02-21
[作者简介] 曹艳萍(1958-), 女, 陕西绥德人, 副教授, 主要从事天然产物应用研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　试验方法

1.2.1　苦荞叶黄酮抗氧化物质的提取[13]　将苦荞叶去杂, 清水漂洗并沥干水分, (60±1) ℃鼓风干燥 24 h, 冷却后粉碎, 过 1.6 mm 筛。用甲醇索氏提取至无色后, 将提取液减压浓缩, 用石油醚处理以除去叶绿素、胡萝卜素等脂溶性物质, 甲醇定容得苦荞叶提取液(L E), 储存待用。

1.2.2　提取物黄酮含量的测定　准确称取干燥恒重的芦丁标准品 100 mg, 用甲醇溶解, 定容至 50 mL, 摇匀得 2 mg/mL 的标准贮备液, 装入棕色瓶于冰箱内保存备用。准确吸取 10 mL 标准贮备液于 100 mL 容量瓶中, 用体积分数 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀得 0.2 mg/mL 的标准应用液。

准确吸取标准应用液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 和 6.0 mL, 分别置于 25 mL 比色管中, 各加入 50 g/L $NaNO_2$ 1 mL, 摇匀; 放置 5 min 后加入 100 g/L $Al(NO_3)_3$ 1 mL, 摇匀; 放置 5 min, 再加入 40 g/L NaOH 10 mL, 加水至刻度, 混匀; 15 min 后用 721 型分光光度计在最大特征吸收波长 510 nm 下测定吸光度, 得到线性回归方程 $A = 2.15c - 0.56$ (A 表示吸光度, c 表示样品浓度, $r = 0.999\ 8$) 作为标准曲线。

取一定量待测液于 25 mL 容量瓶中, 同上操作, 测定吸光度, 由标准曲线得总黄酮含量。

1.2.3　苦荞叶提取物抗氧化性研究　(1) 对食用油脂的抗氧化性试验。用烘箱法比较苦荞叶提取物在相同添加量(2 g/kg) 时对不同油脂的抗氧化作用。准确称取提取物 5.0 g, 用甲醇溶解并定容至 250 mL (20 mg/mL), 取 3 份各 10 mL 分别加入到 100 g 温热的猪油、葵花油和奶油中, 剧烈搅拌混匀, 同时以 100 g 葵花油加 10 mL 甲醇作空白对照。将所有样品放入(65±1) ℃恒温箱中强化保存, 每 8 h 搅拌一次, 通入空气, 交换其在恒温箱中的位置。每天定时取各种平行样, 按照 GB/5009.37-1996 碘量法测定油脂的过氧化值(POV 值), 并以 POV 值的大小表示油脂的氧化速度, 以衡量提取物的抗氧化作用。

取苦荞叶提取液(20 mg/mL) 2.0, 5.0, 9.0 和 10 mL, TBHQ (2 mg/mL) 10 mL, 槲皮素 (2 mg/mL) 10 mL, 分别加入 100 g 温热的葵花油中, 剧烈搅拌混匀, 以 100 g 葵花油为空白对照, 同上法测定 POV 值, 比较苦荞叶提取物不同添加量及不同抗氧化剂对葵花油的抗氧化作用。

以含 0.2 g/kg 苦荞叶提取物的葵花油为底物, 以底物重 0.2 g/kg 添加助剂 V_C、V_E 和柠檬酸, 以 100 g 葵花油为空白对照, 按 GB/8927-88 规定, POV ≥20 meq/kg 为超标, 比较 3 种助剂与苦荞叶提取物的协同抗氧化作用。

(2) 清除羟自由基(·OH) 活性试验-Fenton 反应[14]。取 8 支 10 mL 比色管, 均依次加入 1 mL pH 8.20 的 Tris-HCl 溶液, 0.3 mL 7.5 mmol/L 硫酸亚铁铵溶液和 0.3 mL 7.5 mmol/L 邻二氮菲溶液, 1 号为空白, 2 号再加入 0.2 mL 7.5 mmol/L 过氧化氢溶液, 3～7 号分别加入 1, 3, 4, 5 和 7.5 mL 2 mg/mL 苦荞叶提取液, 8 号加入 1 mL 0.2 mg/mL V_C (显色剂均在最后定容前加入), 定容至刻度。在 37 ℃水浴中反应 1 h, 在 450～550 nm 波长范围内作吸收曲线。在最大吸收波长 510 nm 下测吸光度 A, 计算对羟自由基的清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_3 - A_2}{A_1 - A_2} \times 100\%,$$

式中, A_1 和 A_2 分别为体系不加过氧化氢和加过氧化氢时的吸光度, A_3 为加入苦荞叶提取液后的吸光度。

(3) 抑制超氧阴离子活性试验[14]。取 3 支 10 mL 比色管, 各加入 2.0 mL pH 8.20 的 Tris-HCl 溶液, 再依次分别加入 0, 0.5 和 1.0 mL 2 mg/mL 苦荞叶提取液, 最后都加入 1.0 mL 0.2 mmol/L 邻苯三酚, 用水定容至刻度。在波长 322 nm 处以时间模式记录 1 h 内每隔 30 s 吸光度的变化。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\Delta A_1/\Delta t - \Delta A_2/\Delta t}{\Delta A_1/\Delta t} \times 100\%,$$

式中, $\Delta A_1/\Delta t$ 表示邻苯三酚自氧化反应速率; $\Delta A_2/\Delta t$ 表示加入苦荞叶提取液后邻苯三酚自氧化反应速率。

2　结果与分析

2.1　苦荞叶提取物中总黄酮含量

苦荞叶提取物为暗红色固体, 得率为 82 g/kg, 以芦丁作对照测得粗提物中黄酮类物质含量为 663 g/kg, 苦荞叶中总黄酮含量为 57 g/kg。

2.2　苦荞叶提取物对油脂的抗氧化能力

2.2.1　苦荞叶提取物对不同油脂的抗氧化作用　图 1 为苦荞叶提取物添加量为 2 g/kg 时, 不同油脂体系中的抗氧化效果。图 1 结果表明, 苦荞叶提取物在不同油脂体系中的抗氧化效果不同, 其效果好坏依次为葵花油> 猪油> 奶油。这可能涉及不同的作用机制, 有待于在实际应用中进一步探讨。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

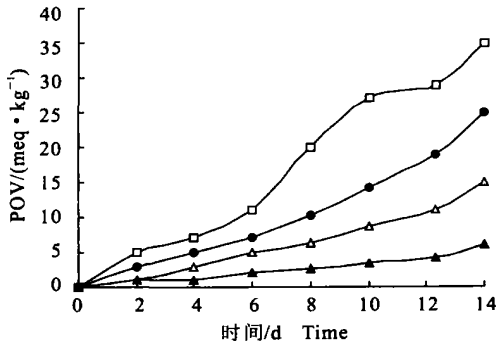

图 1 苦荞叶提取物对不同油脂的抗氧化作用

- □- . 空白; - ●- . 奶油; - △- . 猪油; - ▲- . 葵花油

Fig. 1 Extraction and its antioxidations to different oils

- □- . Blank; - ●- . Cream;

- △- . Lard oil; - ▲- . Sunflower oil

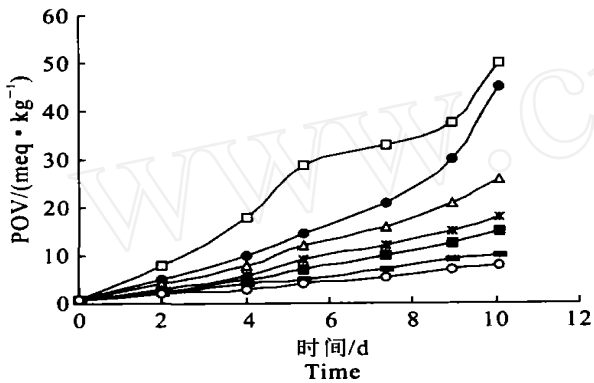

图 2 不同添加量苦荞叶提取物与其他抗氧化物的抗氧化性比较

- □- . 空白; - ●- . 0.4 g/kg LE; - △- . 1.0 g/kg LE;

- *- . 1.8 g/kg LE; - □- . 2.0 g/kg LE;

- —- 0.2 g/kg 槲皮素; - ○- . 0.2 g/kg TBHQ

Fig. 2 Extractions of different amount of tattary buckwheat leaves and other antioxidation

- □- . 空白; - ●- . 0.4 g/kg LE; - △- . 1.0 g/kg LE;

- *- . 1.8 g/kg LE; - □- . 2.0 g/kg LE;

- —- 0.2 g/kg quercetin; - ○- . 0.2 g/kg TBHQ

2.2.2 不同添加量苦荞叶提取物与其他抗氧化物的抗氧化性比较 不同添加量苦荞叶提取物、槲皮素、TBHQ 添加到葵花油中,油脂过氧化值(POV)的测定结果见图 2。由图 2 可知,不同添加量苦荞叶提取物对葵花油的氧化均有一定的抑制作用。随提取物添加量的增加,其抗氧化能力逐渐增强。当提取物添加量增加到 2 g/kg 时,与 0.2 g/kg 槲皮素的抗氧化活性相当,但低于 0.2 g/kg TBHQ。

2.2.3 苦荞叶提取物与其他物质的协同抗氧化作用 由图 3 可以看出,V_C、V_E、柠檬酸与苦荞叶提取物配合使用均具有协同增效作用,且 $V_C > V_E >$ 柠檬酸,均优于提取物和 V_E 单独使用。以 0.2 g/kg 苦荞叶提取物的相同添加量进行比较,提取物和 V_C 的复配与 TBHQ 的抗氧化能力相当。

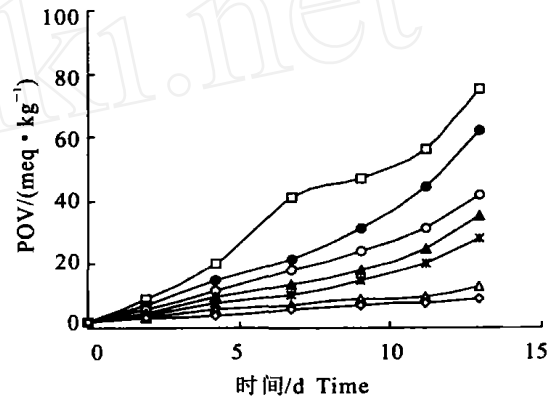

图 3 苦荞叶提取物与 V_C、V_E 和柠檬酸的协同抗氧化作用

- □- . 空白; - ●- . V_E; - ○- . LE;

- △- . LE+ 柠檬酸; - *- . LE+ V_E;

- △- . LE+ V_C; - ◇- . TBHQ;

Fig. 3 Extraction and its synergy with V_C, V_E and critic acid

- □- . 空白; - ●- . V_E; - ○- . LE;

- △- . LE+ critic acid; - *- . LE+ V_E;

- △- . LE+ V_C; - ◇- . TBHQ;

2.3 苦荞叶提取物对羟自由基的清除作用

用不同量苦荞叶提取物、V_C 替代空白,添加到 Tris-Fe^{2+}-邻二氮菲-H_2O_2 体系中,清除羟自由基的能力见表 1。由表 1 可见,0.2 g/kg 苦荞叶提取物与同浓度 V_C 对羟自由基的清除率相当,且随提取物含量的增加,其对羟自由基的抑制率增强,当粗提物浓度达 1.5 g/kg 时,清除率已达 88%。说明苦荞叶提取物对羟自由基有很强的抑制能力。

表 1 不同量苦荞叶提取物对羟自由基的清除率

Table 1 Scavenge of extractions of difference amounts of buckwheat leaves to ·OH

质量分数/(g·kg⁻¹) Quality percentage	清除率/% Scavengeng	质量分数/(g·kg⁻¹) Quality percentage	清除率/% Scavengeng
0.20	38	1.0	85
0.60	55	1.5	88
0.80	75	0.02(V_C)	40

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　苦荞叶提取物对超氧阴离子的抑制作用

邻苯三酚在 pH 8.20 碱性条件下发生自氧化, 经半醌自由基氧化为醌[15]。自氧化动力学曲线如图 4 所示。由图 4 可见, 邻苯三酚的自氧化曲线呈单峰型, 有一极值, 说明在检测波长处吸光度与自由基浓度相关。加入不同量的苦荞叶提取物后邻苯三酚的自氧化曲线降低, 说明提取物对邻苯三酚的自氧化有抑制作用。

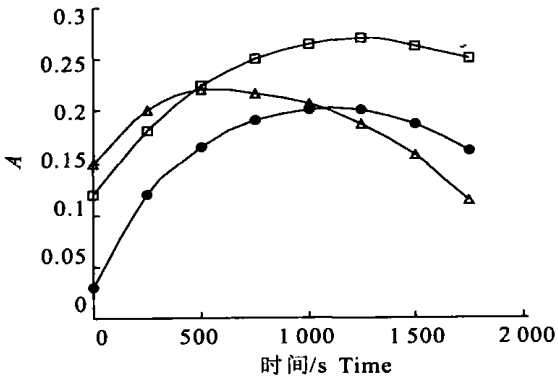

图 4　邻苯三酚自氧化动力学曲线

- △- . 邻苯三酚; - ●- . 邻苯三酚+ 0.1 g/kg LE;
- □- . 邻苯三酚+ 0.2 g/kg LE

Fig. 4　Pyrogallol automatic oxidation kinetics curve

- △- . Pyrogallol; - ●- . Pyrogallol+ 0.1 g/kg LE;
- □- . Pyrogallol+ 0.2 g/kg LE

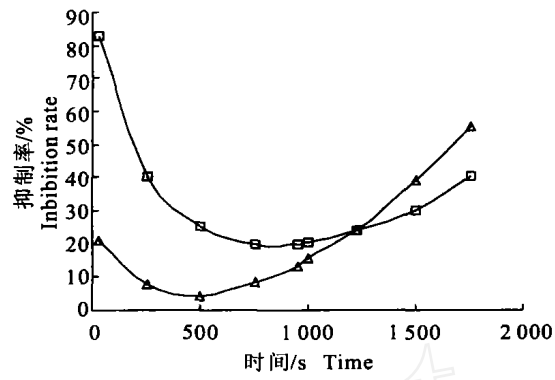

图 5　苦荞叶提取物对超氧阴离子的抑制作用

- □- . 邻苯三酚+ 0.1 g/kg LE;
- △- . 邻苯三酚+ 0.2 g/kg LE

Fig. 5　Inhibition of extraction to $(O_2^{\cdot-})$

- □- . Pyrogallol+ 0.1 g/kg LE;
- △- . Pyrogallol+ 0.2 g/kg LE

试验结果表明, 加入 0.1 g/kg 苦荞叶提取物, 30 s 抑制率达到 83%, 而加入 0.2 g/kg 提取物的抑制率只有 21%, 说明提取物在一定浓度下对自由基链式反应的引发抑制力有饱和值, 超过一定浓度抑制率反而下降(图 5)。0.2 g/kg 提取物在 1 230 s (20.5 min)后, 抑制率超过 0.1 g/kg 的提取物, 说明较大浓度对后期自由基链式反应的传递有较大抑制作用。

3　结论与讨论

(1) 苦荞叶用甲醇提取, 以芦丁作对照, 采用分光光度法测得总黄酮含量为 57 g/kg。

(2) 苦荞叶提取物对脂质, 特别是植物油脂过氧化具有较强的抑制作用, 且随提取物添加量的增加, 其抗氧化作用逐渐增强。当添加量为 2 g/kg 时, 抗氧化作用与 0.2 g/kg 槲皮素相当。

(3) 苦荞叶提取物与 V_C、V_E、柠檬酸均具有协同抗氧化作用, 但作用的大小有差异, 其次序为 V_C > V_E > 柠檬酸。以 0.2 g/kg 苦荞叶提取物的相同添加量进行比较, 苦荞叶提取物和 Vc 的复配与 TBHQ 的抗氧化能力相当。

(4) 苦荞叶提取物对羟自由基(·OH)和超氧阴离子$(O_2^{\cdot-})$均有较强的清除能力。

(5) 虽然苦荞叶提取物添加量超过国家规定常用油脂范围, 但因原料来自粮食作物, 从研究和安全的角度上应是可行的, 同时苦荞叶提取物主要成分是黄酮类物质, 而资料报道, 黄酮类物质皆有消炎、消肿、降压、降血脂等作用, 且已广泛用于食品、药品、化妆品等。

(6) 目前, 对荞麦黄酮的提取及黄酮类物质的生理作用虽已有报道, 但从苦荞叶中提取黄酮并用于脂质的抗氧化研究尚未见报道。因此, 本研究对开发利用本地丰富的荞麦叶资源, 寻找天然抗氧化剂具有重要意义。

[参考文献]

[1] Chan H W S. The Mechanism of Autoxidation in Autoxidation of Unsaturated Lipids[M]. London: Academic Press, 1987. 1-17.

[2] Miller D M, Aust S D. Studies of ascorbic-dependent iron-catalysed lipid peroxidation[J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 217: 113-119.

[3] 苏树祥, 张东普, 侯永键, 等. 二丁基羟基甲苯对大鼠血液生化反应的影响[J]. 现代医药卫生, 1996, 12(3): 95-97.

[4] Iton, Fukushima S, Hagiwara A, et al. Carcinogenecity of BHA in F344Rats[J]. Natl Cancer Inst, 1983, 70: 343-352.

[5] Iton, Hirose M, Imaida K. Antioxidant: carainogenic and chemopreventive properties[A]. Bertino J R et al. Encyclopediaofcancer[C]. San

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Diego: Academic Press, 1997. 51- 63.
[6] 万素英, 赵亚军, 李 琳, 等. 天然食品抗氧化剂——黄酮类化合物[J]. 河北农业大学学报, 1998, 18(3): 317- 322.
[7] 胡 春. 黄酮类化合物的抗氧化性[J]. 中国油脂, 1996, 21(4): 18- 21.
[8] Massaeli H, Sobrattee S, Pierce G N. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating system for determining lipoprotein peroxidation[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, (26): 1524- 1530.
[9] Watanabe M, Sato A, Osawar. Antioxidative activity of buck wheat seed extracts and its rapid estimate for evaluation of breeding materials[J]. J Jpn Soc Food Sci Technol, 1995, 42: 649- 655.
[10] Przybylski R, Leey C, Eskin N A M. Antioxidant and radical- scavenging activities of buck wheat seed components[J]. JAOCS, 1998, 75(11): 1595- 1601.
[11] 刘淑梅, 韩淑英, 崔国金, 等. 甜荞麦叶总黄酮降糖降脂作用及机制[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(19): 1815- 1817.
[12] 段志龙. 陕西荞麦的开发利用[J]. 中国种业, 2002, (12): 43.
[13] 曹艳萍, 卢翠英. 甜荞麦秸中提取总黄酮的工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25 (11): 157 - 159.
[14] 陈 媛, 周 玫. 自由基医学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1991. 18- 21.
[15] 石 碧, 狄 莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 134- 137.

Study on antioxidation of extrations from tartary buckwheat leaves and its synergy

CAO Yan-ping

(*Chemistry Department of Yulin College, Yulin, Shaanxi* 719000, *China*)

Abstract: The total flavone in antioxidant substance extracted from leaves of tartary buckwheat and its scaveninging function to ·OH and O_2^-· were determined by photometry and the inhibitory action to Lipin peroxidation and its synergy with other substances were studied by iodimetry in the experiment. The results showed that the content of total flavone in tartary buckwheat amounted to 57 g/kg; the extraction had powerful antioxidation and could delay the peroxidization of oil lipid significantly; with concentration increase of the extraction, the antioxidation was strengthened consequently, and the ideal addition would be 2 g/kg; V_C, V_E and citric acid were synergetic to the extraction of leaves of tartary buckwheat and the sequence of synergy was V_C> V_E> Lemon. Extractions from tartary buckwheat leaves have effective scavenging power to ·OH and O_2^-.

Key words: leaves of tartary buckwheat; flavone; antoxidation; synergy

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net