

网络出版时间:2015-06-10 08:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.07.013

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150610.0840.013.html

卷丹鳞茎多酚组成及其抗氧化活性研究

焦灏琳^a,张延龙^a,牛立新^b

(西北农林科技大学 a 林学院,b 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】研究卷丹鳞茎提取物的多酚物质组成及其抗氧化活性,为卷丹的进一步开发提供理论参考。【方法】以野生卷丹鳞茎为材料,用 Folin-Ciocalteu 法测定卷丹鳞茎多酚提取物的总酚含量,用 HPLC 法测定多酚组分,并测定了卷丹鳞茎提取物对 ABTS、DPPH 和羟自由基的清除能力。【结果】卷丹鳞茎提取物总酚含量为 48.78 mg/g;HPLC 共鉴定出 10 种酚类成分,其中表儿茶素、芦丁和二氢槲皮素为主要成分,其含量分别为 4.58、3.10 和 1.45 mg/g;多酚提取物对 ABTS·、DPPH· 和 OH· 3 种自由基均表现出较强的清除能力,且清除作用与多酚质量浓度呈显著性正相关, R^2 分别为 0.964、0.992 和 0.838。【结论】卷丹鳞茎提取物具有较强的抗氧化能力,可作为一种天然的植物抗氧化剂来源。

【关键词】 卷丹;抗氧化活性;酚类物质;HPLC

【中图分类号】 S682.2⁺65

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)07-0150-05

Phenolic composition and antioxidant activity of polyphenols from bulbs of *Lilium lancifolium* Thunb

JIAO Hao-lin^a,ZHANG Yan-long^a,NIU Li-xin^b

(a College of Forestry,b College of Horticulture,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 Phenolic compounds extracted from bulbs of *Lilium lancifolium* Thunb were investigated and their antioxidant activity was evaluated to provide basis for further development and application. 【Method】 ABTS radical-scavenging,DPPH radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging assay were carried out to evaluate the antioxidant activities,total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu method and phenolic composition was identified by HPLC. 【Result】 The total phenolic content from *Lilium lancifolium* bulbs was 48.78 mg/g. A total of ten phenolic compounds were identified and quantified,in which (–)-epicatechin,rutin and dihydroquercetin were the major compounds with contents of 4.58,3.10,and 1.45 mg/g,respectively. The bulb extracts exhibited strong radical scavenging capacities to ABTS·,DPPH·,and OH· radical,and the activities positively correlated with mass concentration of phenolic compounds with R^2 value of 0.964,0.992 and 0.838,respectively. 【Conclusion】 The bulb extracts of *Lilium lancifolium* Thunb had significant antioxidant capacity and could be a potential nature source of antioxidants.

Key words: *Lilium lancifolium* Thunb;antioxidant activity;phenols;HPLC

卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb),百合科百合属(*Lilium*)多年生草本植物,在我国分布极广,主

〔收稿日期〕 2014-01-02

〔基金项目〕 陕西省林业厅项目(陕林计字[2011]70号)

〔作者简介〕 焦灏琳(1989—),女,陕西西安人,硕士,主要从事百合鳞茎抗氧化活性研究。E-mail:njaujiaohaoLin@163.com

〔通信作者〕 张延龙(1964—),女,陕西延安人,教授,博士生导师,主要从事园林植物资源与育种研究。

E-mail:zhangyanlong@nwsuaf.edu.cn

产于长江流域。卷丹不仅具有较高的观赏价值,而且其鳞茎部位药食兼用,具有养阴润肺、清心安神的功效^[1],是我国药典收录的3种药用百合之一,也是百合药材的主要来源。现代研究表明,卷丹鳞茎中含有多糖、甾体皂苷、生物碱、黄酮、酚酸甘油酯等多种生物活性物质^[2];药理学分析表明,卷丹鳞茎的醇提取物具有抗氧化、抗真菌^[3]与抗炎^[4]的作用。植物酚类化合物大多具有抗氧化能力,而抗氧化能力与其抗肿瘤、抗菌、抗炎等生物活性直接相关^[5]。目前,对卷丹鳞茎生物活性物质的研究主要集中在甾体皂苷上,而对其酚类物质组成和抗氧化能力的研究鲜有报道。因此,本研究以野生卷丹鳞茎为试验材料,分析其鳞茎提取物的多酚含量和具体组分,以及对多种自由基的抑制和清除能力,以期为卷丹的进一步开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

卷丹百合种球于2012-08采自陕西省汉中市汉台区天台山。将新鲜百合鳞茎去泥洗净,真空冷冻干燥,粉碎,过0.15 mm筛,密封备用。

所用试剂:ABTS、DPPH、没食子酸、矢车菊素芸香糖苷、飞燕草素、木犀草素、儿茶素、绿原酸、根皮苷、柚皮素、表儿茶素、二氢杨梅酮、芦丁、对香豆酸、二氢槲皮素、圣草酚和山奈酚,标准品级(中国上海Sigma公司);甲醇,色谱级(天津博迪化学试剂公司);其余试剂为分析纯(西安化学试剂公司)。

所用仪器:LC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),LGJ-10 真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂),RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),KDC-140HR 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 多酚提取 准确称取百合干粉5.0 g,加入25 mL 甲醇,超声提取20 min(40 ℃、100 W),离心10 min(8 000 r/min)后取上清液,重复上述过程3次。合并提取液经真空旋转蒸发,用甲醇定容至25 mL,4 ℃保存。

1.2.2 多酚总量测定 采用Folin-Ciocalteu法^[6]测定卷丹鳞茎中的总酚含量,以没食子酸为标准品。用甲醇配制质量浓度为0.5 mg/mL的没食子酸标准品溶液,连续稀释得到没食子酸标准溶液分别为0.5、0.25、0.13、0.06、0.03和0.015 mg/mL。准确吸取各梯度的没食子酸标准品溶液和多酚提取液各

0.1 mL于具塞试管中,依次加入7.9 mL蒸馏水和0.5 mL Folin-Ciocalteu试剂,混匀后反应5 min,加入质量分数20%的Na₂CO₃溶液1.5 mL,暗处反应2 h后于765 nm处测定吸光值。标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.973\ 0x + 0.010\ 8$, $R^2 = 0.998\ 4$,多酚含量表示为mg/g。

1.2.3 多酚组分的高效液相色谱(HPLC)检测和含量测定 将制备的多酚提取液经0.22 μm滤膜过滤,备用,通过与各标准品保留时间的对比进行单体酚物质定性,峰面积定量。

色谱条件:LC-2010AHT 高效液相色谱仪,配备自动进样器和光电二级阵列检测器;色谱柱:Hi-bar C₁₈反相色谱柱(250 mm×4.0 mm,5 μm);流动相:A 乙酸水(V(乙酸):V(水)=99.6:0.4),B 乙腈;洗脱程序:0~40 min、5%~40% B,40~45 min、40%~100% B,45~60 min、100% B;柱温:40 ℃;流速:0.5 mL/min;进样量:10 μL;检测波长:280~360 nm。标准品从固定的质量浓度(1 mg/mL)开始进行连续的稀释以获得标准曲线,多酚单体酚含量单位为mg/g。

1.2.4 多酚的抗氧化活性 (1)对ABTS自由基的清除能力。参照Re等^[7]的方法,将卷丹鳞茎多酚提取液用甲醇配制成5个不同质量浓度(1,2,3,4,5 mg/mL)的溶液。ABTS阳离子制备方法为,将7 mmol/L 5 mL ABTS溶液与140 mmol/L 80 μL过硫酸钾溶液暗处反应12 h以上,使用前用甲醇稀释到A_{734 nm}为0.7左右。取0.1 mL不同质量浓度卷丹鳞茎多酚提取液,加入3.9 mL ABTS·溶液,以相同体积的甲醇代替多酚提取液为空白对照(A₀),反应6 min后于734 nm处测定吸光值(A_S),计算清除率。

(2)对DPPH自由基的清除能力。参考Brand-Williams等^[8]的方法,并略有改动。取0.1 mL不同质量浓度卷丹鳞茎多酚提取液,加入3.9 mL 6.25×10⁻⁵ mol/L DPPH(加甲醇配制),充分混匀;以相同体积的甲醇代替多酚提取液为空白对照(A₀),暗处反应30 min后在517 nm处测定吸光值(A_S),计算清除率。

(3)对羟自由基的清除能力。参照Sroka等^[9]的方法,将9 mmol/L FeSO₄ 1 mL、体积分数0.15% H₂O₂ 45 μL和9 mmol/L水杨酸溶液1 mL依次加入4 mL蒸馏水中,与1 mL不同质量浓度卷丹鳞茎多酚提取液混匀后,于37 ℃水浴30 min,以相同体积的甲醇为空白对照(A₀),在536 nm处测

定吸光值(A_s),计算清除率。

1.3 数据统计分析

所有试验数据均重复测定 3 次,结果表示为“平均值±标准差”。

自由基清除率的计算公式为:清除率=[1-(A_s-A_0)]×100%;分析清除率(y)与多酚提取物质量浓度(x)之间的关系。通过 SPSS 16.0 软件对数据进行方差分析,差异显著性水平 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 卷丹鳞茎中多酚含量及组成

多酚类物质具有 2 个或多个活泼的酚羟基结构,可通过提供氢原子或电子有效清除自由基,直接参与体内的抗氧化过程^[5]。如表 1 所示,卷丹鳞茎提取物总酚含量为 48.78 mg/g。HPLC 共鉴定出 10 种酚类物质,包括 2 种酚酸(绿原酸、对香豆酸)、2 种黄烷醇单体(儿茶素、表儿茶素)、2 种黄酮醇(芦丁、山奈酚)、2 种黄烷酮醇(二氢杨梅酮、二氢槲皮素)、1 种黄烷酮(圣草酚)和 1 种花青素(矢车菊素芸香糖苷)。这 10 种多酚单体含量总和为 10.69 mg/g,占总酚含量的 21.91%,其中表儿茶素(4.58 mg/g)、芦丁(3.10 mg/g)和二氢槲皮素(1.45 mg/g)含量较高,为卷丹鳞茎中主要的酚类物质。

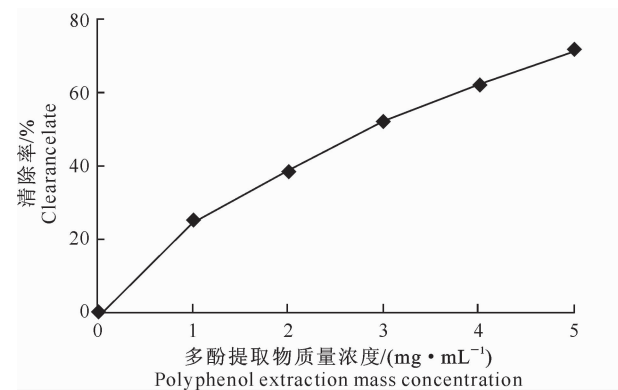


图 1 卷丹鳞茎多酚提取物对 ABTS 自由基的清除作用

Fig.1 Scavenging effects of bulb extracts on ABTS free radical

2.2.2 对 DPPH 自由基的清除能力 DPPH 自由基是一种人工合成的稳定自由基,其醇溶液呈紫色,在 517 nm 处有较强吸收,与样品提供的氢原子反应后吸光值变小。因此,测定样品的 DPPH·清除率可简便准确地评价其抗氧化能力。图 2 表明,卷丹鳞茎多酚提取物对 DPPH·的清除作用明显,清除

表 1 卷丹鳞茎中总酚含量、多酚组分及其含量
Table 1 Content of total phenols and individual phenolic compound from bulbs of *Lilium lancifolium* mg/g

酚类化合物 Phenolic compound	含量 Content
总酚 Total phenols	48.78±0.46
矢车菊素芸香糖苷 Cyanidin 3-rutinoside chloride	0.02±0.00
儿茶素(+)-catechin	1.00±0.03
绿原酸 Chlorogenic acid	0.37±0.02
表儿茶素(-)-epicatechin	4.58±0.09
二氢杨梅酮 Dihydromyricetin	0.04±0.00
芦丁 Rutin	3.10±0.04
对香豆酸 P-coumaric acid	0.08±0.00
二氢槲皮素 Dihydroquercetin	1.45±0.05
圣草酚 Eriodictyol	0.01±0.00
山奈酚 Kaempferol	0.05±0.00

2.2 卷丹鳞茎多酚提取物的抗氧化活性

2.2.1 对 ABTS 自由基的清除能力 ABTS·法是一种快速、简便,广泛应用于日常检测的分光光度分析法。ABTS 阳离子自由基是 ABTS 原液与过硫酸钾黑暗中反应 12 h 以后产生的,其溶液呈绿色,在 734 nm 处有最大吸光值。在供氢抗氧化剂加入后,ABTS 中单电子配对褪色。由图 1 可知,卷丹鳞茎多酚提取物对 ABTS·的清除作用与多酚质量浓度呈明显的量效关系,ABTS·清除率(y)与多酚质量浓度(x)的线性方程为 $y=13.68x-6.356$, R^2 值为 0.964。

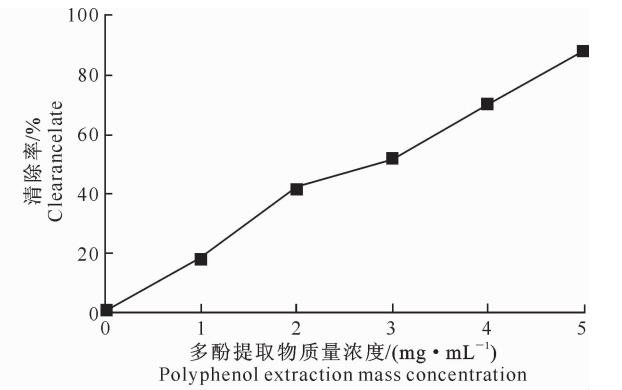


图 2 卷丹鳞茎多酚提取物对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging effects of bulb extracts on DPPH free radical

率随多酚提取物质量浓度增加而加大,DPPH·清除率(y)与多酚质量浓度(x)的线性方程为 $y=17.24x-15.72$, R^2 值为 0.992。

2.2.3 对羟自由基的清除能力 羟自由基是生物体内非常活跃的自由基,对机体危害很大,可穿过细胞膜与绝大多数生物大分子如蛋白质、脂质、DNA

等反应,造成细胞死亡和组织损伤^[12]。本试验用 EDTA 二价铁盐与双氧水生成羟自由基,水杨酸作为 OH· 的捕捉剂,通过比色法定量测定 OH· 的产率及卷丹鳞茎对 OH· 的清除作用。结果(图 3)表明,卷丹鳞茎多酚提取物对 OH· 的清除率随多酚提取物质量浓度增加明显增大,OH· 清除率(y)与多酚质量浓度(x)的线性方程为 $y = 12.13x + 2.720$, R^2 值为 0.838。

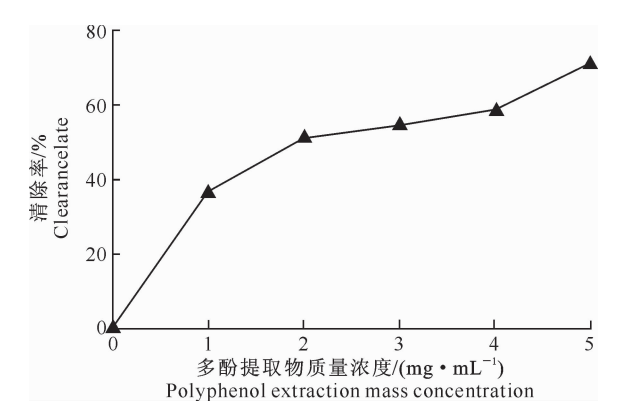


图 3 卷丹鳞茎多酚提取物对羟自由基的清除作用
Fig. 3 Scavenging effects of bulb extracts on hydroxyl free radical

3 讨 论

多酚物质具有 2 个或多个酚羟基结构,易溶于有机溶剂,甲醇是应用最广泛的多酚提取溶剂。Cai 等^[10]用相同的 Folin-Ciocalteu 法测定了 112 种中国传统中草药药用部位的总酚含量。本研究中卷丹鳞茎的多酚含量(48.78 mg/g)高于文献^[10]中的 95 种中草药,仅低于五倍子、石榴皮等 17 种中草药。陆英等^[11]以百合(*Lilium brownii*)鳞茎为材料,用甲醇回流提取,并利用大孔吸附树脂对提取物进行纯化后测得其多酚含量为 6.68%,高于本研究中卷丹的多酚含量(4.88%),其原因主要与纯化效果有关。

本研究通过 HPLC 从卷丹鳞茎中鉴定出 10 种酚类物质,其中表儿茶素、芦丁和二氢槲皮素是主要的酚类物质。表儿茶素已被证明具有强的抗氧化性,能够清除体内羟自由基、超氧化物和过氧化氢自由基,具有降低血脂的作用^[12]。芦丁可有效抑制细胞内的脂质过氧化过程,具有保护组织黏膜和增强血管活性的作用^[13]。Francis 等^[14]报道,麝香百合花瓣的有效药用成分主要是山奈酚和槲皮素,其能够有效清除自由基并抑制环氧合酶的表达,从而减轻人体炎症,这 2 种物质在卷丹鳞茎中均被检测到。

但本试验仅对卷丹鳞茎的多酚粗提物及其体外抗氧化活性进行了初步研究,对于多酚单体的体内抗氧化活性还有待进一步研究。

靳磊等^[15]研究了宜昌百合 3 个生态型的鳞茎多酚提取物对 DPPH· 和 OH· 的清除能力,在相同质量浓度(2 mg/mL)下,卷丹鳞茎多酚提取物对 DPPH· 的清除能力(41.75%)高于西乡县宜昌百合(40.04%)、立节镇宜昌百合(32.29%),但是低于留坝县宜昌百合(44.34%)^[15];而对 OH· 的清除率均高于 3 种宜昌百合。这表明不同百合品种鳞茎多酚提取物抗氧化能力存在差异,卷丹鳞茎多酚提取物对 OH· 的清除能力更强。周中流等^[16]比较了卷丹鳞茎乙醇提取物及不同极性部位的抗氧化活性,发现卷丹抗氧化活性部位主要集中在乙酸乙酯和正丁醇提取部位。

4 结 论

卷丹鳞茎富含多酚物质,HPLC 共检测出 10 种酚类物质,其中表儿茶素、芦丁和二氢槲皮素是其主要成分。多酚提取物对 ABTS·、DPPH· 和 OH· 3 种自由基具有明显的清除能力,表现出较强的抗氧化活性。因此将卷丹鳞茎作为功能性食品和天然抗氧化剂,有较好的开发和应用前景。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press,2010. (in Chinese)

[2] 李玉帆,明 军,王良桂,等. 百合基本营养成分和活性物质研究进展 [J]. 中国蔬菜,2012(24):7-13.
Li Y F, Ming J, Wang L G, et al. Research progress on basic nutritional and bioactive substances of lily [J]. China Vegetables, 2012(24):7-13. (in Chinese)

[3] Joung Y M, Park S J, Lee K Y, et al. Antioxidative and antimicrobial activities of *Lilium* species extracts prepared from different aerial parts [J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 2007, 39: 452-457.

[4] Kwon O K, Lee M Y, Yuk J E, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* LPS-stimulated raw 264.7 cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130: 28-34.

[5] Stevenson D, Hurst R. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64: 2900-2916.

[6] Singleton V, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. American

Journal of Enology and Viticulture,1965,16:144-158.

[7] Re R,Pellegrini N,Proteggente A,et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine,1999,26:1231-1237.

[8] Brand-Williams W,Cuvelier M E,Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Science and Technology,1995,28:25-30.

[9] Sroka Z,Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids [J]. Food and Chemical Toxicology,2003,41:753-758.

[10] Cai Y Z,Luo Q,Sun M. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer [J]. Life Sciences,2004,74:2157-2184.

[11] 陆英,仲伟茂,张盛,等. 大孔吸附树脂纯化百合鳞茎中多酚类化合物 [J]. 食品工业科技,2013,34(11):223-226.

Lu Y,Zhong W M,Zhang S,et al. Study on technology of separation and purification for polyphenols from *Lilium brownii* by croporous absorption resin [J]. Science and Technology of Food Industry,2013,34(11):223-226. (in Chinese)

[12] 林亲录,施兆鹏,刘湘新,等. 儿茶素和表儿茶素对动物血脂的影响 [J]. 中国食品学报,2002,2(3):16-20.

Lin Q L,Shi Z P,Liu X X,et al. Influence of catechin and epicatechin on serum lipids in animals [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2002,2(3):16-20. (in Chinese)

[13] Casa C L,Villegas I,de la Lastra C A. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions [J]. Journal of Ethnopharmacology,2000,71:45-53.

[14] Francis J A,Rumbeiha W,Nair M G. Constituents in easter lily flowers with medicinal activity [J]. Life Sciences,2004,76:671-683.

[15] 靳磊,张延龙,牛立新,等. 3 种生态型宜昌百合鳞茎提取物的抗菌及抗氧化作用 [J]. 中国食品学报,2013,13(2):73-78.

Jin L,Zhang Y L,Niu L X,et al. Study on antimicrobial and anti-oxidation activities of the bulbs extract from three ecotypes of *Lilium leucanthum* (Baker) Baker [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2013,13(2):73-78. (in Chinese)

[16] 周中流,石任兵,刘斌,等. 卷丹乙醇提取物及其不同极性部位抗氧化活性的比较研究 [J]. 食品科学,2011,32(9):55-58.

Zhou Z L,Shi R B,Liu B,et al. A comparative study on the antioxidant properties of ethanol extract and its different polarity fractions from the bulb of *Lilium lancifolium* Thunb [J]. Food Science,2011,32(9):55-58. (in Chinese)

(上接第 149 页)

[9] Sung S K,Yu G H,Nam J,et al. Developmentally regulated expression of two MADS-box genes, *MdMADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple [J]. Planta,2000,210(4):519-528.

[10] Yu H,Goh C J. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the *AP1/AGL9* subfamily during floral transition [J]. Plant Physiology,2000,123(4):1325-1336.

[11] 田云芳,袁秀云,蒋素华,等. 蕙兰 MADS 基因 *APETALA1/FRUITFULL*-like 的克隆和时空表达特性 [J]. 生物工程学报,2013,29(2):203-213.

Tian Y F,Yuan X Y,Jiang S H,et al. Molecular cloning and spatiotemporal expression of an *APETALA1/FRUITFULL*-like MADS-box gene from the orchid (*Cymbidium faberi*) [J]. Chinese Journal of Biotechnology,2013,29(2):203-213. (in Chinese)

[12] Sung S K,An G. Molecular cloning and characterization of a MADS-box cDNA clone of the Fuji apple [J]. Plant and Cell Physiology,1997,38(4):484-489.

[13] Van der Linden C G,Vosman B,Smulders M J M. Cloning and characterization of four apple MADS box genes isolated from vegetative tissue [J]. Journal of Experimental Botany,2002,53(371):1025-1036.

[14] Chang Y Y,Chiu Y F,Wu J W,et al. Four orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AP1/AGL9*-like MADS box genes show novel expression patterns and cause different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology,2009,50(8):1425-1438.