

不同品种玫瑰花中黄酮的提取及抗氧化性

宋可珂¹ 陈红艳^{1*} 廖蓉苏¹ 袁延滨²

(1. 北京林业大学 理学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学 环境与工程学院, 北京 100083)

摘要 研究北京地区栽种的 5 种不同品种玫瑰花中黄酮含量及抗氧化性能。设计正交试验, 确定玫瑰花黄酮的最佳提取条件, 采用邻苯三酚自氧化体系和二苯代苦味酰自由基(DPPH)体系进行抗氧化性研究。试验结果表明: 最佳提取条件为, 乙醇体积分数 65%, 提取温度 70 °C, 提取时间 1.5 h, 液料比(V(乙醇($\varphi=65\%$)): m (玫瑰花粉))30 mL: 1 g; 妙峰山玫瑰中黄酮含量最高, 为 66.040 mg/g; 5 种玫瑰花均表现出较强的清除超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)和 DPPH 自由基(DPPH \cdot)的能力, 且其清除能力和黄酮提取液浓度呈正相关; 其中妙峰山玫瑰中总黄酮的清除能力最强, 其清除 $O_2^- \cdot$ 和 DPPH \cdot 的半抑制浓度(IC₅₀)相应为 0.067 和 0.136 mg/mL, 但与维生素 C (VC) 相比, 其抗氧化能力略低于 VC。

关键词 玫瑰花; 黄酮; 提取; 抗氧化性

中图分类号 TS 202.3

文章编号 1007-4333(2012)05-0059-05

文献标志码 A

Study on extraction and anti-oxidation property of flavonoids from *Roses*

SONG Ke-ke¹, CHEN Hong-yan^{1*}, LIAO Rong-su¹, YUN Yan-bin²

(1. College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract In order to study the contents and anti-oxidation of flavonoids, five species of *Roses* planted in Beijing were investigated. From the *Roses*, the optimum extraction condition of flavonoids was determined by orthogonal design and the scavenging activities. The results showed that the optimum extraction conditions for *Roses* flavonoids were as follows: ethanol concentration was 65%, extraction temperature was at 70 °C, extraction time was 1.5 h and ratio of liquid to solids was 30 mL: 1 g; *Miaofengshang* had the highest content of flavonoids which up to 66.040 mg/g. Anti-oxidation experiments showed that flavonoids from the five species of *Roses* had very strong scavenging capabilities for superoxide anion and DPPH free radical. The scavenging capability of *Miaofengshang* among these species was the strongest, and its IC₅₀ values of superoxide anion and DPPH free radical were 0.067, 0.136 mg/mL respectively, but its anti-oxidant activity was slightly lower than VC.

Key words flavonoids; *Roses*; extraction; anti-oxidation

黄酮类化合物是自然界广泛存在的多酚类化合物, 是自然界药用植物中的主要活性成分^[1], 研究显示, 黄酮类化合物在人类抗衰老、抗癌等方面起着重要作用。目前, 已经从许多植物中提取出多种具有生理活性的黄酮类化合物。自由基是生物体内生化

反应的中间物质, 正常生理情况下, 自由基存在一个较低的浓度范围, 使机体保持正常的生理代谢, 但在衰老、应激等情况下, 体内自由基大量积累引起一系列的反应^[2], 引发各种疾病, 例如冠心病、风湿性关节炎、癌症等加速人体的衰老。由于酚羟基的存在,

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 国家林业局 948 项目(2009-04-62)

第一作者: 宋可珂, 硕士研究生, E-mail: songkeke2268@163.com

通讯作者: 陈红艳, 副教授, 博士, 主要从事生物大分子结构及性能研究, E-mail: chyxfu@sina.com

黄酮类化合物具有清除自由基的能力,但在不同的氧化体系中其清除自由基的机制不同,所体现的抗氧化能力也不一样^[3]。为了全面了解所检测化合物的抗氧化性能,一般选用2种或2种以上的抗氧化体系进行测定。邻苯三酚体系常用于测定SOD或SOD活性物质对的 $O_2^- \cdot$ 歧化活性^[4]。二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)是一种性质稳定的有机自由基,应用DPPH自由基体系评价植物的抗氧化能力切实可行,且操作简单、灵敏^[5]。

玫瑰花是一种有药用价值的天然植物,玫瑰精油和玫瑰色素^[6]可作为天然的食品添加剂;此外,玫瑰花中还含有黄酮^[7]、多酚、多糖^[8]等抗氧化成分,能有效清除自由基,延缓衰老^[9-10]。近年来,对玫瑰花中色素的提取及性能的研究较多^[11-12],对玫瑰黄酮类化合物的研究相对较少。为了研究玫瑰花总黄酮的提取工艺及抗氧化性能,本研究通过采集北京地区5种不同的玫瑰花品种妙峰山、丰华、摩洛哥、四季和大马士革,利用醇提取法分析不同玫瑰花黄酮含量高低及其抗氧化性能,旨在开发利用北京的玫瑰花资源,选择优质的玫瑰花品种,筛选廉价、高效的天然抗氧化剂,为玫瑰花的进一步开发和利用提供理论和技术支持。

1 材料与仪器

KQ-500B超声波发生器,江苏省昆山市超声波仪器有限公司;AR2140分析天平,美国Ohaus公司;SHB-循环水多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;UNICO UV-2000型紫外分光光度计,UNICO上海公司;旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司;5种不同的玫瑰花瓣:妙峰山、丰花、摩洛哥、四季和大马士革,均采自北京地区。所用试剂均为分析纯。

2 试验方法

2.1 显色预试验

将5种玫瑰花(妙峰山、丰花、摩洛哥、四季和大马士革)自然风干、粉碎成粉末状,并采用石油醚浸泡除脂。除脂后玫瑰花粉末自然晾干,作为样品备用。用醇溶液浸泡玫瑰花粉末样品,提取5种玫瑰花中的化学成分,分别用化学试剂显色法^[13]分析。

2.2 黄酮类化合物总含量的测定

采用硝酸铝显色法,按照文献^[14]的方法稍作调整,以芦丁为标准品,测定其梯度浓度溶液的吸光

度值,经线性回归,得到溶液浓度(c)与吸光度值(A)关系曲线的回归方程式:

$$c = 10.24A + 0.012, R^2 = 0.9993$$

将玫瑰花黄酮提取液稀释成合适的浓度,测定其黄酮含量;根据所求的回归方程式,得到稀释后黄酮提取液的质量浓度;再根据稀释倍数计算得到原始黄酮提取液的质量浓度;最后计算玫瑰花中总黄酮的质量浓度。

将乙醇体积分数、提取温度、提取时间和液料比(V (乙醇($\varphi=65\%$)): m (玫瑰花粉),下同。)为考察因素进行单因素试验,在单因素试验结果的基础上,选择对玫瑰花黄酮提取率影响最大的3个水平(表1),在此基础上设计正交试验,以总黄酮提取率为指标确定最佳提取条件。在最优试验条件下分别提取5种不同玫瑰花中的总黄酮,并比较其含量。

表1 正交设计因素水平表

Table 1 Factor plane of orthogonal experiment

因素	A	B	C	D
水平	乙醇体积分数/%	温度/°C	时间/h	液料比/(mL/g)
1	55	60	1.0	20:1
2	65	70	1.5	30:1
3	75	80	2.0	40:1

2.3 玫瑰花黄酮的抗氧化性能

2.3.1 清除超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)试验

采用邻苯三酚自氧化体系,按照文献^[15]的方法,测定邻苯三酚对照溶液吸光度随时间的变化率 F_0 。将玫瑰黄酮粗提液稀释成不同的质量浓度,依照同样的方法,计算玫瑰花黄酮提取液吸光度随时间的变化率 F_x 。各待测物对 $O_2^- \cdot$ 的清除率为

$$E/\% = (F_0 - F_x) \times 100/F_0$$

2.3.2 清除DPPH自由基试验

将玫瑰黄酮粗提液稀释成不同的质量浓度梯度,加入DPPH溶液,在517 nm波长处测定其紫外吸收值^[16]。各加2 mL上述浓度的黄酮提取液于试管中,再加入2 mL浓度为200 $\mu\text{mol/mL}$ 的DPPH溶液充分混合。30 min后在517 nm(最大吸收波长)处测定其吸光度。各待测物对DPPH的清除率为

$$K/\% = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100$$

式中: A_i 表示2 mL DPPH溶液和2 mL待测溶液混合溶液的吸光度值; A_j 表示2 mL待测溶液和2 mL溶剂混合溶液的吸光度; A_c 表示2 mL DPPH

溶液和 2 mL 溶剂混合溶液的吸光度。

3 结果与分析

3.1 显色预试验结果

对 5 种不同的玫瑰花醇提液进行显色预试验结

果见表 2。可以看出,5 种不同的玫瑰花醇提液在质量分数为 1% 的 $FeCl_3$ 溶液体系中呈现深紫色,在镁粉-盐酸反应体系中呈现桃红色沉淀,在饱和醋酸铅体系中出现黄色沉淀,说明玫瑰花醇提液中含有具有黄酮成分结构特征的物质。

表 2 玫瑰花黄酮显色预试验结果

Table 2 Color pre-test results of *Roses* flavonoids

显色剂	妙峰山	摩洛哥	四季	大马士革	丰花	推测玫瑰花中所含成分
$FeCl_3$	深紫色	深紫色	深紫色	深紫色	深紫色	酚类或鞣质类
镁粉-盐酸	桃红色	桃红色	桃红色	桃红色	桃红色	黄酮类
饱和醋酸铅	黄色沉淀	黄色沉淀	黄色沉淀	黄色沉淀	黄色沉淀	黄酮类

3.2 5 种玫瑰花黄酮含量的测定

玫瑰花黄酮提取的正交试验设计及结果见表 3。以玫瑰黄酮为检测对象,采用正交设计软件对正交试验结果进行方差分析及显著性检验,分析结果见表 4。从表 3 可以看出:第 2 次试验提取的黄酮含量最高;极差分析的结果表明,A、B、C、D 各因素对试验结果的影响程度不同,大小顺序依次是 $D >$

表 4 正交试验方差分析结果

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值
乙醇体积分数	0.020	2	1.000	19.000
温度	0.101	2	5.000	19.000
时间	0.235	2	11.750	19.000
液料比	1.389	2	69.450*	19.000

注: * 表示差异显著, $P < 0.05$ 。

表 3 玫瑰花黄酮提取的正交试验设计及结果

Table 3 Orthogonal design and results of *Roses* flavonoids extraction

试验次数	因素水平				提取率/%
	A 乙醇体积分数	B 温度	C 时间	D 液料比	
1	1	1	1	1	2.948
2	1	2	2	2	4.297
3	1	3	3	3	4.193
4	2	1	2	3	4.272
5	2	2	3	1	3.595
6	2	3	1	2	3.815
7	3	1	3	2	4.010
8	3	2	1	3	4.041
9	3	3	2	1	3.293
均值 1	3.813	3.743	3.601	3.279	
均值 2	3.894	3.978	3.954	4.047	
均值 3	3.781	3.767	3.933	4.169	
极差	0.113	0.235	0.353	0.890	

$C > B > A$ 。与 F 临界值相比较, F 值越大说明处理之间差异越明显。显著性分析可以看出 F_D 远远超过了 F 临界值(表 4),表明液料比对提取率有显著性影响,这和极差分析结果相一致。其中原因是当使用的提取溶剂相对来说比较少时,固态的玫瑰粉末不能充分浸泡在溶剂中,导致玫瑰黄酮也不能充分溶解,提取率比较低。随着提取溶剂用量的增加,黄酮提取率也相对升高,当液料比为 30 : 1 (mL/g) 时,提取率最高,液料比 $> 30 : 1$ (mL/g) 时,提取率变化不大。原因是玫瑰花中黄酮含量是有一定限度的,所以,当其所含黄酮充分溶解后,即使增大溶剂用量,其提取率变化不大。综合试验结果,提取黄酮的最佳条件为:乙醇体积分数 65%,提取温度 70 °C,提取时间 1.5 h,液料比 30 : 1 mL/g。

在最佳提取条件下提取 5 种玫瑰花中的总黄酮,其中妙峰山玫瑰的黄酮质量分数最高,为 66.040 mg/g,其次是丰花、摩洛哥、四季和大马士革。其黄酮含量由高到低依次为:55.297、54.443、47.485 和 44.922 mg/g(图 1)。

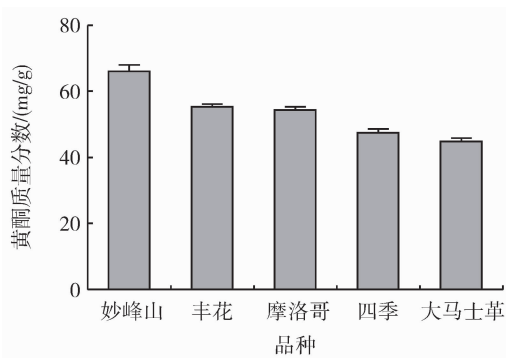


图1 5种玫瑰花中黄酮质量分数比较

Fig. 1 Comparison of flavonoids content from five species of *Roses*

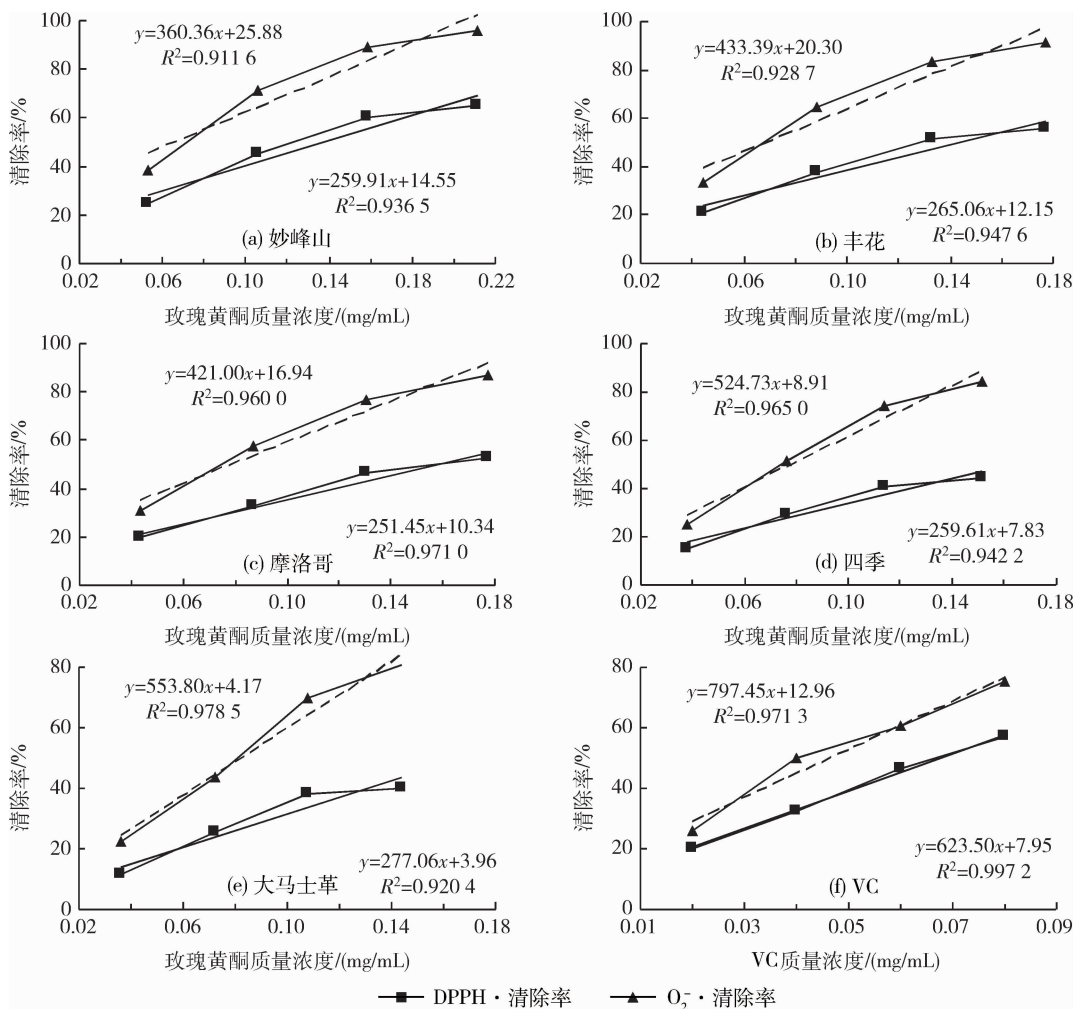


图2 玫瑰花黄酮质量浓度及VC质量浓度对自由基清除率的影响

Fig. 2 Free radical scavenging effects of *Roses* flavonoids and VC concentration

抗氧化剂清除自由基的能力高低,一般情况下 IC_{50} 值越小,抗氧化剂的清除能力越强)。计算结果见表5。

由图2可以看出,清除效果具有相同的变化趋势,即随着提取液质量浓度的增加,玫瑰花黄酮清除

3.3 玫瑰花黄酮的抗氧化性能

超氧阴离子自由基是基态氧接受1个电子后形成的第一个氧阴离子自由基,可以经过一系列反应生成其他的氧阴离子自由基,玫瑰花中黄酮酚羟基能与超氧阴离子自由基发生反应,从而终止自由基链式反应。DPPH自由基是一种很稳定的以氮为中心的自由基,加入玫瑰花黄酮后,具有清除DPPH自由基的作用。图2示出5种玫瑰花黄酮质量浓度和VC质量浓度对DPPH自由基和超氧阴离子自由基清除率的影响。根据线性回归方程,可分别求出5种玫瑰花和VC的半抑制浓度 IC_{50} 值(IC_{50} 值即清除率达到50%时所需药物的浓度,其大小表明了

DPPH自由基和超氧阴离子自由基的能力增强。在所试验的浓度范围内,玫瑰花的清除能力与玫瑰花中黄酮含量成呈现出一定的正相关关系。

从表5可以看出,VC清除DPPH的 IC_{50} 值是

表5 5种玫瑰花黄酮和VC清除自由基的半抑制浓度(IC₅₀)

Table 5 Scavenging capabilities of five species of Roses and VC mg/mL

自由基	妙峰山	丰花	摩洛哥	四季	大马士革	VC
O ₂ ·	0.136	0.143	0.157	0.162	0.166	0.067
DPPH·	0.067	0.069	0.078	0.078	0.083	0.046

注:IC₅₀,清除率达到50%时所需药物的浓度,该值越小,抗氧化剂的清除能力越强。

0.046 mg/mL,妙峰山、丰花、摩洛哥、四季和大马士革分别为0.067、0.069、0.078、0.078和0.083 mg/mL,分别是VC的1.46、1.5、1.7、1.7和1.8倍。VC清除O₂·的IC₅₀值是0.067 mg/mL,妙峰山、丰花、摩洛哥、四季和大马士革分别是0.136、0.143、0.157、0.162和0.166 mg/mL,分别是VC的2.03、2.13、2.34、2.42和2.48倍。这表明5种玫瑰花清除DPPH自由基和超氧阴离子自由基的效果虽不如VC强,但已表现出很强的清除能力。每种品种的玫瑰花清除DPPH自由基的能力强于清除超氧阴离子自由基的能力,其中妙峰山玫瑰的清除能力最强,其次分别是丰花、摩洛哥、四季和大马士革。原因是植物的抗氧化能力与植物的黄酮含量有关^[17],黄酮酚羟基能与自由基发生反应,从而终止自由基链式反应,妙峰山玫瑰中黄酮含量最高,所以其抗氧化能力最强。

4 讨论与结论

1)5种不同品种的玫瑰花中所含的黄酮含量不同,其中妙峰山玫瑰花黄酮含量最高,为66.04 mg/g,其次分别是丰花、摩洛哥、四季和大马士革。

2)5种玫瑰花黄酮均具有清除超氧阴离子自由基及DPPH自由基的能力,玫瑰花黄酮清除DPPH自由基的能力强于清除超氧阴离子自由基的能力,玫瑰花黄酮的清除能力和提取液质量浓度呈正相关,质量浓度越大,其清除率越高。

3)妙峰山玫瑰清除超氧阴离子及DPPH自由基的IC₅₀值相应为0.067和0.136 mg/mL,和VC相比,分别是VC的1.46和2.03倍;抗氧化能力虽低于VC,但在试验所选的5种玫瑰花中,妙峰山玫瑰清除能力最强。

玫瑰花具有较高的经济价值和生态价值,本试验确定的玫瑰黄酮的最佳提取条件为:乙醇体积分

数65%,提取温度70℃,提取时间1.5h,液料比(V($\varphi=65\%$ 乙醇):m(玫瑰花粉))30 mL:1 g。对5种玫瑰花黄酮含量及抗氧化性能进行了比较分析,在所选的5种玫瑰花品种中,妙峰山玫瑰的黄酮含量最高,抗氧化性能最好。除此之外,有研究表明北京妙峰山玫瑰中还含有丰富的玫瑰精油^[18],因此,结合本试验的研究成果,妙峰山玫瑰具有很大的开发潜力,有望成为天然的抗氧化剂素材。

参 考 文 献

- [1] 董彩军,李锋.黄酮类化合物的研究进展[J].农产品加工,2010,199(02):65-69
- [2] 汪秋安,周冰,单杨.天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展[J].化工生产与技术,2004,11(5):29-32
- [3] 胡春,丁霄霖.黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化作用研究[J].食品与发酵工业,1996(3):46-53
- [4] 李贵荣,杨胜圆.党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].化学世界,2001(8):421-422
- [5] 彭长连,陈少薇,林植芳,等.用清除有机自由基DPPH法评价植物抗氧化能力[J].生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661
- [6] 王多宁.玫瑰花的综合利用及开发前景[J].黑龙江农业科学,2010,187(1):117-120
- [7] 王本晓,彭艳丽.玫瑰花中总黄酮醇的定性定量方法研究[J].药物分析杂志,2010,30(4):644-646
- [8] 张素芹,彭广芳,王小梅,等.山东野生玫瑰花中氨基酸及微量元素含量测定[J].时珍国药研究,1997,8(2):34
- [9] 周达,罗成,鲁晓翔.玫瑰花总黄酮微波辅助提取及其抗氧化研究[J].食品工业科技,2010,228(4):269-272
- [10] Franco D,Pinelo M,Sineiro J.Processing of *Rosa rubiginosa*: Extraction of oil and antioxidant substances[J].Bioresour Technol,2007,98(18):3506-3512
- [11] 杨万政,陈慧英,李道远.玫瑰花红色素的提取和稳定性研究[J].中央民族大学学报:自然科学版,2003,12(1):64-68
- [12] 王方,吕镇城,彭永宏.玫瑰花红色素的提取及其稳定性研究[J].华南师范大学学报:自然科学版,2007,118(4):102-109
- [13] 唐得时.中药化学[M].北京:人民卫生出版社,1986
- [14] 李志洲.苦瓜中黄酮类化合物的提取及抗氧化性研究[J].中国生化药物杂志,2007,28(4):264-266
- [15] 何玲玲,王新,石中亮,等.醇提板栗壳色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J].安徽农业科学,2006,34(10):2054-2058
- [16] Amarowicz R,Naczki M,Shahidi F.Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls[J].J Agric Food Chem,2000,48(7):2755-2759
- [17] Soong Y Y,Barlow P J.Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds[J].Food Chemistry,2004,88(3):411-417
- [18] 孙江,李玲,高景红,等.北京妙峰山玫瑰花种植生产特征及精油分析[J].中国园艺文摘,2012(2):27-29