

龙牙百合鳞茎总黄酮提取工艺及抗氧化性研究

薛梅¹, 周卫平² (1. 重庆文理学院林学与生命科学学院, 重庆 402160; 2. 重庆文理学院体育学院, 重庆 402160)

摘要 [目的]探讨龙牙百合鳞茎总黄酮的最佳提取工艺,并研究其抗氧化活性。[方法]以龙牙百合鳞茎为研究对象,采用优化超声波法提取总黄酮。在单因素试验的基础上,采用正交试验法研究了乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度对总黄酮提取量的影响,并确定其最佳工艺条件,并对其体外抗氧化活性进行了研究。[结果]龙牙百合鳞茎总黄酮的最佳工艺条件如下:提取温度为30℃,乙醇浓度为80%,料液比(g:mL)为1:10,提取时间为20 min。在此条件下,百合鳞茎总黄酮提取量为(32.236±0.513)mg/g。抗氧化试验结果表明,龙牙百合鳞茎总黄酮提取液对DPPH·的清除效果优于相同浓度的维生素C溶液,且存在显著差异($P < 0.05$)。[结论]该研究可为龙牙百合的综合开发与利用提供理论依据。

关键词 龙牙百合鳞茎;总黄酮;超声波法;抗氧化活性

中图分类号 S644.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)03-0010-03

Study on the Extraction Technology and Antioxidant Property of Total Flavonoids from *Longya lilium* Bulb

XUE Mei¹, ZHOU Wei-ping² (1. College of Forestry and Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160; 2. School of Physical Education, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160)

Abstract [Objective] To explore the optimum extraction technology of total flavonoids from *Longya lilium* bulb and study their antioxidant activity. [Method] Taking *L. lilium* bulb as research object, total flavonoids were extracted from *L. lilium* bulb by using optimized ultrasonic method. Based on single factor experiment, the effects of ethanol concentration, material-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the extraction quantity of total flavonoids from *L. lilium* bulb were studied and the optimum extraction technology was confirmed by using orthogonal experiment. And their antioxidant activities of total flavonoids *in vitro* were studied. [Result] The optimum extraction conditions of total flavonoids from *L. lilium* bulb were as follows: 80% ethanol, solid-liquid ratio of 1:10 (g:mL), extraction temperature of 30℃, extraction time of 20 min. Under the optimum conditions, the extraction quantity of total flavonoids was (32.236±0.513) mg/g. The results of *in vitro* antioxidant test showed that the scavenging effects of total flavonoids extract from *L. lilium* bulb to DPPH· was better than that of vitamin C solution at the same concentration, and there was significant difference ($P < 0.05$). [Conclusion] The research can provide theoretical basis for the comprehensive exploration and utilization of *L. lilium*.

Key words *Longya lilium* bulb; Total flavonoids; Ultrasonic method; Antioxidant activity

龙牙百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)为多年生草本植物,是我国重要的经济型食用百合品种之一,主产于四川、湖南、重庆等地^[1]。龙牙百合食用部分为鳞茎,且具有多种药效,营养价值很高,是卫生部首批公布的药食同源食品^[2]。

黄酮类化合物又名生物类黄酮(Bioflavonoids),包括黄酮、异黄酮、黄烷酮、双黄酮及其甙类,具有广泛的生理活性,广泛存在于果蔬和中草药中。黄酮具有清除自由基、抗脂质过氧化、提升体内抗氧化水平的作用,此外还具有作为防治心脑血管疾病的天然药物和膳食补充剂开发的潜力^[3]。

目前,关于植物黄酮提取工艺的研究已经涉及多种植物^[4-7],但关于龙牙百合鳞茎的研究还较少。笔者以龙牙百合鳞茎为研究对象,通过前期预试验对水浴、超声波、索式3种提取方法和乙醇、甲醇、乙酸乙酯等提取试剂进行筛选,确定以超声辅助为提取方法、乙醇为提取剂,通过单因素试验和正交试验筛选出龙牙百合鳞茎总黄酮的最佳提取工艺,并对其体外抗氧化活性进行了研究,旨在为龙牙百合的综合开发与利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 将龙牙百合鳞茎(购于重庆江津邱仁平百合种植基地)于60℃恒温烘干后粉碎过60目筛,密封冷藏待用。试验所用药品均为分析纯;芦丁标准品, HPLC ≥

98%,购自中国食品药品检定研究院。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制。精密称取5.0 mg 芦丁标准品置于25 mL容量瓶,加70%乙醇至刻度,摇匀,得到0.2 mg/mL 芦丁溶液;精密量取0、1、2、3、4、5、6 mL 0.2 mg/mL 芦丁溶液分别置于25 mL容量瓶中,各加水6 mL,再加5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀后放置6 min,加10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀后放置6 min,加4%氢氧化钠溶液10 mL,加水至刻度,摇匀放置15 min,以不加标准品的对照管为空白对照,在510 nm波长处测定吸光度。以芦丁标准品的质量浓度(x)为横坐标,以吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程 $y = 10.206x + 0.0075 (R^2 = 0.9989)$ 。

1.2.2 样品总黄酮的测定。称取百合鳞茎粉末2.5 g,经抽滤得到提取物,旋转蒸发后溶解定容。根据芦丁的标准曲线,计算出总黄酮含量。

1.2.3 总黄酮提取条件筛选的单因素试验。

1.2.3.1 超声温度的筛选。在料液比(百合鳞茎/乙醇溶液)为1:40(g:mL,下同)、乙醇浓度为70%、提取时间为30 min的条件下,比较不同提取温度(40、50、60、70、80℃)对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响。

1.2.3.2 乙醇浓度的筛选。在料液比为1:40、提取时间为30 min、提取温度为40℃的条件下,比较不同乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响。

1.2.3.3 料液比的筛选。在提取温度为40℃、乙醇浓度为

基金项目 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1401129)。

作者简介 薛梅(1973—),女,重庆人,实验师,硕士,从事植物生理、园林植物种质资源开发与利用等研究。

收稿日期 2016-11-19

80%、提取时间为 30 min 的条件下,比较不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响。

1.2.3.4 提取时间的筛选。在提取温度为 40 ℃、乙醇浓度为 80%、料液比为 1:20 的条件下,比较不同提取时间(10、20、30、40、50 min)对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响。

1.2.4 优化总黄酮提取条件的正交试验。根据单因素试验结果,选择提取温度(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)、提取时间(D)为考察因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,具体因素与水平设计见表 1。通过测定总黄酮提取量,优选最佳提取工艺条件。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素与水平

Table 1 The factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 提取温度 Extraction temperature ℃	B 乙醇浓度 Ethanol concent- ration//%	C 料液比 Material- liquid ratio	D 提取时间 Extraction time min
1	30	70	1:10	10
2	40	80	1:20	20
3	50	90	1:30	30

1.2.5 重复性试验。根据正交试验结果确定最佳提取方法和条件后,同时做 5 个平行样品,计算相对标准偏差(RSD)。

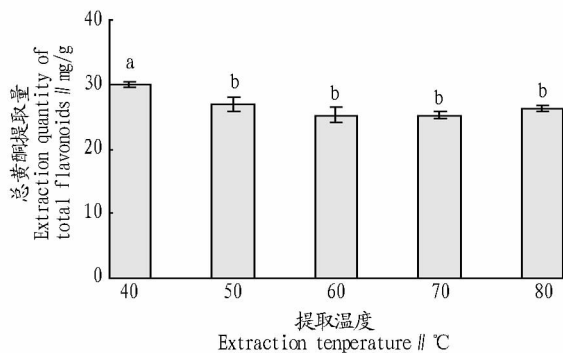
1.2.6 抗氧化性研究。根据正交试验得到的最优提取条件提取龙牙百合鳞茎总黄酮,按比例稀释成不同浓度的百合鳞茎总黄酮溶液,进行 DPPH·清除能力试验。取稀释后不同浓度(5.0、6.2、8.4、12.5、25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的百合鳞茎提取液 2 mL 和 0.2 mmol/L DPPH 溶液 2 mL,加入同一具塞试管中,摇匀后在室温下密闭静置 30 min,以纯溶剂为参比,于 517 nm 波长处测定吸光度,计算龙牙百合鳞茎黄酮提取液对 DPPH·的清除率。采用同样的方法,测定与百合鳞茎总黄酮溶液相同浓度梯度的维生素 C 溶液对 DPPH·的清除率,作为对照。按照以下公式计算 DPPH·清除率: DPPH·清除率 = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$ 。式中, A_1 为加提取液后 DPPH·溶液的吸光度, A_2 为提取液的吸光度, A_0 为未加提取液时 DPPH 溶液的吸光度。

1.3 数据处理 采用 Excel 2003 软件和 SPSS 13.0 统计软件对试验数据进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 提取温度对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响 从图 1 可以看出,在料液比为 1:40、乙醇浓度为 70%、提取时间为 30 min 的条件下,当提取温度为 40 ℃时,龙牙百合鳞茎的总黄酮提取量最高,与其他提取温度差异显著,当提取温度为 50 ~ 80 ℃时不存在显著差异。因此,确定最佳提取温度为 40 ℃。

2.2 乙醇浓度对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响 从图 2 可以看出,在料液比为 1:40、提取时间为 30 min、提取温度为 40 ℃的条件下,当乙醇浓度为 60% ~ 90% 时总黄酮提取量差异不显著,但均显著优于乙醇浓度为 50% 时。当乙醇浓度为 80% 时,龙牙百合鳞茎的总黄酮提取量的标准误差最小,因此确定最佳乙醇浓度为 80%。

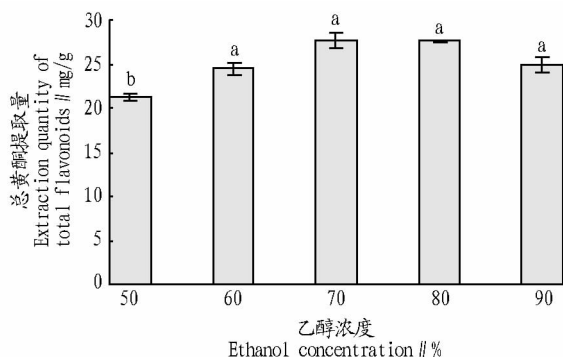


注:各处理间标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters among different treatments indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 1 提取温度对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响

Fig. 1 The effects of extraction temperature on extraction quantity of total flavonoids from *L. lilium* bulb



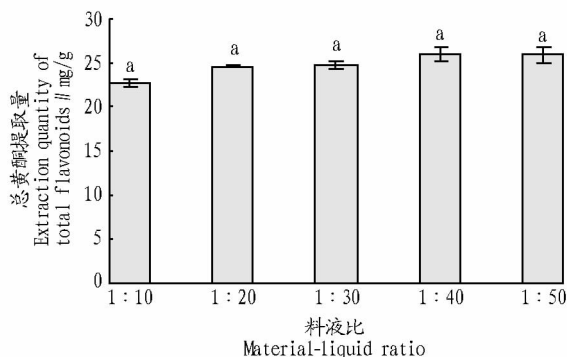
注:各处理间标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters among different treatments indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 2 乙醇浓度对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响

Fig. 2 The effects of ethanol concentration on extraction quantity of total flavonoids from *L. lilium* bulb

2.3 料液比对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响 从图 3 可以看出,在提取温度为 40 ℃、乙醇浓度为 80%、提取时间为 30 min 的条件下,不同料液比对龙牙百合鳞茎总黄酮提取



注:各处理间标有相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)

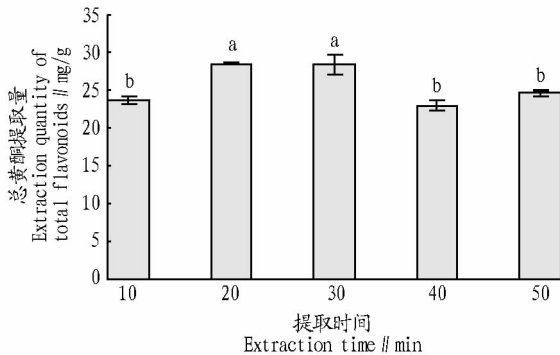
Note: Same small letters among different treatments indicate no significant difference ($P > 0.05$)

图 3 料液比对龙牙百合鳞茎总黄酮提取量的影响

Fig. 3 The effects of material-liquid ratio on extraction quantity of total flavonoids from *L. lilium* bulb

量无明显影响。当料液比为 1:20 时,龙牙百合磷茎总黄酮提取量的标准误差最小,因此确定最佳料液比为 1:20。

2.4 提取时间对龙牙百合磷茎总黄酮提取量的影响 从图 4 可以看出,在提取温度为 40 ℃、乙醇浓度为 80%、料液比为 1:20 的条件下,当提取时间为 20 和 30 min 时总黄酮提取量较高,说明不同提取时间对龙牙百合磷茎总黄酮提取量有显著影响($P < 0.05$)。综合考虑节约时间成本和提取时间为 20 min 时总黄酮提取量标准误差较小的因素,确定龙牙百合磷茎总黄酮的最佳提取时间为 20 min。



注:各处理间标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters among different treatments indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 4 提取时间对龙牙百合磷茎总黄酮提取量的影响

Fig. 4 The effects of extraction time on extraction quantity of total flavonoids from *L. lilium* bulb

2.5 正交试验结果 由表 2 可知,提取温度和乙醇浓度对龙牙百合磷茎总黄酮提取量有显著影响($P < 0.05$),而其他因素对总黄酮提取量的影响不显著。 R 值越大,说明该因素的水平变动对试验结果的影响越大,4 个因素对龙牙百合总黄酮提取量的影响从大到小依次为乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间,最优水平为 $A_1B_2C_1D_2$,即提取温度为 30 ℃,乙醇浓度为 80%,料液比为 1:10,提取时间为 20 min,在此条件下龙牙百合磷茎总黄酮的提取效果最好。

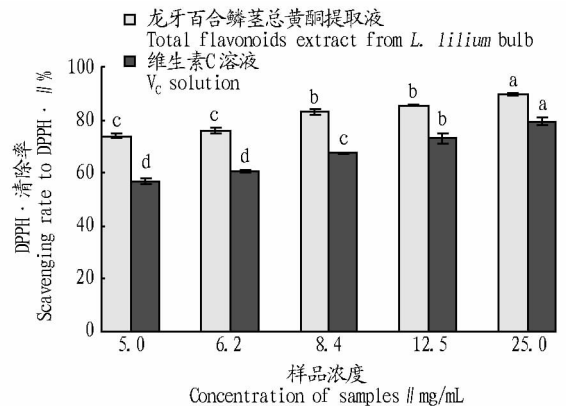
表 2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

试验号 Test No.	A 提取温度 Extraction temperature//℃	B 乙醇浓度 Ethanol concentration//%	C 料液比 Material-liquid ratio	D 提取时间 Extraction time//min	总黄酮提取量 Extraction quantity of total flavonoids mg/g
1	1	1	1	1	60.168
2	1	2	2	2	62.787
3	1	3	3	3	56.834
4	2	1	2	3	56.658
5	2	2	3	1	56.455
6	2	3	1	2	56.314
7	3	1	3	2	56.966
8	3	2	1	3	61.235
9	3	3	2	1	56.799
K_1	179.788	173.792	177.716	173.422	
K_2	169.427	180.476	176.243	176.067	
K_3	175.000	169.947	170.256	174.727	
R	10.362	10.529	7.460	2.646	

2.6 重复性试验 在最优提取条件下,同时进行 5 个平行样品验证试验,结果表明总黄酮提取量为 (32.236 ± 0.513) mg/g,相对标准偏差(RSD)为 2.25%,总黄酮提取量较高,重现性较好,表明此提取工艺稳定合理。

2.7 不同浓度的龙牙百合磷茎总黄酮提取液与维生素 C 的体外抗氧化能力比较 从图 5 可以看出,不同浓度龙牙百合磷茎的总黄酮提取液和维生素 C 溶液对 DPPH· 的清除率均随着浓度的升高而升高。龙牙百合磷茎总黄酮提取液对 DPPH· 的清除率始终优于相同浓度的维生素 C 溶液,龙牙百合磷茎总黄酮提取液与维生素 C 在相同浓度下对 DPPH· 的清除效果存在显著差异($P < 0.05$)。



注:相同浓度下标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters at the same concentration indicate significant differences ($P < 0.05$)

图 5 龙牙百合磷茎总黄酮提取液和维生素 C 溶液对 DPPH· 的清除率比较

Fig. 5 Comparison of scavenging rate of total flavonoids extract from *L. lilium* bulb and vitamin C solution to DPPH·

3 结论与讨论

该研究结果表明:影响龙牙百合磷茎总黄酮提取量的因素主次顺序依次为乙醇浓度、提取温度、料液比、提取时间;最佳提取条件为提取温度 30 ℃,乙醇浓度 80%,料液比 1:10,提取时间 20 min。在优化的工艺条件下,总黄酮的最大提取量达到 (32.301 ± 0.513) mg/g。靳磊等^[8]研究表明野生百合渥丹、山丹的总黄酮含量分别为 3 134.46 和 2 390.80 mg/kg,而兰州百合的总黄酮含量为 1 505.31 mg/kg。这说明龙牙百合磷茎的总黄酮含量优于兰州百合。

该研究中体外抗氧化试验结果表明,在相同浓度下龙牙百合磷茎的总黄酮提取液对 DPPH· 的清除能力显著优于维生素 C 溶液,说明龙牙百合磷茎总黄酮表现出较好的清除 DPPH· 的能力。

龙牙百合作为一种传统的保健食品,目前对其磷茎的开发和利用模式比较单一,对其磷茎的次生代谢相关产物的提取工艺和利用研究还较少。广玉兰在乙醇浓度 70%、料液比 1:40 (g: mL)、提取时间 90 min、提取温度 70 ℃ 的条件下,总黄酮的提取率为 4.896%^[7];红橘果皮在乙醇浓度 70% (g: mL)、料液比 1:20 (g: mL)、提取温度 65 ℃ 和提取时间

(下转第 30 页)

气质方面,3个品种中部叶的香气质都较好,但HY01和HY02香气量高于云烟87;在吸味特征上,HY02的刺激性高

表7 不同烤烟品种(系)感官质量评价

Table 7 Sensory quality evaluation of different varieties (lines) of flue-cured tobacco

品种(系) Varieties (lines)	等级 Grade	烟气特征 Smoke character		香气特征 Aroma character			吸味特征 Smoking character		总分 Total score
		劲头 Strength	浓度 Concentration	香气质 Aroma quality	香气量 Aroma quantity	杂气 Offensive odor	刺激性 Irritation	余味 Aftertaste	
HY01	B2F	7.0	7.5	6.5	7.0	6.5	6.0	6.5	66.3
	C3F	7.0	7.0	7.0	7.5	6.5	6.5	7.0	70.3
	X2F	5.5	6.0	5.5	6.0	5.5	6.0	6.0	58.0
HY02	B2F	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	6.5	7.0	69.5
	C3F	6.0	6.5	7.0	7.5	7.0	7.0	7.0	71.8
	X2F	5.5	6.0	5.5	6.0	6.0	6.0	6.0	59.0
云烟87	B2F	7.0	7.5	6.5	7.0	6.5	6.0	6.5	66.3
Yunyan 87	C3F	6.5	6.5	7.0	7.0	6.5	6.5	7.0	68.5
	X2F	5.5	6.0	5.5	6.0	5.5	6.0	6.0	58.0

3 结论与讨论

烤烟品种是生产优质烟叶的前提,只有种植适宜当地生态条件的烤烟品种,才能获得优质的烟叶来满足工业原料需求,因此种植适宜当地生态条件的烤烟品种是获得高品质烟叶的关键因素^[13-14]。烤烟的农艺性状、抗病性、原烟外观质量、烤后烟叶化学成分、经济性状能很好地反映其田间长势、烟叶质量与经济价值,对选择优良的烤烟品种有较好的指导意义^[15]。

烤烟品种HY01和HY02田间长势较好,抗病能力较强,成熟落黄分层较明显,经济性状和烤后原烟外观质量较好,烟叶化学成分含量较平衡,整体表现优于云烟87。HY06和0917田间发病率较高,产量、产值比云烟87低,烤后原烟外观质量较差。粤烟98、粤烟97烤后烟叶化学成分平衡比云烟87好,农艺性状表现与烤后原烟外观质量与云烟87相当,但是经济性状差,远低于云烟87的产量与产值,差异明显。云烟87变异系各方面表现与云烟87相当。

综合各项指标可知,HY01和HY02大田长势强、农艺性状优良、抗病性强、经济优势较为明显,油分多且色度强,整体表现优于对照云烟87。因此,筛选出HY01和HY02 2个烤烟品种在梅州烟区种植。

参考文献

- [1] 刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 周金仙. 不同生态条件下烟草品种产量与品质的变化[J]. 烟草科技, 2005(9):32-35.
- [3] 邵丽,晋艳,杨宇虹,等. 生态条件对不同烤烟品种烟叶产质量的影响[J]. 烟草科技,2002(10):40-45.
- [4] 李雨,翟欣,胡钟胜,等. 基于气候条件与烟叶质量的烤烟适宜种植品种选用[J]. 中国烟草科学,2015,36(3):19-23.
- [5] 肖金香,刘正和,王燕,等. 气候生态因素对烤烟产量与品质的影响及植烟措施研究[J]. 中国生态农业学报,2003,11(4):158-160.
- [6] 彭新辉,易建华,周清明. 气候对烤烟内在质量的影响研究进展[J]. 中国烟草科学,2009,30(1):68-72.
- [7] 林敬凡,熊杰伟,鲁心正. 气候条件对烤烟质量的影响[J]. 气象,1995,21(1):44-47.
- [8] 石俊雄,陈雪,雷璐. 生态因子对贵州烟叶主要化学成分的影响[J]. 中国烟草科学,2008,29(2):18-22.
- [9] 陈万奎,杨军,罗贞宝,等. 贵州省黔西县不同烤烟品种生态适应性研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(32):10354,10363.
- [10] 高琼,顾勇,冯海金,等. 六盘水烤烟品种筛选研究[J]. 作物研究,2013,27(S1):5-8.
- [11] 张维祥,余善惠,廖松发. 大埔县烤烟新品种比较试验[J]. 广东农业科学,2003(5):13-15.
- [12] 罗战勇,吕永华,李淑玲,等. 广东省生态烟区的划分及其烟叶质量评价[J]. 广东农业科学,2004(1):18-20.
- [13] 高春洋,杨全柳,周正红,等. 几个烤烟新品种在永州的试种表现[J]. 中国烟草科学,2008,29(3):11-15,19.
- [14] 刘宝法,王华彬,周宝仁,等. 几个烤烟新品种在内蒙古的引种试验[J]. 中国烟草科学,2003(2):25-27.
- [15] 林志,曾惠宇,颜成生,等. 湘南不同烤烟品种生态适应性研究[J]. 作物研究,2012,26(3):243-247.

(上接第12页)

60 min的条件下,总黄酮的提取率为6.58%^[4];在工艺条件为微波时间120 s、微波功率400 W、液固比33:1的条件下,山楂叶总黄酮提取量为7.49 mg/g^[5];在浸提液为30%乙醇、料液比1:40、超声波(80 Hz,200 W)处理70 min、80℃水浴温度下提取2次,紫苏叶粗提液总黄酮提取率为21.81 mg/g^[6],说明植物繁殖器官的总黄酮含量整体高于营养器官。该研究表明龙牙百合鳞茎的总黄酮含量较其他植物的营养器官高,且有较理想的抗自由基氧化效果,这为今后研究龙牙百合对人体抗自由基的保健功能提供了新的理论依据,具有一定的实用价值。

参考文献

- [1] 陈立德,刘新桃,蒋盛岩,等. 龙牙百合氨基酸含量的柱前衍生OPA-HPLC法测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10832-10833,10836.
- [2] 罗丽萍,杨柏云,蔡奇英,等. 龙牙百合热处理及茎尖培养技术研究[J]. 江苏农业科学,2015(1):72-73,104.
- [3] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2008,23(3):277-280.
- [4] 李彦杰,杨俊年,刘仁华,等. 万州红橘果皮总黄酮提取工艺优化和抗氧化活性分析[J]. 食品科技,2013,38(11):221-225.
- [5] 刘通,文连奎. 微波辅助提取山楂叶黄酮的试验研究[J]. 农产品加工,2014(5):10-13,18.
- [6] 刘毅学,曾广辉,李爱贞. 超声波辅助法提取紫苏叶总黄酮的研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2014,19(1):20-24.
- [7] 郝玉民,李立祥,易昶寺,等. 广玉兰花总黄酮提取及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(5):1365-1367,1485.
- [8] 靳磊,张延龙,牛立新,等. 3种百合鳞茎中多酚类物质的抗氧化活性分析[J]. 西北植物学报,2014,34(5):995-1001.