

蓝靛果不同提取部位花青素、多酚类的含量测定及 体外抗氧化活性

陈智力, 王秋红, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及
天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:考察 4 种不同方法测定蓝靛果 95% 乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层萃取部位的花青素含量并测定其抗氧化活性。方法:以 95% 乙醇提取蓝靛果,回收溶剂后用水溶解,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,获得蓝靛果 4 个提取部位。分别用色价法、消光系数法、pH 示差法和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定花青素、多酚类的含量,并利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼测定 4 个提取部位的抗氧化的能力,检测波长 517 nm。结果:采用色价法、消光系数法和 pH 示差法测得正丁醇层中花青素含量最高;而以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法结果可知,在乙酸乙酯层中多酚类含量最高为 29.45%。体外抗氧化活性以乙酸乙酯层最强,正丁醇层和水层抗氧化活性接近,石油醚层抗氧化活性最弱。结论:蓝靛果中不仅花青素有一定的抗氧化活性,多酚类也表现出较强的抗氧化活性。

[关键词] 蓝靛果; 花青素; 多酚类; 抗氧化

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)01-0048-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010048

Determination Content of *Lonicera caerulea* var. *edulis* Anthocyanin and Polyphenols in Different Parts and *in Vitro* Antioxidant Activity

CHEN Zhi-li, WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Northern Medicine Base and Application Under Ministry of Education, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Pharmacodynamic Material Bases of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study four different methods for the content determination of anthocyanin in the petroleum ether part, the ethyl acetate part, the *n*-butyl alcohol part and the water part in *Lonicera caerulea* var. *edulis* and its antioxidant activity. **Method:** *L. caerulea* var *edulis* was extracted by 95% ethanol, dissolved in water after solvent recovery, processed with petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol to get four parts of *L. caerulea* var *edulis*. Color value method, extinction coefficient method, pH differential method and $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetric method were used to determine content of anthocyanin and polyphenols, and the DPPH was used to determine the antioxidant ability of different part in *L. caerulea* var. *edulis*, with the detection wavelength at 517 nm. **Result:** Color value method, extinction coefficient method and pH differential method were used to show the highest anthocyanin content in the part of *n*-butyl alcohol. The result of $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetric method showed that the maximum content of polyphenolsin in the ethyl acetate was 29.45%. The highest antioxidant activity *in vitro* was found in the ethyl acetate part; the antioxidant activities of *n*-butyl alcohol part and the water part were similar; the antioxidant activity of the petroleum ether part was the lowest.

[收稿日期] 20150624(013)

[第一作者] 陈智力,在读硕士,从事中药化学研究,Tel:18746067632,E-mail:czlxmyt@163.com

[通讯作者] *匡海学,教授,博士生导师,从事中药及复方的药效物质基础研究和中药药性理论研究,Tel:0451-82110803,E-mail:hxkuang56@163.com

Conclusion: In *L. caerulea* var *edulis*, anthocyanin has a certain antioxidant activity, while polyphenols also showed a high antioxidant activity.

[**Key words**] *Lonicera caerulea* var. *edulis*; anthocyanin; polyphenols; antioxidant activity

蓝靛果忍冬又名蓝靛果、黑瞎子果、羊奶子等,为忍冬科忍冬属的一个变种,为多年生灌木。蓝靛果营养丰富,含有十几种人体需要的氨基酸、脂肪、维生素等^[1-3],常作为水果食用。药理研究表明蓝靛果具有清除自由基、抗衰老、抗炎、抗肿瘤、抗突变、预防和治疗心血管疾病、调节血脂、提高免疫力等生理活性^[4-10],而逐渐引起了人们的关注。目前对蓝靛果的化学研究较少,主要集中在总提取物中的花青素、多酚类,但是对蓝靛果中花青素、多酚类含量研究较少;采用系统溶剂分离的方法,对蓝靛果 95% 乙醇提取物分离得到 4 个萃取部位,同时运用色价法、消光系数法、pH 示差法和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法 4 种方法对蓝靛果不同萃取部位中花青素、多酚类的含量进行测定,完善蓝靛果的化学研究,同时研究了蓝靛果的抗氧化能力,以对蓝靛果进行系统的化学及活性研究。

1 材料

752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),N-1100 型旋转蒸发仪,CA-1111 冷却水循环装置,OSB-2100 型油浴锅(日本 Eyela 公司),AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

蓝靛果经黑龙江中医药大学大学生药学教研室苏连杰教授鉴定为忍冬科蓝靛果忍冬 *Lonicera caerulea* var. *edulis* 的果实;抗坏血酸(天津市东丽区天大化学试剂厂),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,美国 Aladdin 公司),芦丁对照品(批号 100080-200707,中国食品药品检定研究院),双蒸水自制,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蓝靛果 4 个提取部位的制备^[11-12] 取蓝靛果鲜果 1.5 kg,加 95% 乙醇,以料液比(1:10)60 °C 低温连续回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并提取液,减压回收溶剂,得蓝靛果 95% 乙醇提取物浸膏 123.26 g。将蓝靛果浸膏用水溶解,分别用等量体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,萃取液减压回收溶剂,得到石油醚、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物,依次为 4.513,15.700,41.512 g。

2.2 花青素含量的测定

2.2.1 色价法^[13-14] 采用色价法测定蓝靛果不同

提取部位的花青素含量。精密称取石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层浸膏各 0.103 3,0.102 1,0.101 7,0.104 6 g,用酸性乙醇(80% 乙醇-0.1% 盐酸 1:1,下同)溶解并定容于 25 mL 量瓶中,得到蓝靛果 4 个部位的储备液,取储备液适量,在 513 nm 波长下测定吸光度 A ,平行 3 份。根据以下公式计算色价。

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} Y \lambda_{\text{max}} Y = A_{513} \times \frac{N}{\text{HH}(\text{g})}$$

公式中 A_{513} 为 513 nm 下吸光度, N 为稀释倍数。

结果石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层浸膏中花青素色价值分别为 2.460,2.987,11.390,6.501,其中正丁醇部分色价值最高,与其他提取部位组具显著差异。从所得的色价值可知蓝靛果 4 个提取部位中,正丁醇层的花青素含量最高,其次为水层的花青素含量,乙酸乙酯层的花青素含量与石油醚层花青素含量接近,但是石油醚层花青素含量比乙酸乙酯层花青素含量略低。

2.2.2 消光系数法^[15-16] 采用消光系数法测定蓝靛果不同提取部位的花青素含量。分别精密称取石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层浸膏适量,用酸性乙醇定容至 25 mL 量瓶中,摇匀后,在 535 nm 波长下测定吸光度 A ,平行 3 份。根据以下公式计算花青素含量。

$$MF = A_{535} \times V \times \frac{N}{98.2 \times m}$$

公式中 MF 为果实中色素质量分数 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, A_{535} 为 535 nm 下吸光度, V 为定容体积 mL, N 为稀释倍数,98.2 为花色苷色素在 535 nm 波长的平均消光系数, m 为浸膏质量 g。

结果见表 1。其中正丁醇层中花青素含量最高,与其他提取部位组具显著差异,与色价法结果一致;乙酸乙酯层含量最低,与色价法结果不一致,可能是测定方法的不同造成色价法与消光系数法结果有差异。RSD 均 < 3%,表明该方法精密度较好。

2.2.3 pH 示差法^[17-18] 采用 pH 示差法测定蓝靛果不同提取部位的花青素含量。精密吸取 2.2.2 项下 4 个部位的储备液各 2 份,每份 1 mL 于具塞试管中,分别用 pH 1.0(精密称定氯化钾 1.49 g,用双蒸水溶解并定容于 100 mL 量瓶中;精密吸取浓盐酸 1.7 mL,用双蒸水定容于 100 mL 量瓶中,得 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 1 消光系数法测得各层中花青素含量

Table 1 With extinction coefficient method measured anthocyanin in each parts

样品	各层质量 /g	紫外吸收平均值 A	RSD /%	花青素质量分数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
石油醚层	0.105 0	0.172	2.0	0.376
乙酸乙酯层	0.100 1	0.102	2.0	0.233
正丁醇层	0.101 9	0.387	2.2	0.871
水层	0.104 0	0.245	1.1	0.540

注:稀释倍数均为 7.5 倍。

盐酸溶液;将氯化钾溶液和盐酸溶液以体积比 25:67 混合,调节 pH 至 1.0)和 pH 4.5(精密称定无水乙酸钠 1.64 g,用双蒸水溶解并定容至 100 mL 量瓶中,用 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液调节 pH 至 4.5)的缓冲溶液稀释至 5 mL,分别平衡 50,80 min,以双蒸水

表 2 pH 示差法测得各层中花青素含量

Table 2 With pH differential method measured anthocyanin in each parts

样品	$A_{513\text{pH} 1.0}$	$A_{700\text{pH} 1.0}$	$A_{513\text{pH} 4.5}$	$A_{700\text{pH} 4.5}$	各层质量/g	花青素质量分数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
石油醚层	0.172	0.176	0.169	0.172	0.105 0	2.39
乙酸乙酯层	0.102	0.104	0.100	0.102	0.100 1	1.67
正丁醇层	0.378	0.395	0.389	0.387	0.101 9	37.30
水层	0.246	0.242	0.247	0.245	0.104 0	14.46

2.3 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法^[19-20] 采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定蓝靛果不同提取部位多酚的含量,并对 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法用于蓝靛果中多酚含量的测定进行了方法学考察。

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品 5 mg 于 25 mL 量瓶中,加甲醇 2.5 mL,加水至刻度,摇匀,即得 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。精密量取芦丁对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置 25 mL 量瓶中,加水至 6.0 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应的试剂为空白,用紫外-可见分光光度法,测定 500 nm 处吸光度,以吸光度为横坐标,质量浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.3.2 精密密度试验 取芦丁对照品溶液 6.0 mL,用 2.3.1 项下的方法显色后于 500 nm 下测定,结果吸光度的 RSD <0.5%,说明仪器精密密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取芦丁对照品溶液 6.0 mL,在显色后 0,30,60,90,120,150,180 min 分别于 500 nm 下测定吸光度,结果对照品溶液在 30 min 内吸光度的 RSD 0.7%,表明样品溶液在 30 min 内稳

为空白,分别在 513 nm 和 700 nm 波长下测定吸光度 A ,根据以下公式计算花青素含量。

$$HH = (A/\epsilon L) \times MW \times DF \times V/Wt \times 100\%$$

公式中 A 为吸光度, ϵ 为矢车菊花青素-3-葡萄糖苷的消光系数 26 900,DF 为稀释因子,MW 为矢车菊花青素-3-葡萄糖苷的相对分子质量为 449.4, V 为最终体积, Wt 为产品质量, L 为光程 1 cm。以双蒸水作空白,用 A_{700} 来消除样液混浊的影响。

实验结果见表 2。从表 2 可知消光系数法测得正丁醇层中花青素含量最高,为 $37.298\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,与前 2 种测定方法一致,其次为水层含花青素 $14.457\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,与其他提取部位组具有显著性差异,含量最低为乙酸乙酯层。

定性较好。

2.3.4 重复性试验 取蓝靛果不同提取部位各 6 份各 0.1 g,依据 2.3.1 项下的方法显色后,于 500 nm 波长测定样品吸光度,结果石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层的 RSD 分别为 1.9%,1.3%,2.2%,2.1%,表明样品的重复性较好。

2.3.5 加样回收率试验 分别称取蓝靛果石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层 0.100 5,0.051 1,0.050 6,0.101 9 g,加入一定量的对照品,检测其多酚的含量,并计算加样回收率。结果见表 3。

2.3.6 多酚的含量测定 分别称取石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层浸膏适量,溶解并定容于 25 mL 量瓶中,精密吸取药液 1 mL 置 25 mL 量瓶中,处理方法同 2.3.1 项下“各加水至 6.0 mL……在 500 nm 波长处测定吸光度”。根据标准曲线计算含量。见表 4。以在 500 nm 处的紫外吸光度为纵坐标,芦丁的质量浓度为横坐标可得芦丁标准曲线为 $Y = 0.101X - 0.0013 (R^2 = 0.9995)$ 。从表 4 可知用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测得的多酚含量最高为乙酸乙酯层,与其他提取部位组具有显著性差异,与前 3 种方法测得的结果不一致。RSD 均 <3%,表明该方法精密密度较好。

表 3 蓝靛果中多酚的加样回收率试验

Table 3 Results of sample recovery rate

提取部位	样品	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
	中量 /mg					
石油醚层	6.0	5.8	12.0	101.69	100.34	1.5
	6.0	6.1	11.9	98.35		
	6.0	6.1	12.3	101.65		
	6.0	5.9	12.0	100.84		
	6.0	6.0	11.9	99.17		
乙酸乙酯层	14.9	15.1	30.1	100.33	100.20	0.9
	14.9	15.2	29.7	98.67		
	14.9	14.9	29.9	100.34		
	14.9	15.0	30.2	101.00		
	14.9	14.8	29.9	100.67		
正丁醇层	6.9	7.2	14.3	101.42	99.85	1.2
	6.9	7.0	13.7	98.56		
	6.9	6.7	13.5	99.26		
	6.9	7.1	13.9	99.29		
	6.9	6.7	13.7	100.74		
水层	6.3	6.5	13.0	101.56	100.47	1.5
	6.3	6.1	12.6	101.61		
	6.3	6.4	12.5	98.43		
	6.3	6.0	12.2	99.19		
	6.3	6.7	13.2	101.54		

表 4 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测得各层多酚含量

Table 4 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetric method measured anthocyanin

样品	各层质量 /g	A	多酚质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%
石油醚层	0.102	0.111	59.5	1.9
乙酸乙酯层	0.101	0.484	291.5	0.6
正丁醇层	1.004	0.251	136.9	0.1
水层	2.195	0.115	62.0	0.1

2.4 抗氧化活性测定^[21-23] 精密称取石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层各 0.1 g, 定容于 25 mL 量瓶中, 得 4 g·L⁻¹ 的储备液。取各层储备液适量分别稀释至 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g·L⁻¹。用无水乙醇做参比调零测定 517 nm 处的吸光度 A_i; 2 mL DPPH· 标准溶液和 2 mL 无水乙醇混合液在 517 nm 处的吸光度 A₀; 不同浓度待测样品 2 mL 和 DPPH· 标准乙醇溶液 2 mL 加入 10 mL 具塞试管中摇匀、室温下避光静置 30 min 后测定其在 517 nm 波长下的紫外光度 A_j, 并根据以下公式计算清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{自由基清除率 } S = [1 - (A_i - A_j / A_0)] \times 100\%$$

结果见表 5, 抗氧化能力以乙酸乙酯层最强, 正丁醇层和水层均表现出较强的抗氧化能力, 石油醚层的抗氧化能力最弱, 抗坏血酸质量浓度为 0.002 1, 0.004 2, 0.006 3, 0.008 4, 0.010 5, 0.012 6, 0.014 7 g·L⁻¹ 时, 对 DPPH· 的清除率分别为 12.261%, 20.297%, 30.013%, 43.126%, 55.020%, 70.188%, 82.020%, 从抗坏血酸清除率可知各个萃取部位的抗氧化能力均弱于抗坏血酸。

表 5 4 个提取部位不同质量浓度的抗氧化活性清除率

Table 5 The antioxidant activity of the four parts		%				
样品	0.2 g·L ⁻¹	0.4 g·L ⁻¹	0.6 g·L ⁻¹	0.8 g·L ⁻¹	1.0 g·L ⁻¹	
石油醚层	16.837	27.371	34.013	32.314	47.142	
乙酸乙酯层	55.576	79.734	88.137	89.249	90.207	
正丁醇层	46.803	75.162	83.102	78.128	80.538	
水层	44.856	63.639	82.854	83.830	83.998	

3 讨论

通过以上实验可以发现, 在蓝靛果花青素含量测定中, 色价法和消光系数法在测定花青素含量时, 方便快捷, 但是色价法没有含量单位, 只适用于花青素含量的对比, 而消光系数法在计算花青素含量时采用花青素平均比消光度, 因此, 消光系数法的测定值为总花青素含量; pH 示差法能够将含有邻二酚羟基结构的化合物检出, 其检测范围较消光系数法广, 因此, pH 示差法所测得的数值较消光系数法测得值要高。NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法适用于多酚类成分的含量测定, 因此 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法所测得的结果比 pH 示差法所测得结果还要大, 即 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测得的是总酚类的含量。通过花青素、多酚的含量测定, 我们发现花青素主要分布于正丁醇层和水层; 但是, 从 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法结果来看, 乙酸乙酯层中除花青素外, 多酚类含量较高。在蓝靛果中, 花青素含量的测定方法以消光系数法方便、快捷, 而且具有一定专属性; 而 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法适合测定总酚类化合物的含量。

通过 4 个提取部位的抗氧化能力的测定发现, 多酚含量高的乙酸乙酯层的抗氧化活性最强; 花青素含量高的水层和正丁醇层的抗氧化活性接近, 弱于乙酸乙酯层; 石油醚层的抗氧化活性最弱。因此, 在蓝靛果中, 不仅花青素能起到抗氧化的作用, 多酚类也体现出了较强的抗氧化活性。

[参考文献]

[1] 林凤起. 新兴野生浆果植物——蓝靛果忍冬[J]. 新

- 农业,1988(8):3.
- [2] 姚成学. 野生经济灌木蓝靛果忍冬[J]. 内蒙古林业, 1989(8):26.
- [3] 汪矛,唐恩全. 蓝靛果的生长习性[J]. 植物杂志, 1989(6):12-13.
- [4] 刘德江. 蓝靛果花色苷研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2012(4):44-45.
- [5] 刘奕琳,王振宇. 蓝靛果花色苷乙醇洗脱物抗癌活性的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(19):159-161,352.
- [6] 郎杰,隋政,高慧英. 蓝靛果降压作用的实验研究[J]. 中医药信息,1996(1):45.
- [7] 林昌虎. 蓝靛果提取物的抗衰老作用研究[D]. 延吉: 延边大学,2004.
- [8] 王恩福,包怡红. 蓝靛果提取物调节血脂功能特性的研究[J]. 食品与机械,2010,26(1):81-82.
- [9] 王振宇,刘奕琳. 蓝靛果乙醇洗脱物的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,32(9):163-165.
- [10] 王宏涛,叶云,肖顺林,等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(3):360-361.
- [11] 张冬雪. 蓝靛果色素提取条件对比、稳定性及应用研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [12] 代现平. 正交试验优化蓝靛果忍冬中总黄酮的提取工艺[J]. 安徽农业科技,2011,39(2):759-760,763.
- [13] 罗素兰,贺普超. 色价法测定葡萄浆果色素含量的改进[J]. 葡萄栽培与酿酒,1993(3):6-7.
- [14] 杨昱,于泽源. 树莓红色素最佳提取工艺研究[J]. 北方园艺,2010(2):44-46.
- [15] 张采,沈晓同. 蓝莓米酒中总花色苷含量的测定[J]. 安徽农学通报,2014,20(8):163-165.
- [16] 董爱文,向中,李立君,等. 爬山虎红色素的定性定量分析[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(6):99-102.
- [17] 孙婧超,刘玉田,赵玉平,等. pH 示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J]. 中国酿造,2011,(11):171-173.
- [18] 宋德群,孟宪军,王晨阳,等. 蓝莓花色苷的 pH 示差法测定[J]. 沈阳农业大学学报,2013,43(2):231-233.
- [19] 王卫东,陈复生. 陈皮中黄酮类化合物抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂,2007(2):59-62.
- [20] 王建壮,吕华冲. 比色法测定龙血竭总黄酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):55-58.
- [21] 张树军. 忍冬茎叶抗氧化活性成分研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [22] 韩京振,金政,金松竹,等. 蓝靛果抗氧化作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2002,9(1):45-46.
- [23] 吕阐明. 蓝靛果忍冬酚类物质提取及抗氧化性研究[D]. 长春:吉林大学,2012.

[责任编辑 顾雪竹]