南瓜中游离叶黄素的制备及抗氧化活性

孟繁玲[1,2]，张 宇[*1,2]，徐少博[3]，赵 宏[1,2]，王宇亮[1,2]，赵芷萌[1,2]，张 曼[1,2]

（1. 佳木斯大学 黑龙江省新药创制与药效毒理评价重点实验室，黑龙江 佳木斯 154007；2. 佳木斯大学 药学院，黑龙江 佳木斯 154007；3. 黑龙江省第二医院，黑龙江 哈尔滨 150010）

摘要：为了探究南瓜提取物中叶黄素酯的皂化工艺条件和其体外抗氧化能力，在单因素试验基础上，以皂化液浓度、皂化温度和皂化时间为响应因子，采用 Box-Behnken 中心组合实验原理进行三因素三水平设计，优化南瓜叶黄素的皂化工艺；利用高效液相色谱（HPLC）和质谱（MS）分析检测皂化产物；经硅胶柱色谱分离得到纯化的南瓜叶黄素；采用分光光度法，通过比较 DPPH·和·OH 的清除能力评价南瓜中游离叶黄素的体外抗氧化活性。结果表明，南瓜提取物中叶黄素酯的最佳皂化工艺条件为皂化液质量浓度 33 g/dL，温度 33 ℃，时间 5.5 h。在最优工艺条件下，南瓜提取物中游离叶黄素得率为 0.4175%，与预测值相近，说明该优化工艺稳定可行。高效液相色谱（HPLC）和质谱（MS）分析检测表明皂化产物为叶黄素。硅胶柱色谱纯化后，游离叶黄素的纯度可提高到 91.39%。南瓜中游离叶黄素清除 DPPH·和·OH 的半抑制质量浓度 IC_{50} 分别为 0.021 4 mg/mL 和 0.038 3 mg/mL，抗氧化活性较高，可作为一种良好的天然抗氧化剂。

关键词：南瓜；叶黄素；皂化；抗氧化

中图分类号：TS264.4　**文章编号：**1673-1689(2020)08-0081-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.010

Manufacture Process and Antioxidant Activity of Free Lutein from *Cucurbita moschata* Duch.

MENG Fanling[1,2]，*ZHANG Yu*[*1,2]，*XU Shaobo*[3]，*ZHAO Hong*[1,2]，*WANG Yuliang*[1,2]，*ZHAO Zhimeng*[1,2]，*ZHANG Man*[1,2]

(1. Key Laboratory of New Drug Discovery and Efficacy Toxicology Evaluation, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Institute of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 3. The Second Hospital of Heilongjiang Provincial, Harbin 150010, China)

Abstract: The saponification conditions of the extract from *Cucurbita moschata* Duch. was optimized and its antioxidant activity in vitro was evaluated. On the basis of single factor experiment, the saponification solution concentration, saponification temperature and saponification time were optimized as the response factors. The Box-Behnken Center combination experiment principle was

收稿日期：2019-03-17

基金项目：中国博士后科学基金面上项目(2015M571454)；黑龙江省科学基金青年项目(QC2018119)；黑龙江省博士后科研基金项目(LBH-Z14204)；黑龙江省教育厅青年创新人才项目(UNPYSCT-2016095)；黑龙江省卫生健康委项目(2018-493)；黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2017-KYYWF-0590)；黑龙江省北药与功能食品特色学科项目；大学生创新创业训练计划项目；佳木斯市科技专项项目(2016-07)。

*通信作者：张 宇(1964—)，女，硕士，教授，博士研究生导师，主要从事天然药物活性成分筛选及新药开发方面的研究。E-mail：zhangyu@jmsu.edu.cn

carried out by the three-factor and three-level design to optimize the saponification process of *Cucurbita moschata* Duch. lutein. After saponification, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) analysis were used to detect the purified *Cucurbita moschata* Duch. lutein, which was separated by silica gel column chromatography. The free lutein in *Cucurbita moschata* Duch. was evaluated by spectrophotometry comparing the scavenging ability of DPPH· and ·OH in vitro antioxidant activity. The optimum saponification condition for lutein ester in *Cucurbita moschata* Duch. extract was set as 33% saponification at 33 ℃ for 5.5 h. Under the optimal conditions, the yield of free lutein in *Cucurbita moschata* Duch. extract was 0.4175%, which was similar to the predicted value, revealing that the optimization process was stable and feasible. HPLC and MS analysis showed that the saponified product was lutein. After purification by silica gel column chromatography, the purity of free lutein significantly increased to 91.39% . The half-inhibitory concentration IC_{50} of DPPH· and ·OH in free lutein in *Cucurbita moschata* Duch. is 0.021 4 mg/mL and 0.038 3 mg/mL, respectively. It has high antioxidant activity and can be used as a good natural antioxidant.

Keywords: *Cucurbita moschata* Duch., lutein, saponification, antioxidation

南瓜 *Cucurbita moschata* Duch.是双子叶被子植物门葫芦科南瓜族南瓜属植物，俗称金瓜、倭瓜等[1]，我国古代早就有关于南瓜食疗保健作用的记载。在中医史书《本草纲目》中，李时珍将南瓜与上品药材灵芝放在一起，称其具有“补中益气”之效[2]。南瓜营养丰富，富含粗纤维、维生素、β-胡萝卜素，叶黄素等成分[3]，其中叶黄素成分与许多生物活性密切相关。叶黄素又名“植物黄体素”，是一种天然类胡萝卜素类色素[4]。大量研究表明，叶黄素在保护视觉、预防老年性黄斑变性、防治动脉硬化、增强免疫力等方面起着重要作用[5-8]。南瓜中的叶黄素主要以叶黄素酯的形式存在，不易被人体吸收，需要经过皂化处理才能获得人体所能吸收的游离态叶黄素[9-10]。目前，叶黄素的研究主要集中在以万寿菊为原料提取，且对游离叶黄素的制备和纯化方面报道较少[11-13]，限制了叶黄素的开发应用。本研究以氢氧化钾-甲醇溶液为皂化溶剂，采用响应面法优化制备游离叶黄素的工艺参数，并进行进一步的纯化，以期为叶黄素的深入研究和南瓜的综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设备与材料

KQ-250DE 型数控超声波清洗器：购自昆山市超声仪器有限公司；RE-2000A 旋转蒸发器：购自上海亚荣生化仪器厂；FA2004 型电子天平：购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司；DL-5-B 低速大容量离心机：购自上海安亭科学仪器厂；LC-5510 型高效液相色谱仪：购自北京东西分析仪器；Q Exactive 质谱仪：购自美国 Thermo 公司。

红栗南瓜：干燥后粉碎，过 60 目筛，贮存于实验室备用；无水乙醇、乙酸乙酯、正己烷、石油醚：均为分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司产品；甲醇：色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司产品；硅胶H：青岛海洋化工有限公司产品；无水硫酸钠：天津市凯通化学试剂有限公司产品；氢氧化钾：天津市凯通化学试剂有限公司产品；叶黄素标准品（纯度 90%）、LOT(F03N8M46350)：上海源叶生物科技有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 游离叶黄素的制备

1）南瓜叶黄素酯的提取　准确称取南瓜粗粉 60 g，加入乙酸乙酯-无水乙醇（体积比为 2:1）混合溶剂，超声提取。提取结束后抽滤，滤液于 4 000 r/min 下离心10 min，收集上清液，减压浓缩干燥，得叶黄素酯粗品。

2）南瓜叶黄素酯的皂化　参考胡建中的方法[14]，用 2 mL 正己烷将上述步骤中得到的叶黄素酯复溶，用一定浓度的 KOH-甲醇溶液与其混合，比例 1:1，避光皂化。于皂化结束时向反应体系注入一定体积双蒸水，补充正己烷，萃取，取上层用无水硫酸钠干燥，减压浓缩，挥干溶剂备用。

1.2.2　叶黄素的纯化　采用硅胶柱色谱法对叶黄素进行纯化。以石油醚为溶剂进行湿法装柱，将适量 1.1.2 得到的产品用少量溶剂溶解，用胶头滴管沿柱壁缓缓加入。上样完成后，用适量的石油醚和乙酸乙酯混合溶剂进行梯度洗脱，收集目标组分，减压浓缩，挥干溶剂，得纯化产品。

1.2.3　叶黄素的高效液相色谱和质谱分析

1）高效液相色谱条件　HPLC 分析条件：ODS-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇（体积分数 100%），流量 0.5 mg/mL，检测波长 450 nm，柱温30 ℃，进样量 10 μL。

2）质谱条件　MS 条件：采集方式为单离子检测扫描（Single ion monitoring，SIM）与平行反应监测扫描（Parallel reaction monitoring，PRM）；离子极性为正离子；离子化方式为电喷雾离子化；检测对象叶黄素 m/z=568；毛细管电压 3.0 kV；鞘气压力 3×10^6 Pa，辅助气压力 1×10^6 Pa；离子传输管温度 320 ℃，加热（蒸发）温度 350 ℃。

1.2.4　叶黄素标准曲线绘制　准确称取叶黄素标准品 5.00 mg，用甲醇定容于 25 mL 棕色容量瓶中，制备成 0.2 mg/mL 的标准溶液。分别取 1、2、3、4、5 mL 标准溶液用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中，配制成质量浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 的系列标准溶液，按照 HPLC 色谱条件，每个系列质量浓度进样 3 次，取平均值，以叶黄素系列标准溶液质量浓度为横坐标，相应吸收峰面积为纵坐标，绘制叶黄素标准曲线，如图 1 所示，得到回归方程 y=97.47x+0.15，R^2=0.999 8。

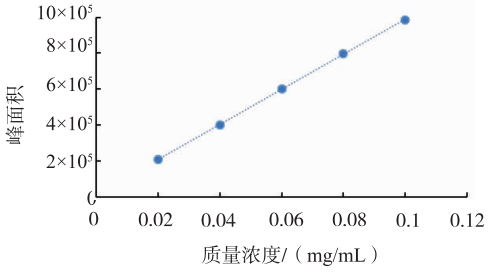


图 1　叶黄素标准曲线

Fig. 1　Lutein standard curve

1.2.5　样品中游离叶黄素的测定　取皂化后产品，溶剂复溶，按 1.2.4 叶黄素标准曲线的测定方法测定峰面积，根据标回归方程求得游离叶黄素质量浓度。南瓜提取物中游离叶黄素得率按公式（1）计算：

$$南瓜提取物中游离叶黄素得率(\%)=\frac{c\cdot V}{m} \quad (1)$$

式中：c 为样品溶液的浓度（mol/L）；V 为复溶溶剂体积（mL）；m 为南瓜粗粉质量（g）。

1.2.6　单因素实验设计　将叶黄素酯提取液减压浓缩干燥，在其他条件不变的情况下，以游离叶黄素得率为指标，考察质量浓度分别为 5、10、20、30、40 g/dL；皂化温度为 25、35、45、55、65 ℃；皂化时间为 2、5、8、11、14 h 条件下各因素对南瓜中游离叶黄素得率的影响，以确定最优皂化条件。

1.2.7　响应面法实验设计　为优化南瓜中游离叶黄素的制备工艺条件，根据 Box-Behnken 试验设计原理，在单因素试验基础上，共设计 17 个试验点，12 个分析点，5 个零点以估计误差，选取皂化液质量浓度 A、皂化温度 B、皂化时间 C 为自变量，以游离叶黄素得率 Y 为响应值，设计三因素三水平的优化试验，试验因素与水平设计见表 1。

表 1　响应面试验因素与水平

Table 1　Response surface test factors and levels

水平	A 质量浓度/(g/dL)	B 温度/℃	C 时间/h
−1	20	25	2
0	30	35	5
1	40	45	8

1.2.8　游离叶黄素的抗氧化能力测试

1）南瓜中游离叶黄素清除 DPPH·的能力　取不同质量浓度南瓜叶黄素乙醇溶液 1 mL 于试管中，分别加入 2×10^{-4} mol/L DPPH·乙醇溶液 1 mL，摇匀，暗处静置 30 min，乙醇为空白对照，517 nm 处测吸光度 A，按公式（2）计算南瓜叶黄素对 DPPH·的清除率：

$$DPPH\cdot清除率=(1-\frac{A_x}{A_o})\times100\% \quad (2)$$

式中：A_x 为样品溶液的吸光度；A_o 为对照溶液的吸光度。

2）南瓜中游离叶黄素清除·OH 的能力　取 6 mmol/L $FeSO_4$ 溶液 1 mL、6 mmol/L 水杨酸乙醇溶液 1 mL，依次加入试管中，不同质量浓度南瓜叶黄素乙醇溶液 1 mL 充分混匀，随后加入 5 mmol/L H_2O_2 溶液 1 mL 以启动反应，并于 37 ℃下水浴 30 min，测定其510 nm 波长处吸光度 A，另设乙醇为空白对照，按公式（3）计算南瓜叶黄素对·OH 的清除率：

$$\cdot OH\ 清除率=(1-\frac{A_x-A_{xo}}{A_o})\times 100\% \quad (3)$$

式中：A_x 为样品溶液的吸光度；A_{xo} 为不加 H_2O_2 时样品溶液的吸光度；A_o 为对照溶液的吸光度。

1.2.9 统计学处理 数据运用 Microsoft Excel、Design Expert 8.0.6、SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计学分析和显著性分析。统计描述：计量资料数据用 $x \pm s$ 表示，$P<0.05$ 表示具有显著性差异，$P<0.000\ 1$ 表示具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 样品测定

2.1.1 南瓜叶黄素的色谱测定 根据标准品的保留时间对南瓜中游离叶黄素的色谱峰初步定性，将样品测定色谱图与标准品色谱图进行比较，以确定样品的相应峰位。按 1.2.3 色谱条件测定标准品溶液和样品溶液，色谱图见图 2。标准品保留时间与样品保留时间相同，初步确定样品与标准品为同一物质。

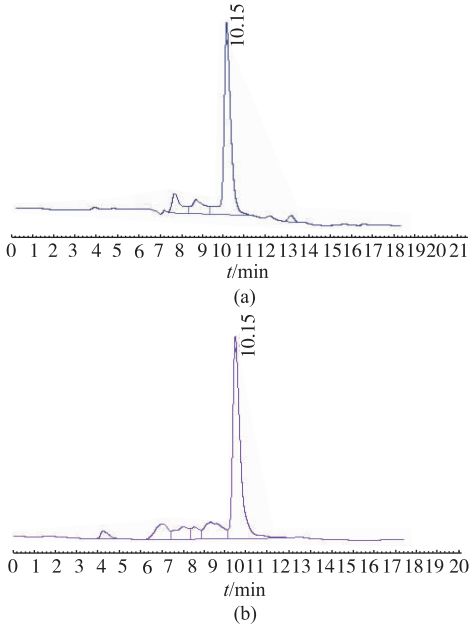


图 2 样品溶液和标准品溶液高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of sample solution and standard solution

2.1.2 南瓜叶黄素的质谱鉴别 叶黄素标准品和样品的 MS 检测结果见图 3。样品溶液中含有与标准品一致的质谱碎片及其特征离子峰度，从而进一步证明南瓜中含有叶黄素。叶黄素的相对分子质量为 568，一级质谱分析特征离子为 *m/z* 569.4、430，其中 *m/z* 569.4 峰为基峰，*m/z* 430 峰为碎片峰。

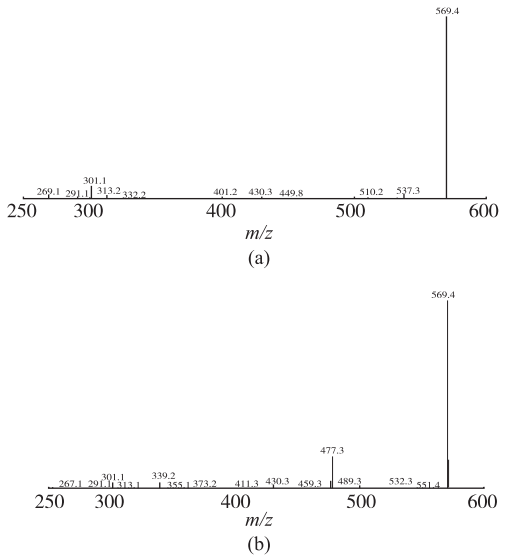


图 3 样品溶液和标准品溶液一级质谱图

Fig. 3 Sample solution and standard solution primary mass spectrum

为了进一步验证 *m/z* 430 离子峰的来源，并探明叶黄素的质谱分析裂解规律，以 *m/z* 569.4 离子峰为母离子，对叶黄素标准品溶液和样品溶液中的叶黄素峰进行了二级质谱分析，样品和标准品的二级质谱图见图 4。样品的二级质谱特征离子与标准品一致，确定 *m/z* 430 峰为 *m/z* 569.4 离子峰的碎片峰，更进一步确定样品与标准品为同一物质。根据叶黄素一级和二级质谱特征，推断叶黄素可能的质谱裂解方式，见图 5。

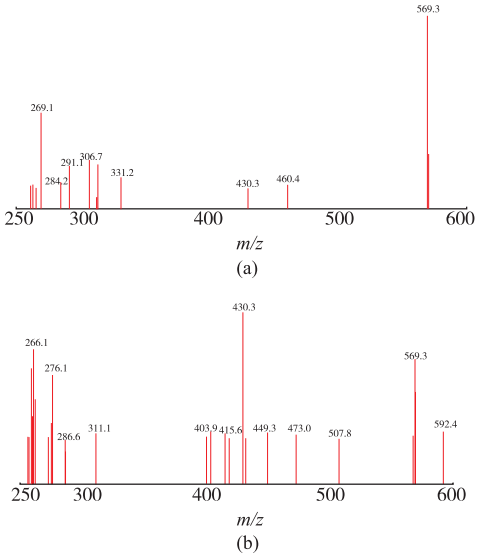


图 4 样品溶液和标准品溶液二级质谱图

Fig. 4 Sample solution and standard solution secondary mass spectrum

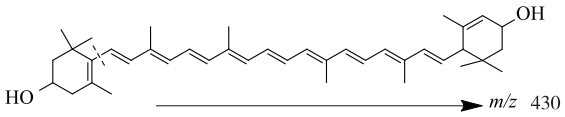


图 5 叶黄素裂解规律图

Fig. 5 Lutein pyrolysis rule

2.2 单因素实验结果分析

2.2.1 氢氧化钾-甲醇溶液质量浓度对叶黄素酯皂化效果的影响 由于叶黄素在强碱环境下易发生氧化和异构化,易转化为玉米黄素,使游离叶黄素得率降低[15],见图 6。在固定皂化温度 35 ℃、皂化时间 5 h 的条件下,考察 KOH-甲醇溶液质量浓度分别为 5、10、20、30、40 g/dL 时对游离叶黄素得率的影响,结果见图 7(a)。由图 7(a)可知,氢氧化钾-甲醇溶液质量浓度在 5~40 g/dL 范围内,随着氢氧化钾质量浓度的增加,游离叶黄素得率逐渐升高,高于 30%则有下降趋势。因此选用 30 g/dL 的氢氧化钾-甲醇溶液为皂化液。

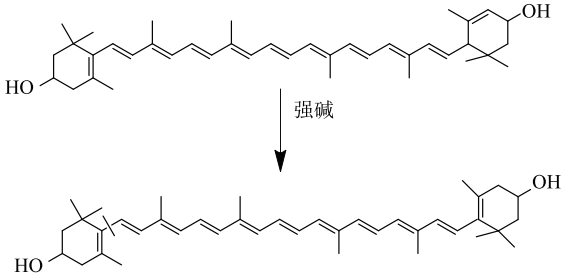


图 6 叶黄素转化玉米黄素示意图

Fig. 6 Schematic diagram of lutein conversion to zeaxanthin

2.2.2 皂化温度对叶黄素酯皂化效果的影响 在固定 KOH-甲醇溶液质量浓度为 30 g/dL,皂化时间 5 h 的条件下,考察皂化温度分别为 25、35、45、55、65 ℃时对游离叶黄素得率的影响,结果见图 7(b)。由图 7(b)可知,皂化温度在 25~65 ℃范围内,游离叶黄素得率呈先上升后下降的趋势。由于温度过低不利于叶黄素酯在皂化体系中分散,导致皂化不完全,而温度过高则会导致游离叶黄素的降解和异构化,使游离叶黄素得率下降,因此皂化温度控制在 35 ℃为宜。

2.2.3 皂化时间对叶黄素酯皂化效果的影响 在固定 KOH-甲醇溶液质量浓度为 30%、皂化温度 35 ℃的条件下,考察皂化时间分别为 2、5、8、11、14 h 时对游离叶黄素得率的影响,结果见图 7(c)。由图 7(c)可知,皂化时间在 2~14 h 范围内,当皂化时间小于 5 h 时,随着皂化时间的延长,游离叶黄素得率呈逐渐增大的趋势。当皂化时间超过 5 h 时,游离叶黄素得率逐渐下降。可能由于 5 h 时几乎所有的叶黄素均以游离状态存在,延长皂化时间只能使叶黄素在碱性条件下发生氧化和异构化,游离叶黄素得率反而减少。因此,选择皂化时间为 5 h。

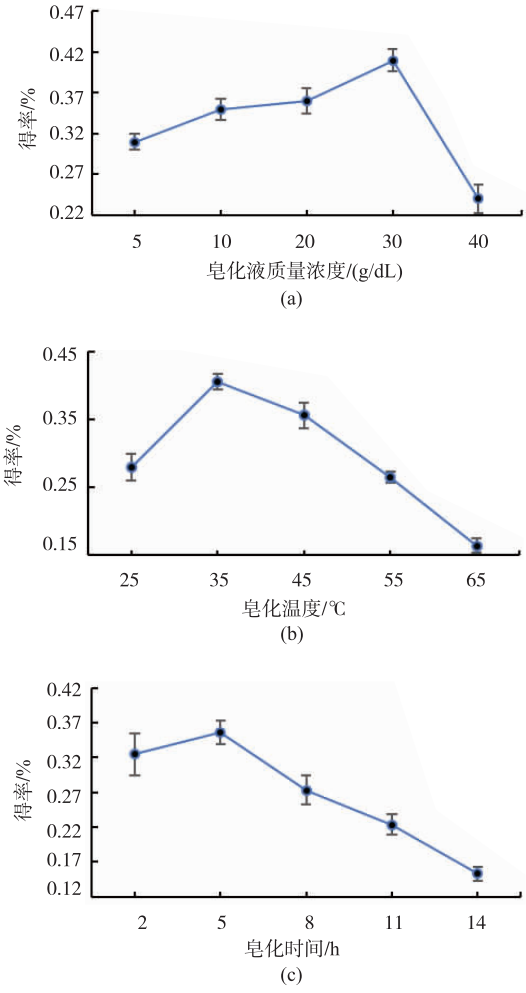


图 7 单因素试验结果

Fig. 7 Single factor test results

2.3 响应面优化叶黄素酯皂化条件

2.3.1 叶黄素酯皂化条件的工艺优化 在单因素试验结果的基础上,采用 Box-Behnken 中心组合实验设计原理对南瓜叶黄素酯皂化条件进行优化,选择皂化液质量浓度 A、皂化温度 B、皂化时间 C 为自变量,以叶黄素得率 Y 为响应值,设计三因素三水平的优化试验,采用 Design Expert 8.0.6 软件对数据进行分析,结果见表 2。

表 2　响应面优化实验设计及结果

Table 2　Response surface optimization experiment design and results

试验号	*A* 浓度/%	*B* 温度/℃	*C* 时间/h	*Y* 得率/%
1	0	−1	1	0.359 6±0.013 4
2	1	0	−1	0.348 8±0.010 1
3	0	0	0	0.429 5±0.023 3
4	0	0	0	0.413 3±0.017 8
5	0	−1	−1	0.323 2±0.015 9
6	1	0	1	0.373 9±0.013 0
7	1	−1	0	0.367 6±0.035 4
8	0	1	−1	0.271 1±0.019 9
9	−1	1	0	0.287 6±0.018 3
10	−1	0	−1	0.277 8±0.017 9
11	1	1	0	0.318 7±0.027 5
12	−1	−1	0	0.307 9±0.029 7
13	0	0	0	0.447 9±0.030 1
14	0	0	0	0.437 6±0.012 3
15	−1	0	1	0.307 7±0.017 9
16	0	0	0	0.456 5±0.030 7
17	0	1	1	0.323 7±0.016 9

通过回归分析得到游离叶黄素得率与皂化液质量浓度 A、皂化温度 B、皂化时间 C 的回归方程为 $Y=0.44+0.029A-0.020B+0.018C-7.150\times10^{-3}AB-1.200\times10^{-3}AC+4.050\times10^{-3}BC-0.054A^2-0.062B^2-0.055C^2$

回归方程方差分析结果见表 3。可知该模型 $P<0.000\ 1$，极显著；失拟项 P 值为 0.676 6，不显著。这说明得到的多项回归方程模型能准确反映皂化液质量浓度、温度和时间对南瓜叶黄素酯皂化的影响；模型决定系数 $R^2=0.974\ 0$，调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.940\ 6$，表明本方程可以解释 94%以上的数据，该模型拟合度较好，误差较小，该模型可用于分析与预测南瓜中游离叶黄素的制备工艺试验。

通过表 3 回归方程系数显著性检验，一次项皂化液质量浓度 A、温度 B 以及平方项 A^2、B^2 和 C^2 游离叶黄素得率有极显著影响，一次项中时间 C 可显著影响游离叶黄素得率，二次项中皂化液质量浓度与温度 AB，皂化液质量浓度与时间 AC 和温度与时间 BC 对游离叶黄素得率影响不显著。从 F 值可以看出，在所选的各因素水平范围内，皂化液质量浓度对叶黄素得率的影响最大，温度的影响次之，时间的影响最小，即 $A>B>C$。

2.3.2　响应面图分析　响应面图是由特定的响应值对应自变量构成的三维曲线图[16]，为了更直观地反映出各自变量对响应值的影响。本研究根据回归方程绘制出各影响因素对南瓜叶黄素得率的响应面图见图 8。根据响应曲面的倾斜度和等高线密集程度，可确定两两因素对响应值的影响程度，倾斜度越高，等高线越密集，说明两者交互作用越显著[17]。由图 8 可知，因素 A、B、C 的曲面倾斜程度皆较高，等高线较紧密，说明因素 A、B、C 对响应值影响极显著；因素 A 和因素 B、因素 A 和因素 C、因素

表 3　回归方程显著性检验

Table 3　Regression equation significance test

方差源	平方和	自由度	均方和	*F* 值	*P* 值(*P*>*F*)
模型	0.059	9	6.555×10^{-3}	29.13	<0.000 1
A	6.498×10^{-3}	1	6.498×10^{-3}	28.88	0.001 0
B	3.089×10^{-3}	1	3.089×10^{-3}	13.73	0.007 6
C	2.592×10^{-3}	1	2.592×10^{-3}	11.52	0.011 5
AB	2.045×10^{-4}	1	2.045×10^{-4}	0.91	0.372 2
AC	5.760×10^{-6}	1	5.760×10^{-6}	0.026	0.877 4
BC	6.561×10^{-5}	1	6.561×10^{-5}	0.29	0.606 0
A^2	0.012	1	0.012	55.44	0.000 1
B^2	0.016	1	0.016	72.11	<0.000 1
C^2	0.013	1	0.013	57.60	0.000 1
残差	1.575×10^{-3}	7	2.250×10^{-4}		
失拟项	4.578×10^{-4}	3	1.526×10^{-4}	0.55	0.676 6
纯误差	1.117×10^{-3}	4	2.793×10^{-4}		
总和	0.061	16			

B 和因素 *C* 的响应面的曲面较平缓,其交互作用对游离叶黄素得率的影响不显著,与方差分析结果一致。对回归方程一阶求导,在游离叶黄素得率得最大值时,其皂化液质量浓度 32.71 g/dL、温度 33.31 ℃、时间 5.46 h,此时南瓜提取物中游离叶黄素得率为 0.443 9%。

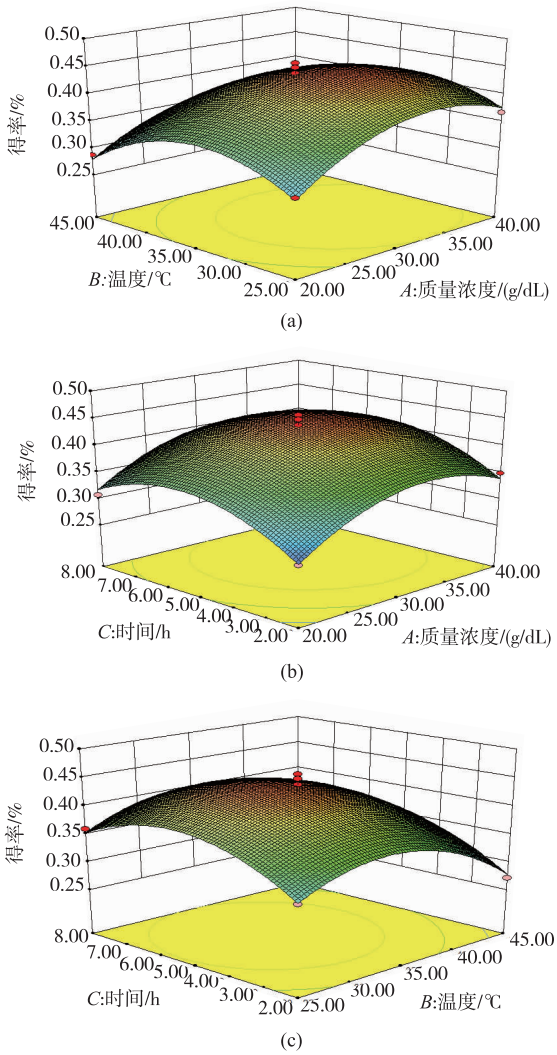


图 8　交互作用对南瓜叶黄素酯皂化效果的影响

Fig. 8　Effect of interaction on the saponification effect of pumpkin lutein ester

2.3.3　验证试验　为检验方法预测的结果,用实验中得到的最佳工艺条件重复试验。为便于实际操作,将试验条件确定为,皂化液质量浓度 33 g/dL,温度 33 ℃,时间 5.5 h,修正后的条件制备游离叶黄素 3 次,得率分别为 0.412 7%、0.436 5%、0.403 3%,平均得率为 0.4175%,与理论值较为吻合,表明优选工艺效果较为理想。

2.4　游离叶黄素的纯化

通过课题组前期预试验比较,最终确定以硅胶为固定相,石油醚–乙酸乙酯为流动相对游离叶黄素进行柱色谱纯化。先用石油醚–乙酸乙酯(3:1)对杂质进行分离洗脱,再用石油醚–乙酸乙酯(3:2)将目标产物洗脱下来。减压浓缩得游离叶黄素产品,纯度达 91.39%,结果见表 4。游离叶黄素 HPLC 色谱图见图 2(a),与叶黄素标准品出峰时间一致。结果表明,利用硅胶柱色谱纯化可以快速将目标叶黄素分离纯化。

表 4　游离叶黄素纯化结果

Table 4　Free lutein purification results

纯化步骤	总体积/mL	总质量/mg	纯度/%	回收率/%
纯化前	20	11.54	35.76	100
硅胶柱色谱纯化	8±1	1.13±0.04	91.39±0.16	9.80±0.35

2.5　南瓜叶黄素的抗氧化活性

2.5.1　南瓜中游离叶黄素对 DPPH·清除作用　南瓜叶黄素对 DPPH·清除效果随着游离叶黄素质量浓度的提高而逐渐增强,在一定质量浓度范围内呈量效关系,结果见图 9。南瓜叶黄素质量浓度与其对 DPPH·清除效果线性回归分析方程为 $y=-3.57x^2+37.41x-13.8$,相关系数 $R^2=0.986\ 9$,半抑制浓度 $IC_{50}=0.021\ 4$ mg/mL,拟合程度良好,说明南瓜叶黄素对 DPPH·具有明显的清除作用。

2.5.2　南瓜中游离叶黄素对·OH 清除作用　南瓜叶黄素对·OH 清除效果随着游离叶黄素质量浓度的提高而逐渐增强,在一定质量浓度范围内呈量效关系,结果见图 9。南瓜叶黄素质量浓度与其对·OH 清除效果线性回归方程为 $y=-2x^2+23.8x-11.8$,相关系数 $R^2=0.975\ 2$,半抑制质量浓度 $IC_{50}=0.038\ 3$ mg/mL,拟合程度良好,说明南瓜叶黄素对·OH 具有明显的清除作用。

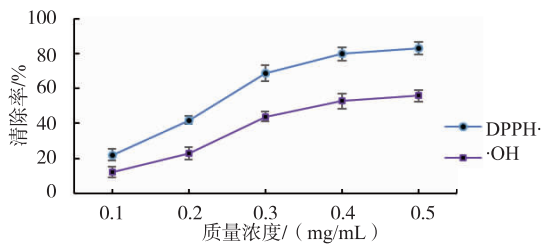


图 9　南瓜叶黄素对 DPPH·和·OH 的清除作用

Fig. 9　Scavenging effects of pumpkin lutein on DPPH· and ·OH

3 结语

采用 Box-Behnken 中心组合实验原理对南瓜中游离叶黄素皂化工艺参数进行响应曲面优化，得到最佳工艺条件为：皂化液质量浓度 33 g/dL，温度 33 ℃，时间 5.5 h，此时南瓜提取物中游离叶黄素得率为 0.417 5%。在硅胶柱色谱纯化后，游离叶黄素的纯度可提高到 91.39%。目前，工业生产叶黄素主要是通过在万寿菊花亚临界低温浸出获得，其设备复杂、原料昂贵。本研究得到的优化工艺高效、可靠、成本低，可为南瓜叶黄素的进一步商业生产提供技术参考。

作者采用紫外分光光度法考察了南瓜叶黄素对 DPPH·和·OH 自由基清除能力，这是两种被广泛认可的抗氧化活性评价方法，具有易操作、准确度高等特点。南瓜叶黄素清除 DPPH·、·OH 的半抑制质量浓度 IC_{50} 分别为 0.021 4 mg/mL 和 0.038 3 mg/mL，结果显示南瓜叶黄素具有较好的抗氧化活性。科学研究表明，炎症、癌症、衰老等大量疾病大都与过量自由基的产生有关联，而抗氧化剂抵消自由基对人体细胞的氧化攻击，这也是已知叶黄素其具有保护视觉、预防老年性黄斑变性等功效的物质基础。本实验结果证明，南瓜叶黄素是良好的天然抗氧化剂，具有广阔的药品、食品等产业开发的前景，为其抗氧化活性相关研究提供了科学依据。

参考文献：

[1] 赵淑玲，朱东顺，闫洪娟，等. 南瓜营养价值及其加工技术[J]. 保鲜与加工，2004，4(1)：29-29.
[2] 王延群. 南瓜的十大保健功效[J]. 现代养生，2013，29(21)：8-9.
[3] 梁艳，程英. 一种改善视力的功能性乳饮品的研制[J]. 食品界，2017，5(10)：120-121.
[4] OTAKA J，SEO S，NISHIMURA M. Lutein，a natural carotenoid，induces α-1，3-glucan accumulation on the cell wall surface of fungal plant pathogens[J]. **Molecules**，2016，21(8)：980.
[5] TIAN Y，KIJLSTRA A，WEBERS C A B ，et al. Lutein and factor D：two intriguing players in the field of age-related macular degeneration[J]. **Archives of Biochemistry & Biophysics**，2015，572(1)：49-53.
[6] 吴正云，施春雷，史贤明. 小球藻异养合成叶黄素的代谢流量分析[J]. 食品与生物技术学报，2009，28(3)：366-370.
[7] KOUSHAN K，RUSOVICI R，LI W，et al. The role of lutein in eye－related disease[J]. **Nutrients**，2013，5(5)：1823-1839.
[8] LANDRUM J T，BONE R A. Lutein，zeaxanthin，and the macular pigment[J]. **Arch Biochem Biophys**，2001，385(1)：28-40.
[9] 刘丽. 叶黄素在视力保护方面研究进展[J]. 中外健康文摘：医药月刊，2007，4(8)：270-271.
[10] KHACHIK. Process for isolation，purification，and recrys-tallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof [P]. US Patent：5382714. 1995-01-17.
[11] COBB B F，KALLENBACH J，HALL C A，et al. Optimizing the supercritical fluid extraction of lutein from corn gluten meal[J]. **Food & Bioprocess Technology**，2018，11(4)：757-764.
[12] D'ESTE M，FRANCISCI D D，ANGELIDAKII. Novel protocol for lutein extraction from microalga Chlorella vulgaris [J]. **Biochemical Engineering Journal**，2017，127(6)：175-179.
[13] GONG M，WANG Y，BASSI A. Process analysis and modeling of a single-step lutein extraction method for wet microalgae[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2017，101(22)：8089-8099.
[14] 胡建中，王可兴，潘思轶. 高效液相色谱法测定柑橘汁中类胡萝卜素[J]. 食品科学，2006，27(12)：634-636.
[15] 张莉华，许新德，何国军，等. 玉米黄素制备工艺中强碱的影响研究[J]. 中国食品添加剂，2011，22(1)：116-120.
[16] 何晨阳，刘明月，时振伟，等. 响应面法优化蛇莓花色苷浸提工艺及稳定性研究[J]. 中草药，2018，49(8)：1829-1834.
[17] 王欢，黄嫣，李希，等. 响应面法优化白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(20)：34-37.