

胡代花. 6种天然植物提取物对维生素 D₂稳定性的保护作用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 927-931.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.031

6种天然植物提取物对维生素 D₂稳定性的保护作用

胡代花

(陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723000)

摘要: 为考察小米草、金银花、樱桃、野菊花、葡萄籽和竹叶等 6 种天然植物提取物对维生素 D₂(V_{D₂})稳定性的保护作用, 将其分别与 V_{D₂} 以 10:1 质量比例混合, 采用 HPLC 方法测定混合后第 30 d、第 60 d、第 90 d 样品中 V_{D₂} 含量变化, 并与白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚三种天然抗氧化剂和人工合成抗氧化剂 BHT 进行比较。结果表明, 未添加抗氧化剂的 V_{D₂} 稳定性较差, 第 30 d、60 d、90 d 时 V_{D₂} 的存留率分别为 51.68%、2.69% 和 0.27%, 而添加 6 种天然植物提取物均对 V_{D₂} 稳定性具有一定的保护作用, 且随着放置时间的延长, 其对 V_{D₂} 稳定性的保护作用愈明显。第 30 d 时, 添加 6 种天然植物提取物后 V_{D₂} 的存留率为 52.61%~70.31%, 其效果不及添加白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚; 第 60 d 时, 添加 6 种天然植物提取物后 V_{D₂} 的存留率为 29.43%~53.34%, 其中小米草、葡萄籽和金银花提取物对 V_{D₂} 稳定性的保护作用较佳, 其 V_{D₂} 存留率达 45.17%~53.34%, 与其他 3 种天然植物提取物、3 种天然抗氧化剂和 BHT 相比差异均达到极显著水平 ($P<0.01$); 第 90 d 时, 添加 6 种天然植物提取物后 V_{D₂} 的存留率为 8.27%~22.39%, 其中小米草、金银花、樱桃提取物对 V_{D₂} 稳定性的保护作用较佳, 其 V_{D₂} 存留率达 17.84%~22.39%, 与其他 3 种天然植物提取物、3 种天然抗氧化剂和 BHT 相比差异均达到极显著水平 ($P<0.01$)。

关键词: 维生素 D₂; 天然植物提取物; 抗氧化

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)04-0927-05

Protective effect of six natural plant extracts on the stability of vitamin D₂

HU Dai-hua

(Vitamin D Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: To study the protective effect of six natural plant extracts including eyebright extract, honeysuckle extract, cherry extract, chrysanthemum indicum extract, grape seed extract and bamboo leaves extract on the stability of vitamin D₂(V_{D₂}), the extracts were mixed with V_{D₂} in 10:1 mass ratio respectively, and the changes of V_{D₂} content was determined by high performance liquid chromatography 30 d, 60 d, and 90 d after mixing by comparing the stability of V_{D₂} in the mixture protected by three natural antioxidants tea polyphenols, resveratrol, and soybean isoflavone and synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT), respectively. The retention rates of V_{D₂} without antioxidants was only 51.68%, 2.69%, and 0.27% after placed for 30 d, 60 d, and 90 d respectively. Six natural plant extracts presented good protective

effects on the stability of V_{D₂}, and the longer the mixation, the better the effects. At the 30th day after mixation the retention rate of V_{D₂} was 52.61%~70.31% in the mixtures with six natural plant extracts, less than those with three natural antioxidants. At the 60th day, the retention rate of V_{D₂} were 29.43%~53.34% in the mixtures with six natural plant extracts among which eyebright extract, grape

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 陕西省重点科技创新团队项目(2012KCT-29); 陕西理工大学博士后项目(SLGBH16-04); 陕西理工大学校级科研项目(SLGKY16-19); 陕西省 2011 协同中心项目(QBXT-Z(P)-15-15); 汉中市科技局项目(2013FZ24)

作者简介: 胡代花(1983-), 女, 陕西安康人, 博士, 讲师, 主要从事维生素 D 类保健食品研发, (E-mail) hudaiahua007@163.com

seed extract, and honeysuckle extract showed better protective effects. At the 90th day, the retention were 8.27%–22.39% in the mixtures with six natural plant extracts among which eyebright extract, honeysuckle extract, and cherry extract performed better.

Key words: vitamin D₂; natural plant extract; antioxidation

维生素 D₂(V_{D₂})是维生素 D 家族的重要一员,能调节钙磷代谢,促进骨骼健康,在临床上用于预防和治疗佝偻病、骨质疏松及甲状旁腺功能低下等疾病^[1-3]。由于 V_{D₂}性质不稳定,遇光、热、氧等易降解而失效^[4-6],导致生物利用率降低,从而限制了它在药品、食品、保健食品等领域的广泛应用。目前常用 β -环糊精包被或微囊化技术提高 V_{D₂}及其制剂产品的稳定性^[7-9]。

作者所在课题组^[10]前期研究了茶多酚、大豆异黄酮及白藜芦醇 3 种源于中国优势资源的天然抗氧化剂对 V_{D₂}稳定性的保护作用,结果表明未添加天然抗氧化剂的 V_{D₂}稳定性较差,添加这 3 种天然抗氧化剂均对 V_{D₂}稳定性具有一定的保护作用,且随着放置时间的延长,对 V_{D₂}稳定性的保护作用愈明显。来源于植物的天然抗氧化剂在食品生产中具有广阔的应用前景^[11-19]。

为考察小米草、金银花、樱桃、野菊花、葡萄籽、竹叶等 6 种植物提取物对 V_{D₂}稳定性的影响,本研究应用高效液相色谱法分别测定添加 6 种天然植物提取物及白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚 3 种天然抗氧化剂的混合样品中 V_{D₂}稳定性变化,并与人工合成抗氧化剂二丁基羟基甲苯(BHT)进行比较,分析 6 种天然植物提取物对 V_{D₂}稳定性的保护作用,为天然 V_{D₂}抗氧化稳定剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1260),Sartorius 万分之一电子天平(BSA224S-CW),低速离心机(Eppendorf 5810 R),超声波清洗仪(KQ-500E),240 mm 玻璃干燥器,电热恒温水浴锅(HWSY21-K),冰箱(海尔 BCD-278TAJ)。

1.2 试剂

V_{D₂},分析纯(上海晶纯有限公司产品),V_{D₂}标准品(99%,美国 Supelco 公司产品),无水乙醇为分析纯,小米草提取物(黄酮 30%,生产批号 YS-

140926)、竹叶提取物(黄酮 10%,生产批号 YS-141005)、葡萄籽提取物(原花青素 95%,生产批号 YS-141102)、野菊花提取物(黄酮 10%,生产批号 YS-140912)、金银花提取物(绿原酸 20%,生产批号 YS-140527)、樱桃提取物(V_C 21%,生产批号 YS-150305)购自西安源森生物科技有限公司,白藜芦醇(98%)、茶多酚(98%)、大豆异黄酮(98%)购自陕西森弗生物技术有限公司,2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)(98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,变色硅胶(2.0~5.6 mm)为青岛裕宝精细化工有限公司产品。

V_{D₂}标准储备液(1 000 μ g/ml):精密称取 0.100 0 g V_{D₂},于 100 ml 容量瓶中用无水乙醇溶解并定容至刻度;V_{D₂}标准使用液:准确吸取 V_{D₂}标准储备液 10 ml 移至 100 ml 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,该溶液浓度为 100 μ g/ml。

1.3 样品处理

将 V_{D₂}与小米草提取物、竹叶提取物、葡萄籽提取物、野菊花提取物、金银花提取物、樱桃提取物等 6 种天然植物提取物,以及白藜芦醇、茶多酚、大豆异黄酮等 3 种天然抗氧化剂分别按照质量比 1:10 (3 mg:30 mg)各称取 9 份置于 5 ml 塑料离心管中,加入 2 ml 无水乙醇,40 $^{\circ}$ C 超声波处理 30 min,置于 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中使溶剂挥发干净,所得样品置于干燥器中在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。分别于第 30 d、60 d、90 d 取出各处理 3 个重复样品,在 5 ml 离心管中加入 2 ml 无水乙醇,40 $^{\circ}$ C 超声波处理 30 min,3 500 r/min 离心 10 min,残渣中继续加入 2 ml 无水乙醇,40 $^{\circ}$ C 超声波处理 30 min,3 500 r/min 离心 10 min。合并上清液,3 500 r/min 离心 10 min。上清液稀释 10 倍后,吸取样品溶液过 0.45 μ m 膜,滤液直接进行色谱分析。整个过程避光操作,每处理 3 个重复。BHT 与 V_{D₂}分别以 1:1 (3 mg:3 mg)和 5:1 (15 mg:3 mg)质量比例混合,空白对照为不添加抗氧化剂的 V_{D₂}样品,样品处理及分析同前。

1.4 标准曲线的绘制

准确移取 V_{D₂}标准贮备液及标准使用液,用无

水乙醇稀释定容,分别配置 1 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml、15 μg/ml、20 μg/ml、40 μg/ml、60 μg/ml、80 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml、800 μg/ml 不同浓度标准 V_{D₂} 溶液;以上每个浓度的溶液分别进样 10 μl,以 264 nm 处的吸收峰面积对浓度作曲线,进行拟合。获得标准曲线方程为 $Y=17.37x-10.65$ ($R^2=0.9999$),线性范围为 1.00~800.00 μg/ml,平均回收率($n=9$)为 98.69%, $RSD(n=9)$ 为 2.91%。

1.5 色谱条件

Agilent RP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×100.0 mm,3.5 μm),柱温 30℃,流速 1.0 ml/min,进样 10 μl。流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液(95:5),流速 1.0 ml/min,检测波长 264 nm。

1.6 数据处理

试验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用 Tukey's HSD 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 抗氧化剂对 V_{D₂} 稳定性的影响

未添加抗氧化剂的 V_{D₂} 稳定性较差,经 40℃ 超

声波处理后在 4℃ 冷藏干燥保存条件下,V_{D₂} 损失较大,第 30 d、60 d、90 d 时 V_{D₂} 的存留率分别为 51.68%、2.69% 和 0.27%,其损失率高达 48.32%、97.31% 和 99.73%。第 0 d、30 d、60 d、90 d 时 V_{D₂} 含量差异显著($P<0.05$),第 30 d 时 V_{D₂} 含量与第 0 d、60 d、90 d 时 V_{D₂} 含量之间均存在极显著差异($P<0.01$);第 60 d、90 d 时 V_{D₂} 含量与第 0 d 时 V_{D₂} 含量之间均存在极显著差异,而前二者间不存在极显著差异(表 1)。

3 mg V_{D₂} 添加不同抗氧化剂后进行 40℃ 超声波处理,V_{D₂} 剩余质量与未添加抗氧化剂对照相比均明显升高。第 30 d 时添加 6 种天然植物提取物后 V_{D₂} 剩余质量小于添加 3 种天然抗氧化剂后 V_{D₂} 剩余质量;而添加小米草、葡萄籽和金银花 3 种天然植物提取物后第 60 d V_{D₂} 剩余质量,以及添加小米草、金银花和樱桃提取物 3 种天然植物提取物后第 90 d V_{D₂} 剩余质量,均显著高于同期添加白藜芦醇、大豆异黄酮和茶多酚 3 种天然抗氧化剂和 BHT 后 V_{D₂} 剩余质量(表 1)。

表 1 添加不同抗氧化剂后 V_{D₂} 剩余质量变化

Table 1 Changes of vitamin D₂ residual mass by adding different antioxidants

抗氧化剂处理	V _{D₂} 剩余质量(mg)			
	第 0 d	第 30 d	第 60 d	第 90 d
对照	3.00±0.01aA	1.55±0.02bB	0.08±0.01cC	0.01±0dC
樱桃提取物	3.00±0.01	1.58±0.02	0.99±0.02**	0.54±0.02**
野菊花提取物	3.00±0.01	1.67±0.01**	0.90±0.02**	0.48±0.01**
竹叶提取物	3.00±0.01	1.76±0.01**	0.88±0.04**	0.25±0.02**
金银花提取物	3.00±0.01	1.75±0.02**	1.36±0.03**	0.67±0.01**
小米草提取物	3.00±0.01	2.11±0.02**	1.60±0.02**	0.66±0.03**
葡萄籽提取物	3.00±0.01	2.05±0.02**	1.53±0.04**	0.40±0.01**
茶多酚	3.00±0.01	2.16±0.02**	0.79±0.02**	0.25±0.02**
白藜芦醇	3.00±0.01	2.19±0.01**	0.76±0.01**	0.25±0.02**
大豆异黄酮	3.00±0.01	2.21±0.01**	0.85±0.01**	0.27±0.01**
BHT(V _{D₂} :BHT=1:1)	3.00±0.01	1.62±0.02*	0.71±0.01**	0.18±0.01**
BHT(V _{D₂} :BHT=1:5)	3.00±0.01	1.93±0.01**	1.12±0.02**	0.44±0.02**

在对照中,不同大、小写字母分别表示不同时间之间差异达到 0.01 和 0.05 显著水平。同一列中,*、** 分别表示相同贮藏时间与对照相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

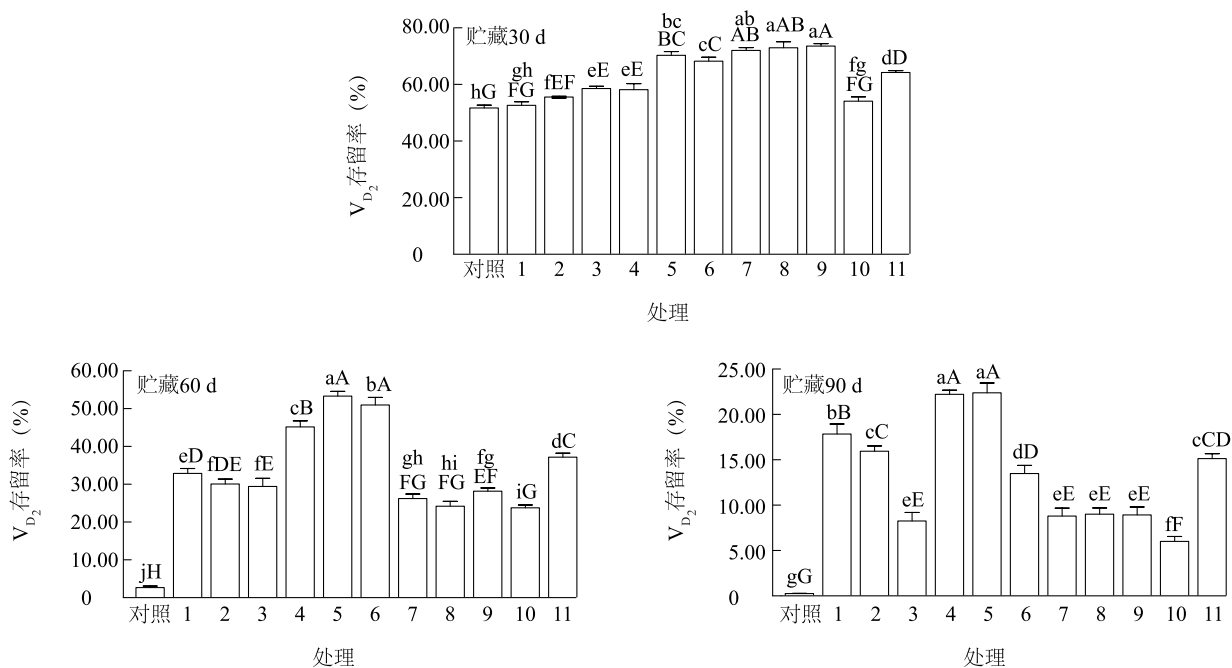
2.2 抗氧化剂对 V_{D₂} 稳定性保护作用比较

图 1 表明,第 30 d 时以 1:10(质量比)添加的 6 种含抗氧化成分的天然植物提取物和 3 种天然抗氧

化剂,以及以 1:1 及 1:5(质量比)添加的人工合成抗氧化剂 BHT 均对 V_{D₂} 稳定性具有一定的保护作用。对 V_{D₂} 稳定性的保护作用从大到小依次为大豆异黄

酮、白藜芦醇、茶多酚、小米草提取物、葡萄籽提取物、竹叶提取物、金银花提取物、野菊花提取物和樱桃提取物, V_{D_2} 存留率分别为 73.56%、73.00%、72.00%、70.31%、68.25%、58.56%、58.19%、55.54% 和 52.61%。添加 6 种天然植物提取物和 3 种天然抗氧化剂后 V_{D_2} 的存留率均在 52% 以上。其中大豆异黄酮、白藜芦醇、茶多酚、小米草提取物、葡萄籽提取物、竹叶提取物、金银花提取物和野菊花提取物处理的 V_{D_2} 存留率与对照相比差异极显著, 添加大豆异黄酮、白藜芦醇、茶多酚、小米草提取物、葡萄籽提取物后 V_{D_2} 的存留率与对照相比均增加了 32.06% 以上。与天然抗氧化剂添加处理相比, BHT 添加处理的 V_{D_2} 存

留率较小, 以 1:5 和 1:1 (质量比) 添加后 V_{D_2} 存留率与对照相比分别增加了 24.48% 和 4.49%, 差异分别达到极显著和显著水平。其中 1:5 质量比添加处理的 V_{D_2} 存留率低于葡萄籽提取物、小米草提取物、茶多酚、白藜芦醇和大豆异黄酮处理的 V_{D_2} 存留率 ($P < 0.01$), 但高于竹叶提取物、金银花提取物、野菊花提取物和樱桃提取物处理的 V_{D_2} 存留率 ($P < 0.01$); 而 1:1 (质量比) 添加处理的 V_{D_2} 存留率与樱桃提取物和野菊花提取物添加处理均无显著差异, 而与大豆异黄酮、白藜芦醇、茶多酚、小米草提取物、葡萄籽提取物、竹叶提取物、金银花提取物等 7 种天然抗氧化剂处理的差异极显著 ($P < 0.01$)。



1: 樱桃提取物; 2: 野菊花提取物; 3: 竹叶提取物; 4: 金银花提取物; 5: 小米草提取物; 6: 葡萄籽提取物; 7: 茶多酚; 8: 白藜芦醇; 9: 大豆异黄酮; 10: BHT (V_{D_2} : BHT = 1 : 1); 11: BHT (V_{D_2} : BHT = 1 : 5)。不同大、小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$)。

图 1 添加不同抗氧化剂对 V_{D_2} 稳定性的保护作用

Fig.1 Effect of different antioxidants additions on the stability of vitamin D_2

第 60 d 时添加植物提取物、天然抗氧化剂和 BHT 处理均对 V_{D_2} 稳定性具有较好的保护作用。保护效果从高到低依次为小米草提取物、葡萄籽提取物、金银花提取物、樱桃提取物、野菊花提取物、竹叶提取物、大豆异黄酮、茶多酚和白藜芦醇, 其 V_{D_2} 存留率分别为 53.34%、50.96%、45.17%、32.87%、30.08%、29.43%、28.18%、26.24% 和 25.37%, 各处理 V_{D_2} 存留率均显著高于对照 ($P < 0.01$)。小米草、葡萄籽、金银花、樱桃、野菊花提取物添加处理间 V_{D_2} 存留

率均存在显著差异 ($P < 0.05$), 添加小米草、葡萄籽、金银花、樱桃提取物处理 V_{D_2} 存留率均高于添加茶多酚、白藜芦醇和大豆异黄酮处理 ($P < 0.05$)。以 1:5 和 1:1 质量比添加 BHT 后 V_{D_2} 存留率分别为 37.18% 和 23.75%。其中 1:5 质量比添加处理的 V_{D_2} 存留率低于小米草提取物、葡萄籽提取物和金银花提取物处理的 V_{D_2} 存留率 ($P < 0.01$), 但高于樱桃提取物、野菊花提取物、竹叶提取物、大豆异黄酮、茶多酚和白藜芦醇处理 ($P < 0.01$); 1:1 质量比添加处理

的V_{D₂}存留率小于除白藜芦醇处理外其他8种天然抗氧化剂处理($P<0.05$)。

第90 d时各添加处理均对V_{D₂}稳定性具有较好的保护作用。保护效果从高到低依次为小米草提取物、金银花提取物、樱桃提取物、野菊花提取物、葡萄籽提取物、白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚和竹叶提取物,其V_{D₂}存留率分别为22.39%、22.22%、17.84%、15.95%、13.48%、9.01%、8.92%、8.80%和8.27%,各处理V_{D₂}存留率均显著高于对照($P<0.01$)。添加小米草提取物、金银花提取物后V_{D₂}的存留率高于添加樱桃提取物、野菊花提取物、葡萄籽提取物、白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚和竹叶提取物后V_{D₂}的存留率($P<0.01$),添加樱桃提取物、野菊花提取物、葡萄籽提取物后V_{D₂}的存留率高于添加白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚和竹叶提取物后V_{D₂}的存留率($P<0.01$)。以1:5和1:1质量比添加BHT后V_{D₂}存留率分别为15.13%和6.01%。其中以1:5质量比添加BHT后V_{D₂}存留率低于添加小米草提取物、金银花提取物、樱桃提取物后V_{D₂}存留率($P<0.01$),但高于添加葡萄籽提取物、白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚和竹叶提取物后V_{D₂}存留率($P<0.05$)。

3 结论

含黄酮、绿原酸、V_C及原花青素等成分的小米草提取物、金银花提取物、樱桃提取物、野菊花提取物、葡萄籽提取物等5种天然植物提取物,与V_{D₂}以10:1质量比添加后均对V_{D₂}稳定性具有较佳保护作用,且随着放置时间的延长,其保护效果显著优于添加白藜芦醇、大豆异黄酮、茶多酚3种天然抗氧化剂和BHT。本研究结果拓展了这5种天然植物提取物的新用途,也为V_{D₂}相关食品、保健食品和药品的研制提供了一定理论依据。但本研究中天然提取物未纯化或部分纯化,还需进一步对单体化合物的抗氧化活性及其与V_{D₂}稳定性的关系、抗氧化机理和多组分协同作用等深入研究。

参考文献:

[1] ZHAO G X, EARL S F, LI C Y. Associations of serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone with surrogate markers of insulin resistance among US adults without physician-diagnosed diabetes: NHANES, 2003-2006 [J]. Diabetes

Care, 2010, 33: 344-347.

- [2] ARTAZA J N, NORRIS K C. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells[J]. Journal of Endocrinology, 2009, 200: 207-221.
- [3] KAMEN D L, TANGPRICHA V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity [J]. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2010, 88: 441-450.
- [4] RAVINDER K, BHAWANA S, SUMIT A. Vitamin D₂ stability in milk during processing, packaging and storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56: 421-426.
- [5] BYRDWELL W C, EXLER J, GEBHARDT S E, et al. Liquid chromatography with ultraviolet and dual parallel mass spectrometric detection for analysis of vitamin D in retail fortified orange juice[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24: 299-306.
- [6] GANESAN B, BROTHENSEN C, MC MOHAN D J. Fortification of cheddar cheese with vitamin D does not alter cheese flavour perception[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94: 3708-3714.
- [7] 王双侠,苏适,柴宝丽.钙口服液维生素D₂稳定性研究[J].食品安全质量检测学报,2017,8(3):993-997.
- [8] 刘贝,陆剑锋,姜绍通,等.维生素D₂明胶微球的制备工艺研究及性能表征[J].中国食品添加剂,2017(5):68-74.
- [9] 王双侠,柴宝丽,苏适.维生素D₂羟丙基-β-环糊精包合物的制备研究[J].齐齐哈尔大学学报(自然科学版),2017,33(1):83-84,88.
- [10] 胡代花,张嘉昕,韩豪,等.3种天然抗氧化剂对维生素D₂稳定性的保护作用[J].江苏农业科学,2016,44(8):363-366.
- [11] 符莎露,吴甜甜,吴春华,等.植物多酚的抗氧化和抗菌机理及其在食品中的应用[J].食品工业,2016,37(6):242-246.
- [12] 董蒙蒙,喻樊,刘佳,等.中华补血草5种黄酮类化合物抗氧化和抗肿瘤活性的比较[J].江苏农业科学,2015,43(2):297-299.
- [13] 李进强,卢国洪,邱建鹏,等.三种红树植物醇提取物抗菌及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(4):173-177.
- [14] 黄翊鹏,张荣亭,张利云,等.长清茶抗氧化活性研究[J].山东农业科学,2016,48(2):53-57.
- [15] 刘学铭,黄小霞,廖森泰,等.3种富含花青素植物提取物抗氧化和降血脂活性比较研究[J].中国食品学报,2014,14(1):20-27.
- [16] 王兴娜,汪晶,黄午阳,等.青梅果实不同极性组分的抗氧化活性[J].江苏农业学报,2016,32(1):211-215.
- [17] 沈旭丹,吴月德,庞凤,等.几种植物提取物的抗氧化活性比较[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2016,15(1):34-39.
- [18] 李植飞,李堪,李芳耀,等.容县乌榄叶挥发油化学成分及抗氧化活性分析[J].南方农业学报,2015,46(2):317-321.
- [19] 史东辉,马学会.植物提取物的抗氧化作用及其在畜禽生产中的应用研究进展[J].中国畜牧杂志,2009,45(19):73-76.

(责任编辑:张震林)