

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0105-05

云杉总黄酮抗氧化活性研究

郭霏霏¹, 刘文丛^{2*}, 郑毅男^{1*}¹吉林农业大学中药材学院; ²吉林农业大学资源与环境学院,长春 130118

摘要:本试验测定云杉总黄酮及其二氢槲皮素的含量,研究其抗氧化活性,为后期云杉黄酮的进一步研究提供部分理论依据。采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮的含量,采用高效液相色谱法测定云杉总黄酮中二氢槲皮素的含量。采用 DPPH、ABTS 及还原力法测定云杉总黄酮的抗氧化能力。云杉总黄酮的含量为 2.78 g/100 g,其二氢槲皮素的含量为 0.374%。云杉总黄酮对 DPPH、ABTS 自由基有较好的清除作用,当浓度为 0.5 mg/mL 时清除率分别为 78.7% 和 82.3%。其还原力也较强。

关键词:云杉;总黄酮;二氢槲皮素;含量测定;抗氧化

中图分类号:R965.2

文献标识码:A

Antioxidant Activity of Total Flavanoids in *Picea asperata* Mast.

GUO Fei-fei¹, LIU Wen-cong^{2*}, ZHENG Yi-nan^{1*}

¹Institute of Traditional Chinese Medicines, Jilin Agricultural University; ²College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: The purpose of this study was to determine the total flavonoids and dihydroquercetin contents in *Picea asperata* Mast., and to further investigate its antioxidant activity. The sodium nitrite-aluminum nitrate colorimetric method and HPLC method were used to determine the contents of total flavonoids and dihydroquercetin, respectively. The DPPH scavenging, ABTS scavenging and reducing power assays were used to determine antioxidant ability of the total flavonoids of *P. asperata*. As the result, the total flavonoids content in *P. asperata* was 2.78 g/100 g, in which the dihydroquercetin content was 0.374%. In addition, the total flavonoids of *P. asperata* showed an obvious eliminating effect against DPPH and ABTS free radicals, at the concentration level of 0.5 mg/mL. The eliminating rate was 78.7% and 82.3%, respectively. Its reducing power was also strong.

Key words: *Picea asperata* Mast.; total flavonoids; dihydroquercetin; content determination; antioxidant

黄酮类化合物广泛存在于植物界中,资源丰富,属次级代谢产物,而且是许多药用植物中主要活性成分之一,成为近年来国内外很多学者研究的重要化合物。黄酮化合物具有抗氧化^[1]、抗衰老^[2]、抗肿瘤^[3,4]、抑菌、消炎、抗病毒^[5]、增强免疫力^[6]等显著的生理活性,具有广阔的开发前景。

二氢槲皮素作为一种重要的黄酮类化合物,广泛存在于松科植物中。有研究表明^[7],二氢槲皮素在总黄酮化合物中的含量最高。目前在落叶松、水红花子(红蓼)、马尾松、红豆杉、水松、红松、岗松等植物中发现其单体或者糖苷化合物。二氢槲皮素具有抗癌^[8]、抗病毒^[9]、抗氧化^[10]、对心脑血管系统影

响^[11]等生物活性。由于二氢槲皮素为多羟基化合物,特别是 5,7-OH 及 3',4' 位临位二羟基的存在使其抗氧化能力更强。作为一种天然的抗氧化剂,对各种自由基具有很强的清除作用。

松科(*Pinaceae*)云杉属(*Picea*)植物云杉(*Picea asperata* Mast.)是我国重要的松科植物,属于常绿乔木,在我国大部分地区均有分布,为云杉属中分布较广的树种之一。其很多研究表明,松科植物的松塔、树干及松针中含有大量的黄酮化合物,具有抗氧化^[12]、抗病毒、抑菌及消炎^[13]等生物活性。因此,松科植物中的黄酮化合物成为研究学者研究开发的热点。目前,对云杉树干中黄酮化合物的提取及其抗氧化活性研究甚少。本文采用热回流提取法提取云杉中的黄酮化合物,同时初步研究黄酮化合物的抗氧化活性,为进一步研究云杉提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

云杉(*Picea asperata Mast.*)树干,经吉林农业大学郑毅男教授鉴定为松科(Pinaceae)云杉属(*Picea*)植物长白山地区云杉树干部分。粉碎成木屑,备用。

二氢槲皮素对照品(纯度大于98%,上海晶纯实业有限公司),芦丁对照品(上海中药标准化研究中心),甲醇(色谱纯,美国Fisher公司),纯水(杭州玩哈哈有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸),二铵盐(ABTS)(美国Sigma公司),2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)(西亚试剂公司),甲醇、乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、三氯乙酸、三氯化铁、过硫酸钾、铁氰化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(SPD-20A 紫外检测器,LC-20AT 泵,CTO-10AS VP 柱温箱,LC-solution 工作站),日本岛津公司;SZ-93 自动双重纯水整流器(上海亚荣生化仪器厂);UV-5100 紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);XMTD 数显水浴锅(余姚市东方电工仪器厂);KQ-250DB 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);EYELA 系列旋转蒸发仪(日本 TOKYO RIKAKAKAI CO., LTD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 云杉二氢槲皮素含量测定

1.3.1.1 供试品溶液的制备

供试样品的提取方法参照张卫鹏^[14]的方法,并结合试验略加修改。称取云杉木屑5 g,加入500 mL 60%乙醇于圆底烧瓶中,在水浴80 °C下回流2 h,回流2次。合并提取液,过滤并减压浓缩,置100 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得到云杉总黄酮的供试样品溶液。

1.3.1.2 对照品溶液的制备

二氢槲皮素含量测定的方法参照张卫鹏^[14]的方法,并略加改动。精密称取二氢槲皮素对照品10 mg,置于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容置刻度,摇匀,0.45 (m)微孔滤膜过滤,即得到浓度为1 mg/mL的二氢槲皮素对照品溶液。

1.3.1.3 色谱条件

色谱柱:COSMOSIL 5C₁₈-MS-II(150 mm (4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%甲酸水(35:65),等度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:290 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL;检测时间:20 min。

1.3.2 云杉总黄酮含量测定

1.3.2.1 待测样品溶液和芦丁标准溶液的配制

云杉总黄酮提取方法参照杨志岩^[15]的方法,并结合试验略加修改。称取60 g云杉木屑,加入2000 mL 60%乙醇于圆底烧瓶中,在水浴80 °C下回流2 h,回流2次。合并提取液,过滤并减压浓缩置干。精密称取干燥样品0.1006 g,加入60%乙醇溶解,并定容于100 mL容量瓶中,配制成1 mg/mL的云杉总黄酮待测样品溶液。

精密称取芦丁标准品10 mg,加入60%乙醇溶解,并定容于100 mL容量瓶中,配制成0.1 mg/mL的芦丁标准品溶液。

1.3.2.2 芦丁标准曲线的制作

取一定量1.3.2.1项下配制的芦丁溶液配制成浓度分别为0.00、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL的芦丁溶液。精密吸取不同浓度的芦丁溶液1.0 mL于10 mL的具塞试管中,加入5% NaNO₂溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后加入10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后加入4% NaOH溶液4 mL,摇匀,15 min后于510 nm下测定吸光度。以芦丁浓度C为横坐标,吸光度A为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.2.3 总黄酮含量测定

精密吸取1.3.2.1项下配制的样品溶液1 mL于10 mL具塞试管中,加入5% NaNO₂溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后加入10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min后加入4% NaOH溶液4 mL,摇匀,15 min后于510 nm下测定吸光度。

1.3.3 云杉总黄酮抗氧化活性研究

1.3.3.1 清除DPPH自由基活性测定

测定参照文献^[16]的方法,并稍加改动。将云杉总黄酮样品及BHT(对照品)用60%乙醇配制成不同浓度的样品溶液(0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL)。将DPPH用无水乙醇配制成2×10⁻⁴ mol/L的溶液。取3 ml样品溶液,加入3 ml DPPH溶液,震荡,摇匀。室温下反应30 min,在517 nm下测定其吸光度。

自由基清除率=(A-B+C)/A×100%,式中A为3 mL无水乙醇+3 mL DPPH溶液的吸光

度;B 为 3 mL 样品溶液 + 3 mL DPPH 溶液的吸光度;C 为 3 mL 样品溶液 + 3 mL 无水乙醇的吸光度。实验重复三次,取平均值作图。

1.3.3.2 清除 ABTS 自由基活性测定

测定参照文献^[16]的方法,并稍加改动。用去离子水配制成 7 mmol/L 的 ABTS 溶液及 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液。取过硫酸钾溶液 88 μL,加入 5 mL ABTS 溶液中,在室温下置于黑暗处反应 16 h,形成 ABTS 自由基储备液。在 734 nm 下,用 60% 乙醇将 ABTS 自由基储备液稀释至吸光度为 0.7 ± 0.02,备用。准确吸取 1 mL 不同浓度(0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL)的样品溶液,加入 4 mL ABTS⁺溶液,震荡混匀,在室温下反应 30 min,与 734 nm 下测定其吸光度。空白对照将样品溶液用体积分数为 60% 的乙醇代替。

ABTS 自由基清除率(%) = $(A_2 - A_1)/A_2 \times 100\%$,式中 A_1 为样品的吸光度, A_2 为空白对照的吸光度。实验重复三次,取平均值作图。

1.3.3.3 还原力测定

测定参照文献^[16]的方法,并稍加改动。取不同浓度(0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL)的样品 2.5 mL,加入 2.5 mL(0.2 mol/mL),pH 6.6 磷酸盐缓冲液和 2.5 mL 1% K₃Fe(CN)₆,混合均匀(1:1:1),于 50 ℃ 反应 20 min,迅速冷却,取出再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸,而后于 2000 rpm 离心 10 min,取上层溶液 2.5 mL,分别加入 2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL 0.1% FeCl₃(5:5:1),以 BHT 作为对照,测定波长 700 nm。实验重复三次,取平均值作图。采用铁离子还原法,测定的吸光度值大小与该化合物

还原力强弱呈正比。

2 实验结果

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系考察

取 1.3.1.2 项下配制的对照品溶液 0.01、0.05、0.1、0.4、0.8、1.0 mL, 分别用甲醇定容至 1 mL, 摆匀后进行测定。采用 1.3.2 项的色谱条件测定, 以浓度(μg/mL)为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 建立标准曲线, 其回归方程为: $Y = 3.54 \times 10^7 X - 1.79 \times 10^7$, $R^2 = 0.9998$ ($n = 6$), 线性范围 0.01 ~ 1.0 mg/mL。结果表明, 二氢槲皮素在线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.2 精密度试验

取对照品溶液, 重复进样 5 次, 测定峰面积值, 计算 RSD 值, 实验重复三次, 得 RSD 值分别为 2.94%、2.16% 和 2.44%。实验结果表明, 仪器精密度良好。

2.1.3 重复性试验

取 1.3.1.2 项下二轻槲皮素对照品溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 测定峰面积值, 计算 RSD 值, 实验重复三次, 得 RSD 值分别为 2.26%、2.13% 和 2.51%。实验结果表明该法重复性良好。

2.1.4 稳定性试验

取 1.3.1.1 项下样品溶液分别在 0、1、2、4、8、10 h 于上述色谱条件下测定峰面积值, 计算 RSD 值, 实验重复三次, 得 RSD 值分别为 2.89%、2.35% 和 2.46%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

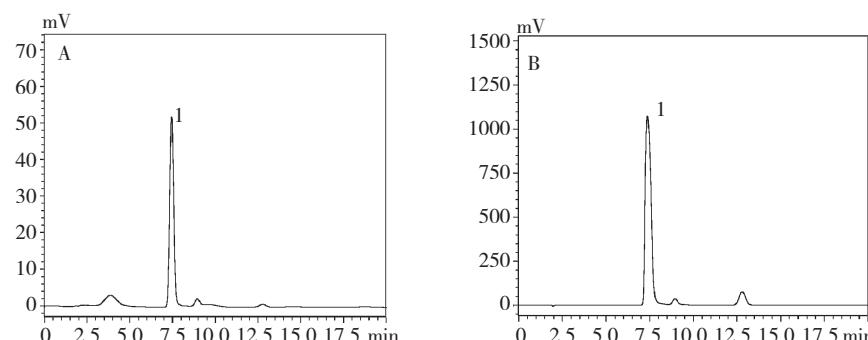


图 1 二氢槲皮素(A)及云杉总黄酮提取液(B)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of dihydroquercetin (A) and total flavonoids extract of *P. asperata* (B)

2.1.5 加样回收率试验

取二轻槲皮素标准品 1 mg, 精密称定, 加入

1.3.1.1 项下供试品溶液 10 mL, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 测定峰面积值, 计算 RSD 值, 实验重复三

次。计算得二氢槲皮素平均回收率。检测结果表明,平均加样回收率分别为:99.6%、101.2%、98.9%;RSD 分别为:2.8%、2.25%、2.76%。表明该法的回收率结果良好。

2.2 云杉总黄酮供试样品二氢槲皮素含量测定

在上述色谱条件下,对照品及样品中的二氢槲皮素保留时间基本一致,理论塔板指数均大于3000。二氢槲皮素的保留时间为7.442 min。取上述1.3.1.1项下的供试样品溶液,以峰面积外标法计算,云杉总黄酮中二氢槲皮素的含量为0.374%。二氢槲皮素对照品及供试样品的色谱图如下。

2.3 芦丁标准曲线及云杉总黄酮待测样品含量测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,绘制芦丁标准曲线,得芦丁标准曲线的回归方程为 $Y = 12.83X + 0.0025, R^2 = 0.9994$,其总黄酮含量为2.78 g/100 g。

2.4 云杉总黄酮对DPPH自由基的清除作用

按1.3.3.1节测得A、B及C的吸光度。DPPH自由基清除率结果如图2所示。由图2可知,云杉总黄酮有较好的清除自由基作用,当浓度为0.5 mg/mL时,其黄酮的清除率为78.7%,BHT的清除率为80.9%。不同浓度的BHT对DPPH自由基的清除作用大于不同浓度黄酮对DPPH自由基的清除作用,随着浓度的增加,样品清除DPPH自由基的能力也不断增强。当黄酮的浓度为0.05 mg/mL时,其清除率为56.4%,其 $IC_{50} < 0.05$ mg/mL。

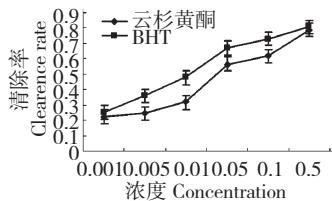


图2 不同浓度的云杉总黄酮及BHT对DPPH自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effects of different concentrations of total flavonoids of *P. asperata* and BHT on DPPH free radical

2.5 云杉总黄酮对ABTS自由基的清除作用

按1.3.3.2节测得A₁、A₂的吸光度。ABTS自由基清除率结果如图3所示。由图3可知,不同浓度的样品对ABTS自由基的清除能力不同,随着样品浓度的增加,对ABTS自由基清除率越高。当浓

度为0.5 mg/mL时,黄酮的清除率为82.3%,BHT的清除率为83.7%。不同浓度的BHT对ABTS自由基的清除作用大于不同浓度黄酮对ABTS自由基的清除作用。当黄酮的浓度为0.1 mg/mL时,其清除率为57.7%,其 $IC_{50} < 0.1$ mg/mL,当浓度大于0.1 mg/mL时,样品与BHT的清除率相接近。

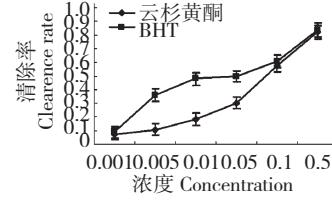


图3 不同浓度的云杉总黄酮及BHT对ABTS自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging effects of different concentrations of total flavonoids of *P. asperata* and BHT on ABTS free radical

2.6 云杉总黄酮还原力测定结果

按1.3.3.3节测得样品及BHT吸光度。还原力结果如图4所示。由图4可知,不同浓度样品的还原力不同,随着样品浓度的增加,其吸光度越高。当浓度为0.5 mg/mL时,黄酮的吸光度为0.468,BHT的吸光度为0.939。不同浓度BHT的还原力大于其不同浓度黄酮的还原力。

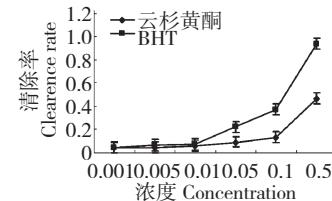


图4 不同浓度的云杉总黄酮及BHT的还原力

Fig. 4 Reducing power of different concentrations of total flavonoids of *P. asperata* and BHT

3 结论与讨论

本试验采用高效液相色谱法测定云杉总黄酮中二氢槲皮素的含量,其含量为0.374%。采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮的含量,其含量为2.78 g/100 g。

本试验利用提取得到的云杉总黄酮样品进行抗氧化试验,结果表明总黄酮对DPPH、ABTS+自由基具有较好的清除作用,清除率分别达到78.7%和82.3%。此黄酮还具有较强的还原能力,三种方法都表明云杉总黄酮随着其对应浓度增加抗氧化能力

增强,呈较好的量效关系。

黄酮具有较好的抗氧化效果,因此在食品、药品、化妆品及工业领域能发挥良好的抗氧化作用。作为食品添加剂加入食品中,延长有效期;加入化妆品中可延缓衰老;作为抗氧化剂可应用于抗震、稳定剂、颜料漆的抗氧化剂、火箭燃料、发动机油脂添加剂等等。加大对黄酮的研究,不仅对天然产物的研究与开发有积极作用,而且将黄酮开发成药品或食品,对人类健康具有实际意义,可带来其经济效益。

参考文献

- 1 Cao JG, Xia X, Chen XF, et al. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51:242-250.
- 2 Ye HY(叶怀义), Gong FL(龚赋岚). Study on effect of anti-semility of liquorice flavone. *J Haerbin Univ Commerce*(哈尔滨商业大学学报), 2004, 20:93-95.
- 3 Park KI, Park HS, Nagappan A, et al. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chem*, 2012, 135:2728-2735.
- 4 Li YL, Gan GP, Zhang HZ, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113: 115-124.
- 5 Wang ZM(王尊民), Gao XM(高秀妹), Zhao QY(赵庆友), et al. Antivirus and anti-bactericidal effects of total flavones extracted from phoenix tree flower. *Chin J Veterin Sci*(中国兽医学报), 2013, 33:272-276.
- 6 Zhou Q(周倩), Li J(李俊), Wang TY(王婷玉), et al. Effect of total flavonoids extracted of *Litsea coreana* leave on cytokines production and immunity of peritoneal macrophage from collagen-induced arthritis. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2010, 26:353-358.
- 7 Barton GM, Gardner JAF. Determination of dihydroquercetin in douglas fir and western larch wood. *Anal Chem*, 1998, 30: 279-281.
- 8 Kawai S, Tomono Y, Katase E. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anti Cancer Res*, 1999, 19: 1261-1269.
- 9 Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on moloney marine leukemia virus reverse transcriptase. *J Nat Prod*, 1992, 55:179-183.
- 10 Wei Y, Chen XQ, Jiang XY, et al. Determination of taxifolin in *Polygonum Orientale* and study on its antioxidant activity. *J Food Comp Anal*, 2009, 22:154-157.
- 11 Wang QH(王秋红), Kuang HX(匡海学), Wu L(吴伦), et al. Protective effect of dihydroquercetin on acute myocardial ischemia induced by isoproterenol in rats. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:177-180.
- 12 Zhang X(张霞). Extraction and purification of flavonoids from pine needles and anti-oxidative activity of the extract. Beijing: Beijing Forestry University(北京林业大学), MSc. 2010.
- 13 Zhang Y(张宇), Wang L(王莉), Fu YM(傅宇明), et al. Study on antioxidant and anti-inflammatory activity of the pine cone of *Pinus sylvestris* L. var. mongolica litvin. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21:1549.
- 14 Zhang WP(张卫鹏), Liu W(刘伟), Fu JH(付警辉), et al. Structural identification and quantitative analysis extraction of Taxifolin in *Larix olgensis* Henry var. koreana Nakai. *Food Sci*(食品科学), 2013, 34:293-296.
- 15 Yang ZY(杨志岩), Yin SH(尹树花), Bai M(白明), et al. Optimization of extraction of total flavonoids from Chinese pine pollen by response surface design(RSD). *Modern Food Sci Technol*(现代食品科技), 2008, 24:253-256.
- 16 Hao XM(郝旭梅), Bao JC(鲍建才), Yang ZH(杨智慧), et al. Antioxidant activity of polysaccharide from the leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* Seem. *Packaging Food Machinery*(包装与食品机械), 2011, 29(4):1-5.
- 17 Hashimoto F. Chemistry on tea polyphenols. *PhD Thesis*, 1988, 127-131 (in Japanese).
- 18 Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. CXIV. Structures of novel fermentation products, theogallinin, theaflavonin and desgalloyl theaflavonin from Black tea, and changes of tea Leaf polyphenols during fermentation. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40, 1383-1389.
- 19 Lv HP, Lin Z, Gu JP, et al. Study on the gallic acid in Pu-erh Tea. *J Tea Sci*, 2007, 27:104-110.

(上接第 59 页)

- 13 Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I, et al. Tannins and related compounds. CXIV. Structures of novel fermentation products, theogallinin, theaflavonin and desgalloyl theaflavonin from Black tea, and changes of tea Leaf polyphenols during fermentation. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40, 1383-1389.
- 14 Lv HP, Lin Z, Gu JP, et al. Study on the gallic acid in Pu-erh Tea. *J Tea Sci*, 2007, 27:104-110.

- 15 Hashimoto F. Chemistry on tea polyphenols. *PhD Thesis*, 1988, 127-131 (in Japanese).
- 16 Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and related compounds. LXXVII. novel chalcon-flavan dimers, assamicains A, B and C, and a new flavan-3-ol and proanthocyanidins from the fresh leaves of *Camellia sinensis* L. var. assamica Kitamura. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37:77-85.