

天山雪莲不同器官中黄酮、总酚含量和抗氧化活性分析

白壮东, 吴燕笛, 韩乾奇, 郭斌*, 尉亚辉*

西北大学生命科学院西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069

摘要:研究了天山雪莲不同部位的总黄酮、总酚含量及抗氧化活性。以天山雪莲根、茎、叶、花、花苞片为材料, 测定其80%乙醇提取物的总黄酮含量、总酚含量、 Fe^{3+} 还原力和对DPPH自由基的清除率。结果表明, 天山雪莲中总黄酮和总酚的含量高低依次为叶>花苞片≈花>根>茎; 对 Fe^{3+} 还原能力大小次序是叶>花苞片>花>根>茎; 对DPPH的清除能力依次为叶≈花苞片>花>根>茎。实验结果表明叶片可以作为天山雪莲采摘和药用的主要部位; 天山雪莲花苞片中可能含有黄酮和酚类之外的抗氧化物质。

关键词:天山雪莲; 总黄酮; 总酚; 抗氧化活性

中图分类号: S567.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.022

Determination of Flavonoids, Phenols and Antioxidant Activities in Different Organs of *Saussurea involucrata*

BAI Zhuang-dong, WU Yan-di, HAN Qian-qi, GUO Bin*, WEI Ya-hui*

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: In the present study, the contents of flavonoids, total phenolic and antioxidant activities in different organs of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. were investigated. The flavonoids and total phenolic contents, ferric ion reducing antioxidant power and DPPH radical scavenging capacity of samples extracted from root, stem, leaf, blossom and bract of *S. involucrata* by 80% ethanol were determined. The results showed: (1) the contents of flavonoids and total phenolic were: leaf > bract ≈ blossom > root > stem; (2) the ferric ion reducing ability was leaf > bract > blossom > root > stem; (3) the DPPH radical scavenging capacity was leaf ≈ bract > blossom > root > stem. These data clearly demonstrated that the leaf of *S. involucrata* was the main part as field picking and medicinal usage. In addition, the bract of *S. involucrata* may contain other special strong antioxidants except flavonoids and phenols.

Key words: *Saussurea involucrata*; flavonoids; total phenolic; antioxidant activity

菊科天山雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., 又名新疆雪莲, 高山雪莲, 藏语称恰果苏巴, 维吾尔语称喀尔古丽, 生于新疆天山、阿尔泰山、昆仑山雪线附近的岩缝、石壁和冰碛砾石滩中, 多年生一次性开花草本, 为珍贵的高原药用植物^[1-3]。天山雪莲含有黄酮类、生物碱、酚类、挥发油、鞣质、木脂素类、多糖类等活性成分, 在抗氧化、清除自由基、抗炎消肿、降低血压血脂、抑制癌细胞增殖等方面有重要的作用^[4-6]。另外, 天山雪莲中多糖和黄酮类物质可抵抗疲劳, 提高小鼠游泳的时间, 减少小鼠血乳酸含量, 增加肝糖原含量^[7]。我们基于其抗氧化活性这

一特点, 对其不同部位(根、茎、叶、花苞片、花)的黄酮和总酚含量进行测定, 将其含量和抗氧化能力(还原力和DPPH自由基清除率)指标相结合, 分析黄酮和总酚含量与雪莲抗氧化活性之间的关系, 为更好的利用和挖掘这一重要的高原药用植物资源提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料: 天山雪莲, 采自新疆天山天池附近, 由西北大学生命科学学院魏朔南教授鉴定为菊科植物天山雪莲(与中科院植物所标本馆天山雪莲标本对比), 同株植物分为根、茎、叶、花苞片、花五部分。

试剂: 1, 1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、福林酚试剂 美国 Sigma 公司; 甲醇、乙醇、亚硝酸钠、氯化铝、

收稿日期: 2015-04-28 接受日期: 2015-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(31000144); 陕西省教育厅重点实验室科研计划(14JS099)

* 通讯作者 Tel: 86-29-88303484; E-mail: weiyahui@mwu.edu.cn; guobin@nwwu.edu.cn

氢氧化钠、碳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁均为国产分析纯;芦丁标准品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707,装量 100 mg,供含量测定用);原儿茶酸标准品(中国食品药品检定研究院,批号 110809-200604,装量 50 mg,供含量测定用)。

仪器:紫外分光光度计(岛津 UV-2501PC)、离心机(德国 Eppendorf)、KQ5200DB 型数控超声清洗器(中国玉环曙峰)、40 目筛子、研钵。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液的制备

取天山雪莲的根、茎、叶、花苞片、花,经烘箱 60 °C 干燥 12 h,在研钵中研碎,过 40 目筛。精确称取 10.0 g 于 250 mL 的小烧杯中,加入 80% 乙醇 100 mL,称重,超声处理 1 h,放冷至室温,再用 80% 乙醇补足减失的重量,离心分离,取上清液,过滤,浓缩,冷冻干燥得到不同部位提取物。用 80% 乙醇将提取物配制成 10 mg/mL 的溶液,置于-4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 总黄酮含量的测定

参考付婉艺等的方法^[8],并加以改进。精确称取 10.0 mg 芦丁标准品,用 80% 的乙醇溶液在 50 mL 容量瓶中配置成质量浓度为 0.2 mg/mL 芦丁标准液。吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 的标准液,分别于 10 mL 的容量瓶中,加乙醇 1 mL,摇匀,加 5% NaNO₂ 0.15 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% AlCl₃ 0.15 mL 摇匀,放置 6 min,加 4% NaOH 2 mL 摇匀,乙醇定容,放 10 min 后于 510 nm 处测定吸光度。以芦丁质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,获得曲线方程($y = 7.9200x + 0.0453$, $R^2 = 0.9969$)。

分别吸取天山雪莲根、茎、叶、花苞片、花提取液 0.5 mL 进行样品测定,按照曲线方程获得总黄酮的含量。提取物中总黄酮的含量表示为每克提取物相当于芦丁的毫克数。

1.2.3 总酚含量测定^[9]

精确称取 10.0 mg 原儿茶酸标准品,置于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,配制成 0.1 mg/mL 的原儿茶酸标准溶液。取 7 支 25 mL 具塞刻度试管,分别移取 0、0.2、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 标准溶液于试管中,加入 1 mL 福林酚显色剂,再依次给每个试管中加入 5 mL 1 mol/L 的碳酸钠水溶液,加入蒸馏水至 10 mL,充分混合,在室温、避光的条件下

放置 1 h,然后在波长 760 nm 处测定吸光度。以原儿茶酸溶液的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标制作标准曲线,获得曲线方程($y = 162.31x + 0.0935$, $R^2 = 0.9963$)。

吸取天山雪莲根、茎、叶、花、花苞片提取液 0.8 mL 进行样品测定,按照曲线方程获得总酚的含量。提取物中总酚的含量表示为每克提取物相当于原儿茶酸的毫克数。

1.2.4 还原能力的测定^[10]

取七个相同规格的试管,编号 1-7,1 号试管加入 0.2 mL 80% 乙醇作为空白样品,2 号试管加入 0.2 mL 浓度为 2 mg/mL 的 Vc 溶液作为对照样品。其余 3~6 号试管分别加入 0.2 mL 天山雪莲根、茎、叶、花苞片、花提取液作为样品,依次给 7 个试管加入磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6) 2.3 mL,再加入 5 mL 1% 铁氰化钾水溶液,放置在 50 °C 水浴中反应 20 min,加入 5 mL 10% 三氯乙酸水溶液,混合均匀。分别在每个试管吸取上清液 2.5 mL,置于新的对应编号的试管中,然后依次加入 2.5 mL 蒸馏水,0.5 mL 0.1% 三氯化铁水溶液,静置 5 min。在波长 700 nm 处测吸光度。

1.2.5 自由基清除实验^[11]

精确称取 4.0 mg DPPH(1,1-二苯基-2-苦肼基),置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇配置成 0.04 mg/mL DPPH 溶液,分别吸取天山雪莲根、茎、叶、花苞片、花提取液 0.2 mL,置于 5 个相同试管中,依次加入 DPPH 甲醇溶液 5 mL,放置在室温下避光反应 1 h,在波长 517 nm 处测吸光度 $A_{\text{样品}}$,同时测定 0.2 mL 甲醇在 5 mL 0.04 mg/mL DPPH 甲醇溶液中的吸光度 $A_{\text{空白}}$ 。DPPH 的清除率计算方式:

$$\text{清除率}(\%) = \left(\frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \right) \times 100$$

1.2.6 数据统计分析

数据用 SAS9.2 软件统计,显著性分析采用方差分析和多重比较,利用 Excel 表格进行相关系数分析。

2 结果与分析

2.1 不同部位提取物总酚、总黄酮含量

由表 1 和表 2 可知,天山雪莲不同部位总酚和总黄酮的含量有显著的差异($P < 0.05$)。总黄酮和总酚含量均以叶中的含量最多,分别为 56.1 mg/g 和 10.5 mg/g。其次为花苞片(花)和根。茎中的总

黄酮和总酚含量最少。总黄酮和总酚的含量在花苞片中黄酮的含量高于总酚的含量。片和花中没有显著差异。从数据也可以看出,雪莲

表1 天山雪莲不同部位提取物总黄酮含量($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The content of flavonoids in different organs of *S. involucrata* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

部位 Organ	吸光值 Absorbance				总黄酮含量 Total flavonoids (mg/g)
	平行样 1 Sample 1	平行样 2 Sample 2	平行样 3 Sample 3	平均值 Average	
茎 Stem	0.072	0.071	0.070	0.071	6.5 ± 0.1 ^a
根 Root	0.106	0.109	0.106	0.107	15.6 ± 0.3 ^b
花 Blossom	0.149	0.152	0.150	0.150	26.4 ± 0.4 ^c
花苞片 Bract	0.157	0.153	0.156	0.155	28.2 ± 0.4 ^{cd}
叶 Leaf	0.262	0.281	0.260	0.268	56.1 ± 0.6 ^e

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Note: Values with different small letter in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$), same as below.

表2 天山雪莲不同部位提取物总酚含量($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The content of total phenolics in different organs of *S. involucrata* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

部位 Organ	吸光值 Absorbance				总酚含量 Total phenolics (mg/g)
	平行样 1 Sample 1	平行样 2 Sample 2	平行样 3 Sample 3	平均值 Average	
茎 Stem	0.422	0.443	0.477	0.447	2.7 ± 0.1 ^a
根 Root	0.673	0.712	0.678	0.688	4.6 ± 0.1 ^b
花 Blossom	1.041	1.024	1.043	1.036	7.3 ± 0.2 ^{cd}
花苞片 Bract	0.981	0.965	0.983	0.976	6.8 ± 0.2 ^c
叶 Leaf	1.421	1.477	1.473	1.457	10.5 ± 0.2 ^e

天山雪莲中黄酮的含量已有很多人报道^[12],但是不同部位的含量对比没有详细的资料。我们对天山雪莲不同部位的总黄酮含量进行对比发现叶片中最高。因此,我们在采集雪莲时,只需要将其叶片采摘,而不必要将其全株采挖。这样既保护了野生雪莲资源,又不影响对其有效成分的利用。酚类物质也是药用植物的有效成分之一^[13]。本研究第一次报道了天山雪莲总酚的含量,为天山雪莲酚类物质的研究提供数据参考。

2.2 不同部位提取物对 Fe^{3+} 还原能力的影响

对 Fe^{3+} 还原能力的测定是用来考察抗氧化剂还原能力的一种方法,在 700 nm 处的吸收值越高,表示还原能力越强^[14]。由表 3 可知,天山雪莲不同部位提取物对 Fe^{3+} 还原能力不同,叶的还原能力显著高于其他部位($P < 0.05$),对 Fe^{3+} 还原能力大小次序是:叶片 > 花苞片 > 花 > 根 > 茎。通过不同部位提取物对 Fe^{3+} 还原能力与其总酚、总黄酮含量的

相关系数比较,可得:茎、根、花、花苞片、叶提取物对 Fe^{3+} 还原能力与总酚的相关系数 $r = 0.9579$,根据相关系数的 t 检验,二者显著正相关($P < 0.05$);与总黄酮的相关系数 $r = 0.9902$,根据相关系数的 t 检

表3 不同部位提取物还原能力($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Fe^{3+} reducing ability of different organs of *S. involucrata* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

样品 Sample	吸光值 Absorbance
空白组 Blank group	0.023 ± 0.001 ^a
对照组 Control group	0.239 ± 0.003 ^b
茎 Stem	0.083 ± 0.001 ^c
根 Root	0.118 ± 0.001 ^d
花 Blossom	0.141 ± 0.002 ^e
花苞片 Bract	0.173 ± 0.002 ^d
叶 Leaf	0.256 ± 0.003 ^e

验,二者显著正相关($P < 0.05$)。相关性分析表明天山雪莲不同部位提取物对 Fe^{3+} 还原能力既与其总酚含量有关,又与其总黄酮含量有关。一直以来人们认为天山雪莲具有抗氧化活性^[15],主要因为其中含有黄酮^[12]。我们研究表明,天山雪莲的抗氧化活性可能与其中的酚类物质有密切的关系。

2.3 不同部位提取物对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 是一种很稳定的氮中心的自由基,自由基有单电子,在 517 nm 处有一强吸收,其醇溶液呈现紫色的特征。DPPH 检测法是通过 DPPH 分子中一个稳定的自由基与抗氧化剂提供的一个电子配对结合,使 DPPH 的紫色逐渐消失,其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系^[16]。由表 4 可知,天山雪莲叶片提取物和花苞片提取物对 DPPH 自由基的清除能力最强,显著高于其他三个部位($P < 0.05$);花和茎提取物对 DPPH 自由基的清除能力最弱,显著低于其他三个部位($P < 0.05$)。通过不同部位提取物对 DPPH 自由基的清除能力与其总酚、总黄酮含量的相关系数比较,发现不同部位提取物对 DPPH 自由基清除能力与总酚的相关系数 $r = 0.6678$,根据相关系数的 t 检验,二者没有显著的直线相关关系;不同部位提取物对 DPPH 自由基清除能力与总黄酮的相关系数 $r = 0.7395$,同样进行 t 检验,二者也没有显著的直线相关关系。另外,花提取物对 DPPH 自由基的清除率是 13.32%,花苞片提取物对 DPPH 自由基的清除率是 84.24%,差异显著($P < 0.05$)。从总酚和总黄酮含量来分析,花和花苞片中总酚和总黄酮含量没有显著性差异,而显著低于叶片中的。这表明,花苞片中含有黄酮和酚类之外的抗氧化物质,而这些物质的存在导致其对 DPPH 自由基的清除率的增加。这一结论为天山雪莲中抗氧化物质的分离提供依据。

表 4 不同部位提取物对 DPPH 自由基的清除能力($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 4 DPPH radical scavenging capacity of different organs of *S. involucrata* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

部位 Organ	清除率 Scavenging rate (%)
茎 Stem	17.64 ± 0.973 ^a
根 Root	29.83 ± 0.921 ^b
花 Blossom	13.32 ± 0.985 ^c
花苞片 Bract	84.24 ± 0.686 ^d
叶 Leaf	85.81 ± 0.655 ^d

3 结论

本研究测定了天山雪莲根、茎、叶、花苞片和花中总黄酮和总酚含量,并对其提取物进行了抗氧化分析(Fe^{3+} 还原能力和 DPPH 自由基清除率),得出叶中总黄酮和总酚含量最高,对 Fe^{3+} 还原能力最强和 DPPH 自由基清除能力最强;花苞片总黄酮和总酚含量显著低于叶($P < 0.05$),但 DPPH 自由基清除能力与叶中的无显著性差异。研究结果表明天山雪莲叶片是抗氧化物含量最高的部位,可以作为雪莲采摘和药用的主要部位;另外,尽管天山雪莲的花苞片生物量少,但其含有黄酮和酚类之外的抗氧化物质,可以作为研究天山雪莲抗氧化活性成分的材料来源。

参考文献

- Li JS (李君山), Zhu ZY (朱兆仪), Cai SQ (蔡少青). A survey on botanical origins of drug Xue Lianhua produced in China. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25: 461-465.
- Tan DY (谭敦炎), Zhu JW (朱建雯), Yao F (姚芳), et al. Studies on reproduction ecology in *Saussurea involucrata*. *J Xinjiang Agric Univ* (新疆农业大学学报), 1998, 21: 1-5.
- Chen FJ (陈发菊), Yang YG (杨映根), Zhao DX (赵德修), et al. Advances in studies of species, habitats distribution and chemical composition of snow lotuses (*Saussurea*) in China. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1999, 16: 561-566.
- Yi T, Zhao ZZ, Yu ZL, et al. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as "Snow Lotus" herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128: 405-411.
- Yao LY, Zhao QS, Xiao J, et al. Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucrata*. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50: 849-853.
- Byambaragchaa M, Cruz JD, Kh A, et al. Anticancer potential of an ethanol extract of *Saussurea involucrata* against hepatic cancer cells *in vitro*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 7527-7532.
- Su KY, Yu CY, Chen YW, et al. Rutin, a flavonoid and principal component of *Saussurea involucrata*, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model. *Int J Med Sci*, 2014, 11: 528-537.
- Fu WY (付婉艺), Li HH (李厚华), Li L (李玲), et al. Extraction and purification of total flavonoids in suspension cultured cells of *Saussurea involucrata*. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric For, Nat Sci* (西北农林科技大学学报, 自然科学版), 2013, 41: 175-181.