

竹叶花椒黄酮类成分含量及抗氧化活性相关性分析

杨 悅, 冯靖雯, 陈鸿平, 刘友平*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

摘要:为比较不同产地竹叶花椒黄酮类成分含量及抗氧化活性差异, 探究黄酮成分与抗氧化活性相关性, 以21个产地的竹叶花椒为材料, 建立HPLC同时测定4种黄酮类成分含量(芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷)的方法, 采用分光光度法测定总黄酮组分含量, 采用DPPH、ABTS自由基清除试验评价其抗氧化活性, 并结合皮尔逊相关分析探究黄酮类成分与抗氧化活性相关性。建立的方法简便、准确, 可用于竹叶花椒中4种黄酮类成分的含量测定; 不同产地竹叶花椒中黄酮类成分及抗氧化活性存在明显差异; 相关性分析结果表明: 总黄酮和芦丁与DPPH、ABTS清除率的EC₅₀均呈显著负相关, 因此, 总黄酮与芦丁可作为评价竹叶花椒抗氧化能力的指标。本研究为竹叶花椒抗氧化活性研究提供实验依据, 为其大健康衍生品开发提供实验依据。

关键词:竹叶花椒; 产地; 黄酮; 抗氧化; 皮尔逊相关性分析

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)11-1809-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.001

Correlation analysis of flavonoids content and antioxidant activity of *Zanthoxylum armatum* DC.

YANG Yue, FENG Jing-wen, CHEN Hong-ping, LIU You-ping*

State Key Laboratory of Southwest Characteristic Traditional Chinese Medicine Resources,
School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: To compare the content of flavonoids and the antioxidant activity difference of *Zanthoxylum armatum* DC. from different places of production, the correlation between flavonoids and antioxidant activity is explored. Taking *Z. armatum* from 21 producing areas as the materials, this paper establishes a method to simultaneously determine the contents of four types of flavonoids (including rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercitrin) with HPLC, test the content of total flavonoids by adopting spectrophotometry, evaluate its antioxidant activity through DPPH and ABTS free radical scavenging tests, and analyzes and explores the correlation between flavonoids and antioxidant activity combined with product-moment coefficient of correlation. The established method is simple and accurate which can be used in testing the contents of four types of flavonoids in *Z. armatum*; there are obvious differences in the content of flavonoids and the antioxidant activity of *Z. armatum* from different places; according to the correlation analysis results, it can be seen that the total flavonoids and rutin are significantly negative to the EC₅₀ of both DPPH and ABTS clearance. Therefore, total flavonoids and rutin can be used as indicators to evaluate the antioxidant capability of *Z. armatum*. This study provides an experimental basis for the antioxidant activity research of *Z. armatum* and a reference for the development of its health derivatives.

Key words: *Zanthoxylum armatum* DC.; producing areas; flavonoids; antioxidant activity; Pearson correlation analysis

竹叶花椒是芸香科植物竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC.)的干燥成熟果皮, 性辛·温, 具有温中止痛、杀虫止痒等功效, 俗称“藤椒”, 又名万花针、

白总管、竹叶总管、山花椒等, 主要分布在我国秦岭以南的广大西南区域^[1,2]。目前四川省栽种面积达300多万亩^[3], 形成川中、川西、攀西3个花椒特色优势种植区, 攀西及川中地区为竹叶花椒集中地^[4]。

基于清香浓郁的特殊风味, 竹叶花椒在餐饮行业流通广泛, 常用作风味调节剂和防腐剂, 防腐作用

收稿日期: 2021-03-25 接受日期: 2021-09-10

基金项目: 国重·双一流·中药质量保障提升科研创新团(030041011)

*通信作者 Tel: 86-013990886005; E-mail: youpingliu@cdutcm.edu.cn

与抗氧化活性物质相关^[5]。现代药理学研究表明,竹叶花椒具有镇痛抗炎、保肝、抗氧化、驱蚊杀虫、抗肿瘤、降血糖、抗阿兹海默症^[6-12]等作用,其中保肝、抗肿瘤、降血糖等药效作用与竹叶花椒抗氧化活性有关,目前未有研究表明竹叶椒药材抗氧化活性与其传统功效有关联。本课题组前期研究表明,竹叶花椒不同极性部位均具有清除 DPPH、ABTS 及羟基自由基作用。有文献报道,不同产地的竹叶花椒均具有较好的抗氧化活性^[13],且自由基清除率、总抗氧化活性和还原电位实验,三种实验方法均表明抗氧化作用与提取物剂量呈正相关^[14]。藤椒水提液有很好的抗氧化活性,可能与黄酮类成分的芦丁、槲皮素等有关^[15]。目前关于不同产地竹叶花椒黄酮类成分含量差异及其与抗氧化活性相关性的研究较少。因此,本文收集四川川中、攀西等 21 个产地的 27 批竹叶花椒,建立 HPLC 方法同时测定 4 种黄酮类成分,紫外测定总黄酮含量,结合 DPPH、ABTS 自由基清除试验评价不同产地竹叶花椒抗氧化活性差异。通过皮尔逊相关分析法,探究黄酮成分和抗氧化活性的相关性,旨在为竹叶花椒抗氧化活性研究与大健康衍生品开发提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);

表 1 27 批竹叶花椒样品来源信息

Table 1 Source information of 27 batches of *Z. armatum*

编号 No.	收集地 Collection place	收集时间 Collection time
s1	凉山彝族自治州盐源县	2019/9/7
s2	凉山彝族自治州盐源县	2019/9/7
s3	凉山彝族自治州盐源县	2019/9/7
s4	凉山彝族自治州德昌县	2019/9/7
s5	凉山彝族自治州德昌县	2019/9/7
s6	凉山彝族自治州冕宁县	2019/9/6
s7	凉山彝族自治州金阳县	2019/9/7
s8	凉山彝族自治州布拖县	2019/9/7
s9	凉山彝族自治州布拖县	2019/9/6
s10	凉山彝族自治州宁南县	2019/9/7
s11	广元市利州区	2019/8/27
s12	巴中市通江县	2019/8/9
s13	遂宁市大英县	2019/7/29
s14	乐山市夹江县	2019/8/29
s15	绵阳三台县	2019/9/8
s16	攀枝花米易县	2019/9/9

Agilent 8453 紫外分光光度计(美国 Agilent 公司);BN3000 型万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司);CP2000 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);UPTUO-I-1000TE 优普系列超纯水机(成都纯水科技有限公司);SG8200HDT 型超声波清洗机(上海冠特超声仪器有限公司);Varioskan flash 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 材料

芦丁(批号:AF9022006,纯度:98%)、金丝桃苷(批号:AF9110614,纯度:98%)、槲皮苷(批号:AF20030853,纯度:98%)、异槲皮苷(批号:AF9030801,纯度:98%)均购自成都埃法生物科技有限公司;乙腈、甲醇(色谱级,美国 TEDIA 有限公司);甲酸(分析级,成都金山化学试剂有限公司);95%乙醇(分析级,成都市科隆化学品有限公司);过硫酸钾、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(成都市科隆化学品有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,上海麦克林生化有限公司);2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS,上海麦克林生化有限公司);L-抗坏血酸(大连美仑生物技术有限公司);竹叶花椒样品来源信息见表 1,经成都中医药大学严铸云教授鉴定为芸香科植物竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC.)的干燥成熟果皮。

续表1(Continued Tab. 1)

编号 No.	收集地 Collection place	收集时间 Collection time
s17	巴中市平昌县	2019/9/10
s18	巴中市平昌县	2019/9/10
s19	巴中市平昌县	2019/9/10
s20	南充仪陇县	2019/9/11
s21	达州市渠县	2019/9/13
s22	南充市营山县	2019/9/13
s23	凉山州西昌市	2019/9/14
s24	泸州市泸县	2019/9/15
s25	四川峨眉山	2019/9/16
s26	重庆江津	2020/9/20
s27	眉山市洪雅县	2019/9/11

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定^[16]

2.1.1 对照品溶液制备

精密称取芦丁对照品 5.43 mg, 加甲醇制成 1 mL 含芦丁 0.543 mg 的溶液作为对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液制备^[17]

将竹叶花椒粉碎, 过 3 号筛, 精密称定花椒样品粉末约 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 超声提取 30 min, 称重, 用甲醇补足重量, 过滤, 取续滤液 0.1 mL 置 10 mL 容量瓶中, 加入 5% 的 NaNO₂ 溶液 0.4 mL, 摆匀; 放置 6 min 后, 再加入 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液 0.4 mL, 摆匀; 再放置 6 min 后, 加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 4 mL, 15 min 后甲醇定容。

2.1.3 最大吸收波长的选择

以甲醇按供试品制备方法制备为空白溶液, 取供试品溶液在 400~800 nm 之间扫描, 根据扫描结果选择 510 nm 作为测定波长。

2.1.4 标准曲线的制备

精密称取对照品溶液 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1.0、1.2 mL 至 10 mL 容量瓶, 以甲醇为空白, 在 510 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程: $y = 11.835x + 0.0213, R^2 = 0.999$ 。

2.1.5 样品含量的测定

取不同产地竹叶花椒样品, 按“2.1.2”项下制备溶液, 在 510 nm 处测定吸光度, 根据线性回归方程计算不同产地竹叶花椒中总黄酮含量。

2.2 4 种黄酮类成分测定

2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷对照品适量, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解定容, 混匀, 得到浓度分别为 0.1、0.2、0.062、0.154 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取竹叶花椒粉末(过 3 号筛)约 1 g, 精密称定, 加 25 mL 甲醇, 超声(500 W, 30 kHz)30 min, 放冷, 称重, 用甲醇补重, 过滤, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.3 色谱条件

采用 ZORBAX SB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 10% B; 5~10 min, 10%→17% B; 10~25 min, 17% B; 25~30 min, 17%→20% B; 30~45 min, 20% B; 45~50 min, 20%→30% B; 50~55 min, 30%→40% B; 55~60 min, 40%→58% B; 60~65 min, 58%→100% B); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长为 360 nm; 进样量为 10 μL。混合对照品溶液及竹叶花椒样品溶液的 HPLC 色谱图见图 1。

2.2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8、10 μL, 分别进样, 记录 HPLC 色谱图。以对照品的质量浓度(X, mg/mL)为横坐标, 以峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程, 结果见表 2。

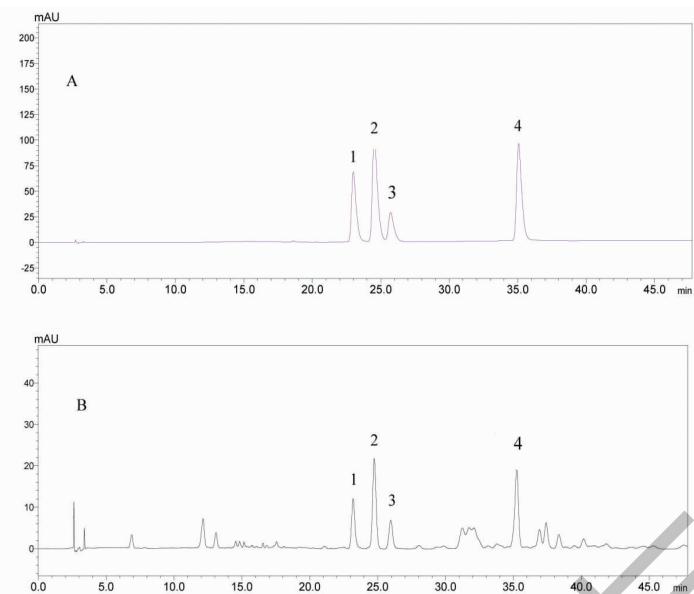


图 1 混合对照品溶液(A)及样品溶液(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference (A) and test (B) solution

注:1-芦丁;2-金丝桃苷;3-异槲皮苷;4-槲皮苷。Note:1-Rutin;2-Hyperoside;3-Isoquercitrin;4-Quercetin.

表 2 竹叶花椒中 4 种黄酮成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of four flavonoids in *Z. armatum*

成分 Component	回归方程 Regression equation	R	线性范围 Linear range(μg/mL)
芦丁 Rutin	$y = 1.997754.7501x - 38184.4271$	0.9997	0.05~1
金丝桃苷 Hypericin	$y = 5.367582.7775x - 92105.2730$	0.9997	0.1~2
异槲皮苷 Isoquercetin	$y = 2.707226.4682x - 40383.6881$	0.9995	0.0331~0.62
槲皮苷 Quercetin	$y = 3.130473.2779x - 89395.2220$	0.9996	0.077~1.54

2.2.5 方法学考察

2.2.5.1 精密度试验

在“2.2.3”色谱条件下,对同一对照品溶液重复 6 次进样进样量 10 μL,计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 0.50%、0.54%、0.50%、0.62%,表明仪器精密度良好。

2.2.5.2 重复性试验

取同一批竹叶花椒 6 份,制备成供试品溶液,在“2.2.3”色谱条件下进样,计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 1.79%、1.88%、1.65%、4.13%,表明方法重复性良好。

2.2.5.3 稳定性试验

取竹叶花椒供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h,按“2.2.3”色谱条件下进样,计算芦丁、金丝桃

苷、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 2.24%、1.91%、2.41%、3.09%,结果见表 3,表明芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5.4 加样回收率试验

取一批竹叶花椒样品 6 份,精密称定,加入适量对照品溶液,按“2.2.2”项方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定并计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷平均回收率分别为 100.97%、101.21%、99.24%、99.01%,RSD 值分别为 1.31%、3.87%、3.24%、1.98%,结果见表 4。

2.2.6 样品的含量测定

取不同产地竹叶花椒样品,按“2.2.2”项下制备样品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,根

表3 竹叶花椒中4种黄酮成分稳定性试验结果

Table 3 Stability test results of four flavonoids in *Z. armatum*

成分 Component	时间 Time (h)	峰面积 Peak area	平均值 Average	标准偏差 S	相对标准偏差 RSD (%)
芦丁 Rutin	0	290 836	288 448.3	6 474.19	2.24
	2	296 233			
	4	280 341			
	8	296 603			
	12	283 947			
	24	282 730			
金丝桃苷 Hypericin	0	464 958	470 928	9 005.08	1.91
	2	475 908			
	4	457 177			
	8	486 166			
	12	472 212			
	24	469 147			
异槲皮苷 Isoquercetin	0	141 990	143 608.8	3 464.65	2.41
	2	147 796			
	4	140 440			
	8	148 997			
	12	140 398			
	24	142 032			
槲皮苷 Quercetin	0	308 497	306 139.2	9 450.55	3.09
	2	313 746			
	4	301 431			
	8	318 144			
	12	306 374			
	24	288 643			

表4 竹叶花椒中4种黄酮类成分加样回收试验结果

Table 4 Results of recovery test of four flavonoids from *Z. armatum*

成分 Component	样品量 Sample quantity (g)	原有量 Original quantity (mg)	加入量 Addition (mg)	测的量 Measure (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
芦丁 Rutin	0.500 3	0.290 2	0.303 0	0.598 4	101.694 8	100.97	1.31
	0.500 3	0.289 6	0.303 0	0.596 0	101.112 6		
	0.500 3	0.288 7	0.303 0	0.592 7	100.340 2		
	0.500 4	0.294 0	0.303 0	0.592 0	98.353 5		
	0.500 1	0.286 2	0.303 0	0.596 0	102.263 9		
	0.500 5	0.295 8	0.303 0	0.602 0	101.051 7		
	0.500 4	0.288 5	0.303 0	0.597 5	101.993 8		
金丝桃苷 Hypericin	0.500 3	0.453 5	0.468 6	0.905 5	96.4595 1	101.21	3.87
	0.500 3	0.455 4	0.468 6	0.905 6	96.0859 8		

续表4(Continued Tab. 4)

成分 Component	样品量 Sample quantity (g)	原有量 Original quantity (mg)	加入量 Addition (mg)	测的量 Measure (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%)
异槲皮苷 Isoquercetin	0.500 3	0.452 7	0.468 6	0.935 0	102.927 5		
	0.500 1	0.455 1	0.468 6	0.943 9	104.308 6		
	0.500 5	0.472 1	0.468 6	0.953 1	102.636 4		
	0.500 4	0.462 5	0.468 6	0.953 8	104.843 3		
	0.500 3	0.117 8	0.120 2	0.233 9	96.557 8	99.13	3.24
	0.500 3	0.125 3	0.120 2	0.240 1	95.512 9		
	0.500 4	0.122 8	0.120 2	0.239 9	97.389 5		
	0.500 1	0.120 6	0.120 2	0.245 7	104.065 3		
	0.500 5	0.119 1	0.120 2	0.240 2	100.778 1		
	0.500 4	0.122 5	0.120 2	0.243 3	100.490 7		
槲皮苷 Quercetin	0.500 3	0.222 6	0.225 0	0.450 3	101.194 6	99.30	1.98
	0.500 3	0.227 1	0.225 0	0.455 7	101.597 2		
	0.500 3	0.223 1	0.225 0	0.446 6	99.342 7		
	0.500 4	0.230 1	0.225 0	0.453 7	99.367 4		
	0.500 5	0.238 3	0.225 0	0.458 7	97.972 0		
	0.500 4	0.233 5	0.225 0	0.450 3	96.349 6		

据外标一点法计算不同产地竹叶花椒中4种黄酮类成分含量结果见表5。

表5 27批竹叶花椒样品中黄酮成分含量

Table 5 Contents of flavonoids in 27 batches of *Z. armatum* (mg/g, n = 3)

样品编号 No.	总黄酮 Flavonoid	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hypericin	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin	总量 Total
s1	75.513 6	1.001 4	1.034 2	0.367 0	0.822 3	3.224 9
s2	79.495 2	1.052 1	1.094 9	0.377 2	0.862 2	3.386 4
s3	83.364 9	1.348 6	3.983 2	2.136 1	0.902 4	8.370 3
s4	84.265 0	0.957 4	1.198 9	0.351 3	0.809 8	3.317 4
s5	78.744 3	1.244 6	3.780 8	2.048 4	0.888 2	7.962 0
s6	58.005 7	0.728 0	0.806 9	0.302 1	0.516 7	2.353 7
s7	68.765 3	1.005 2	1.251 4	0.396 9	0.779 9	3.433 4
s8	44.689 8	0.484 3	0.442 7	0.165 7	0.510 2	1.602 9
s9	76.124 7	1.364 1	1.566 0	0.451 9	1.059 3	4.441 3
s10	62.240 4	0.705 7	0.759 2	0.225 1	0.570 2	2.260 2
s11	64.572 6	0.977 2	0.841 5	0.144 1	0.905 1	2.867 9
s12	90.173 1	1.086 5	0.908 5	0.236 9	0.732 1	2.964 0
s13	80.926 7	1.201 3	1.015 5	0.262 4	0.824 9	3.304 1
s14	30.460 7	0.485 6	0.552 5	0.114 9	0.565 2	1.718 2
s15	66.618 0	1.051 5	0.925 0	0.298 0	0.728 2	3.002 7
s16	86.629 2	1.172 1	0.981 5	0.304 4	0.872 2	3.330 2
s17	75.964 3	0.893 8	0.863 2	0.224 8	0.679 8	2.661 6

续表 5(Continued Tab. 5)

样品编号 No.	总黄酮 Flavonoid	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hypericin	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin	总量 Total
s18	86.491 9	0.984 7	0.835 5	0.232 9	0.697 8	2.750 9
s19	82.981 2	1.438 4	1.828 7	0.543 1	1.236 4	5.046 6
s20	39.118 2	0.861 3	1.042 7	0.206 0	0.941 6	3.051 6
s21	87.573 0	0.828 3	0.822 4	0.134 0	0.692 4	2.477 1
s22	73.200 3	0.833 8	0.755 7	0.212 8	0.632 8	2.435 1
s23	74.561 0	0.728 9	1.003 8	0.234 5	0.651 3	2.618 5
s24	77.777 8	0.973 5	0.830 8	0.234 4	0.709 9	2.748 6
s25	85.041 2	1.157 9	1.052 2	0.184 1	0.982 2	3.376 4
s26	70.749 5	1.104 7	0.981 0	0.296 6	0.775 5	3.157 8
s27	73.520 5	0.953 0	1.0906	0.1719	0.898 4	3.113 9

不同批次竹叶花椒总黄酮、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷的含量测定结果见表 5, 不同产地的总黄酮及 4 种黄酮类成分含量存在较大差异。其中, 凉山盐源(s3)竹叶花椒金丝桃苷、异槲皮苷含量最高, 凉山布拖(s8)的 4 种黄酮类成分含量总量(TL)最低, 由此可知, 凉山州竹叶花椒黄酮含量差异较大。巴中平昌(s19)的芦丁和槲皮苷含量最高, 巴中通江(s12)总黄酮含量最高。乐山夹江(s14)的总黄酮含量最低, 且 4 种黄酮类成分含量总量(TL)较低。

2.3 抗氧化活性测定

2.3.1 供试品溶液的制备

按照“2.1.2”项下的方式制备供试品原液, 再分别制成浓度为 0.004、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.48 mg/mL 的溶液。

2.3.2 Vc 溶液制备

精密称取 L-抗坏血酸(Vc)5.06 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加 95% 乙醇溶解, 定容, 摆匀, 即得 Vc 原溶液浓度为 0.506 mg/mL。再分别制成浓度为 0.000 506、0.001 265、0.002 53、0.005 06、0.006 325、0.012 65、0.025 3 mg/mL。

2.3.3 DPPH 溶液的配制

精密称取 DPPH 2.02 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加 95% 乙醇溶解, 定容, 摆匀, 即得 DPPH 溶液(浓度为 0.040 4 mg/mL)。

2.3.4 ABTS 溶液的配制^[13]

将 ABTS 配制成 6.94 mmol/L 水溶液, 将 K₂S₂O₈ 配制成 2.6 mmol/L 水溶液, 在使用前将二者混合溶液置于阴凉处 12~16 h, 使两者发生完全

充分的反应。然后用 95% 乙醇稀释原溶液, 在波长 734 nm 处检测, 直到最终测得的吸光度值在 0.70 ± 0.02 之间, 即完成 ABTS⁺溶液的配制。

2.3.5 DPPH 清除率计算

96 孔板加入样品后置于阴暗处反应 1 h 后使用 Varioskan Flash 酶标仪测定 OD 值, 测定波长选择 517 nm。DPPH 清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A₀ 表示 100 μL DPPH 溶液 + 100 μL 95% 乙醇的吸光度值; A₁ 表示 100 μL DPPH 溶液 + 100 μL 供试品/Vc 溶液的吸光度值; A₂ 表示 100 μL 供试品溶液 + 100 μL 95% 乙醇的吸光度值。

2.3.6 ABTS 清除率计算

96 孔板加入样品后置于阴暗处反应 40 min 后使用 Varioskan Flash 酶标仪测定吸光度 OD 值, 测定波长选择 750 nm。ABTS 清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A₀ 表示 25 μL 95% 乙醇 + 175 μL ABTS⁺的吸光度值; A₁ 表示 25 μL 样品 + 175 μL ABTS⁺的吸光度值; A₂ 表示 25 μL 样品 + 175 μL 95% 乙醇的吸光度值。

2.3.7 相关性分析

采用 Graphpad prism 7.0 软件^[18], 预测出 EC₅₀ 值, 结果见表 6。

由表 6 可知, 不同产地花椒甲醇提取物对 DPPH、ABTS 自由基清除能力具有一定差异。其中, 巴中通江(s12)对 DPPH 自由基的清除能力最高, 绵阳

表 6 DPPH 和 ABTS 法测定的 27 批竹叶花椒的 EC₅₀ 值Table 6 EC₅₀ of 27 batches of *Z. armatum* determined by DPPH and ABTS methods

样品编号 No.	EC ₅₀ (mg/mL)		样品编号 No.	EC ₅₀ (mg/mL)	
	DPPH	ABTS		DPPH	ABTS
Vc	0.008 1	0.0427 5	s14	0.481 1	1.525 0
s1	0.131 3	0.292 6	s15	0.078 1	0.192 5
s2	0.102 3	0.342 4	s16	0.074 8	0.238 1
s3	0.072 2	0.504 8	s17	0.076 8	0.528 9
s4	0.092 8	0.382 6	s18	0.074 7	0.370 2
s5	0.081 9	0.624 5	s19	0.074 0	0.641 4
s6	0.145 8	0.691 9	s20	0.329 3	0.588 9
s7	0.100 9	0.730 2	s21	0.062 3	0.360 9
s8	0.405 7	0.414 7	s22	0.076 5	0.919 9
s9	0.144 6	0.472 1	s23	0.087 3	0.939 7
s10	0.146 2	0.394 1	s24	0.068 1	0.790 0
s11	0.082 7	0.258 6	s25	0.062 9	0.313 3
s12	0.054 2	0.654 4	s26	0.077 3	0.554 2
s13	0.055 3	0.319 5	s27	0.082 7	0.554 6

三台(s15)对 ABTS 自由基的清除能力最高,但清除率均低于对照组。

皮尔逊相关系数被用于衡量 2 个变量之间的线性关系^[19],应用 IBM SPSS Statistics 23 软件对 27 批不同产地竹叶花椒甲醇提取物中总黄酮、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷成分含量分别与 DPPH 自由

基清除率的 EC₅₀ 值、ABTS 自由基清除率的 EC₅₀ 值计算皮尔逊相关系数。结果见表 7,总黄酮和芦丁与 DPPH、ABTS 自由基清除率的 EC₅₀ 值均呈显著负相关性,表明总黄酮与芦丁可作为评价竹叶花椒抗氧化能力的指标之一。芦丁含量与总黄酮含量相关系数较高(相关系数≥0.6),存在较高一致性。

表 7 黄酮类物质与抗氧化性相关系数

Table 7 Correlation coefficient between flavonoids and antioxidant activity

样本 Sample	皮尔逊相关系数 Pearson correlation coefficient						
	总黄酮 Flavonoid	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hypericin	异槲皮苷 Isoquercetin	槲皮苷 Quercetin	DPPH EC ₅₀	ABTS EC ₅₀
总黄酮 Flavonoids	-	0.671 **	0.299	0.23	0.388 *	-0.886 **	-0.454 *
芦丁 Rutin	0.671 **	-	0.605 **	0.493 **	0.832 **	-0.632 **	-0.401 *
金丝桃苷 Hypericin	0.299	0.605 **	-	0.979 **	0.456 *	-0.25	-0.037
异槲皮苷 Isoquercetin	0.23	0.493 **	0.979 **	-	0.291	-0.182	-0.014
槲皮苷 Quercetin	0.388 *	0.832 **	0.456 *	0.291	-	-0.33	-0.308
DPPH EC ₅₀	-0.886 **	-0.632 **	-0.25	-0.182	-0.33	-	0.457 *
ABTS EC ₅₀	-0.454 *	-0.401 *	-0.037	-0.014	-0.308	0.457 *	-

注: * 在 0.05 级别(双尾), 相关性显著; ** 在 0.01 级别(双尾), 相关性显著。

Note: * At the 0.05 level (two tailed), the correlation was significant; ** At the 0.05 level (two tailed), the correlation was significant.

3 讨论与结论

本研究采用 HPLC 法同时测定竹叶花椒中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷成分含量,采用分光光度计测定总黄酮含量,比较不同产地黄酮类成分

含量差异。结果显示,总黄酮含量范围为 30.460 7 ~90.173 1 mg/g,巴中市通江县(s12)总黄酮含量是乐山市夹江县(s14)总黄酮含量 3 倍,金丝桃苷含量范围为 0.442 7 ~3.983 2 mg/g,凉山州盐源县

(s3)金丝桃苷含量超过凉山州布拖县(s8)含量近10倍,凉山州盐源县(s3)四种黄酮类成分含量总和(TL)是布拖县(s8)的5倍,不同产地的总黄酮及4种黄酮类成分含量存在较大差异。

采用DPPH、ABTS自由基清除法试验,对21个产地的川产竹叶花椒的抗氧化活性进行分析,并采用皮尔逊双变量相关分析对黄酮成分和抗氧化活性进行相关性分析。结果表明,不同产地竹叶花椒抗氧化活性存在较大差异。巴中通江(s12)对DPPH自由基的清除能力最高,相对其他地区,3批巴中竹叶花椒甲醇提取物对DPPH的清除能力均较高,与黄酮含量测定结果一致,但绵阳三台对ABTS自由基的清除能力最好,表明不同体外抗氧化活性试验结果存在差异。

相关性分析结果,芦丁含量与总黄酮含量存在较高一致性,因此,竹叶花椒中芦丁含量可作为总黄酮含量高低的评价指标。总黄酮和芦丁与DPPH、ABTS自由基清除率的EC₅₀值呈显著负相关,说明竹叶花椒中总黄酮、芦丁抗氧化作用明显,Zhang^[20]比较了芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、山奈酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖四种单体化合物的抗氧化活性,活性顺序为金丝桃苷>芦丁>异槲皮苷,目前未见文献报道槲皮苷的抗氧化活性,芦丁和金丝桃苷含量占4种黄酮类成分含量总和的57.8%~67.3%,因此,芦丁可作为评价竹叶花椒抗氧化活性的指标之一。

在测定竹叶花椒黄酮类成分含量中,不同产地总黄酮、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷与槲皮苷含量存在明显差异。查阅文献发现,影响因素较多^[21],由于本实验采集样品产地较集中,有一定的局限性,进一步研究将收集全国不同省份竹叶花椒样品,初步探索竹叶花椒抗氧化机制,为其大健康衍生品开发提供实验依据。

参考文献

- Huang CJ. Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1997, 43(2):43.
- Wang YP, Niu NX, Yin H, et al. Research progress of *Zanthoxylum armatum* [J]. Shaanxi Forest Sci Technol (陕西林业科技), 2019, 47(5):102-107.
- Ye M. Development status and prospect of pepper industry in Sichuan [J]. China Rural Sci Tech (中国农村科技), 2020 (9):70-73.
- Xu SM, Yang S, Li ZN, et al. Analysis of volatile components from *Zanthoxylum armatum* DC. in Sichuan Province by GC-MS [J]. China Condiment (中国调味品), 2020, 45(12):124-129.
- Cheng YB, Wang QL, Yang M. Research advance of *Zanthoxylum armatum* DC [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2011, 15(1):11-13.
- Su D. Effect of *Zanthoxylum armatum* DC. inhibitory of two hyperglycemia enzyme and analgesia [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology (兰州理工大学), 2015.
- Parra SA, Gaur K, Ranawat LS, et al. An overview on various aspects of plant *Berberis lycium Royale* [J]. Amer J Pharmacol Sci, 2018, 6(1):19-24.
- Zhang XX. Study on extraction process and functional properties of volatile oil from *Zanthoxylum armatum* DC. [D]. Enshi: Hubei Minzu University (湖北民族学院), 2017.
- Kumar V, Reddy SG, Chauhan U, et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum armatum* against diamondback moth, *Plutella xylostella* [J]. Nat Prod Res, 2016, 30:689-692.
- Nooreen Z, Singh S, Singh DK, et al. Characterization and evaluation of bioactive polyphenolic constituents from *Zanthoxylum armatum* DC., a traditionally used plant [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:366-375.
- Song TT, Guo T, Zhan JB, et al. Study on the inhibition against α-glycosidase and mechanism of *Zanthoxylum armatum* DC. [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2019, 38(1):58-62.
- Murtaza S, Ghous T, Ahmed S, et al. On-line anti-acetylcholine esterase activity of extracts of *Oxystelma esculentum*, *Aerva javanica* and *Zanthoxylum armatum* [J]. J Chem Soc Pakistan, 2013, 35:800-803.
- Zhao R, Zhang MM, Chen Q, et al. Research on spectra-effect relationship of antioxidant activity of *Zanthoxylum armatum* DC. based on DPPH and ABTS methods [J]. China Condiment (中国调味品), 2020, 45(5):7-12.
- Kanwal R, Arshad M, Bibi Y, et al. Evaluation of ethnopharmacological and antioxidant potential of *Zanthoxylum armatum* DC [J]. J Chem, 2015, 15(2):1-8.
- Xu L. Research on the flavonoids and antioxidant and antibacterial activity of water extract from *Zanthoxylum armatum* DC Prodr [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), 2016.
- Mei GR. Study on the *Zanthoxylum Pericarpium* quality evaluation and quality standard of decoction pieces [D]. Chengdu University of TCM (成都中医药大学), 2016.
- Li HY. Comparative study on pharmacognosy, chemical composition and pharmacodynamics between *Zanthoxylum Bungeanum* Maxim and *Z. schinifolium* Sieb et Zucc [D]. Chengdu University of TCM (成都中医药大学), 2009.