

8种壳斗科植物多酚含量及抗氧化能力

关小丽¹, 杨子明², 颜小捷², 刘春丽³, 刘金磊², 黄永林^{2*}, 李典鹏²

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006;
3. 广西师范大学, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**从壳斗科植物中筛选多酚类成分含量高、抗氧化能力强,具开发价值的植物资源。**方法:**采用 Folin-酚法对 8 种壳斗科植物总酚的含量进行测定,通过 1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)法,2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸-6)二铵盐 ABTS 自由基清除法、Fe²⁺螯合法和 Fe³⁺还原法等 4 种方法评价其提取物的抗氧化能力,分析其总酚含量和抗氧化能力的关系。**结果:**在所选取的 8 种壳斗科植物中,红锥的总酚含量最高,为 10.61%,其次为大叶栎 10.09%。综合 4 种抗氧化能力检测结果,8 种植物都有很好的抗氧化能力,其中红锥抗氧化能力最强,抗氧化能力与总酚含量存在着较好的量效关系。**结论:**8 种壳斗科植物中红锥与大叶栎为最具开发成与抗氧化活性相关的保健品及护肤品的资源植物。

[关键词] 壳斗科; 总酚; 含量测定; 抗氧化能力

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0065-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020065

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0951.005.html>

[网络出版时间] 2014124 9:51

Content and Antioxidant Activity of Polyphenols from 8 Fagaceae Plants GUAN Xiao-li¹, YANG Zi-ming², YAN Xiao-jie², LIU Chun-li³, LIU Jin-lei², HUANG Yong-lin^{2*}, LI Dian-peng² (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 3. Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the polyphenols with high content and strong antioxidant capacity, and to encourage the development of Fagaceae resources. **Method:** The total content of polyphenols from 8 kinds of Fagaceae plants were determined by Folin-phenol method, and their antioxidant capacities were evaluated by four antioxidant methods, including 1, 1-diphenyl-2-picryl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging, 2, 2-amino-di (3-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt (ABTS) radical scavenging, Fe²⁺ chelating, and Fe³⁺ reducing assays. The relationship between the total polyphenols content and antioxidant capacity was analyzed. **Result:** The *Castanopsis hystrix* had the highest total polyphenols content (10.61%), and followed by *C. fissa* (10.09%). Comprehensive evaluation of antioxidant capacity test results showed that all plants had good antioxidant capacity, and the *C. hystrix* had the strongest antioxidant capacity. A dose-effect relationship between the antioxidant capacity and the total polyphenols content of *C. hystrix* was found. **Conclusion:** *C. hystrix* and *C. fissa* were the most potential plant resources for the health and skin care products with antioxidant activity.

[Key words] Fagaceae; total polyphenols; determination; antioxidant activity

植物多酚具有多元酚结构,且以邻位酚羟基清除羟自由基等,是天然抗氧化剂的主要来源^[1-3]。
(如连苯三酚、邻苯二酚)最为典型,具有还原性,能壳斗科 Fagaceae 植物是常绿或落叶乔木,全世

[收稿日期] 20140428(001)

[基金项目] 广西自然科学基金回国基金项目(2014jjCB20002);广西植物功能物质研究与利用重点实验室项目(ZRJJ2013-7);西部之光人才培养计划项目(科发人字[2013]165号)

[第一作者] 关小丽,硕士,从事天然产物化学及药理研究,Tel:18934771690,E-mail:gxi117g@163.com

[通讯作者] *黄永林,博士,研究员,从事天然产物化学研究,Tel:13507830572,E-mail:hyl@gxib.cn

界有8属1 047种,中国有7属320种^[4]。壳斗科植物的分布面积和蓄积量均在我国森林资源中占首位,同时具有能源植物、粮食作物、经济植物三重作用,是极具开发价值的重要植物资源^[5]。现有的文献报道,壳斗科植物均含大量多酚类物质,但是对多酚类物质含量和抗氧化能力的研究不多^[6-8]。本实验选取的8种壳斗科植物中,红锥、苦槠、米槠、大叶栎等4种植物已有化学成分及大叶栎中化合物的抗氧化和脂肪酶抑制活性研究文献报道^[8-12],其余的青冈栎、小叶青冈栎、饭甑青冈和石柯属柃木还未见有关化学成分及生物活性的文献报道。本实验采用Folin-酚法对8种壳斗科植物叶中所含总酚的含量进行测定,通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法,2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除法,Fe²⁺螯合法和Fe³⁺还原法等4种方法评价其提取物的抗氧化能力,筛选具抗氧化潜能和利用价值的壳斗科资源植物,为壳斗科植物中多酚类物质的合理开发与利用提供科学依据。

1 材料

8种壳斗科植物样品(叶)均于2013年12月采自广西植物研究所桂林植物园内,经韦发南研究员鉴定,分别为壳斗科锥属红锥 *Castanopsis hystrix*,苦槠 *C. sclerophylla*,米槠 *C. carlesii*,大叶栎 *C. fissa*,青冈属青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca*,小叶青冈栎 *C. gracilis*,饭甑青冈 *C. fleuryi* 和石柯属柃木 *Lithocarpus henryi*。没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号201303042),福林酚试剂(GOLD WHEAT),DPPH(美国Sigma公司),ABTS(美国Sigma公司),菲啰嗪(美国Sigma公司),抗坏血酸(湖南省南化化学品有限公司),乙二胺四乙酸(汕头市西陇化工厂有限公司),水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

高速中药粉碎机(瑞安市百信药器械厂),电子恒温不锈钢水浴锅(上海宜昌仪器纱筛厂),XS205型电子天平(瑞士梅特勒公司),KQ3200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RT-9100型半自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 总酚含量测定^[13-14]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品10.5 mg,置100 mL量瓶中,加80%乙醇溶解

并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.105 g·L⁻¹的没食子酸对照品溶液,放置冰箱备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(新鲜叶子剪碎,在阴凉处放置1周,粉碎,过25目筛)1.00 g,加80%的乙醇按1:50的料液比超声提取3次,每次30 min,过滤,合并滤液,滤渣洗涤3次,转移至250 mL的量瓶中并加80%的乙醇定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.3 标准曲线的制备 分别精密吸取没食子酸对照品(质量浓度0.105 g·L⁻¹)0,50,100,150,200,250 μL于试管中,加水至1 mL,加Folin试剂0.5 mL,充分混匀静置5 min后,加入质量分数为7.5% Na₂CO₃溶液1.5 mL,加水至5 mL,混匀后在40℃水浴中避光放置1 h,冷却,在760 nm波长下测定其吸光度(A),以没食子酸吸光度(Y)为纵坐标,以含量(X)为横坐标,得没食子酸标准曲线 $Y = 0.0305X + 0.0132 (r = 0.9988)$,且没食子酸在0~26.25 μg呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 取同一样品(苦槠)按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.3项下方法测定其A,连续测定6次,分别为0.573,0.573,0.573,0.573,0.573,0.574,样品总酚平均含量为6.56%(RSD 0.05%),表明该仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一样品(苦槠)按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.3项下方法测定其A,每隔30 min测定1次,结果样品在4.5 h内稳定(RSD 0.1%),表明该方法稳定性好。

2.1.6 重复性试验 取同一样品(苦槠)按2.1.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.3项下方法测定,样品总酚平均质量分数为6.54%(RSD 0.5%),表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收试验 精密称取已知含量的同一样品(苦槠)6份,按2.1.2项下方法平行制备供试品溶液,精密吸取一定量的供试品溶液,加入已知含量的没食子酸对照品,按2.1.3项下方法测定其A,结果其平均回收率为99.23%(RSD 1.3%),加样回收率试验结果见表1。

2.1.8 含量测定 精密称取样品1.00 g,按2.1.2项下方法平行制备3份供试品溶液,精密吸取一定量的供试品溶液,按2.1.3项下方法测定其A,含量测定结果见表2。

2.2 抗氧化能力测定

2.2.1 消除DPPH·能力^[15-16] 分别移取不同质量浓度的样品溶液0.6 mL于试管中,加入0.6 mL

表 1 没食子酸加样回收试验

Table 1 Recovery test of gallic acid

A	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.570	0.018 256	95.90	99.23	1.3
0.578	0.018 518	98.75		
0.579	0.018 551	99.11		
0.583	0.018 682	100.54		
0.583	0.018 682	100.54		
0.583	0.018 682	100.54		

注:样品量均为 0.009 183 mg;加入量均为 0.009 450 mg。

表 2 总酚含量测定

Table 2 Determination of total polyphenols

样品	A	质量分数 /%	平均质量分数 /%	RSD /%
红锥	0.654	10.50	10.61	0.65
	0.661	10.62		
	0.666	10.70		
苦楮	0.571	6.53	6.56	0.32
	0.573	6.56		
	0.576	6.59		
米楮	0.647	7.42	7.48	0.84
	0.649	7.44		
	0.660	7.57		
大叶栎	0.623	10.00	10.09	0.61
	0.631	10.13		
	0.632	10.14		
青冈栎	0.504	5.74	5.84	1.16
	0.512	5.84		
	0.521	5.95		
小叶青冈栎	0.279	3.11	3.15	0.91
	0.282	3.15		
	0.286	3.19		
饭甗青冈	0.512	5.84	5.89	0.53
	0.518	5.91		
	0.518	5.91		
稠木	0.456	5.19	5.22	1.00
	0.456	5.19		
	0.466	5.30		

注:样品所用的均为植物叶子(表 3~6 同)。

DPPH 95% 乙醇溶液(0.392 g·L⁻¹)混匀,37 ℃ 水浴中放置 30 min 后在 517 nm 测定其 A,按照上述方法以抗坏血酸(VC)作阳性对照。用以下公式计算对 DPPH·清除率,并计算半数清除率(IC₅₀),见表 3。

表 3 不同植物对 DPPH·的消除能力

Table 3 Elimination capacity to DPPH· in different plant

品种	IC ₅₀ /×10 ⁻³ g·L ⁻¹
VC	3.19
红锥	2.90
苦楮	6.71
米楮	5.21
大叶栎	3.51
青冈栎	6.95
小叶青冈栎	11.47
饭甗青冈	7.95
稠木	8.66

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中:A_{空白}为溶剂代替样品溶液所测得的吸光度,A_{对照}为溶剂代替 DPPH 溶液所测得的吸光度。

从表 3 可见,总酚含量与 DPPH·消除能力存在着一定的量效关系,总酚含量越高,抗氧化能力越强,锥属植物红锥(IC₅₀ 2.90 × 10⁻³ g·L⁻¹)的 DPPH·消除能力比对照品 VC(IC₅₀ 3.19 × 10⁻³ g·L⁻¹)还强,大叶栎(IC₅₀ 3.51 × 10⁻³ g·L⁻¹)的 DPPH·消除能力与 VC 接近,最弱的是小叶青冈栎(IC₅₀ 11.47 × 10⁻³ g·L⁻¹)。

2.2.2 消除 ABTS·能力^[17-18] 试管中加入不同质量浓度的样品溶液 200 μL 和 ABTS 溶液 2 mL,在室温条件下避光放置 30 min 后,于 734 nm 处测定其 A,按照上述方法以 VC 作阳性对照。用以下公式计算对 ABTS·的消除能力,见表 4。

$$\text{ABTS}\cdot\text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中:A_{空白}为溶剂代替样品溶液所测得的吸光度,A_{对照}为溶剂代替 ABTS·溶液所测得的吸光度。

表 4 不同植物对 ABTS·的消除能力

Table 4 Elimination capacity to ABTS· in different plant

品种	IC ₅₀ /×10 ⁻³ g·L ⁻¹
VC	2.11
红锥	2.98
苦楮	8.88
米楮	5.14
大叶栎	4.03
青冈栎	3.30
小叶青冈栎	11.37
饭甗青冈	8.11
稠木	10.75

8 种壳斗科植物 ABTS·消除能力与总酚含量存在着一定的量效关系,总酚含量越高,抗氧化能力越强,其中能力最强的是红锥 ($IC_{50} 2.98 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$),与 VC ($IC_{50} 2.11 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$) 的抗氧化能力接近,最弱的是小叶青冈栎 ($IC_{50} 11.37 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$),青冈栎多酚含量为 5.84%,其抗氧化能力达到 $IC_{50} 3.30 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$,这可能与其主要成分中多酚物质的类型不同有关,总体上这 8 种植物的 ABTS·消除能力不及 VC。

2.2.3 Fe^{2+} 螯合力^[19] 试管中加入不同质量浓度的样品溶液 1 mL,再加 4 mL 蒸馏水和 0.1 mL 的 $FeCl_2$ ($1 mmol \cdot L^{-1}$) 溶液,充分混匀后加入 0.1 mL ferrozine ($5 mmol \cdot L^{-1}$) 试剂启动反应,室温放置 10 min 后,在 562 nm 处测定 A,同时以 EDTA 作对比,用以下公式计算 Fe^{2+} 螯合力,见表 5。

$$Fe^{2+} \text{ 螯合力} = [(A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为溶剂代替样品溶液所测得的吸光度, $A_{\text{对照}}$ 为溶剂代替 $FeCl_2$ 溶液和 ferrozine 所测得的吸光度。

从表 5 可见,所检测提取物当中总酚含量最小的小叶青冈栎的螯合能力最强 ($IC_{50} 70.66 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$),但都远比 EDTA ($IC_{50} 2.51 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$) 的螯合能力弱。

2.2.4 还原力的测定^[20] 试管中加入 0.5 mL 不

表 6 不同植物的还原能力

Table 6 Reducing power of different plant

质量浓度 / $\times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$	红锥	苦楮	米楮	大叶栎	青冈栎	小叶青冈栎	饭甗青冈	桐木
16.28	0.122	0.088	0.098	0.122	0.059	0.038	0.063	0.031
32.55	0.292	0.181	0.186	0.252	0.125	0.086	0.110	0.084
52.08	0.459	0.278	0.303	0.389	0.233	0.143	0.209	0.111
74.40	0.664	0.412	0.448	0.580	0.284	0.191	0.287	0.205
104.17	0.913	0.567	0.642	0.780	0.404	0.284	0.413	0.295

从表 6 可见,随着样品浓度的增大,其还原能力增强,量效关系明显;样品中总酚的百分含量越高,其还原能力越强,如在 $16.28 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$ 时总酚含量最高的红锥 (10.61%) 与总酚含量最低的小叶青冈栎 (3.15%) 还原能力分别为 0.122,0.038,但都比 VC (0.199) 的还原能力弱。

3 讨论

对壳斗科 8 种植物叶中的总酚含量进行了比较,结果发现红锥和大叶栎的含量相对其他几个种

表 5 不同植物对 Fe^{2+} 螯合力

Table 5 Chelating power to Fe^{2+} in different plant

品种	$IC_{50} / \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$
EDTA	2.51
红锥	328.57
苦楮	455.77
米楮	474.37
大叶栎	389.04
青冈栎	411.86
小叶青冈栎	70.66
饭甗青冈	498.64
桐木	449.34

同质量浓度的样品溶液,然后加入 0.2 mL 磷酸缓冲液 (PBS, $0.2 mol \cdot mL^{-1}$, pH 6.6) 和 0.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液混匀,在 50 °C 水浴中反应 20 min,取出迅速冷却,并加入 1 mL 10% 的三氯乙酸混匀,4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清液 1 mL,加入 0.2 mL 1% $FeCl_3$ 溶液和 3 mL 蒸馏水混匀,5 min 后,于 700 nm 处测定 A,按照上述方法以 VC 做阳性对照,采用以下公式计算还原力,吸光值越大表示还原能力越强,见表 6。

$$\text{还原力} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) - A_{\text{空白}}$$

式中: $A_{\text{空白}}$ 为溶剂代替样品溶液所测得的吸光度, $A_{\text{对照}}$ 为溶剂代替 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液所测得的吸光度。

都要高,其中红锥的含量最高,为 10.61%,含量最低的是小叶青冈栎 3.15%。综合考察 4 种抗氧化能力测试方法所得的结果表明,8 种壳斗科植物都具有较好的体外抗氧化能力,并且抗氧化能力与总酚含量存在着一定的量效关系,在 DPPH 法,ABTS 法和 Fe^{3+} 还原法中样品含量越高,其抗氧化能力越强。在对 Fe^{2+} 螯合力检测中,与对照品相比螯合力非常弱,但是含量最低的小叶青冈栎螯合能力相对较强,其原因是否与其所含多酚类主要成分类型不同有关,有待进一步研究。

现代医学研究已经证明,很多疾病都与过剩的自由基有关,多酚通过清除机体有害自由基,阻止自由基的氧化反应,起到保护机体的作用^[21]。植物多酚作为一类储量丰富、可再生的绿色资源,已越来越多地受到关注,如金缕梅多酚和单宁酸被用于美白护肤品的配制等^[22]。本研究通过对8种壳斗科植物的总酚含量进行测定和抗氧化能力研究,为利用这些植物进行抗氧化活性相关的保健品及护肤品的研究与开发提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京:中国林业出版社, 1992:1-7.

[2] 左丽丽, 王振宇, 樊梓鸾, 等. 植物多酚类物质及其功能研究进展[J]. 中国林副特产, 2012, 120(5): 39-41.

[3] 冯丽, 宋曙辉, 赵霖, 等. 植物多酚种类及其生理功能的研究进展[J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 105-107.

[4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第22卷[M]. 北京:北京科学出版社, 1998:331-332.

[5] 周伟, 夏念和. 我国壳斗科植物资源——尚待开发的宝库[J]. 林业资源管理, 2011, 69(2): 93-96, 100.

[6] 周磊, 许敏, 杨崇仁, 等. 壳斗科植物的化学成分及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(7):260-273.

[7] 鲁玉妙, 马惠玲. 我国植物多酚研究文献计量及研究热点分析[J]. 食品科学, 2012, 33(7):290-296.

[8] Huang Y L, Tsujita T, Tanaka T, et al. Triterpene hexahydroxydiphenoyl esters and a quinic acid purpurogallin carbonyl ester from the leaves of *Castanopsis fissa*[J]. Phytochemistry, 2011, 72(16): 2006-2014.

[9] Chen H F, Tanaka T, Nonaka G, et al. Hydrolysable tannins based on a triterpenoid glycoside core, from *Castanopsis hystrix* [J]. Phytochemistry, 1993, 32(6):1457-1460.

[10] Huang Y L, Matsuo Y, Tanaka T, et al. New phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols from the leaves

of *Castanopsis sclerophylla*[J]. Heterocycles, 2011, 83(10):2321-2328.

[11] Huang Y L, Tanaka T, Matsuo Y, et al. Two new phenolic glucosides and an ellagitannin from the leaves of *Castanopsis sclerophylla*[J]. Phytochem Lett, 2012, 5(1):158-161.

[12] Huang Y L, Tsujita T, Tanaka T, et al. Isolation of ellagitannin monomer and macrocyclic dimer from *Castanopsis carlesii* leaves [J]. Heterocycles, 2012, 84(1):381-389.

[13] 赵丰丽, 张云鸽, 庞冠兰. 柿叶多酚测定条件及其抗氧化活性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11):173-176.

[14] 李文仙, 俞丹, 林玲, 等. Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J]. 营养学报, 2011, 33(3):302-307.

[15] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):36-40.

[16] 尹震花, 顾雪竹, 张一冰, 等. 三白草体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 99-102.

[17] 韩飞, 周孟良, 钱健亚, 等. 抗氧化剂抗氧化活性测定方法及其评价[J]. 粮油食品科技, 2009, 17(6): 54-57.

[18] Awika J M, Rooney L W, Wu X, et al. Screening methods to measure antioxidant activity of *Sorghum* (*Sorghum bicolor*) and *Sorghum products* [J]. Agric Food Chem, 2003, 51(11):6657-6662.

[19] 张伟, 尹震花, 彭涛, 等. 补骨脂生品及炮制品抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 250-254.

[20] Decker E A, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food [J]. J Agr Food Che, 1990, 38(3):674-677.

[21] Oyaiza M. Antioxidative activity of browning products of glucosam inefractionated by organic solvent and thin layer chromatography [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1986, 35(6):771-775.

[22] 王建新. 天然活性化妆品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1997:346-357.

[责任编辑 邹晓翠]