

木蝴蝶总黄酮的抗氧化活性

王锐*, 何娟, 袁晓春, 蒋彬, 薛梅

(昭通师范高等专科学校化学系, 云南 昭通 657000)

[摘要] 目的:研究木蝴蝶总黄酮的抗氧化活性。方法:采用二苯代苦味酰基苯肼(DPPH)法、水杨酸法和邻苯三酚自氧化法来考察其抗氧化活性,并与Vc做比较。结果:在试验浓度内,木蝴蝶总黄酮对二苯代苦味酰基苯肼自由基(DPPH·)、羟自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O₂⁻·)均有较好的清除作用,其EC₅₀分别为19.73, 231.70, 318.93 mg·L⁻¹,在9.52~57.12 mg·L⁻¹,其对DPPH·的清除率高于Vc。结论:木蝴蝶总黄酮有良好的抗氧化活性,具有进一步开发利用的价值。

[关键词] 木蝴蝶; 总黄酮; 自由基; 清除率; 抗氧化活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0102-04

Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Oroxylum indicum*

WANG Rui*, HE Mei, YUAN Xiao-chun, JIANG Bin, XUE Mei

(Chemistry Department of Zhaotong Teacher's College, Zhaotong 657000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of total flavonoids from *Oroxylum indicum*. **Method:** The antioxidant activity of the total flavonoids from *O. indicum* was determined by DPPH, salicylic acid and pyrogallol auto-oxidation. **Result:** Compared with Vc, the total flavonoids from *O. indicum* had better scavenging effect on DPPH·, ·OH, O₂⁻· in the determination of the concentration range, the EC₅₀ was 19.73, 231.70, 318.93 mg·L⁻¹ respectively; and the scavenging effect on DPPH· was better than Vc in the concentration range of 9.52-57.12 mg·L⁻¹. **Conclusion:** The total flavonoids from *O. indicum* had better antioxidant activities, so it would be valuable to be further developed and used.

[Key words] *Oroxylum indicum*; total flavonoids; free radicals; scavenging rate; antioxidant activity

木蝴蝶为紫葳科木蝴蝶属植物木蝴蝶的成熟种子,又名千层纸、玉蝴蝶等。主产于四川、贵州、云南、广西、广东等省。始载于《滇南本草》,《中国药典》2010年版收录。木蝴蝶性味苦、甘、凉,入肺、肝、胃经,有清肺利咽止咳、疏肝和胃生肌之功效具有镇痛、抗炎、抗菌、抗氧化、抑制病毒及肿瘤生长等多种药理作用。木蝴蝶中含有黄芩苷、白杨素、木蝴蝶苷A、木蝴蝶苷B、木蝴蝶定、千层纸苷等多种黄酮类物质^[1-3]。国内外对其化学成分、药理作用和临床应用等都有研究^[4],但目前木蝴蝶的抗氧化性研究在国内外都鲜见报道。本文采用二苯代苦味酰

基苯肼(DPPH)法、水杨酸法和邻苯三酚自氧化法试验木蝴蝶总黄酮对二苯代苦味酰基苯肼自由基(DPPH·)、羟自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除作用,研究木蝴蝶的抗氧化活性,为进一步研究与开发利用提供理论依据。

1 仪器与试剂

AF1604型电子天平(上海天平仪器厂), ZKF035型真空干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),RE-52D旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂),UV-VIS2802PCS型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司),Eppendorf Research移液器(德国Eppendorf股份公司)。SC-05型低速离心机(安徽科大中佳),HH-S601型超级恒温水浴锅(金坛市岸头良友实验仪器厂)。

木蝴蝶购于云南昭通中药房;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号10081-9905),DPPH

[收稿日期] 20120316(012)

[通讯作者] *王锐,硕士,讲师,从事天然产物化学研究,Tel: 13878060020, E-mail: wangrui0020@ yahoo. com. cn

(Sigma 公司,批号 D9132), V_c 、亚硝酸钠、硝酸铝、硫酸亚铁、水杨酸、双氧水、氢氧化钠、无水乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 木蝴蝶总黄酮含量测定

2.1.1 木蝴蝶总黄酮的提取 精确称取过四号筛的木蝴蝶粉末 5.0 g。先用 200 mL 60~90 °C 石油醚提取 1 h 以除去脂溶性杂质,移去石油醚,得脱脂木蝴蝶粉末,然后用体积分数 50% 乙醇 120 mL 于 50 °C 恒温水浴提取 5 h。过滤,减压浓缩,得木蝴蝶总黄酮浓缩液。用 60% 乙醇定容至 100 mL,作为样品原液置于 4 °C 冰箱保存备用^[5-6]。

2.1.2 芦丁标准曲线的制作 采用 $Al(NO_3)_3$ - $NaNO_2$ - $NaOH$ 比色法,在 510 nm 波长处测定吸光度^[7]。精确称取 105 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 12 mg,用 60% 乙醇定容至 50 mL,得 $0.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液。精密量取芦丁对照品溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL 分别置于 25 mL 具塞试管中,各加 2 mL 蒸馏水,随后加入 5% $NaNO_2$ 溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min;再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min;最后加入 1% $NaOH$ 溶液 10 mL,摇匀,显色,用蒸馏水定容至刻度摇匀,放置 15 min 后于 510 nm 处测吸光度值(以不加芦丁的空白管为对照)。以芦丁质量浓度 (X) 为横坐标,吸光度 (Y) 为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0043X + 0.0031$ ($R^2 = 0.9997$)。结果表明,芦丁在 $0.0096 \sim 0.0768 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

2.1.3 样品中总黄酮含量测定 精密量取样品溶液 1 mL 按 2.1.2 法在 510 nm 波长处测定吸光度,按以下公式计算出样品中总黄酮含量为 0.952%。

$$\text{总黄酮质量分数} = CV_1V_2/mV_3 \times 100\%$$

式中 C 为线性方程计算出的质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), m 为样品质量 (g), V_1 为提取液定容体积 (mL), V_2 为测定时反应体系总体积 (mL), V_3 为吸取测定体积。

2.2 木蝴蝶总黄酮抗氧化活性试验 采用 DPPH 法、水杨酸法和邻苯三酚自氧化法来进行抗氧化试验,并以样品的不同加入量与其对应的自由基清除率作图,拟合出样品浓度与清除率的关系方程,计算 EC_{50} 。

2.2.1 DPPH·的清除试验 精确称取 4 mg DPPH·,用 60% 乙醇溶解并定容于 250 mL 量瓶中,配制成 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH·溶液,于 0~4 °C 避光保存,备用。

将样品原液精确地配制成系列浓度的溶液。分别取样品溶液 2 mL 与 DPPH 溶液 2 mL 均匀混合,于黑暗中放置 30 min,在 517 nm 处测定其吸光度值 A_i ,同时测定 2 mL 乙醇加 2 mL DPPH·溶液的吸光度 A_c ,2 mL 样品溶液加 2 mL 乙醇的吸光度 A_j ,并以 V_c 做阳性对照进行测定。根据 $\text{DPPH} \cdot$ 清除率 = $[1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$,计算 DPPH·的清除率^[5,8-9]。不同加入量的样品对 DPPH·清除作用见图 1。

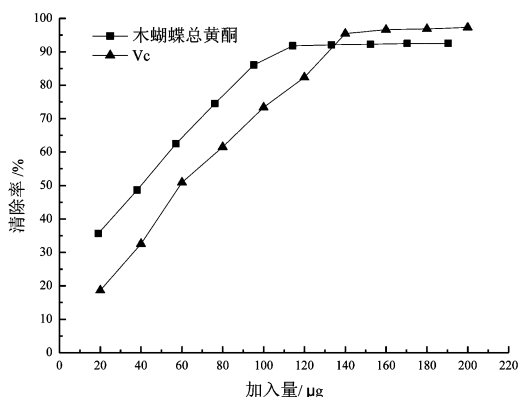


图 1 不同剂量样品对 DPPH·清除作用

由图 1 可见,在 20~200 μg 木蝴蝶总黄酮和 V_c 对 DPPH·都具有较强的清除作用。在 19.04~114.24 μg 总黄酮对 DPPH·的清除率为 35.66%~91.80%,清除能力强于 V_c 。经计算机线性拟合,在 $9.52 \sim 57.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,总黄酮对 DPPH·清除作用曲线方程为 $Y = 1.2158X + 26.011$ ($R^2 = 0.987$),式中 Y 为清除率, X 为样品质量浓度。表明总黄酮与清除率线性关系良好, EC_{50} 为 $19.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当 V_c 和总黄酮分别增至 140, 114.24 μg 后,清除率增大的幅度减缓,基本趋于稳定。

2.2.2 ·OH 的清除试验 在管中加入不同浓度的样品溶液 1 mL, $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇 1 mL, $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $FeSO_4$ 溶液 1 mL,最后加入 1 mL $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 ,启动反应,37 °C 水浴反应 30 min,以蒸馏水作参比,在 510 nm 下测定各样品溶液的吸光度。考虑到样品溶液本身的吸光度,以 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $FeSO_4$ 1 mL, $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇 1 mL,样品溶液 1 mL 和蒸馏水 1 mL 作为待测溶液的本底吸收,以 V_c 做阳性对照进行测定。由 ·OH 清除率 = $[A_o - (A_x - A_{x0})]/A_o \times 100\%$ 计算 ·OH 的清除率^[10-11]。

其中, A_o 为空白对照溶液的吸光度, A_x 为加入样品溶液后的吸光度, A_{x0} 为样品溶液的本底吸光

度。不同加入量的样品对·OH 清除作用见图2。

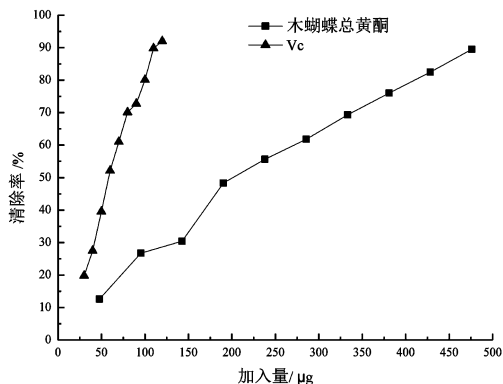


图 2 不同剂量样品对·OH 清除作用

由图2可见, V_C 和木蝴蝶总黄酮对·OH 均有清除作用, 虽后者清除能力不如前者, 但加入量在 47.6 ~ 476 μg, 木蝴蝶总黄酮对·OH 清除率随加入量的增大而增大。其清除率由 12.56% 增至 89.51%。经计算机线性拟合回归方程为 $Y = 0.17572X + 9.286$ ($R^2 = 0.9799$)。式中 Y 为清除率; X 为样品质量浓度。表明在 47.6 ~ 476 mg·L⁻¹, 木蝴蝶总黄酮对·OH 清除作用量效关系良好, 其清除·OH 的 EC₅₀ 为 231.70 mg·L⁻¹。

2.2.3 O₂⁻ 的清除试验 取 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 5 mL 于试管中, 分别加入 4 mL 不同浓度的样品溶液, 置于 25 °C 水浴中预热 20 min, 再加 3 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚溶液 1 mL, 混匀, 于 25 °C 水浴中准确反应 4 min, 后迅速加入 1 mL 10 mmol·L⁻¹ HCl 终止反应, 在波长 320 nm 处测吸光度, 以 Vc 做阳性对照进行测定。按 O_2^- 清除率 = $(A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$ 计算 O₂⁻ 的清除率^[12-13]。其中, A₀ 为空白对照溶液的吸光度, A_x 为加入样品溶液后的吸光度。不同加入量的样品对 O₂⁻ 清除作用见图3。

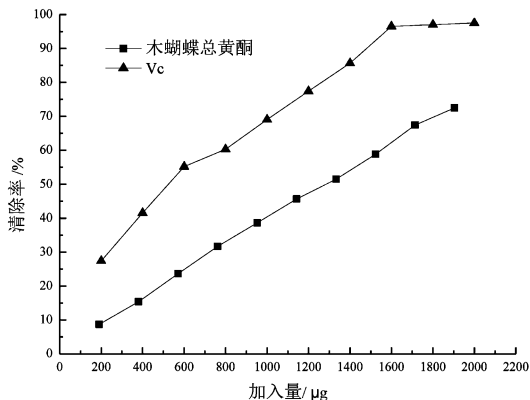


图 3 不同剂量样品对 O₂⁻ 清除作用

从图3可见, V_C 和木蝴蝶总黄酮对 O₂⁻ 均有清除作用。在 200 ~ 1 800 μg V_C 对 O₂⁻ 的清除能力强于木蝴蝶总黄酮, 当加入量高于 1 800 μg 后, V_C 对 O₂⁻ 的清除能力基本趋于平缓。木蝴蝶总黄酮质量为 190.4 μg 时, 其清除率仅为 8.73%; 质量为 1 904 μg 时, 其清除率增至 72.51%, 随着木蝴蝶总黄酮质量浓度的增大, 其对 O₂⁻ 的抑制能力增强, 在 47.6 ~ 476 mg·L⁻¹, 存在明显的量效关系, 线性拟合方程为 $Y = 0.1504X + 2.0327$ ($R^2 = 0.9985$), 式中 Y 为清除率, X 为样品质量浓度, 计算 EC₅₀ 为 318.93 mg·L⁻¹。

3 讨论

自由基是具有未成对电子的分子或离子, 其活性高, 一旦产生即迅速对 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子发生破坏性反应, 损害机体的组织和细胞, 进而引起各种病变。现已明确许多疾病或症状, 如心脏病、老年痴呆症、帕金森病和肿瘤等都与自由基有关^[14]。为了减轻自由基的危害, 寻找高效、价廉、低毒或无毒的天然抗氧化剂, 筛选具有抗自由的物质, 意义重大。

本研究采用 DPPH 法、水杨酸法和邻苯三酚自氧化法, 对木蝴蝶总黄酮进行体外自由基清除实验, 发现其对 DPPH·, ·OH, O₂⁻ 均具有清除或抑制作用。在试验浓度内, 随着木蝴蝶总黄酮浓度的增大, 其对 DPPH·, ·OH, O₂⁻ 的清除能力都增强, 并且有明显的量效关系。木蝴蝶总黄酮清除 DPPH·, ·OH, O₂⁻ 的 EC₅₀ 分别为 19.73, 231.70, 318.93 mg·L⁻¹, 其中清除 DPPH· 的活性最强。虽然在一定试验浓度内, 木蝴蝶总黄酮对·OH 和 O₂⁻ 的清除能力弱于 V_C, 但在 9.52 ~ 57.12 mg·L⁻¹, 其清除 DPPH· 能力强于 V_C。这可能是由于不同产物对同一底物或不同底物的反应机制不同, 因此表现出的清除能力不同。

通过木蝴蝶总黄酮体外抗氧化试验, 表明木蝴蝶有较强的抗氧化活性, 具备作为天然抗氧化剂的潜在开发价值。至于木蝴蝶所含黄酮化合物的结构及其与抗氧化能力之间的关系还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 兰茂. 滇南本草. 第 3 卷 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1978: 24.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 60.

蝎龙酒质量标准研究

王亚洲, 杨春旭*

(广西医科大学第四附属医院, 广西 柳州 545005)

[摘要] 目的: 建立蝎龙酒新的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)定性鉴别处方中的白芍、红花和当归; 采用高效液相色谱法对芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸进行含量测定。用 Inertsil C_{8,3} 柱, 乙腈-0.1% 磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 340 nm。结果: TLC 特征斑点明显、专属性强。芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的线性范围分别为 23.35 ~ 373.56, 5.57 ~ 89.08, 2.42 ~ 38.72 mg·L⁻¹; 平均加样回收率分别为 101.08%, 99.85%, 100.34% (n=6)。结论: 所建的新标准可用于蝎龙酒的质量控制。

[关键词] 蝎龙酒; 芍药苷; 羟基红花黄色素 A; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0105-04

Quality Standard of Xielong Liquor

WANG Ya-zhou, YANG Chun-xu*

(The No. 4 Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

[Abstract] **Objective:** To study a new quality standard of Xielong liquor. **Method:** Radix paeoniae alba, flos carthami and radix angelicae sinensis in the the formula were identified qualitatively by TLC. The

[收稿日期] 20120209(001)

[基金项目] 广西科技厅攻关基金项目(9920028); 广西柳州市科技局科技攻关基金项目(990608)

[第一作者] 王亚洲, 硕士, 主管药师, 从事药品质量标准工作, Tel:0772-3802560, E-mail: lzpharmacy@163.com

[通讯作者] * 杨春旭, 博士, 主任医师, 从事医院管理及科研工作, Tel:0772-3802560, E-mail: yangchunxu008@126.com

- [3] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 807.
- [4] 殷文光, 李曼玲, 康琛. 木蝴蝶的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1965.
- [5] 王燕, 王儒彬, 孙磊, 等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 109.
- [6] 胡殿丽. 木蝴蝶总黄酮提取工艺和脂肪酸成分研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [7] 徐保利, 管慧洁, 李慧, 等. 锦灯笼果实总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 33.
- [8] 李姣娟, 周尽花, 戴瑜, 等. 川桂叶总黄酮清除 DPPH·自由基作用的研究[J]. 中南林业科技大报, 2010, 30(10): 125.
- [9] Gupta R C, Sharma V, Sharma N, et al. *In vitro* antioxidant activity from leaves of *Oroxylum indicum* (L.) Vent.-A north Indian highly threatened and vulnerable medicinal plant[J]. Pharm Res, 2008, 1(1): 65.
- [10] 陈乃东, 周守标, 王春景, 等. 春花胡枝子黄酮类化合物的提取及清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 85.
- [11] 马稳, 吴香梅, 张凯歌. 夏桑菊提取物对自由基的清除作用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2313.
- [12] 周萍, 安东, 王朝川, 等. 食用菌复合多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 42.
- [13] 任红荣, 张卫明, 单承莺, 等. 香水莲醇提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(3): 200.
- [14] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 48.

[责任编辑 顾雪竹]