

不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性

王燕¹, 王儒彬¹, 孙磊², 王本华¹, 丁月新¹, 许丽琴¹, 田粟^{1*}

(1. 河北医科大学公共卫生学院, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学图书馆, 石家庄 050017)

[摘要] 目的: 研究不同采摘时期连翘叶的总黄酮、总酚酸含量的变化及其与清除 2,2-二苯基-1-苦肼基自由基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)能力的关系。方法: 连翘叶样品粉末脱脂后用 60% 甲醇超声波提取。采用 DPPH 自由基清除法评价不同采摘时期连翘叶的抗氧化能力。样品粗提取物总黄酮含量的测定采用亚硝酸钠法, 总酚酸含量的测定采用 Folin 试剂法。采用 SPSS 13.0 分析软件对数据进行统计学处理。结果: 不同采摘时期连翘叶的总黄酮、总酚酸含量以及清除 DPPH 自由基的能力存在着显著的差异; 3 月采摘的刚萌发幼叶表现出最高的总黄酮、总酚酸含量以及清除 DPPH 自由基的能力。相关性研究表明, 连翘叶的总黄酮、总酚酸含量与清除 DPPH 自由基能力均存在显著正相关关系, 其相关系数分别为 0.886, 0.841。结论: 3 月连翘叶的抗氧化能力和抗氧化物质含量都显著高于其他生长时期连翘叶, 这显示从抗氧化方面而言连翘嫩叶刚萌发的时期是最佳的采摘时期, 为较好的开发和利用连翘叶提供了理论依据。

[关键词] 连翘叶; 总黄酮; 总酚酸; 2,2-二苯基-1-苦肼基自由基; 抗氧化

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0109-04

Relationship Between Total Flavonoids, Total Phenolics and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activities during Growth of *Forsythia suspensa* Leaves

WANG Yan¹, WANG Ru-bin¹, SUN Lei², WANG Ben-hua¹, DING Yue-xin¹, XU Li-qin¹, TIAN Su^{1*}

(1. School of Public Health, HeBei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Hebei Medical University Library, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective:** The changes of total flavonoid content, total phenolic content and antioxidant activity

[收稿日期] 20110222(003)

[基金项目] 河北医科大学科研基金项目(2006013); 河北省科技支撑项目(09276433)

[第一作者] 王燕, 硕士生, 从事营养与食品卫生研究, Tel: 15100169139, E-mail: wangyan1983123@qq.com

[通讯作者] * 田粟, 副教授, 博士, 从事营养学以及食品功效成分分析研究, Tel: 0311-88860836, 13582115616, E-mail: sutian314@hebmu.edu.cn

[6] 王素贤, 尹双, 吴立军, 等. 女贞子化学成分的研究(II)[J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(1): 25.

[7] Phan V K, Chau V M, Hoang T H, et al. Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(11): 1109.

[8] 马文哲, 凌铁军, 张玉虎, 等. 乌檀的化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(2): 167.

[9] Sua B N, Kanga Y H, Rosa E P, et al. Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new

bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*[J]. Phytochemistry, 2003(64): 293.

[10] Hans A, Monika L, Reiner W, et al. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*[J]. Phytochemistry, 1995, 38(6): 1537.

[11] Jean W, Francois T, Dulcie A M, et al. Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*[J]. Phytochemistry, 2003(64): 845.

[责任编辑 邹晓翠]

in *Forsythia suspensa* leaves during growth were measured, and the relationship between them was also investigated. **Method:** The sample powder of *F. suspensa* leaves was defatted and extracted with 60% methanol by ultrasound-assisted method. The antioxidant abilities were estimated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The total flavonoid content in each extract was investigated by the $AlCl_3$ coloring method, the total phenolic content was investigated by the Folin-ciocalteu method. Statistical comparisons and the correlation between antioxidant component and antioxidant activities were made with the version 13.0 of SPSS soft ware. **Result:** The results showed that the total flavonoid content, total phenolic content and DPPH radical scavenging activity in leaves were significantly different during growth, the leaves picked in march had the highest the total flavonoid content, total phenolic content, and DPPH radical scavenging capacity. There is a significant positive relationship between flavonoid content, phenolic content and DPPH scavenging capacity, and their correlation coefficients are 0.886 and 0.841, respectively. **Conclusion:** The *F. suspensa* leaf on March had the highest DPPH redical scavenging activity, the total flavonoid content and the total phenolic content, this suggest that fresh young leaf can be considered as a valuable source of antioxidant products.

[**Key words**] *Forsythia suspensa*; total flavonoids; total phenolics; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); antioxidant activity

连翘作为传统的中草药,通常是以果实入药,并具有清热解毒、消肿散结之功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈肿等症^[1]。然而,作为生物资源来说,连翘叶应该更为丰富,而且在河北邯郸武安市的长寿村,用连翘叶泡茶已经成为当地人们的一种生活习惯,这提示连翘叶可能具有良好的食用安全性和某种潜在的保健作用。杨健雄等人曾报道陕西产连翘叶沸水粗提取物具有抗氧化^[2]、抗衰老^[3]和降血脂^[4]的作用。但是,到目前为止,有关连翘叶的抗氧化成分分析以及不同生长时期连翘叶的抗氧化能力的变化趋势方面尚未见详细报道。

黄酮类和酚酸类化合物是植物中广泛存在的具有抗氧化作用的次生代谢产物^[5]。本研究拟以黄酮类成分和酚酸类成分为焦点,比较不同生长时期的连翘叶(3~10月)的总黄酮和总酚酸含量,并采用 2,2-二苯基-1-苦肟基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基分析法测定其消除自由基的能力,研究评价总黄酮、总酚酸含量与自由基清除能力之间的相关关系。

1 材料

连翘叶采摘于河北医科大学校内,经本校药学院生药教研室鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的叶。芦丁(芸香叶苷)购自 SCRC 国药集团化学试剂有限公司, Folin-Ciocalteu 试剂购自德国 Merck 公司, DPPH 对照品购自美国 Sigma 公司,其他试剂均为市售分析纯。

DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥器(上海一恒科技有限公司), 4041 型电动咖啡研磨机(德国博朗公司), Sartorius CP124S 型电子天平(德国赛多利斯公司), KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), RE52CS-2 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), 752N 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 连翘叶原料的处理 实验所用连翘叶分别采摘于 2008 年 3 月到 10 月期间的每月 21 日。从同一高度处均匀摘取叶片(不含叶柄),混合后作为不同时期的样品。所取样品用潮湿的滤纸擦拭其表面后,放入温度设定为 34 ℃ 的鼓风干燥箱中,进行 24~36 h 烘干,粉碎,过筛(40 目)后,待测。

2.2 样品的制备 参照前期确定的方法^[6],精确称取不同采摘时期的连翘叶,连翘成药粉末各 0.50 g,加入石油醚脱色脱脂后,用 60% 的甲醇溶液 10 mL 超声提取 10 min,离心收集上清液,如此重复 3 次,合并滤液。将所得滤液用旋转蒸发器浓缩,加甲醇定容至 10 mL,作为样品原液置于 -18 ℃ 冰箱保存备用。

2.3 总黄酮含量测定的标准曲线 精确移取 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 芦丁的对照品溶液 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇补足 1 mL。加入蒸馏水 4 mL,混合放置 5 min 后,加 5%

亚硝酸钠溶液 0.3 mL 和 10% 氯化铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL 后, 用水定容至 10 mL, 充分混合。510 nm 处测定吸光度, 得到回归方程 $Y = 1.096X + 0.068 (R^2 = 1)$, 式中 Y 表示波长 510 nm 处的吸光度; X 表示芦丁的质量浓度。

2.4 总酚酸含量测定的标准曲线 精确吸取 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 没食子酸对照液 15, 30, 45, 60, 75, 90 μL 分别置于 3 mL 离心管中, 用甲醇补足 0.5 mL。加入 Folin-Ciocalteu 试剂 1 mL, 混合放置 3 min 后, 加 7.5% 碳酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 80 min, $1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 750 nm 处测定吸光度, 以吸光度作纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 81.14X + 0.07 (R^2 = 0.9999)$, 式中 Y 表示波长 750 nm 处的吸光度; X 表示没食子酸的质量浓度。

2.5 样品中总黄酮、总酚酸含量的测定 精密吸取样品原液 40 μL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇补足 1 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。按 2.3 标准曲线制备项下操作, 测定其吸光度。按以下公式计算连翘叶中总黄酮相当于芦丁的含量。

分别吸取连翘叶的样品原液 5 μL , 置于 3 mL 离心管中, 用甲醇补足 0.5 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。按 2.4 标准曲线制备项下操作, 测定其吸光度。按以下公式计算连翘叶中总酚酸相当于没食子酸的含量。

$$\text{总黄酮、总酚酸质量分数} = \frac{CV_1V_3}{mV_2} \times 100\%$$

式中 C 为线性回归方程计算出的质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); m 为称取的样品质量 (g); V_1 为提取液定容体积 (mL); V_2 为吸取测定体积 (mL); V_3 为测定时反应体系体积 (mL)。

2.6 清除 DPPH 自由基活性的测定 清除 DPPH 自由基能力测定参考文献[7]。取等体积不同浓度的样品甲醇提取物溶液 0.2 mL 与 7.8 mL DPPH 的 50% 丙酮溶液 (浓度为 $6.6 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混和, 室温避光反应 40 min 后, 于 515 nm 处测定其吸光度 (A_s)。同时测定 0.2 mL 甲醇溶剂与 DPPH 溶液混合后的 A_c , 以及 0.2 mL 甲醇溶剂与 7.8 mL 50% 丙酮溶剂混合后的 A_b , 每个浓度重复 3 次, 根据以下公式计算 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (A_c - A_s) / (A_c - A_b) \times 100\%$$

分别以各样品的不同质量浓度与其对应的

DPPH 自由基消除率作图, 拟合出消除率与样品浓度关系的方程, 并计算 EC_{50} 。参照文献[8], 样品清除自由基能力使用自由基清除能力的参数—AE (antiradical efficiency) 表示, $AE = 1/EC_{50}$ 。AE 越大, 其清除自由基的能力越强。

2.7 统计学相关分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理采用 SPSS 13.0 分析软件中 ANOVA 单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 说明有统计学意义。样品总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关关系采用 SPSS 13.0 分析软件中的 Pearson 简单相关系数来评价。

3 结果与分析

3.1 不同采摘时期连翘叶的总黄酮和总酚酸含量 从表 1 可以看出, 在不同采摘时期的连翘叶中, 总黄酮含量存在着较大的差异, 其中, 3 月连翘叶的总黄酮质量分数最高, 为 $15.95\% \pm 1.59\%$, 其次是 6 月和 5 月, 4 月和 9 月总黄酮含量最低, 仅为 3 月连翘叶的约 60%。不同采摘时期连翘叶的总酚酸含量具有和总黄酮含量相似的变化趋势, 测定结果见表 1。在连翘的生长过程中, 3 月连翘叶的总酚酸质量分数 $5.13\% \pm 0.22\%$, 显著高于其他时期的连翘叶。

表 1 不同采摘时期连翘叶中总黄酮、总酚酸质量分数和清除 DPPH 自由基能力的差异 ($\bar{x} \pm s$)

采摘日期/月	总黄酮 /%	总酚酸 /%	清除自由基能力 ($1/EC_{50}, \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)
3	15.95 ± 1.59^a	5.13 ± 0.22^a	26.97 ± 0.91^a
4	9.23 ± 0.44^b	2.68 ± 0.17^b	19.30 ± 3.27^b
5	10.78 ± 0.93^c	3.13 ± 0.44^b	17.03 ± 0.83^b
6	11.29 ± 0.46^d	3.08 ± 0.31^b	19.46 ± 2.10^b
7	9.81 ± 0.86^e	3.41 ± 0.44^b	18.88 ± 0.65^b
8	9.94 ± 1.00^e	3.65 ± 0.69^b	18.33 ± 1.40^b
9	9.29 ± 0.45^b	3.26 ± 0.24^b	19.03 ± 3.77^b
10	9.99 ± 0.68^e	3.87 ± 0.57^b	19.36 ± 1.25^b

注: 每组数据中不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.2 不同采摘时期连翘叶提取物清除 DPPH 自由基的能力 不同采摘时期的连翘叶提取物清除 DPPH 自由基的能力见表 1。以清除 DPPH 自由基能力 (AE) 比较, 在不同生长时期的连翘叶中, 清除 DPPH 自由基能力最大值出现在叶子的萌芽时期——3 月, 其清除自由基能力 (AE) 为 $26.97 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1}$, 3 月连翘叶清除自由基的能力是连翘成药

的 4 倍。随着叶子的不断生长,在 4 月到 10 月间采摘的连翘叶的清除自由基的能力没有显著性差异。

3.3 不同采摘时期连翘叶的总黄酮质量分数、总酚酸质量分数与 DPPH 自由基清除能力的相关关系

图 1 显示的是连翘叶的总黄酮质量分数、总酚酸质量分数与 DPPH 自由基清除能力(AE)之间的相关关系。结果显示,不同采摘时期连翘叶的总黄酮质量分数、总酚酸质量分数与清除 DPPH 自由基的能力均呈显著正相关($P < 0.01$),相关系数分别为 0.886,0.841。由此可说明,黄酮及酚酸成分在连翘叶清除 DPPH 自由基方面有积极的作用,且黄酮类成分的作用更明显。

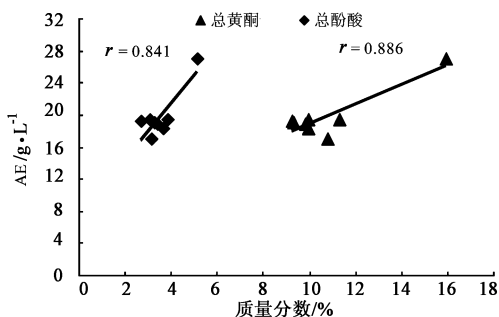


图 1 总黄酮、总酚酸质量分数与 DPPH 自由基清除能力的相关关系

4 讨论

本研究发现连翘叶中的黄酮类、酚酸类化合物的含量在不同的采摘时期存在着显著性的差异。本实验结果也显示 3 月刚萌芽的连翘幼叶的总黄酮、总酚酸含量最高,这可以用 Harbow M E^[9] 等人关于植物幼嫩部位较多黄酮、酚酸类成分的产生是植物自我保护作用的理论来解释。

DPPH 是一类较为稳定的自由基。目前有些学者认为天然抗氧化物清除 DPPH 自由基的能力在某种程度上可以反映抗氧化清除自由基的总能力^[10]。本研究发现,随着样品的总黄酮含量和总酚酸含量的增加其清除 DPPH 自由基的能力有升高的趋势。这证实了多酚类化合物具有良好的清除自由基效果及较强的抗氧化能力。而总黄酮含量与 DPPH 自由

基清除能力之间的相关性稍优于总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力之间的相关性的研究结果提示,酚类化合物和黄酮类化合物均贡献了连翘叶的自由基清除能力,而连翘叶中的黄酮类成分可能是更为重要的抗氧化成分。

由此可见,连翘叶在抗氧化、抗衰老方面有很大可挖掘的潜能;且不同采摘期的连翘叶中抗氧化成分的含量存在差异,科学选择连翘叶的采摘时期,对合理利用和开发连翘叶资源具有参考意义。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:117.
- [2] 杨建雄,朱淑云,李发荣. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学,2002,23(12):120.
- [3] 杨建雄,刘静,李发荣,等. 连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J]. 营养学报,2004,26(1):65.
- [4] 杨建雄,侯改霞,李发荣,等. 连翘叶提取物对高脂血症小鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2003,11(4):1621.
- [5] Cook N C, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources [J]. Nutr Biochem, 1996, 7: 66.
- [6] 田粟,唐龙妹,许丽琴,等. 超声波提取连翘叶总黄酮与总酚酸的实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(1):109.
- [7] Brand-williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Lebensm-Wiss Technol, 1995, 28: 25.
- [8] Concepcion S M, Jose A L, Fulgencio S C. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols [J]. J Sci Food Agric, 1998, 76: 270.
- [9] Harbow M E, Balentine D A. Tea chemistry [J]. Crit Rev Plant Sci,1997, 16, 415.
- [10] 严奉伟,朱建飞,吴谋成. 功能食品清除自由基活性评价方法及其进展[J]. 长江大学学报:农学卷,2006,3(4):214.

[责任编辑 邹晓翠]