

黄褐毛忍冬中酚酸类化合物含量及其抗氧化活性相关性

杨占南¹, 林丽娇², 何磊磊², 玉秋萍², 张妮², 宋庆发², 余正文²

(1.贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州贵阳 550001)

(2.贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001)

摘要: 为探究黄褐毛忍冬总绿原酸含量、总黄酮含量与抗氧化活性相关性; 利用 50% 甲醇恒温震荡提取黄褐毛忍冬花蕾中总绿原酸、总黄酮, 紫外分光光度法测定其含量, DPPH 比色法测定其抗氧化活性, 采用 SPSS 软件对化合物含量与抗氧化活性进行相关性分析; 结果表明: 在 0.01 水平上总绿原酸含量、总黄酮含量与黄褐毛忍冬抗氧化活性呈正相关, 相关数为分别为 0.734 和 0.683, 即绿原酸对黄褐毛忍冬的抗氧化活性贡献最大, 其次是黄酮。

关键词: 黄褐毛忍冬; 总绿原酸; 总黄酮; 抗氧化活性; 相关性

文章编号: 1673-9078(2012)9-1228-1230

The Correlation Both The Content of Phenolic Acids and Their Antioxidant Activity of *Lonicera fulvotomentosa*

YANG Zhan-nan^{1,2}, LIN Li-jiao², HE Lei-lei², YU Qiu-ping², ZHANG Ni², SONG Qing-fa², YU Zheng-wen²

(1.Key Laboratory for Information System of Mountainous Area and Protection of Ecological Environment of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

(2.School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: For explore the correlation among the content of total chlorogenic acid, total flavonoids and their antioxidant activity of *Lonicera fulvotomentosa*, the total chlorogenic acid and flavonoids was obtained with rotary shaker extraction technique, their content and antioxidant activity detected by UV and DPPH methods, respectively. The correlation both the content of phenolic acids and their antioxidant activity have been analyzed using SPSS methods. The positive correlations have been shown significant both the content of total chlorogenic acid and flavonoids and their antioxidant activity of *L. fulvotomentosa*, the correlated factors were 0.734 and 0.683 at the 0.01 level. This means that the chlorogenic acid play important role for the antioxidant activity of *L. fulvotomentosa*, followed by was flavonoids.

Key words: *Lonicera fulvotomentosa*; total chlorogenic acid; total flavonoids; antioxidation activity; correlation

黄褐毛忍冬为忍冬科植物黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa*)的干燥花蕾或带初开的花^[1], 2010 年版中国药典将黄褐毛忍冬定为山银花药材基源植物之一^[2], 是一种耐干旱, 耐瘠薄, 抗寒能力较强的药用植物^[3]。主要分布在贵州兴义、兴仁、册亨、安龙、梵净山、雷山、贞丰、盘县、绥阳、印江、榕江等地, 尤其在黔西南境内储量最大^[4]。黄褐毛忍冬的化学成

收稿日期: 2012-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(31060056); 贵州师范大学博士科研项目(11904-05032110014); 贵州省中药现代化专项(黔科合中药字[2011]5046号); 贵州省科技基金项目(黔科合J字[2011]2368号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2009]4007号)

作者简介: 杨占南(1974-), 男, 副教授, 从事仪器分析研究

通讯作者: 余正文(1973-), 男, 博士, 教授, 从植物源功能性食品开发

分主要包括挥发油、黄酮类、有机酸、三萜类、无机元素等, 药理研究表明, 黄褐毛忍冬具有抗氧化、抗菌、抗炎、解热、保肝、止血、免疫调节, 其中的有机酸及黄酮类化合物具有降低心肌耗氧量, 使冠脉、脑血管血流量增加、抗心律失常、软化血管、降血糖血脂等作用, 同时它还是一种天然的抗氧化剂, 具有清除人体中超氧离子的自由基, 抗衰老, 增加机体免疫力的生理活性^[5]。

黄褐毛忍冬作为一种传统中药, 其化学成分、药理性状、临床应用、新产品开发、资源植物等近年来屡见报道, 但是对黄褐毛忍冬的抗氧化活性成分的报道不多^[6], 有关总绿原酸、总黄酮含量与抗氧化活性之间的相关性尚未见报道, 笔者采用 50% 甲醇恒温震荡提取黄褐毛忍冬花蕾中总绿原酸、总黄酮, 紫外分

光光度法测定其含量, DPPH 比色法测定其抗氧化活性, 采用 SPSS 软件分析化合物含量与抗氧化活性之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

黄褐毛忍冬材料于 2011 年 7 月采于黔西南州境内(安龙县、兴义市、兴仁县及贞丰县), 由贵州师范大学方小平教授鉴定为忍冬科植物黄褐毛忍冬的干燥花蕾, 样品存放于贵州师范大学生命科学学院天然产物研究室。

绿原酸、芦丁(含量 > 98%, 长沙上禾生物科技有限公司); 甲醇(AR)、亚硝酸钠(AR)、硝酸铝(AR)及氢氧化钠(AR)(上海广诺化学科技有限公司), 水为双蒸水。

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 恒温培养振荡器(THY-111B; 金坛市天宏实验仪器厂); 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备

取适量芦丁、绿原酸及 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼), 加入甲醇配制成 1.0 mg/mL 芦丁、40.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 绿原酸及 0.1 mg/mL DPPH 对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的配制

精密称取黄褐毛忍冬 0.10 g 左右至 100 mL 的锥形瓶中, 加 50% 甲醇 25 mL, 摇床恒温振荡提取 24 h^[7,8], 过滤并后用 50% 甲醇定容于 25 mL, 即为供试品液。

1.2.3 标准曲线制定

黄酮标准曲线的测定^[9-10]精密吸取 0.1 mg/mL 的对照品 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 于 10 mL 的试管中, 加 0.3 mL 3% NaNO_2 溶液, 摇匀放置 6 min, 加入 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_2)_3$ 6 min 后, 再加 4 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液用水定容到 10 mL, 摇匀放置 10 min。在 510 nm 波长处, 以第一管溶液作为空白。测得不同浓度下吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 浓度为横坐标进行回归, 绘制标准曲线。标准曲线方程为 $Y=0.0119X+0.0015$, $r^2=0.9917$, 线性范围为 0.1372~0.5789 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

绿原酸标准曲线制定^[11-12]精密吸取 40.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 绿原酸的对照品 0、1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 于 10 mL 的试管中, 加甲醇定容到 10 mL。在 320 nm 波长处, 以第一管溶液作为空白。测得不同浓度下吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 浓度为横坐标进行回归, 绘制标准曲线。标准曲线方程为 $Y=0.0515X-0.0117$, $r^2=0.9983$, 线性范围为 0.1871~0.8329 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.4 样品吸光值的测定

总黄酮吸光值的测定 取上述供试品滤液 0.5 mL, 按 2.3.1 黄酮标准曲线的测定方法的得到黄褐毛忍冬 24 个样品吸光值, 按照如下公式计算总黄酮含量:

$$\text{总黄酮含量}(\%)=C \times 25 \times 100 / 0.1 \times 10^6 \quad (C \text{ 为原液浓度})$$

总绿原酸吸光值的测定: 取上述供试品滤液 1 mL, 用甲醇稀释 25 倍, 按 2.3.2 绿原酸标准曲线的测定方法的得到黄褐毛忍冬 24 个样品的吸光值, 按照如下公式计算总原酸含量:

$$\text{总绿原酸}(\%)=C \times 25 \times 100 / 0.1 \times 10^6 \quad (C \text{ 为原液浓度})$$

1.2.5 清除 DPPH 活性的测定^[6,13]

对照品溶液制备: 取供试品的溶液 1 mL 加入 50% 甲醇, 定容于 25 mL 的容量瓶中, 即供试样品稀释了 25 倍, 将实验室原配制 DPPH 浓度为 0.1 mg/mL 的对照品溶液, 稀释至 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (通过多次试验确定的适宜此黄褐毛忍冬的浓度)。

吸光度值测定: 取 3 支试管, 第 1 支试管加入稀释好的植物提取液 1 mL 与 DPPH 溶液 4 mL, 混合摇匀, 第 2 支试管加入 4 mL DPPH 溶液与 1 mL 甲醇, 混合摇匀, 第 3 支试管加入稀释好的植物提取液 1 mL 与 4 mL 甲醇, 混合摇匀。在黑暗中 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 以甲醇为空白在 517 nm 测定它们的吸光度值。按如下公式计算抑制率: 抑制率/% = $[(1-A_i-A_j)/A_0] \times 100$ (式中: A_i : 稀释 25 倍浓度提取液和甲醇; A_0 : 甲醇+DPPH; A_j : 稀释 25 倍浓度提取液+DPPH), 公式中引入 A_j 是为了消除浸提液本身颜色对测定的干扰。

1.2.6 酚酸含量与抗氧化活性分析

利用 SPSS 软件对酚酸含量与抗氧化活性相关性进行分析(结果见表 2)。

2 结果与讨论

2.1 黄褐毛忍冬中酚酸含量及其抗氧化活性

24 个不同来源的黄褐毛忍冬样品中, 总黄酮含量为 6.00%~21.60%; 总绿原酸含量为 3.10%~12.80%; 自由基清除率 24.30%~68.50%。总的看来, 样品中总黄酮及总绿原酸含量高的样品, 其清除自由基活性也普遍较高, 表明自由基清除率与总黄酮及总绿原酸含量有关。但由于总绿原酸包括绿原酸及异绿原酸, 总黄酮中包括芦丁、金丝桃苷、木犀草素-7-O- β -D-半乳糖苷、忍冬苷、苜蓿苷、金圣草素-7-O-新橙皮糖苷、苜蓿素-7-O-新橙皮糖苷和槲皮素^[4], 样品的清除自由基活性是这些化合物协同或拮抗的综合体现, 因此, 个别样品中化合物含量和抗氧化活性不一致。

表 1 黄褐毛忍冬中酚酸含量及 DPPH 自由基清除率

Table 1 The content of phenolic acids and their antioxidant activity of *L. fulvotmentosa*

样品来源	黄酮总含量/%	总绿原酸含量/%	自由基清除率/%
安龙县龙广镇果约村	20.80	9.70	38.60
安龙县龙广镇果约村	11.50	7.00	32.00
安龙县笃山乡坡井村	15.30	6.30	23.40
安龙县德卧县田坝村	10.50	5.96	28.20
安龙县笃山乡龙井村	10.10	5.60	27.00
安龙县龙广镇花木村	12.40	7.12	31.80
安龙县德卧镇钟家地村	21.60	11.70	47.70
安龙县德卧镇德卧村	12.60	6.96	36.60
安龙县德卧镇大水井村	19.12	12.80	44.30
安龙县德卧镇大水井村	12.50	7.34	30.00
安龙县德卧镇大水井村	15.20	7.39	35.30
安龙县德卧镇大水井村	11.30	5.71	31.00
安龙县德卧镇大水井村	14.60	7.80	36.50
贞丰县珉谷镇放牛坪村	12.70	7.67	34.80
贞丰县珉谷镇明滩村	19.80	6.65	32.80
贞丰县珉谷镇核桃村村	17.80	10.90	51.20
贞丰县珉谷镇坪上村	17.30	10.70	57.80
贞丰县珉谷镇马曹井村	19.90	10.80	68.50
兴义市万峰湖镇龙万村	20.00	10.70	54.10
兴义市则戎乡打场村	15.10	8.23	38.10
兴义市泥函镇泥出村	14.80	7.47	37.20
兴仁县屯角镇黄泥寨村	10.60	5.95	30.10
兴仁县巴铃镇绿荫河村	18.09	10.80	41.50
兴仁县大山乡猪槽箐村	6.00	3.10	24.30

注: 供试样品浓度 0.16 mg/mL(药材); DPPH 的浓度为

表 2 黄褐毛忍冬中酚酸含量含量及清除 DPPH 自由基活性相关性

Table 2 The correlation phenolic acids and their antioxidant activity of *L. fulvotmentosa*

Pearson Correlation	总绿原酸含量/%	总黄酮含量/%	DPPH 自由基清除率/%
总绿原酸含量/%	1	0.852(**)	0.734(**)
总黄酮含量/%	0.852(**)	1	0.683(**)
DPPH 自由基清除率/%	0.734(**)	0.683(**)	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

参考文献

[1] 贵州省中药材.民族药材质量标准[S].贵阳:贵州省科技出版社:2003
 [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第一部[M].中国医药科技出版社,2010
 [3] 黄丽华,陈训.贵州花江大峡谷黄褐毛忍冬生物学特性初步研究[J].贵州师范大学学报,2003,8(3):2

52μg/mL。

2.2 黄褐毛忍冬中酚酸含量及其抗氧化活性相关性

从酚酸含量与清除 DPPH 自由基活性相关性分析结果看,在 0.01 水平上,总绿原酸、总黄酮与 DPPH 自由基清除率的相关系数分别为 0.734 和 0.683,均为显著线性相关,但总绿原酸对 DPPH 自由基清除率贡献较总黄酮稍大一些。提示这两类化合物可能是黄褐毛忍冬抗氧化活性的物质基础。

3 结论

3.1 在 0.01 水平上总绿原酸含量、总黄酮含量与黄褐毛忍冬 DPPH 自由基清除率呈正相关,表明绿原酸和黄酮类化合物是该植物抗氧化活性的物质基础; DPPH 自由基清除率与总绿原酸、总黄酮含量的相关数分别为 0.734 和 0.683。即绿原酸对黄褐毛忍冬的抗氧化活性的影响大于黄酮。

3.2 黄褐毛忍冬中总绿原酸通常包括绿原酸和异绿原酸、文献报道的主要黄酮类化合物包括芦丁、金丝桃苷、木犀草素-7-O-β-D-半乳糖苷、忍冬苷、苜蓿苷、金圣草素-7-O-新橙皮糖苷、苜蓿素-7-O-新橙皮糖苷和槲皮素^[14]。从组分中药的观点看,黄褐毛忍冬的抗氧化活性是这些化合物相互协同或拮抗的综合表征,仅以个别化合物或几个含量的含量评价药材的质量是不科学的,也是不客观的^[15]。这些单个化合物的含量与抗氧化活性之间的相关性,以及它们的抗氧化作用机制是相互协同或拮抗,正在进一步研究。

3.2 DPPH清除自由基活性只是抗氧化活性之一,黄褐毛忍冬中总绿原酸、总黄酮的其他抗氧化活性也有待深入研究。

[4] 杨成华,刘廷慧.贵州的忍冬属植物资源[J].贵州林业科技 1999,27(2):26-29
 [5] 黄丽华,王道平,詹尚明,等.黄褐毛忍冬花蕾挥发油化学成分分析[J].贵州科学,2011,29(2):44-47
 [6] WU Lan. Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts [J]. 浙江大学学报(B卷英文版), 2007, 8(9): 673-679
 [7] Bilia AR, Magalhães PM, Bergonzi MC, et al. Simultaneous

- analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar [J]. *Phytomedicine* 2006, 13, 487-493
- [8] Jessing, KK, Cedergreen, N, Jensen J, et al. Degradation and ecotoxicity of the biomedical drug artemisinin in soil. *Environ [J]. Toxicol. Chemistry.*, 2009, 28(4): 701-710
- [9] 李春红,田吉,何兵.川渝产山银花中总黄酮和总绿原酸的含量测定[J].*临床合理药*,2009,3(2):5
- [10] 韩丽琴,董顺福,刘建华.金银花中金属元素与总黄酮含量的测定[J].*中国药房*,2007,18:33
- [11] 王颖,王华林,张文,等.贵州忍冬花叶茎中绿原酸含量的比较[J].*时珍国药*,2011,2(7):1606-1607
- [12] 刘豫东,张桂伟,刘世尧. “雷雨一号”山银花及其培育亲本绿原酸含量测定[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*,2011,36(1): 173-177
- [13] 童珊珊,徐亚萍,金花,等.绵茵陈提取液中绿原酸的测定及其抗氧化活性研究[J].*江苏中医药*,2009,41(4):57-59
- [14] HUANG Xiong, LI Song-lin, LI Ping, et al. Simultaneous determination of eight main flavonoids in Flos *Ionicerae* by high performance liquid chromatography [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2005, 40 (3): 285-288
- [15] 崔向微,张贵君.组分中药与中药现代化[J].*时珍国医国药*, 2009,20(5):1290-1291