

两种香青中总黄酮含量测定及抗氧化活性¹

王瑛^{a,b} 张本印^a 党军^{a,b} 陶燕铎^a 梅丽娟^a 王启兰^{④a}

^a(中国科学院西北高原生物研究所 青海省西宁市新宁路23号 810008)

^b(中国科学院研究生院 北京市石景山区玉泉路19号 100049)

摘要 研究对乳白香青和珠光香青进行定性、定量比较分析,建立乳白香青与珠光香青总黄酮含量测定方法并进行对比分析。采用薄层层析实验对乳白香青与珠光香青中总黄酮进行定性鉴别;用紫外分光光度法,对两种香青的总黄酮含量及其抗氧化活性进行测定。经测定,乳白香青与珠光香青中总黄酮含量分别为40.43mg/mL和34.32mg/mL;乳白香青抑制 DPPH 自由基的能力 IC_{50} 为 2.96mg/mL;珠光香青 IC_{50} 为 3.488mg/mL。

关键词 珠光香青;乳白香青;总黄酮;抗氧化活性

中图分类号: O657.32;O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2013)05-2104-05

1 引言

乳白香青 (*Anaphalis lactea* Maxim.) 与珠光香青 (*Anaphalis margaritacea* (Linn.) Benth. et Hook. f.) 均属菊科香青属多年生草本植物,主要分布于青海东部、甘肃南部及四川西北部。为常用藏药,全草用药,具有活血散瘀、祛风湿、消痞瘤、平肝潜阳、祛痰、平喘及外用止血、治风寒感冒、胃溃疡等功效^[1-4]。对开发和利用乳白香青资源有重要意义。研究表明乳白香青和珠光香青中含有大量黄酮类化合物^[5]。黄酮类化合物具有广泛的生物活性及药理作用,如它是一种很强的抗氧化剂^[6,7],可有效清除体内的氧自由基,这种抗氧化作用可以阻止细胞的退化、衰老,也可阻止癌症的发生^[8,9],对肾脏的保护作用、营养作用、对心血管的保护作用^[10]、抗辐射、抗炎^[11]、驱虫^[12]、镇痛解热及护肝等作用等,且无毒无害。对于以上两类香青的研究主要集中于对化学成分研究,除了包锦渊等^[13]对乳白香青中黄酮含量进行测量过以外,其他成分均未见报道。本文利用薄层层析法对乳白香青、珠光香青中黄酮类成分进行定性检测,用分光光度法进行定量分析。并对二者性质、含量以及抗氧化活性进行了比较研究,这对进一步研究其相关药理作用及开发西部地区药用植物资源有重要意义。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

HH-6型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);N-1001型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);752型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司)

¹ 国家自然科学基金(31101012);国家科技攻关项目(0713351614)

^④ 联系人:电话:(0971)6117264;E-mail:wql@nwipb.cas.cn

作者简介:王瑛(1987—),女,辽宁省大连市人,硕士研究生,主要从事天然药化研究工作。

收稿日期:2013-04-08;接受日期:2013-04-16

司); 101A-2E 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器有限公司); HSGF254型硅胶薄层板(青岛海洋化工厂分厂); AG204型电子分析天平(瑞士苏黎世梅特勒公司); DFY-300型摇摆式高速万能粉碎机(浙江温岭市林大机械有限公司); 芦丁标准品(中国药品生物制品检定所批号100080-200306); 三氯甲烷、甲醇和乙醇等试剂均为分析纯; 乳白香青、珠光香青(2011年8月采于青海省互助北山林场, 阴干, 粉碎, 过80目筛)。

2.2 实验方法

2.2.1 对照品储备液的制备

准确称取在120℃干燥至恒重的芦丁对照品25mg, 置于100mL容量瓶中, 加乙醇适量, 超声处理使之溶解, 冷置, 加乙醇至刻度并摇匀。准确量取20mL, 置于50mL容量瓶中, 加水至刻度并摇匀, 即得0.1mg/mL的芦丁对照品溶液。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制校准曲线, 结果见图1。

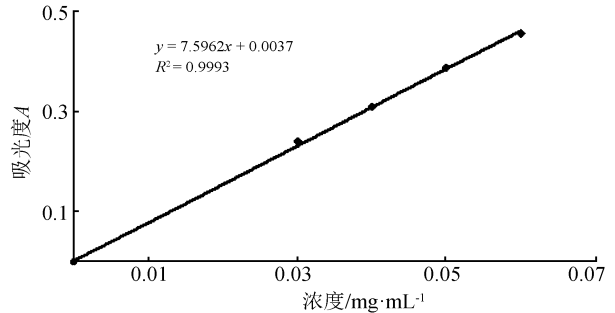


图 1 芦丁校准曲线

2.2.2 供试品储备液的制备

称取珠光香青、乳白香青粗粉(80目)各约

1.0g 置于索氏提取器中, 加入适量三氯甲烷回流提取至无色, 弃去三氯甲烷液, 药渣挥去三氯甲烷, 加甲醇继续提取至无色(约2h), 提取液蒸干, 残渣加稀乙醇溶解(30%—40%), 转移至50 mL容量瓶中, 加稀乙醇至刻度并摇匀, 作为供试品储备液。

3 结果与讨论

3.1 定性检验

分别取珠光香青、乳白香青粉各5g, 分别置于两个100mL烧杯中, 各加入50mL甲醇, 放于超声仪上进行超声提取10—20min, 过滤, 甲醇定容, 所得溶液作为样品定性溶液。

采用薄层层析法, 各取少量样品溶液, 以毛细管吸取分别在两个聚酰胺薄膜上进行点样, 两类样品均以芦丁为标准品进行点样, 将薄层板同时置于相应展开剂(乙醇:丙酮:水=7:15:16)中, 溶剂展开后热风吹干, 喷以三氯化铝试液, 热风吹干, 取出, 放于紫外灯光(365nm)下检视, 在于对照品相应的位置上, 显示相同颜色的荧光斑点。

3.2 定量测定

3.2.1 线性关系的确定

准确吸取对照品溶液0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0mL, 分别置于25mL容量瓶中, 各加水6mL, 分别加入5% NaNO₂ 1mL, 混合均匀, 放置6min; 然后加入10% Al(NO₃)₃ 1mL, 摇匀, 放置6min; 再分别加入4% NaOH 10mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置15min。以第一份溶液为空白, 在500nm处测吸光度值。得回归方程 $A = 8.8786C + 0.0267$, 相关系数 $r = 0.9976$, 线性范围: 0.009—0.0482g/L。

3.2.2 样品含量的测定

准确称取乳白香青、珠光香青粗粉各1份, 按3.2.1节处理。按3.2.1节的操作测乳白香青中总黄酮含量及珠光香青中总黄酮含量。

3.3 方法学考察

3.3.1 稳定性测定实验

准确量取两类供试品溶液各0.1mL,分别置25 mL容量瓶中,按3.2.1节操作,每5min测定,结果表明在40min内样品溶液的稳定性良好,乳白香青 RSD 为2.6%,珠光香青 RSD 为1.31%。

3.3.2 精密度考察

取对照品溶液,按3.2.1节的操作,连续测定其吸光度6次,乳白香青 RSD 为0.85%,珠光香青 RSD 为0.38%,表明用本方法精密度良好。

3.3.3 样品回收率实验

取样品液5份,分别置于25mL容量瓶中,每份中加入芦丁对照品分别3.0mL,按3.2.1节的操作,得乳白香青平均回收率为93.3%,RSD 为3.6%,珠光香青平均回收率为99.32%,RSD 为3.7%。

3.4 抗氧化活性的测定

参考 Larrauri^[14] 和 Yokozawa^[15] 的测定方法并加以改进。准确称取 DPPH 配制成0.06mmol/L 无水甲醇溶液,同时将样品用甲醇配制成一系列浓度。取各浓度下样品0.1mL 加入到3.5mL DPPH 溶液中,用无水甲醇定容至5mL,充分混匀,在室温下静置30min后,利用在515nm 波长下 DPPH 有紫红色团的特征吸收峰,以紫外分光光度法测定加入样品提取物后吸光度的变化,测其吸光度值。DPPH 自由基的清除率计算公式:清除率(%) = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$, 式中: A_0 —— 未加提取液时 DPPH 溶液的吸光度值; A —— 加入提取液测定时的吸光度值。以样品(mg/mL)对 DPPH 清除率作图(图2),就可以得到清除50% DPPH 时所需样品的量,即 IC_{50} 值。 IC_{50} 值以清除每毫克 DPPH 所需样品量表示。

3.4.1 含量测定与抗氧化活性

由表1可知,乳白香青总黄酮含量 40.43 mg mL^{-1} , IC_{50} 为 2.96 mg mL^{-1} ;珠光香青中总黄酮含量 34.32 mg mL^{-1} , IC_{50} 为 3.488 mg mL^{-1} ;由于 IC_{50} 值越小,抗氧化活性越强。故表明乳白香青较珠光香青有较好的抗氧化活性。

表 1 两种香青中总黄酮含量及 IC_{50} (mg/mL)

	总黄酮含量 (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)
乳白香青	40.43	2.960
珠光香青	34.32	3.488

3.5 讨论

3.5.1 乳白香青与珠光香青总黄酮鉴定

由实验可看出,以三氯化铝试液做显色剂,薄层层析法对香青中总黄酮进行鉴定,效果明显,表明该方法不仅简便易行,而且结果可靠。

3.5.2 乳白香青与珠光香青含量比较

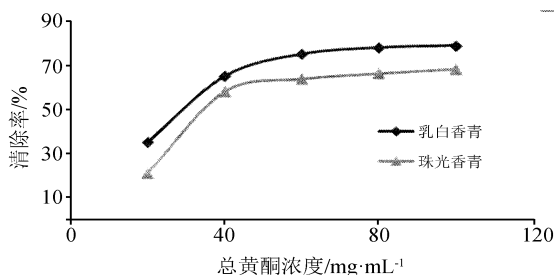


图 2 两种香青总黄酮对 DPPH 自由基抑制率

实验表明乳白香青中含有较高含量的黄酮, 同时为从香青中提取黄酮的最佳工艺研究提供了依据, 有重要应用价值。

3.5.3 方法学考察结果分析

(1) 通过用三氯甲烷和甲醇提取乳白香青、珠光香青中的黄酮, 由实验得出的测定结果, 表明提取黄酮较为完全, 提取含量较高。

(2) 用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 体系与黄酮形成络合物的化学吸光分析法, 其回归方程的相关分析和方差分析结果表明, 线性关系好, 且线性范围宽, 其方法简便快捷。

(3) 对本次试验进行稳定性、精密度以及回收率检验, 结果表明在 40min 内样品溶液的稳定性良好且本方法精密度良好, 样品回收率较高。

4 结论

本实验测定方法可以准确地进行定性、定量检测, 操作简便快速、结果可靠、重现性好, 可完善在乳白香青、珠光香青化学成分方面的研究, 并有效控制其质量, 同时也为乳白香青、珠光香青中化学成分的研究提供了一定的科学依据。

以芦丁为对照品, 亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠体系作为显色剂, 建立了用紫外分光光度法测定两种香青中总黄酮含量的方法, 并用于测定乳白香青与珠光香青中总黄酮的含量, 结果表明本法操作简便快速, 结果稳定可靠, 可用于测定香青总黄酮含量。同时对其抗氧化活性进行测定, 其 IC_{50} 值分别为 2.960 mg mL^{-1} 和 3.488 mg/mL , 说明两种香青总黄酮均具有一定的抗氧化活性。因此, 可以对这两种香青中总黄酮作为天然抗氧化剂来开发。目前国内外对乳白香青与珠光香青的研究很少, 对化学成分和相关活性的研究也仅停留在成分预试和有效成分含量分离测定方面。为了更好的开发、利用这一植物资源, 对乳白香青与珠光香青中抗氧化类物质的提取、分离及各成分间的协同作用和活性有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1996.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(32)卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [4] 袁彦平, 刘兆平, 金东庆. 乳白香青治疗气管炎的动物实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 388—392.
- [5] 任召言. 乳白香青珠光香青和翘茎凤毛菊化学成分研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [6] Yu Z, Jing J, Cheng M L *et al.* Isolation and Purification of Four Flavone C-glycosides from Antioxidant of Bamboo Leaves by Macroporous Resin Column Chromatography and Preparative High-performance Liquid Chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(3): 1326—1336.
- [7] Mojca S, Petra K, Majda H. Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities[J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(2): 191—198.
- [8] Liu SJ, Luo X, Li DX *et al.* Tumor Inhibition and Improved Immunity in Mice Treated with Flavone From *Cirsium Japonicum* DC [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(9): 1387—1393.
- [9] Li M W. New Therapeutic Aspects of Flavones: The Anticancer Properties of *Scutellaria* and Its Main Active Constituents [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35(1): 57—68.
- [10] Cheng JY, Kazunao K, Suzuki Y *et al.* Inhibitory Effects of Total Flavones of *Hippophae Rhamnoides* on Thrombosis in Mouse Femoral Artery and in Vitro Platelet Aggregation [J]. *Life Sciences*, 2003, 72(5): 2263—2271.
- [11] Yung SH, Su CH. Polymethoxy Flavones are Responsible for the Anti-inflammatory Activity of Citrus Fruit Peel [J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(3): 868—873.
- [12] Sloan A, Deborah LZ, Kenneth M *et al.* Flavones from *Struthiola Argentea* with Anthelmintic Activity in Vitro [J].

Phytochemistry, 2008, **69**(2): 541—545.

- [13] 包锦渊, 卢永昌, 白鹤松. 乳白香青中黄酮类成分的定性定量分析[J]. 分子科学学报, 2009, **25**(1): 72—74.
- [14] Larrauri JA, Yokozawa T. Effects of Temperature on the Free Radicals-cavenging Capacity of Extracts from Red and White Grape Pomace Peels[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, **46**(7): 2694—2697.
- [15] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T *et al*. In Vitro and in Vivo Studies on the Radical-scavenging Activity of Tea[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, **46**(6): 2143—2150.

Determination of Total Flavones and Antioxidant Activity of *Anaphalis lactea* Maxim. And *Anaphalis margaritacea* Benth.

WANG Ying^{a,b} ZHANG Ben-Yin^a DANG Jun^{a,b} TAO Yan-Duo^a MEI Li-Juan^a WANG Qi-Lan^a

^a(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810008, P. R. China)

^b(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

Abstract To screen the extracting method of total flavones in *Anaphalis lactea* Maxim and *Anaphalis margaritacea* Benth, this study took different methods to make a qualitative analysis, this research provide a scientific basis for further study of optimized extracting technique of total flavones. It also make full use of *Anaphalis lactea* Maxim and *Anaphalis margaritacea* Benth resources. This study used rutin as a comparison, applied spectrophotometry at 500 nm to determine the content of total flavones in. The qualitative analysis is mainly in chemical analysis ways. By comparing and analysis, The content of total flavones in *Anaphalis lactea* Maxim(40.43 mg/mL) relatively higher than in *Anaphalis margaritacea* Benth(34.32 mg/mL).

Key words *Anaphalis lactea* Maxim; *Anaphalis margaritacea* Benth; Total Flavones; Antioxidant Activity

如何上网查阅《光谱实验室》上发表的论文 (论文在发表后约1-2个月,上网才能检索到)

- 1) 在浏览器上输入“www.cnki.net”,然后回车,进入中国知网(中国期刊网)首页。
- 2) 找到“资源总库”下面的“特色导航”,点击“期刊大全”。找到“专辑导航”,点击“自然科学与工程技术”。
- 3) 页面出现后,找到红字标题“基础科学(803种期刊)”,然后点击“物理学(46)”,出现期刊的“图形方式”(即期刊的封面)后,第1页第3排左起第2位即为《光谱实验室》。或找到红字标题“工程科技 I (1032种期刊)”,再点击“化学(56)”,出现期刊的“图形方式”(即期刊的封面)后,在第1页第5排左起第1位即为《光谱实验室》。点击《光谱实验室》即可查阅有关内容。

也可以在“专辑导航”中点击“核心期刊导航”,首页出现后,找到红字标题“第四编自然科学(352种期刊)”,即可查阅自然科学各学科的“核心期刊”。若要查阅《光谱实验室》,请点击“化学/晶体学类(26)”,出现期刊的“图形方式”(即期刊的封面)后,在第1页的第3排左起第4位即为《光谱实验室》。

目前,《光谱实验室》是中国知网(中国期刊网)独家网上出版期刊,因而在其他网站上将有可能查不到本刊内容。

《光谱实验室》编辑部