

doi:10.11937/bfyy.20171150

杏花提取物抗氧化活性与其绿原酸含量的相关性

梁永锋, 王学峰, 马文霞, 李嘉会

(宁夏师范学院 化学化工学院, 宁夏 固原 756000)

摘要:以杏花提取物为试材, 维生素 C 和绿原酸标准品为对照品, 采用 $K_3Fe(CN)_6$ 测定其还原能力, *D*-脱氧核糖-铁体系法、二苯代苦味酰基自由基和邻苯三酚自氧化法测定杏花提取物中绿原酸的抗氧化活性。结果表明: 杏花提取物具有较强的还原性, 其抗氧化活性与绿原酸含量密切相关。其中杏花提取物抗羟基自由基活性高于维生素 C, 浓度为 $200 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, 其还原性可达到 64.90%; 抗超氧阴离子自由基活性略低于维生素 C, 浓度为 $200 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, 抗氧化活性为 95.26%; 抗二苯代苦味酰基自由基活性比维生素 C 略高, 当浓度为 $200 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, 抗氧化活性为 81.34%。该研究说明, 杏花提取物的还原性和抗氧化活性与绿原酸具有良好的数量关系, 杏花中的抗氧化活性物质主要是绿原酸。

关键词: 杏花提取物; 抗氧化; 绿原酸; 相关性

中图分类号: R 284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)24-0160-05

杏花属蔷薇科杏 (*Prunus armeniaca*) 树的花, 是一种民间常用中药, 杏花亦称“中医之花”。杏花中含有绿原酸、多糖、黄酮等多种对人体有益的活性成分^[1-2]。

绿原酸具有清除自由基、抑制癌细胞突变、抗肿瘤等多种药理作用^[3]。自由基是人体代谢的产

物, 主要以超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢自由基等形式存在于人体内, 许多疾病与体内自由基含量过高有关, 如动脉粥样硬化、高血压、癌症、心肌缺血灌注损伤、关节炎和类风湿等^[4]。用人工合成的抗氧化剂来消除体内的自由基和治疗疾病, 往往效果不佳, 且产生毒副作用, 因此, 近年来关于中草药的抗氧化活性研究越来越引起自由基医学的重视^[5-6]。

该研究通过近年来普遍采用的中药抗氧化活性评价方法二苯代苦味酰基自由基法, *D*-脱氧核糖-铁体系法和邻苯三酚自氧化法^[7]对杏花提取物的抗氧化活性与其绿原酸含量的相关研究, 为进一步研究杏花的药理作用和开发其药用价值提供参考。

第一作者简介: 梁永锋(1963-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为天然产物分析及应用。E-mail: qylyf338@163.com

基金项目: 宁夏回族自治区科技支撑计划资助项目(NXKJZC2015); 宁夏师范学院“六盘山资源开发与利用工程中心”资助项目(HG16-08); 宁夏师范学院科研资助项目(NXSFBY1789)。

收稿日期: 2017-07-10

results showed that the microwave time was 5 minutes, optimum pectin microwave power was 400 W, solvent-solid ratio was $8 : 1 mL \cdot g^{-1}$ and $Al_2(SO_4)_3$ usage was 0.7 g, and the extractive yield of the pectin in navel orange peel was 22.33%. The extraction technology of pectin from Fuchuan navel orange peel prepared by microwave assisted salting out method could provide necessary technical support for industrial production.

Keywords: microwave assisted; salting out method; Fuchuan navel orange peel; pectin

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试杏花采自宁夏固原市原州区古雁岭,将新鲜的杏花用蒸馏水清洗后,沥干,放入恒温箱中,在 60 ℃ 烘箱烘干至恒重,自然晾干,粉碎,过 80 目筛,备用。

供试试剂:绿原酸标准品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200413,质量分数 99%);DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,Sigma 公司)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、盐酸、邻苯三酚、三氯乙酸、氢氧化钾、无水乙醇、水杨酸、抗坏血酸、硫代巴比妥酸(TBA)、EDTA、 FeCl_3 、 H_2O_2 、 FeSO_4 等均为国内产分析纯。

供试仪器:FW-177 中草药粉碎机;UV-1750 型紫外分光光度计(日本岛津);XH300A 微波催化合成/萃取仪(北京祥鸽科技发展有限公司);L-S 电子天平(梅特勒-托利多仪器公司);RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣升华仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的建立

准确称取 110 ℃ 干燥的绿原酸标准品 1.0 mg,用乙醇溶解并定容至 100 mL,配制成 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的绿原酸标准品储备液。取 0.5 mL 绿原酸标准品储备液于 10 mL 容量瓶中,加乙醇定容,摇匀,用 UV-1750 型紫外可见分光光度计在 250~500 nm 波长范围内扫描,确定绿原酸标准品的最大吸收波长为 331 nm。用乙醇将绿原酸标准品配制成质量浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,在最大吸收波长 331 nm 处测定其吸光度值(A),并以吸光度 A 为纵坐标、绿原酸质量浓度 C($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线^[2],得到回归方程: $A=0.0357C+0.01$, $R^2=0.9994$,表明绿原酸标准品在测量的浓度范围内具有良好的线性关系。

1.2.2 杏花提取物中绿原酸的提取

参考文献[2]的方法,称取 10 g 经过预处理的杏花样品于 500 mL 锥形瓶中,用 250 mL 60% 的乙醇浸润 30 min,在功率为 80 W 下超声辐射 80 min,过滤,将滤液收集,相同条件下再提取 1 次,将 2 次滤液合并。将滤液在 60 ℃ 下减压浓缩

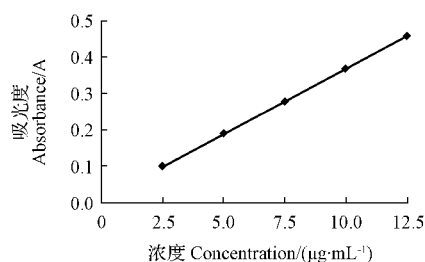


图1 绿原酸标准曲线

Fig. 1 Chlorogenic acid standard curve

干燥,得到绿原酸粗提物 0.445 g。

1.2.3 杏花提取物中绿原酸的定性鉴定

精确称取在 110 ℃ 干燥恒重后的绿原酸标准品 2 mg,在棕色试剂瓶中,用 10 mL 甲醇溶解,配制成浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照溶液。称取 2 mg 杏花提取物,将其在棕色试剂瓶中用 10 mL 甲醇溶解作为供试样品溶液。分别取对照液和供试液各 10 μg ,点于同一硅胶薄层板上,用(14:1:1)乙酸丁酯-甲酸-水为展开剂,在 365 nm 紫外灯下观察,薄层色谱上对照品和供试液在相同位置,显示相同斑点,再在薄层色谱上喷 2% FeCl_3 溶液,发现对照液、供试液在相同位置显示清晰的亮黄色斑点,说明杏花提取物中含有绿原酸。

1.2.4 杏花提取物中绿原酸含量的测定

准确称取 0.1 g 杏花提取物,用 70% 乙醇溶解并容至 100 mL,配制成杏花提取物样品溶液。取杏花提取物样品溶液 1.00 mL,用乙醇稀释并定容至 100 mL,用 UV-1750 型紫外可见分光光度计在波长 331 nm 处,测得其样品溶液的吸光度值为 0.329。依据绿原酸标准曲线方程计算其浓度,绿原酸的含量(%) = 杏花提取物样品溶液的体积(mL) × 根据标准曲线计算的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) × 稀释的倍数/杏花提取物质量(g) × 100,得到杏花提取物中绿原酸含量为 89.36%。

1.2.5 杏花提取物还原能力的测定

采用普鲁士兰法测定还原能力,分别取 2.5 mL 浓度为 5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 绿原酸粗提物样品(空白用蒸馏水代替,其它试剂下同)溶液,加入 2.5 mL 的磷酸盐缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.6)及 1% 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液 2.5 mL,于 50 ℃ 水浴反应 20 min 后急速冷

却,加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,取反应液 5 mL。加入 5 mL 的 H_2O 和 0.10% $FeCl_3$ 溶液 1 mL,混合均匀,10 min 后于 700 nm 处测定其吸光度值^[8],以水为空白,吸光度值越大,还原能力越强。用同样方法相同的浓度分别进行抗坏血酸和绿原酸标准品的阳性对照试验。

1.2.6 杏花提取物清除 $\cdot OH$ 的活性

采用 *D*-脱氧核糖-铁体系法测定 $\cdot OH$,取 0.4 mL $50\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ KH_2PO_4 -KOH 缓冲液,分别加入 5、10、20、50、100、200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的绿原酸粗提物样品溶液,0.1 mL $1.04\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ EDTA 溶液,0.1 mL $20\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ $FeCl_3$ 溶液,0.1 mL $10\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ H_2O_2 ,0.1 mL $60\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ DR(其中对照不加),0.1 mL $20\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 抗坏血酸,使反应体系最终体积为 1 mL,37 $^{\circ}C$ 下保温 1 h,取出迅速加入 25% 盐酸 1 mL 终止反应,加入 1 mL 1% TBA,沸水浴煮沸 15 min,立即冷却,若有混浊加入 3 mL 正丁醇萃取,在 532 nm 下测其吸光度值^[9-10]。用同样的方法相同的浓度分别进行抗坏血酸、绿原酸标准品的阳性对照试验。 $\cdot OH$ 清除率(%) = $(A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0 \times 100$ 。式中, A_0 空白吸光度; A_1 加入清除剂和 DR 后吸光度; A_2 样品本身吸光度(不加 DR)。

1.2.7 杏花提取物清除 DPPH \cdot 的活性

分别取浓度为 5、10、20、50、100、200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 绿原酸粗提物样品溶液 1 mL 向其中加入 2 mL $0.2\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ DPPH \cdot 无水乙醇溶液,常温下黑暗处放置 30 min,在 517 nm 下测得吸光度值为 A_x ;以 2 mL 95% 乙醇溶液代替 DPPH \cdot 溶液为空白组;2 mL $0.2\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ DPPH \cdot 乙醇溶液与 2 mL 蒸馏水为对照组;同时以等体积蒸馏水和 95% 乙醇混合液作为空白调零^[11]。每浓度重复 3 次,取吸光度的平均值。用同样方法相同的浓度分别进行抗坏血酸、绿原酸标准品的阳性对照试验。 $DPPH\cdot$ 清除率(%) = $(A_0 - (A_x - A_y)) / A_0 \times 100$ 。式中, A_0 为对照组吸光度值, A_y 为空白组吸光度值, A_x 为加入杏花多糖后溶液的吸光度值。

1.2.8 杏花提取物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的活性

采用邻苯三酚自氧化法测定 $O_2^{\cdot -}$,取 2.5 mL $50\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ pH 8.34 的磷酸盐缓冲溶液 PBS,分别加入 2 mL 浓度为 5、10、20、50、100、

200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 绿原酸粗提物样品溶液,再加入 0.25 mL $10\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的邻苯三酚,保持溶液总体积为 4.5 mL,均匀混合,25 $^{\circ}C$ 下保温,在 4 min 时加入 $10\text{ mol} \cdot L^{-1}$ HCl 1 滴,使反应终止,用相同浓度的样品液为参比,在波长 325 nm 处测其吸光度值^[8,11],得到样品的吸光度值 A_1 。用蒸馏水代替样品溶液,加入与测试样品相同的其它试剂,以 pH 8.34 的 PBS 溶液做参比,在波长 325 nm 处测其吸光度值,得到空白吸光度值 A_0 。用同样方法相同的浓度分别进行抗坏血酸、绿原酸标准品的阳性对照试验。 $O_2^{\cdot -}$ 消除率(%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 杏花提取物的还原能力

图 2 表明,维生素 C、杏花绿原酸粗提物和绿原酸标准品对 Fe^{3+} 具有还原能力,浓度小于 20 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时还原能力均比较弱,但随着浓度的增大其还原能力均迅速逐渐增强。且在浓度较低范围内维生素 C 的还原能力明显大于杏花绿原酸粗提物和绿原酸标准品,当浓度大于 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,随着还原能力都在增强的同时,三者的还原能力逐渐接近。

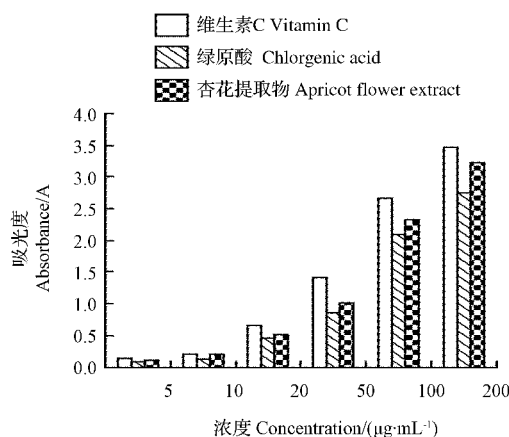


图 2 维生素 C、绿原酸和杏花提取物的还原性

Fig. 2 Reducibility of vitamin C, chlorogenic acid and apricot flower extract

2.2 杏花提取物对 $\cdot OH$ 的抗氧化活性

图 3 表明,在 5~200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 范围内,杏花绿原酸粗提物、绿原酸标准品和维生素 C 对 *D*-脱

氧核糖-铁体系产生 $\cdot\text{OH}$ 抗氧化活性不同,相同浓度其抗氧化活性杏花绿原酸粗提物>绿原酸标准品大于维生素C。而且随着浓度的增大,抗氧化活性增大,当浓度 $>100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗氧化活性基本稳定,浓度为 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 其抗氧化活性分别为64.90%、49.92%、19.68%。同时发现杏花绿原酸粗提物和绿原酸标准品对 $\cdot\text{OH}$ 抗氧化活性变化趋势一致。

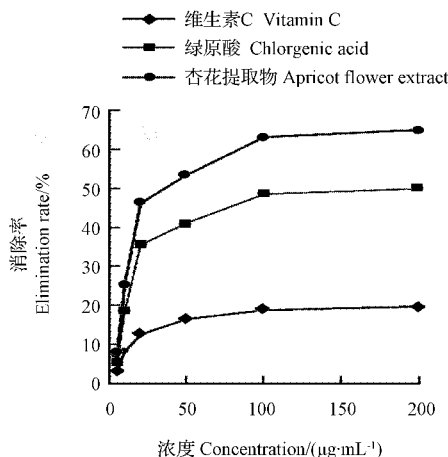


图3 维生素C、绿原酸和杏花提取物对 $\cdot\text{OH}$ 抗氧化活性的影响

Fig. 3 Effects of vitamin C, chlorogenic acid and apricot flower extract on $\cdot\text{OH}$ antioxidant activity

2.3 杏花提取物对DPPH·的抗氧化活性

图4表明,在 $5\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,杏花绿原酸粗提物、绿原酸标准品和抗坏血酸3种物质对DPPH·自由基均具有强的抗氧化活性,随着浓度的增大,其抗氧化活性增强。相同浓度下,杏花绿原酸粗提物、绿原酸标准品活性均大于维生素C,浓度为 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其抗氧化活性分别为81.34%、78.42%、74.65%,且杏花提取物和绿原酸对DPPH·的抗氧化活性具有良好的效量关系。

2.4 杏花提取物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抗氧化活性

由图5可知,杏花绿原酸粗提物、绿原酸标准品和维生素C对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 具有一定的抗氧化活性,且随着浓度的增大,其抗氧化活性逐渐增大,效量关系明显。在相同的浓度下,维生素C对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抗氧化活性明显大于杏花绿原酸粗提物和绿原酸标准品。当浓度为 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,维生素C对

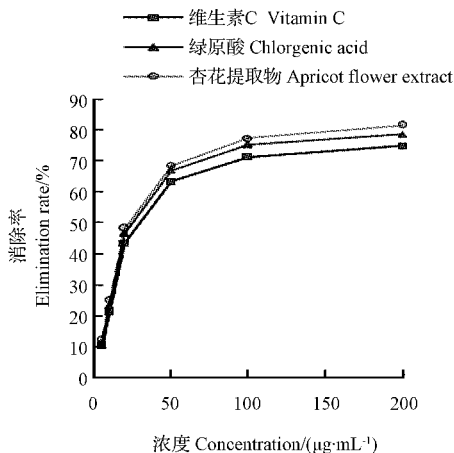


图4 维生素C、绿原酸和杏花提取物对DPPH·抗氧化活性的影响

Fig. 4 Effects of vitamin C, chlorogenic acid and apricot flower extract on DPPH· antioxidant activity

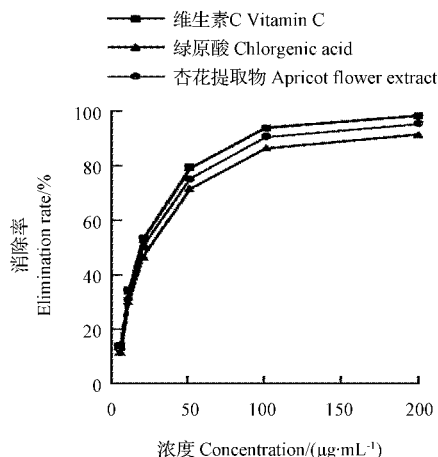


图5 维生素C、绿原酸和杏花提取物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 抗氧化活性的影响

Fig. 5 Effects of vitamin C, chlorogenic acid and apricot flower extract on $\text{O}_2^{\cdot-}$ antioxidant activity

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抗氧化活性几乎接近100%,杏花绿原酸粗提物的抗氧化活性为95.26%,绿原酸标准品的抗氧化活性为91.35%。

3 讨论与结论

该研究采用体外化学模拟法首次在常温下对杏花绿原酸粗提物抗氧化活性研究进行了探讨,并以绿原酸标准品和抗坏血酸为对照,试验表明

杏花提取物对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 具有较强的抗氧化活性,并且与其浓度具有良好的剂量关系,说明杏花中的抗氧化活性物质主要是绿原酸;但由于中药材成分的复杂性,往往含有多种抗氧化活性成分,因此,不同的提取方法、溶剂和条件使最终成分、含量不同,导致评价效果产生差异;同时,体外化学模拟法与人体自身的抗氧化作用机理有所差异,关于杏花绿原酸能否作为人体抗氧化活性物质还需要进一步的探讨和进行大量的动物及临床试验研究;另外,关于杏花绿原酸抗氧化机制、抗氧化活性的稳定性及杏花中其它抗氧化活性成分的协同作用方面还需要继续进行探索和研究。

参考文献

- [1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [2] 梁永锋. 超声波提取杏花中绿原酸工艺的优化[J]. 湖北农业科学,2016,55(15):3965-3967,3874.
- [3] 王辉,田呈瑞,马守磊. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5):341-345.
- [4] 金善华,金光石. 中药材抗氧化剂的研究概况和发展趋势[J]. 中国中医药现代远程教育,2011,9(12):157-160.
- [5] 叶汉侠,王蕾材. 18种中草药抗氧化活性的比较研究[J]. 浙江万里学院学报,2004,17(5):111-113.
- [6] 刘方,武子斌,牛淑敏,等. 中药材抗氧化及自由基清除活性的研究[J]. 中国药学杂志,2001,36(7):442-445.
- [7] 李秋红,李廷利,黄莉莉,等. 中药抗氧化的作用机理及评价方法研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1257-1258.
- [8] 关炳峰,谭军,周志娣. 金银花提取物的抗氧化作用与其绿原酸含量的相关性研究[J]. 食品工业科技,2007,28(10):127-129.
- [9] 刘彬,黄文,张洁,等. 家蝇幼虫提取物清除氧自由基的作用[J]. 昆虫知识,2006,43(1):85-88.
- [10] 金杰,李志西,张锋,等. 桑椹醋提取物对二苯代苦味酰基自由基($\text{DPPH}\cdot$)的清除作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(3):135-137.
- [11] 贾之慎,杨贤强. 茶多酚清除活性自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的分光光度法研究[J]. 中国茶叶,1993,19(1):25.

Correlation Between Antioxidant Activity of Apricot Flower Extract and Its Chlorogenic Acid Concentration

LIANG Yongfeng, WANG Xuefeng, MA Wenxia, LI Jiahui

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia Normal University, Guyuan, Ningxia 756000)

Abstract: Taking apricot as test material, antioxidant activity of chlorogenic acid extracted from apricot flower was measured by *D*-deoxyribose-iron system method along with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl pyrogallol autoxidation method, while vitamin C and chlorogenic acid were used as reference substance and reduction ability of the extract was measured by using $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. The results showed that apricot flower extract had strong reducibility, and its antioxidant activity was closely related to chlorogenic acid content. The extract had higher anti-hydroxyl and anti-DPPH \cdot activity but lower anti-superoxide anion activity than vitamin C. Its reducibility with concentration of $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for hydroxyl was as high as 64.09%, and antioxidant activity was 95.26% and 81.34% for superoxide anion and DPPH \cdot , respectively. This study showed that the main extract of apricot flower was chlorogenic acid and its concentration largely determined reductive and antioxidant activities of the extract.

Keywords: apricot blossom extraction; antioxidant; chlorogenic acid; correlation