

芍药花粉提取物的抗氧化能力研究

黄海霞,张亚坤,张丹丹,冯 蒙,安梦晓

(河南科技大学 农学院,河南 洛阳 471003)

摘要: 为了探究芍药花粉提取液的抗氧化能力和主要活性物质的含量,为开发芍药花粉在天然抗氧化剂和化妆品等相关领域的应用提供一定的理论和试验基础,利用不同体积分数的乙醇溶液制备芍药花粉提取液,测定其主要抗氧化组分黄酮、多酚的含量,通过研究不同质量浓度芍药花粉提取液对 DPPH 自由基、羟自由基的清除能力,分析芍药花粉提取液的抗氧化效果与其多酚、黄酮含量之间的相关性。结果表明,芍药花粉提取液对 DPPH 自由基、羟自由基具有一定的清除能力,清除率与提取液质量浓度之间呈现出良好的剂量依赖效应。在高质量浓度(0.8 g/L)芍药花粉提取液中,70%乙醇提取液清除 DPPH 自由基的效果最佳,清除率可达 79.88%,而 30%乙醇提取液对羟自由基的清除能力最强,清除率达到 93.82%。70%乙醇提取液中黄酮、多酚含量均显著高于 30%乙醇、100%乙醇提取液中的含量。研究认为,70%乙醇是制备芍药花粉提取液较为理想的溶剂。芍药花粉提取液有着较强的抗氧化能力,其抗氧化性与黄酮含量呈线性正相关,而与多酚含量关系不密切。

关键词: 芍药; 花粉提取液; 抗氧化能力; DPPH 自由基; 羟自由基

中图分类号: S682.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0117-04

Study on Antioxidant Capacity of Peony Pollen Extracts

HUANG Hai-xia, ZHANG Ya-kun, ZHANG Dan-dan, FENG Meng, AN Meng-xiao

(Agricultural College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: To explore antioxidant activity of the extracts from peony pollen, and to reveal the experimental and theoretic basis for exploitation of peony pollen in natural antioxidant and cosmetics applications, the extracts were prepared from peony pollen by different volume fraction of ethanol, and the contents of flavonoids and polyphenols were determined. Antioxidant capacities of different extracts were evaluated by DPPH and hydroxy free radicals elimination methods. Also, the relations between their contents and antioxidant activities were analyzed. The extracts had certain scavenging effects on DPPH and hydroxy free radicals, and also the scavenging capability was enhanced with the increase of concentration. Under the high concentration(0.8 g/L), the 70% ethanol extract gave the best result of elimination of the DPPH free radical, scavenging rate achieving 79.88%. The elimination of the hydroxyl free radical of 30% ethanol extract was the strongest, achieving 93.82%. The contents of flavonoids and polyphenols in 70% ethanol extract were superior to the others obviously. 70% ethanol was ideal solvent to prepare the extract from peony pollen. There was a remarkable linearity between antioxidant capacities and the contents of flavonoids, but the relation was not close between antioxidant capacities and polyphenols.

Key words: peony; pollen extract; antioxidant capacity; DPPH free radical; hydroxy free radical

收稿日期:2012-05-21

基金项目:河南科技大学 SRTP 项目(No2010182)

作者简介:黄海霞(1977-),女,陕西清涧人,讲师,硕士,主要从事天然植物的抗氧化研究。E-mail: huanghaixia_228@163.com

芍药是中国的传统名花,有着与“花王”牡丹相媲美的称号“花相”。芍药是非常有价值的药用和观赏植物,已成为洛阳的优势产业之一。目前对芍药花粉的研究主要集中在花粉活力测定与花粉离体培养方面,关于其活性成分及抗氧化活性等方面的研究却鲜有报道。近年来,花粉食品层出不穷,作为一种新型的营养保健佳品风靡全球,被称为“完全营养食品”^[1]。花粉食品还被证实是一种功效卓著的体力和耐力的增强剂,具有强大的抗衰老功能及恢复青春活力的作用^[2]。花粉种类不同,所含成分及抗氧化能力也有很大区别。鉴于此,对芍药花粉中主要的抗氧化组分黄酮、多酚含量进行测定,并分析其不同质量浓度醇提液的抗氧化活性,旨在对芍药花粉的抗氧化机制进行较为系统和深层次的研究,将天然抗氧化剂的研究推向新的起点,并为其应用奠定理论和试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源与处理

2010 年 5 月中旬在洛阳国际牡丹园采集芍药花粉。将采集到的花粉置于烘箱内 40℃ 烘干,过筛孔内径为 420 μm 的金属筛,置入棕色广口瓶中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 芍药花粉提取液的制备 准确称取芍药花粉 0.40 g 3 份置入干燥的三角瓶中,记号标记。分别加入体积分数为 30%、70%、100% 的乙醇 10 mL,摇匀,密封后 65℃ 恒温振荡水浴提取 0.5 h。然后转移至离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即为质量浓度为 40 g/L 的提取液,以相应体积分数的乙醇稀释后制成 0.2、0.4、0.8 g/L 花粉提取液,以备测定。

1.2.2 芍药花粉提取液活性成分含量的测定 利用 AlCl_3 显色法^[3]及 Folin 酚法^[4]分别测定提取液中抗氧化组分黄酮和多酚含量。以没食子酸(购自上海同天生物技术有限公司,批号为 10021231)、芦丁(购自上海生工生物工程有限公司,批号为 LJ1013S408J)标准品分别制作标准曲线。黄酮标准曲线方程 $y=0.7179A_{420}$ ($R^2=0.9958$),多酚标准曲线方程 $y=0.0074A_{765}$ ($R^2=0.9915$)。

将适当稀释的花粉提取液加入反应体系后,分别于 420 nm 和 765 nm 波长下测定其吸收值 A ,通过黄酮、多酚标准曲线得到提取液中黄酮、多酚含量。

1.2.3 芍药花粉提取液抗氧化能力的测定

1.2.3.1 DPPH 法 利用 DPPH 的褪色效应,测

定波长为 517 nm 处吸光度的下降值,可计算出花粉提取液对 DPPH 自由基的清除率^[5]。采用不同体积分数(30%、70%和 100%)的乙醇制备芍药花粉提取液,分别测定 3 个质量浓度 0.2、0.4、0.8 g/L 芍药花粉提取液对 DPPH 自由基的清除率。

精确移取花粉提取液 2 mL 于试管中,再加入 2 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH 溶液,摇匀,室温放置 30 min,测定 A_{517} ,即为 $A_{\text{样品}}$ (用 2 mL 乙醇与 2 mL 样品溶液混匀后调零,以排除试样本身颜色的影响)。向 2 mL 乙醇中加入 2 mL DPPH 溶液,测定 A_{517} ,即为 $A_{\text{对照}}$ 。

$$\text{清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

1.2.3.2 水杨酸法 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生 $\cdot\text{OH}$,但由于 $\cdot\text{OH}$ 具有很高的反应活性,存活时间短,若在反应体系中加入水杨酸,就能有效地捕捉 $\cdot\text{OH}$,并产生有色产物。反应式如下: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ 。

该产物在 510 nm 处有强吸收,若在此反应体系中加入具有清除 $\cdot\text{OH}$ 功能的被测物,便会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,从而使有色产物生成量减少。采用固定反应时间法,在反应体系(0.55 mmol/L H_2O_2 1 mL,4.5 mmol/L Fe^{2+} 1 mL,4.5 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL)中加入芍药花粉提取液,在 510 nm 处测量各质量浓度下的吸光度,便能测定芍药花粉提取液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率^[6]。

清除率 $= [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0 \times 100\%$,其中, A_0 :用蒸馏水代替提取液时测得吸光度, A_x :反应液中加入提取液测得吸光度, A_{x_0} :用蒸馏水代替水杨酸时测得提取液的本底吸光度。

1.2.4 芍药花粉提取液的抗氧化能力与其黄酮、多酚含量间相关性分析 分别以提取液质量浓度为横坐标,以对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率为纵坐标,拟合曲线,通过曲线方程得到半抑制浓度 (IC_{50})。 IC_{50} ^[7]是对自由基清除率达到 50% 时提取液的浓度,可作为判断抗氧化能力强弱的依据, IC_{50} 越小,表明抗氧化能力越强。欲分析花粉提取液抗氧化能力与黄酮、多酚含量的相关性,分析 IC_{50} 与提取液中黄酮、多酚含量之间的关系即可。

1.3 数据处理

用 SPSS 11.5 软件进行双因素方差分析,计算结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。小写字母表示在 0.05 水平差异显著,大写字母表示在 0.01 水平差异极显著。

2 结果与分析

2.1 芍药花粉提取液对 DPPH 自由基的清除能力

从表 1 可以看出,芍药花粉提取液对 DPPH 自由基具有一定的清除能力,其清除率与提取液质量浓度之间呈现出良好的剂量—效应关系,即随着提取液质量浓度的增大,清除自由基的能力也随之增强。3 个质量浓度下的芍药花粉提取液,均是 70%乙醇提取液清除 DPPH 自由基的效果最优,其中 0.8 g/L 花粉提取液的清除率最大,为 79.88%。100%乙醇提取液对自由基的清除能力不佳,其中 0.2 g/L 花粉提取液的清除率仅为 7.07%。总体来说,高质量浓度芍药花粉提取液具有良好的抗氧化能力,以 70%乙醇制备的提取液清除 DPPH 自由基的效果最佳,30%乙醇提取液次之。

表 1 芍药花粉提取液对 DPPH 自由基的清除能力

提取液质量浓度/(g/L)	乙醇体积分数/%	清除率/%
0.8	30	69.27±2.55bB
	70	79.88±5.11aA
	100	48.36±5.84eD
0.4	30	56.84±3.47cdCD
	70	61.12±5.11cBC
	100	22.53±2.68gE
0.2	30	30.49±3.96fE
	70	52.29±3.42deCD
	100	7.07±5.59hF

2.2 芍药花粉提取液对羟自由基的清除能力

从表 2 可以看出,不同质量浓度的芍药花粉提取液对羟自由基具有不同程度的清除能力,随着提取液质量浓度的增加,对羟自由基的清除能力逐渐增强。乙醇体积分数一定时,0.8 g/L 提取液对羟自由基的清除能力明显高于其他 2 个质量浓度,该质量浓度下 30%乙醇提取液对羟自由基的清除率达到 93.82%。提取液质量浓度一定时,30%乙醇制备的提取液清除羟自由基的能力最强,100%乙醇提取液清除效果不佳。

表 2 芍药花粉提取液对羟自由基的清除能力

提取液质量浓度/(g/L)	乙醇体积分数/%	清除率/%
0.8	30	93.82±2.25aA
	70	79.52±5.46bB
	100	55.59±3.78dCD
0.4	30	83.07±1.67bB
	70	62.46±2.98cC
	100	43.93±4.12eE
0.2	30	57.09±2.70cdCD
	70	52.56±0.90dD
	100	35.53±1.60fF

2.3 芍药花粉提取液中黄酮、多酚含量

从表 3 可以看出,各提取液中黄酮含量差异达到极显著水平,其中 70%乙醇提取液中的黄酮和多酚含量分别达到 227.81 mg/g、26.98 mg/g,均极显著高于 30%乙醇、100%乙醇提取液中的含量;30%乙醇、100%乙醇提取液中多酚含量差异达显著水平。说明 70%乙醇对于芍药花粉中黄酮、多酚的提取效果最佳。

表 3 芍药花粉提取液中黄酮、多酚含量及其与 IC₅₀ 的相关性

乙醇体积分数/%	IC ₅₀ /(g/L)		黄酮含量/(mg/g)	多酚含量/(mg/g)
	DPPH 法	水杨酸法		
30	0.37	0.14	220.16bB	17.77cB
70	0.15	0.13	227.81aA	26.98aA
100	0.82	0.62	87.82cC	20.21bB
r ₁	-0.96	-0.99		
r ₂	-0.56	-0.27		

注:r₁、r₂ 分别表示 IC₅₀与黄酮、多酚含量之间的相关系数。

2.4 芍药花粉提取液的抗氧化能力与其黄酮、多酚含量间相关性分析

从表 3 可以看出,2 种抗氧化指标的半抑制浓度大小与黄酮的含量呈密切的负相关($r=-0.96$ 、 -0.99),表明芍药花粉的抗氧化活性与黄酮含量呈线性正相关,而与多酚含量的相关性不密切。DPPH 法和水杨酸法都显示出 70%乙醇提取液的半抑制浓度最小,且黄酮、多酚的含量最多,由此可见,70%乙醇是制备芍药花粉提取液较理想的有机溶剂。

3 结论与讨论

本研究对比分析了以 30%、70%、100%乙醇 3 种溶剂制备的质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8 g/L 芍药花粉提取液的抗氧化效果。通过 DPPH 法、水杨酸法有效评价了芍药花粉对 DPPH 自由基、羟自由基的清除能力,结果说明,芍药花粉提取液具有一定的抗氧化能力,抗氧化能力大小与提取液质量浓度之间呈现出良好的剂量依赖效应。高质量浓度的花粉提取液具有较强的抗氧化作用,其中 70%乙醇提取液清除 DPPH 自由基的效果最佳,清除率可达 79.88%;30%乙醇提取液对羟自由基的清除能力最强,清除率达到 93.82%。

此外,3 种体积分数的乙醇溶剂对花粉中黄酮、多酚的提取效果也截然不同,70%乙醇提取液中黄酮、多酚含量均极显著高于 30%乙醇、100%乙醇提取液中的含量。通过对这 2 种主要活性物质含量与

抗氧化能力的关系分析,芍药花粉的抗氧化性与黄酮含量关系十分密切,而与多酚含量无明显的联系。这一研究结果与于善凯等^[8]的研究结果相似之处在于提取液中酚类物质的含量与抗氧化能力没有明显的对应关系;而另有报道^[9-10]认为,花卉、橄榄的抗氧化活性与多酚含量密切相关。还有研究^[4]表明,牡丹根的抗氧化能力与其多酚、黄酮类物质均有一定的相关性。分析原因可能是由于采用的抗氧化指标体系不同,以致得到的结论也有所差异;另外,提取液中还含有其他的抗氧化组分,这些天然抗氧化成分往往具有协同增效作用。

综上所述,70%乙醇是制备芍药花粉提取液较理想的有机溶剂。芍药花粉提取液有着较强的抗氧化能力,其抗氧化活性与其黄酮含量有密切的相关性。

参考文献:

- [1] 宋国安. 花粉的营养与保健功效[J]. 中国食品与营养, 2004(10):45-47.
- [2] 王萍,张蓓. 蜂花粉抗衰老的作用机理与应用[J]. 中国老年保健医学, 2008,6(3):31.
- [3] 黄海霞,侯宇清. 不同品种牡丹抗氧化能力与其多酚黄酮含量的关系研究[J]. 时珍国医国药, 2010,21(11):2921-2923.
- [4] Liu Zai-an, Ma Lan-ping, Zhou Bo, *et al.* Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2000, 75(6):53-63.
- [5] Wettasinghe M, Shahidi F. Scavenging of reactive oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals[J]. Food Chemistry, 2000,70:17-26.
- [6] 马建华. 水杨酸甲酯清除羟基自由基活性的研究[J]. 化学通报, 2006,69(3):82-83.
- [7] 熊何健,郑建华,吴国宏,等. 荔枝多酚的分离制备及清除 DPPH 活性[J]. 食品科学, 2006,27(7):86-88.
- [8] 于善凯,张英. 不同品种杭白菊中酚类物质含量和清除自由基活性的比较[J]. 食品科学, 2001,22(4):84-87.
- [9] 徐良雄,曾佑炜. 不同花卉抗氧化能力及多酚黄酮含量比较[J]. 中国野生植物资源, 2005,24(1):51-54.
- [10] McDonald S, Prenzler P D, Antolovich M, *et al.* Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts[J]. Food Chem, 2001,73:73-84.

《河南农业科学》2013 年征稿启事

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊。多年来,本刊依托科研单位的办刊优势和庞大的优秀作者群,使刊物质量逐年提升,期刊影响因子和在业界的影响力大幅提高,自 2000 年以来连续被评为“全国中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国农业核心期刊”。2011 年成为中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,进入 RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)。

为了进一步拓宽本刊的报道范围,满足不同层次读者的学科需求,自 2013 年起,本刊将增设农业经济、农业信息技术、食品科学、农业工程等学科内容。栏目设置如下:综述;作物栽培·遗传育种;农业资源·环境·微生物;植物保护;园艺·林学;畜牧·兽医·水产;农业经济与信息技术;食品科学·农业工程。

欢迎赐稿!

《河南农业科学》编辑部

地址:郑州市花园路 116 号 河南省农科院《河南农业科学》编辑部 邮编 450002

电话:0371-65739041 65739090 65730809

E-mail:hnnykx@163.com

网址:<http://www.hnagri.org.cn/hnnykx.htm>