

蒲公英花中总酚酸和总黄酮含量测定及其抗氧化性能研究

杨 岚, 李华峰, 刁海鹏, 唐兴玉, 彭太芳, 孙体健*

(山西医科大学基础化学教研室, 山西 太原 030001)

摘 要: 测定蒲公英花 75% 乙醇提取液中总酚酸和总黄酮含量, 并测定该提取液对超氧阴离子自由基、羟自由基和油脂自氧化的清除作用。结果表明: 蒲公英花中总酚酸平均含量为 4.09%, 总黄酮平均含量为 3.65%。提取液对超氧阴离子自由基、羟自由基和油脂自氧化均有较好的清除效果, 并在供试质量浓度范围内呈现量效关系。对超氧阴离子自由基的半数抑制率 IC_{50} 为 $96.1 \mu\text{g/mL}$, 对羟自由基的 IC_{50} 为 $7.7 \mu\text{g/mL}$ 。蒲公英花提取液可使花生油的过氧化值(POV)显著降低, 其效果与在花生油中添加 0.10% 的 VC 相当。

关键词: 蒲公英花; 酚酸; 黄酮; 抗氧化性

Total Phenolic Acid Content, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Dandelion Flowers

YANG Lan, LI Hua-feng, DIAO Hai-peng, TANG Xing-yu, PENG Tai-fang, SUN Ti-jian*

(Department of Basic Chemistry, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: In order to determine the contents of dandelion flowers, the material was extracted with 75% aqueous ethanol under the aid of ultrasonic. Meanwhile, the resultant ethanol extract was tested for its abilities to scavenge superoxide anion and hydroxyl free radicals and inhibit peanut oil autooxidation. The results indicated that the contents of total phenolic acid and total flavonoids in dandelion flowers were 4.09% and 3.65%, respectively. The ethanol extract from dandelion flowers could effectively scavenge superoxide anion and hydroxyl free radicals and inhibit peanut oil autooxidation in a dose-dependent manner. The half inhibitory concentrations against superoxide anion and hydroxyl free radicals were $96.1 \mu\text{g/mL}$ and $7.7 \mu\text{g/mL}$, respectively. The peroxide value (POV) of peanut oil showed a marked decline in the presence of the ethanol extract and the efficacy was similar to that of 0.10% vitamin C addition.

Key words: dandelion flower; phenolic acid; flavonoids; antioxidant activity

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0160-04

蒲公英为菊科植物蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.Mazz.)、碱地蒲公英(*Taraxacum sinicum* Kitag.)或同属数种植物的干燥全草。蒲公英在全国大部分地区均有分布, 是一种常见的民间草药, 具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋的功效, 临床应用广泛, 用于疮痈肿毒、乳痈、肺痈等症^[1]。蒲公英花中含有丰富的色素类、酚酸类、黄酮类、挥发油类物质及丰富的微量元素, 在药品、食品、化妆品的研究上有很大的开发价值, 可用于保色、增香、抑菌、防腐等^[2]。酚酸类物质具有抗血栓形成、溶纤和抗脂质过氧化的作用,

是治疗心肌缺血、心绞痛、心肌梗死等心血管病的有效成分, 同时还具有抗诱变、抗菌、抗病毒等作用^[3]。天然来源的生物黄酮分子质量小, 能被人体迅速吸收, 能通过血脑屏障, 能进入脂肪组织, 具有消除疲劳、保护血管、预防动脉硬化、扩张毛细血管、疏通微循环、抗脂肪氧化、活化大脑及其他脏器细胞的功能^[4]。生命活动的氧化代谢过程中会不断产生各种含氧自由基, 其中超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$), 羟自由基($\cdot OH$)和脂基自由基($ROO\cdot$)是 3 种最具代表性的自由基, 而超氧阴离子自由基的产生最早, 羟自由基的作用最强^[5]。

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: 山西省科学技术厅科技攻关项目(20090311057-1); 山西省普通高等学校大学生创新性实验项目(2006-13-2)

作者简介: 杨岚(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物化学。E-mail: yanglanyanglan@163.com

* 通信作者: 孙体健(1960—), 女, 教授, 本科, 研究方向为天然产物化学与新药开发。E-mail: suntijian@163.com

含氧自由基可与体内的核酸、蛋白质等生物大分子相互作用,从而对后者产生毒害作用,引起机体许多功能障碍和疾病的发生^[6]。本实验拟对蒲公英花 75% 乙醇超声提取液的抗氧化活性成分含量进行测定以及评估其对超氧阴离子自由基、羟自由基和油脂自氧化的清除能力,为蒲公英花的进一步利用提供科学依据,提高其药用价值,应用价值以及经济价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

蒲公英花采自太原地区野生种类(*Taraxacum mongolicum* Hand.Mazz.)。

芦丁标准品(92.5%)、绿原酸标准品 中国药品生物制品检定所;VC 东北制药总厂一分厂;花生油 山东省龙大植物油有限公司;无水乙醇、十二烷基磺酸钠、铁氰化钾、三氯化铁、亚硝酸钠、氯化铝、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、邻二氮菲、硫酸亚铁、 H_2O_2 、三氯甲烷、乙酸、碘化钾、硫代硫酸钠等均 为分析纯。

1.2 仪器与设备

HH-S 型恒温水浴锅 江苏金坛医疗仪器厂;760CRT 双光束紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;KQ-250DE 型超声波清洗器(40kHz) 昆山市超声仪器有限公司;BS-210S 电子天平 北京赛多利斯天平有限公司。

1.3 蒲公英花有效成分提取

将同一批蒲公英花风干、粉碎,过 80 目筛,精密称取粉末 0.20g 置于 100mL 锥形瓶中,按照料液比 1:100 加入 75% 乙醇 20.0mL,在功率为 100W、温度为 55℃ 的条件下超声提取两次,每次 30min^[10]。合并两次提取液,过滤,减压浓缩,至 25mL 容量瓶中,加 75% 乙醇定容至刻度,混匀,即得样品溶液。

1.4 总酚酸含量测定

精密吸取样品溶液 0.2mL,置于 25mL 比色管中,加无水乙醇至 5.0mL,摇匀,加入 0.3% 十二烷基磺酸钠溶液 2.0mL,1% 铁氰化钾-1% 三氯化铁(体积比 1:1)混合液 2.0mL,摇匀,暗处放置 5min,加 0.1mol/L 盐酸定容至 25.0mL,摇匀,暗处放置 20min。平行空白,用紫外-可见分光光度计,从 400nm 到 900nm(间隔 1nm)进行全波长扫描^[7]。以波长为横坐标,吸光度为纵坐标作图,得到吸收曲线,确定 760nm 为最大吸收波长。将对照品绿原酸配成 35.0 μ g/mL 的标准溶液,分别精确吸取绿原酸标准溶液 0.0、0.3、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0mL,按照上述方法测定吸光度,以绿原酸的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程为 $y = 0.177x + 0.0825$ ($r = 0.9994$)。

1.5 总黄酮含量测定

精密吸取样品溶液 1.0mL,置于 10mL 比色管中,加入 5%NaNO₂ 溶液 0.4mL 摇匀,放置 6min,加 10%AlCl₃ 溶液 0.4mL 摇匀,放置 6min,再加 4%NaOH 溶液 4.0mL,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀放置 15min,平行空白。用紫外-可见分光光度计在 200~700nm(间隔 1nm)进行全波长扫描^[8],以波长为横坐标,吸光度为纵坐标作图,得到吸收曲线,确定 510nm 为最大吸收波长。将对照品芦丁配成 100.0 μ g/mL 的标准溶液,分别精密吸取芦丁标准溶液 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,按照上述方法测定吸光度,以芦丁质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程: $y = 0.0124x - 0.0038$ ($r = 0.9990$)。

1.6 超氧阴离子自由基的清除作用

参照邻苯三酚自氧化法^[9]。精密吸取 50.0mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.4)4.5mL 若干份分别置于 10mL 比色管中,加入不同质量浓度的样品溶液 1.0mL(同时以双蒸水为空白,以 0.1% 的 VC 溶液为对照),混匀,在 25℃ 水浴中保温 20min 后,立即加入在 25℃ 水浴中预热过的 5.0mmol/L 的邻苯三酚 0.3mL,迅速摇匀,立即倾入 1cm 比色杯中在 320nm 波长处测定吸光度,每隔 30s 读数一次,共测 5min。分别计算空白溶液和样品溶液吸光度随时间的变化率 F_0 和 F_x 。每个样品重复 3 次。被测物对超氧阴离子自由基的清除率按式(1)计算。

$$\text{清除率}/\% = \frac{F_0 - F_x}{F_0} \times 100 \quad (1)$$

1.7 羟自由基的清除作用

采用邻二氮菲-二价铁氧化法测定^[10]。精密吸取 5.0mmol/L 的邻二氮菲无水乙醇溶液 1.5mL 若干份分别置于 10mL 比色管中,依次加入 0.75mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)4.0mL,7.5mmol/L 的硫酸亚铁溶液 1.0mL 和不同质量浓度的样品溶液 2.5mL(同时以双蒸水为空白,以 0.1% 的 VC 溶液为对照),最后加入 0.1% H_2O_2 1.0mL 启动反应。在 37℃ 反应 1h,于 536nm 波长处测定空白组吸光度 $A_{\text{损伤}}$ 和加药组吸光度 $A_{\text{加药}}$,未损伤管不加 H_2O_2 测定吸光度 $A_{\text{未损伤}}$ 。每个样品重复 3 次。被测物对羟自由基的清除率按式(2)计算。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_{\text{加药}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}} \times 100 \quad (2)$$

1.8 对油脂抗氧化率测定

用碘-硫代硫酸钠滴定法测定并计算其过氧化值^[11]。称取花生油 20.0g 置于 250mL 锥形瓶中,加入样品溶液 5.0mL (同时以无水乙醇为空白,0.1% 的 VC 溶液为对照),充分振荡后,置 65℃ 恒温干燥箱中,于 24、48、72、96、120、144h 时取油样测定其过氧化值(POV)。

即称取 2.0g 混匀的样品, 置于 250mL 碘量瓶中, 加入三氯甲烷-乙酸(体积比 2:3)混合液 30.0mL 溶解后, 加饱和碘化钾溶液 1.0mL, 加塞, 摇匀, 暗处放置 3min 后, 加双蒸水 50.0mL, 摇匀立即用 0.0111mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色时, 加 0.5% 淀粉指示剂 1.0mL, 继续滴定至蓝色消失为止, 记录消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积。按公式(3)计算 POV 值。

$$\text{POV} = \frac{(V_1 - V_2)c}{m} \times 1000 \quad (3)$$

式中: V_1 为空白试剂消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积/mL; V_2 为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积/mL; c 为硫代硫酸钠溶液的浓度(0.0111mol/L); m 为样品质量/g。

2 结果与分析

2.1 蒲公英花提取液总酚酸及总黄酮含量

在 760nm 波长处测定提取液吸光度, 得到绿原酸回归方程为 $y = 0.177x + 0.0825 (r = 0.9994)$, 结果表明绿原酸含量在 0.42~4.20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。在 510nm 波长处测定提取液吸光度, 得到芦丁回归方程: $y = 0.0124x - 0.0038 (r = 0.9990)$, 结果表明芦丁含量在 5.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。根据回归方程得蒲公英花中总酚酸含量为 4.09%, 总黄酮含量为 3.65%。

2.2 蒲公英花提取液清除超氧阴离子自由基的能力

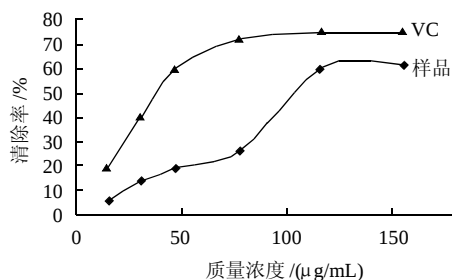


图1 蒲公英花提取液对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.1 Scavenging rates of dandelion flower extract at different doses against superoxide anion free radicals

由图1可见, 蒲公英花提取液和 VC 溶液对超氧阴离子自由基有较强的清除能力, 并且随着溶液质量浓度的增加, 清除率呈上升趋势。蒲公英花提取液和 VC 清除超氧阴离子自由基的半数抑制率 IC_{50} 分别为: 96.1、46.4 $\mu\text{g/mL}$ 。当蒲公英花提取液质量浓度较低时, 对超氧阴离子自由基的清除能力较弱, 但当质量浓度增大时, 清除能力增强, 但是弱于相同质量浓度的 VC。

2.3 蒲公英花提取液清除羟自由基能力

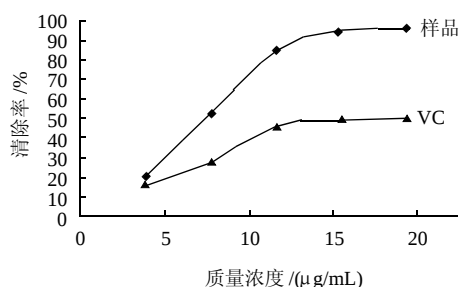


图2 蒲公英花提取液对羟自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging rates of of dandelion flower extract at different doses against hydroxyl free radicals

由图2可见, 蒲公英花提取液对羟自由基有良好的清除能力, 随着提取液质量浓度的增加对羟自由基的清除作用明显提高, 呈明显的量效关系。清除率最大可达 96.4%。通过计算其 IC_{50} 为 7.7 $\mu\text{g/mL}$, 相同质量浓度的 VC 溶液的 IC_{50} 为 19.4 $\mu\text{g/mL}$, 说明蒲公英花提取液对羟自由基的清除能力高于 VC 溶液。

2.4 蒲公英花提取液抗油脂自氧化能力

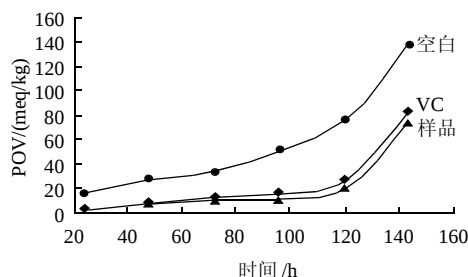


图3 蒲公英花提取液抗油脂自氧化作用

Fig.3 Changes in POV value of peanut oil in the presence of vitamin C, dandelion flower extract or neither of them

由图3可知, 蒲公英花提取液对花生油的自氧化有明显的抑制作用, 可抑制油脂的氧化酸败, 使其 POV 值下降, 延长油脂的保存时间。在初期即可降低 POV 值, 说明该提取液不但能抑制油脂的自动氧化, 而且能很好地去除油脂中已有的过氧化物^[12]。并且随添加量的增加, 抗氧化能力也随之增强, 在实验剂量范围内呈正相关, 其效果与在花生油中添加 0.10% 的 VC 效果相当。

3 讨论

3.1 利用超声波浸提技术提取蒲公英花中的总酚酸和总黄酮。超声提取法是利用超声波增大物质分子运动的频率和速度, 增加溶剂穿透力, 提高有效成分的溶出度, 缩短提取时间的浸提方法。超声辅助提取具有快捷、经

济、效率高、低温不破坏有效成分等优点^[13], 优于传统的回流提取和索氏提取。结果表明, 蒲公英花中总酚酸平均含量为 4.09%, 总黄酮平均含量为 3.65%, 优于回流提取的 0.889%^[14], 与微波提取的 3.33%^[15]效果相近, 但超声提取可以避免微波提取的爆沸现象, 反应过程容易控制, 是一种简单易行的提取方法。

3.2 采用三氯化铁-铁氰化钾等试剂显色后用比色法测定总酚酸含量, 显色剂配制时间, 放置时间和显色时间对吸光度有较大影响^[16], 显色后溶液暴露在空气中 30min 后波长扫描无明显最大吸收波长, 吸收峰变扁平, 故总酚酸的测定时间不宜过长。此外光线和温度对实验结果也有一定影响, 需要避光保存。

3.3 相同质量浓度的蒲公英花提取液对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除能力有所不同, 对羟自由基的清除能力明显高于超氧阴离子自由基。原因可能与提取液中酚酸类和黄酮类物质的结构有关。不同种类化合物对不同体系的抗氧化作用可能不同, 对不同自由基和不同组织的作用存在一定的选择性^[17]。关于蒲公英花提取液中所含酚酸和黄酮类化合物的种类、结构及其与抗氧化能力之间的关系还有待进一步研究。

3.4 油脂在贮存条件中, 由于受到光、热和某些金属等因素的影响, 极易发生氧化。油脂氧化后分解产生的醛、酮、酸等小分子有强烈刺激气味, 不适宜食用。氧化生成的聚合物在人体中很难代谢, 会对肝脏造成损害。合成抗氧化剂有一定的毒性, 而许多植物中都含有天然抗氧化剂成分, 其毒性远远低于合成抗氧化剂^[18]。蒲公英花提取液有较强的抗油脂自氧化能力, 是值得开发利用的天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 2010: 331.
- [2] 赵守训, 杭秉倩. 蒲公英的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(3): 1-3.
- [3] 曹伟, 陈卫军, 宋纪蓉. 不同种类蜂蜜总酚酸含量测定和抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 48-51.
- [4] 裴凌鹏, 惠伯棣, 金宗谦, 等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203-207.
- [5] HU C, KITTS D D. Dandelion flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric and prevents lipid oxidation *in vitro*[J]. *Phytomedicine*, 2005, 12: 588-597.
- [6] 林亲录, 施兆鹏. 类黄酮与酚酸的天然抗氧化剂的结构与其抗氧化力的关系[J]. 食品科学, 2001, 22(6): 85-91.
- [7] 石晋, 栾雨时, 赵宁. 雪莲果块茎中绿原酸及总酚酸的含量测定[J]. 中药材, 2009, 32(2): 230-232.
- [8] ZHANG Youfei, SHI Chunhong. The extracting techniques and analysis methods for flavonoids in plant[J]. *Journal of Analytical Science*, 2009, 25(1): 102-107.
- [9] 陆曦, 王磊, 魏红, 等. 黄酮类化合物抗氧化活性的构效关系[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 233-237.
- [10] 何玲玲, 王新, 石中亮, 等. 水提板栗壳色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 56-57.
- [11] 谢宗波, 彭道锋, 乐长高. 南瓜茎黄酮的微波提取及抗氧化性能研究[J]. 中国食品添加剂, 2009(6): 88-91.
- [12] 潘英明, 梁英, 黄志清, 等. 苏木、紫苏等五种中草药抗氧化活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 43-45.
- [13] 郭孝武. 一种提取中草药化学成分的方法: 超声提取法[J]. 天然产物与开发, 1999, 11(3): 37-40.
- [14] 刁海鹏, 吕俊杰, 曹晓峰. 蒲公英花中总黄酮含量测定[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35(2): 178-179.
- [15] 宁坚刚, 魏永生. 蒲公英花中黄酮类物质的提取和含量测定[J]. 青海大学学报, 2004, 22(4): 59-60.
- [16] 徐佳佳, 陆兔林, 王云峰, 等. 不同产地通关藤饮片中绿原酸及总酚酸的含量比较[J]. 药物鉴定, 2008, 17(23): 21-23.
- [17] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 343-344.
- [18] 蒋企洲, 欧瑜, 何执中, 等. 枇杷叶黄酮对油脂的抗氧化性能研究[J]. 医学综述, 2008, 14(10): 1583-1585.