

度的提取液,培养一定时间(细菌 37℃、24 ~ 36h,霉菌 28℃、酵母 30℃、48 ~ 60h)后,测量其抑菌圈的大小。

2 结果与讨论

2.1 巴西蘑菇水提物对各种菌的最低抑菌浓度(MIC)

以上结果显示,巴西蘑菇水提物对细菌、真菌均有一定的抑菌效果。其中对细菌的作用十分显著,尤其对金色葡萄球菌和大肠杆菌。对霉菌也有较强的抑制效果,对酵母的抑制作用相对弱些。

2.2 巴西蘑菇醇提物对各种菌的最低抑菌浓度(MIC)

以上结果显示,巴西蘑菇醇提物对六种微生物均有一定的抑制效果,特别对桔青霉和枯草杆菌其作用十分突出。醇提物对霉菌的抑制优于对细菌(枯草杆菌除外)和酵母的抑制。

2.3 水提物、醇提物的抑菌活性比较(MIC)

从表 3 看出,巴西蘑菇醇提液比水提液的抑菌作用更强。醇提液浓度在 5% 时对所有供试菌种均有抑制作用,水提液则要 10%。二者抑菌作用均不如化学防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾。

食品由于保存不当易造成微生物的侵袭而导致腐

败。食品加工上采用的化学防腐剂虽然防腐效果较好,但均有一定的毒性,危害人体健康。因而,现在国内外食品防腐剂的研究重点已经转向寻找新的有效而安全的天然防腐剂^[5,6]。很早以前,人们就利用食用菌具有抗菌能力进行防腐。我们的实验证明巴西蘑菇子实体对多种造成食品腐败的微生物具有一定的抗性,为其在这方面的开发利用提供一定的理论依据。对于其抗菌活性物质还有待进一步的研究。

参考文献

- 1 黄年来. 巴西蘑菇值得研究推广. 中国食用菌, 1994, 13 (1): 11 ~ 13.
- 2 黄年来. 巴西蘑菇值得研究推广. 中国食用菌, 1994, 13 (2): 8 ~ 9.
- 3 范秀容, 李广武等. 微生物学实验第二版. 高等教育出版社, 1989, 14.
- 4 秦红敏等. 竹荪的菌丝培养及其抗菌活性的初步研究. 微生物学报, 1999, 62: 393 ~ 395.
- 5 [日] 井上真由美著, 彭武厚等译. 微生物灾害及其防止技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- 6 Fields M. L. Fundamentals of Food Microbiology. AVI Publishing Company, 1978.

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

于善凯 张英 浙江大学食品科学与营养系 杭州 310029

摘要 4 种桐乡产杭白菊及黄菊和野菊, 分别用乙醇-水体系进行热回流提取, 用比色法测定醇提物中总酚和总黄酮含量, 并用化学发光法检测其清除活性氧自由基的能力。结果表明不同品种间含量存在较大差异, 总酚和总黄酮含量(以菊花干基计)最高的是异种大白菊, 分别为 9.76% 和 4.46%; 最低的是黄山种野菊, 分别为 3.21% 和 1.99%。不同菊花均显示了良好的清除活性氧自由基的活性。清·OH 和 $O_2^{\cdot-}$ 的 IC_{50} 分别在 0.54 ~ 1.98 mg/ml 和 24.2 ~ 54.5 μ g/ml 之间。其中清 $O_2^{\cdot-}$ 活性最强是大洋菊, 最弱是软梗小洋菊, 而清·OH 能力最强为早小洋菊, 最弱为异种大白菊。结果表明, 菊花中酚类物质的含量高低与抗自由基活性强弱无明显的对应关系。

关键词 杭白菊 总黄酮 总酚 自由基清除剂

Abstract Six species chrysanthemum samples, including 4 Hangbaiju, 1 Huangju and 1 Yeju, were collected from the famous "Hangbaiju Kingdom of China", Tongxiang city, Zhejiang province. Fresh flower was dried by microwave oven assisted by hot air circulation, and extracted individually by thermal reflux with 70% ethanol-water solution. The contents of total phenols (TP) and total flavonoids (TF) of these extracts were measured by spectrophotometric analy-

and 4.46% TF (in dry base of flower), and Yeju was the lowest one at 3.21% TP and 1.99% TF. Chemiluminescence method demonstrated that all of samples had good scavenging capacity on reactive oxygen free radicals. The IC_{50} ranged in $0.54 \sim 1.98 \text{ mg/ml}$ to $\cdot\text{OH}$ and $24.2 \sim 54.5 \mu\text{g/ml}$ to $\text{O}_2^{\cdot-}$, respectively. Among these chrysanthemums, Dayangju had the strongest scavenging activity to $\text{O}_2^{\cdot-}$, and Ruangengxiaoyangju was the weakest one; similarly, Zaoxiaoyangju had the strongest scavenging activity to $\cdot\text{OH}$ and Yizhongdabaiju was the weakest one. This research showed no obvious correlativity between the phenolic compound content of chrysanthemums and their anti-free radical capacity.

Key words Chrysanthemum Hangbaiju Total flavonoid Total phenols Free radical scavenger

菊花是菊科植物菊 (*Chrysanthemum Morifolium Ramat*) 的头状花序, 为多年生草本, 是一种农村常见的庭院式经济作物。常用的菊花品种根据地理条件分有毫菊、滁菊、杭白菊、怀菊等。其中杭白菊主要产于浙江杭嘉湖地区, 桐乡市是著名的“中国杭白菊之乡”。

菊花有疏风、清热、明目、解毒之功效, 主治头痛、眩晕、目赤、心肺烦热、疮痍、肿毒^[1], 现代研究表明, 菊花具有抗菌、抗炎、抗自由基、抗氧化、增强毛细血管抵抗力的作用, 以上生物学效应是与其所含的酚类化合物, 尤其是黄酮的作用密切相关的^[2]。

本文以桐乡产的杭白菊为主要研究对象, 以黄菊和野菊为对照, 提取活性成分, 对总酚和总黄酮含量进行测定, 用化学发光法检测其抗活性氧自由基的活性, 并对含量和活性之间的关系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试样处理

表1 菊花试样的种类和编号

类别	属名	种名 (中文拼音)	No.
杭白菊	<i>Chrysanthemum Morifolium Ramat</i>	异种大白菊 Yizhongdabaiju	1
		软梗小洋菊 Ruangengxiaoyangju	2
		大洋菊 Dayangju	3
		早小洋菊 Zaoxiaoyangju	4
黄菊	<i>Chrysanthemum Morifolium Ramat</i>	黄菊 Huangju	5
野菊	<i>Chrysanthemum Morifolium India</i>	野菊 (黄山种) Yeju	6

六种菊花均于大蕾期 (1999 年 11 月间) 采自浙江省桐乡市桐福镇同一地块, 采后及时用微波杀青—气流干燥进行处理, 干花水分含量在 10% 左右, 试样密封保存, 分析前用烘箱法逐个测定水分含量。

1.2 试剂与仪器

芦丁 (Rutin): 上海试剂二厂生产, BR, 含量 $\geq$

95% ;

对羟基苯甲酸: 上海五联化工厂出品, CR, 含量 99% ;

luminol Fluka 产品, 纯度 $\geq 98\%$;

Folin 试剂 B, 用前稀释 3 倍 ;

酵母多糖: 活性干酵母 1g $\rightarrow$ 超纯水洗涤 2 次 $\rightarrow$ 离心 $\rightarrow$ 倒掉上清液 $\rightarrow$ 加入 10ml 0.05mol/L 的 PBS (pH7.8) $\rightarrow$ 沸水浴中煮沸 10min $\rightarrow$ 备用 其它试剂均为分析纯, 化学发光所用试剂用超纯水配制。紫外—可见分光光度计 (UV751-GD) 上海分析仪器总厂出口, BPCL 微弱发光测量仪由中国科学院生物物理研究所制造。

1.3 提取方法

采用热回流提取^[2]: 称取干菊花试样 5g, 加入 75ml 70% 乙醇, 热回流提取 2h, 过滤, 残渣用 50ml 70% 乙醇洗涤, 过滤, 合并滤液, 定容至 100ml 备用。

1.4 醇提物得率测定

精确吸取各提取液 10ml 于称量皿中, 80℃ 水浴挥去乙醇, 115℃ 烘箱中恒温 1h, 冷却后称重, 计算醇提得率。

1.5 酚类物质含量测定

1.5.1 总酚含量测定—Folin 酚比色法^[3]

标准曲线的制作: 精确称取 0.139g 对羟基苯甲酸, 用少量无水乙醇溶解后, 加蒸馏水定容至 500ml。取六支具塞试管, 分别加入 0、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4ml 的对羟基苯甲酸标液, 用水稀释至 10ml, 各加 1ml Folin 试剂及 2ml 20% Na_2CO_3 , 沸水浴加热 1min, 冷却并稀释至 20ml, 室温放置 30min, 测定 OD_{745} 值, 制作标准曲线。

样品测定 将菊花提取液稀释 5~10 倍, 取稀释液 0.6~0.8ml 测定, 每一试样重复测定两次, 取 OD_{745} 的平均值, 从上述标准曲线计算相应的总酚含量。

1.5.2 总黄酮含量测定— NaNO_2 — $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[4]

标准曲线的制作: 精称芦丁 0.021g, 用 30% 乙醇溶解定容至 100ml, 备用。取七支具塞试管, 分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 芦丁标液, 用 30% 乙醇补足体积至 5ml, 混匀器混匀, 各加入 0.3ml 5% NaNO_2 , 混匀后静置 5min, 加 0.3ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 混匀后静置 6min, 加入 4ml 1mol/L NaOH , 再加入 0.4ml 30% 乙醇使总体积为 10ml, 混匀后静置 10min, 在波长 510nm 处测定吸光值, 制作标准曲线。

样品测定: 取 (见 1.3) 1ml, 用 30% 的乙醇适度稀释 (5~20 倍)。然后取稀释液 1ml 测定, 每一试样重复测定两次, 取 OD_{510} 的平均值, 从上述标准曲线计算相应的总黄酮含量。

1.6 清除自由基活性测定

1.6.1 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的测定^[5]

采用邻苯三酚-Luminol 的发光体系产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 用菊花提取物抑制。具体步骤为: 在发光管中分别加入 0、20、60、80、100 μl 适当稀释的菊花提取液, 用 PBS 补足体积至 100 μl , 加入 0.625mmol/L 邻苯三酚 50 μl , 最后加入 10^{-4}mol/L Luminol-CBS (0.05mol/L, pH10.0) 混合液 950 μl , 立即测定发光峰值 (36s 的积分值, 记作 $\text{CP}_{36\text{s}}$)。空白用 PBS 代替试样。计算抑制率 (I), 作出试样浓度与抑制率的线性回归方程, 并得出 IC_{50} 。

1.6.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的测定^[2]

采用 $\text{Cu}^{2+}-\text{VC}-\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol-酵母多糖的发光体系产生 $\cdot\text{OH}$ 。在发光管分别中加入 2、20、60、80、100 μl 适当稀释的菊花提取液, 用 PBS 补足体积至 100 μl 依次加入 2mmol/L 抗坏血酸 200 μl , 2mmol/L CuSO_4 400 μl , 酵母多糖 200 μl , 10^{-5}mol/L Luminol-PBS 混合液 600 μl , 最后加入 68mmol/L H_2O_2 600 μl , 测定发光峰值 (每 6s 的积分, 记作 $\text{CP}_{6\text{s}}$)。空白用 PBS 代替试样。计算抑制率, 作出试样浓度与抑制率的线性回归方程, 并得出 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 菊花中的酚类物质含量

图 1 和图 2 分别是以对羟基苯甲酸和芦丁为标准的总酚和总黄酮的工作曲线。6 种菊花试样的总酚和总黄酮含量见表 2。

6 种菊花的总酚含量差异很大, 最高的异种大白菊为 9.76%, 其余依次是软梗小洋菊、早小洋菊、黄菊、大洋菊和野菊, 野菊的总酚仅为 3.21%, 约为异种大白菊的 1/3。天然存在的黄酮类化合物基本上都带

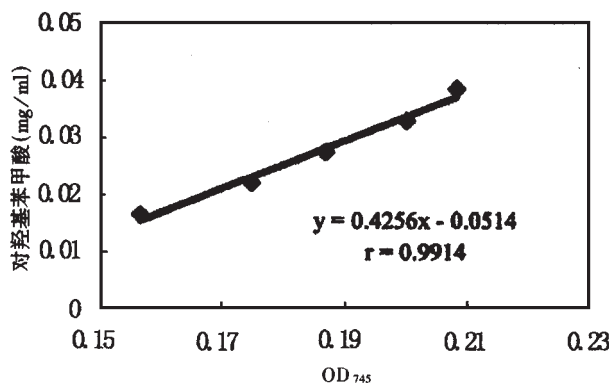


图 1 对羟基苯甲酸的总酚标准曲线

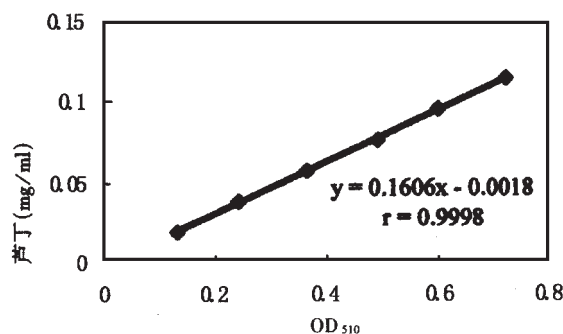


图 2 芦丁的总黄酮标准曲线

有羟基, 也属酚类物质, 故总酚含量事实上包含了黄酮。从表 1 可见, 4 种杭白菊的总黄酮含量比较接近, 在 4%~4.5% 之间, 显著高于黄菊和野菊。菊花总黄酮普遍是总酚量的 50% 左右 (46%~62%), 例外的是大洋菊, 其酚类物质绝大部分 (89.1%) 以类黄酮形式存在。

用 70% 的乙醇作为萃取剂, 以 1:15 的固液比热回流提取 2h, 干菊花的醇提得率大于 20%, 得率最高的大洋菊达 32.12%。杭白菊主要品种 (小洋菊和大白菊) 醇提物中的总黄酮含量在 18%~20%, 相应的总酚含量高达 34%~41%, 显著高于黄菊和野菊。大洋菊则由于醇提物得率相当高, 导致提取物中总黄酮含量较低。

2.2 不同品种菊花清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的活性

半抑制浓度 (IC_{50}) 与自由基清除剂的清除能力成反比, 即 IC_{50} 越小, 表明清除能力越强, 反之亦然。6 种菊花清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的浓度与抑制率的关系及它们的 IC_{50} 列于表 3。

清 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活力最强的是大洋菊和黄菊 (IC_{50} 为 24 $\mu\text{g/ml}$), 最弱的是软梗小洋菊 (IC_{50} 为前者的 2 倍); 清 $\cdot\text{OH}$ 活性的强弱依次是: 早小洋菊、大洋菊、野菊、软梗小洋菊、黄菊和异种大白菊; 不同菊花品种的

表2 菊花及其提取物中的酚类物质含量

No	品种	花中含量(干基计, %)			醇提得率 (%)	醇提物中含量(%)	
		总酚	总黄酮	总黄酮/总酚		总黄酮	总酚
1	异种大白菊	9.76	4.46	0.456	23.84	18.71	40.96
2	早小洋菊	7.06	4.22	0.598	21.07	20.04	33.51
3	软梗小洋菊	8.50	4.01	0.471	22.27	18.00	38.17
4	大洋菊	4.39	3.90	0.891	32.12	12.15	13.65
5	黄菊	4.71	5.66	0.564	26.82	9.90	17.57
6	野菊	3.21	1.99	0.617	20.39	9.75	15.77

表3 不同品种菊花清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的浓度(C)与抑制率(I)的关系

No *	清 $O_2^{\cdot-}$ 活性				清 $\cdot OH$ 活性			
	线性回归方程	IC ₅₀ (μg/ml)	r	n	线性回归方程	IC ₅₀ (μg/ml)	r	n
1	C = 1.1077I - 25.614	29.77	0.999	3	C = 0.0791I - 1.972	1.983	0.994	4
2	C = 0.9092I - 9.533	35.93	0.996	4	C = 0.0110I - 0.012	0.538	0.999	3
3	C = 1.7522I - 39.811	47.80	0.978	4	C = 0.0271I - 0.367	0.988	1.000	3
4	C = 0.8404I - 17.820	24.20	0.995	3	C = 0.0148I - 0.187	0.553	0.999	4
5	C = 0.3644I + 6.223	24.44	0.999	3	C = 0.0331I - 0.528	1.127	0.998	4
6	C = 1.2444I - 23.661	38.56	0.999	3	C = 0.0097I + 0.154	0.639	0.995	4

注 本表中样品编号与样品的对应同表1、表2。

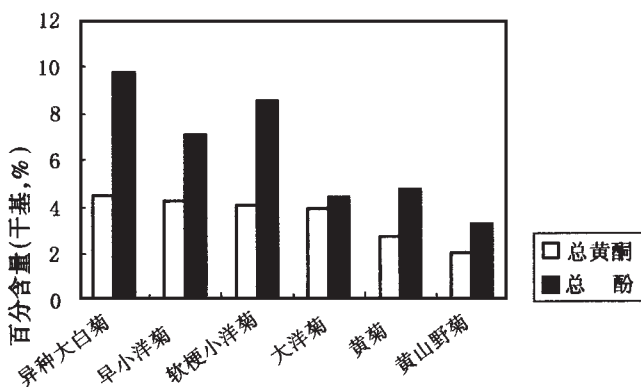
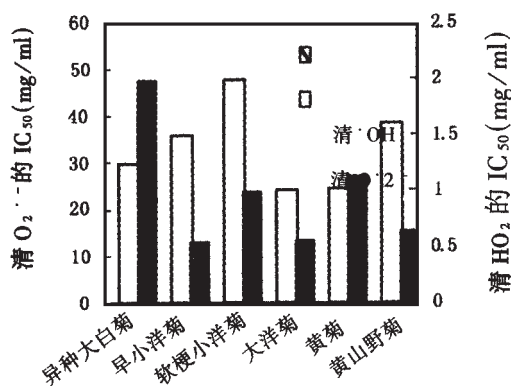


图3 不同菊花品种间总酚与总黄酮含量的比较

图4 菊花中清·OH活力与清 $O_2^{\cdot-}$ 活力比较

清 $O_2^{\cdot-}$ 和清 $\cdot OH$ 活性无对应关系。从 IC₅₀ 的平均值估算,菊花中有效成分的清 $O_2^{\cdot-}$ 活力约为清 $\cdot OH$ 活性的30倍。

3 讨论

6种菊花的总黄酮、总酚含量与清 $O_2^{\cdot-}$ 和清 $\cdot OH$ 的 IC₅₀ 值分别列在图3和图4中。

综合图3、图4的结果可得出如下结论:总酚和总黄酮含量最高的异种大白菊,清 $\cdot OH$ 能力最弱;早小洋菊和大洋菊的清 $\cdot OH$ 活性均强于野菊花,软梗小洋菊的清 $\cdot OH$ 活性也强于黄菊;菊花中酚类物质的含量与清 $\cdot OH$ 活力无对应关系。清 $O_2^{\cdot-}$ 活性最强的大洋菊和黄菊中酚类物质的含量并不高,总黄酮含量相近的四种杭白菊清 $O_2^{\cdot-}$ 活性相差很大,总酚含量与清 $O_2^{\cdot-}$ 能力间也无对应关系。表明酚类物质不是菊花清除活性氧自由基的唯一和关键组分。菊花中含有的有效成分除黄酮、酚酸类外,还含有萜类、内酯和多糖等组分,也具有相当的抗自由基和抗氧化活性,有必要对它们进行深入研究。

参考文献

- 1 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上海科学技术出版社, 1986, 2128 ~ 2129.
- 2 胡春. 黄酮类化合物抗氧化性质的研究 - 菊花生物抗氧化性及保健作用的研究. 无锡轻工大学博士学位论文, 1994, 86 ~ 89.
- 3 王洪新. 食品天然抗氧化剂的研究 - 芦叶抗氧化成分及其在食品中的应用. 无锡轻工大学博士学位论文, 1993, 103.
- 4 王红, 张卫明. 银杏叶中黄酮类化合物的质量研究. 中国野生植物资源, 1995, 1: 13 ~ 16.
- 5 张尔贤等. 油柑清除活性氧作用研究 I. 化学发光评价. 自由基生命科学进展第一集, 1993, 118 ~ 115.