

文章编号 :1003- 8701(2012)03- 0052- 05

松针中黄酮类化合物抗氧化性能的研究

王 昕 ,周晓丹 ,何欣悦 ,张 思 ,谢冰雪 ,刘海燕

(吉林大学生物与农业工程学院 ,长春 130025)

摘 要 :松针落叶中含有大量的黄酮类化合物 ,研究发现松针黄酮对各种自由基均有较强清除作用 ,总体抗氧化活性很强 ,对金属离子有很好的螯合作用 ,并可以在一定程度上抵抗蛋白质的羰基化氧化。但在不同的浓度、温度、pH 值等条件下 ,其表现出的抗氧化活性却差异很大。试验结果表明 ,松针黄酮的抗氧化性能总体强于 Vc ,同时又验证了其 Vc 有良好的协同作用。

关键词 :松针落叶 ;黄酮类化合物 ;抗氧化作用 ;自由基清除作用 ;协同作用

中图分类号 :S789.4

文献标识码 :A

Research on the Anti-oxidizing Activity of Flavonoid in Pine Needle

WANG Xin, ZHOU Xiaoi- dan, HE Xin- yue,

ZHANG Si, XIE Bing- xue, LIU Hai- yan

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130025, China)

Abstract: Pine needle leaves contain large amounts of flavonoids, and studys found that pine needle flavonoids have strong scavenging effect on various free radicals, while its total anti- oxidizing activity is very strong. It also has good chelating effect on the metal ion, and to some extent can resist protein carbonylation oxidative. But in different concentration, temperature, pH value conditions, the anti- oxidizing activity of pine needle flavonoids ranges between different levels. The results of experiment showed that the anti- oxidizing activity of pine needle flavonoids was stronger than Vc overall, and at the same time its good synergistic effect with Vc verified.

Keywords: Pine needle leaves; Favonoids; Antioxidant effect; Free radical scavenging effects; Synergistic effect

黄酮是一类自然界中广泛存在的且具有多种生物学功能的化合物 ,它可抑制脂质过氧化^[1]、降血脂^[2]、抑制毛细血管透性增加和变脆等 ,在生物体内有预防心血管疾病、防癌抗癌^[3]、调节免疫、抗衰老^[4]、抗菌杀菌^[5]、吸收紫外辐射、提高记忆力、抗过敏^[6]、活血化瘀等诸多药理作用及功效^[7-8]。近年来 ,人们分别从不同花、叶类植物中提取黄酮进行研究 ,证实了黄酮的抗氧化能力和不可小觑的医用价值。

松针属一种废弃物 ,来源经济、广泛。同时松针也一直被认定为具有很高的药用价值 ,应用于诸多

领域^[9-10]。松针落叶中含有较多黄酮类化合物 ,运用超声波辅助溶剂提取法提取松针总黄酮 ,具有较高的提取率^[11-12]。松针落叶中的黄酮类物质 ,具有较强的抗羟基自由基和超氧阴离子氧化的能力^[13-14] ,但对其他类型的自由基的清除能力 ,仍需要进一步研究和确定。此项研究对松针中的总黄酮含量进行了分析测定 ,研究了松针黄酮的抗氧化性能 ,并与常用抗氧化剂 Vc 进行对比 ,对于提取与制备天然抗氧化剂具有一定的参考意义。

1 试验原料及设备

1.1 试验样品

收集长春市吉林大学校园内秋季松针落叶 ,高速粉碎机粉碎 ,100 目过筛 ,取一定量粉末溶解

收稿日期 2012- 03- 15

基金项目 :大学生创新实验项目(2010C45112)

作者简介 :王 昕(1970-) ,女 ,副教授 ,博士 ,主要从事食品科学与工程方向研究。

于 50% 的乙醇中, 料液比 1:40, 在功率 90 w 的条件下, 超声振荡 20 min, 加速溶解。溶液经纱布、滤纸两次过滤后进行旋转蒸发, 蒸发结束再次加入乙醇, 使其浓度达到 85% 以上(体积比 1:2)。均匀的溶液静置 24 h 后, 再次过滤, 取上清液进行二次旋转蒸发^[11]。蒸发所得溶液即为松针黄酮提取液, 分光光度法测定其浓度为 0.191 g/100 mL, 用此溶液进行松针黄酮抗氧化性能的测定。

1.2 主要化学试剂

无水乙醇、邻苯三酚、硫代巴比妥酸、苯甲醚、 β -胡萝卜素、邻菲罗啉、DNPH、盐酸胍(均为分析纯 天津益仁达化学试剂厂); 脱氧核糖、牛血清白蛋白(均为生化试剂 北京宜科思源宝公司)。

1.3 主要设备

CF-10A 高速粉碎机(大祥公司); KQ2200DE 超声波发生器(昆山舒美公司); RE-5299 旋转蒸发器(上海亚荣公司); HZ-1500 喷雾干燥器(辉展公司)。

2 试验方法

2.1 自由基清除能力测定方法

分别取 1 mL 蒸馏水、1 mL 松针黄酮提取液、1 mL 浓度为 2 mg/mL 的 Vc 溶液、1 mL 黄酮溶液+2 mg Vc 粉末于 4 支试管中, 0~3 号编号。以下所有抗氧化性测定中均按此配制和编号。

2.1.1 超氧阴离子清除能力

在 0~3 号试管中依次加入 pH=8.2, 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 2 mmol/L EDTA)和二次蒸馏水, 于 25℃ 恒温 20 min 后加入 25℃ 预热过的 80 mmol/L 邻苯三酚(对照管用 10 mmol/L 盐酸代替), 迅速摇匀, 立即倾入比色杯中, 在波长 420 nm 处每 0.5 min 测定 1 次吸光度, 共测 4 min。计算 4 支试管吸光度值随时间的变化率, 平行测定 3 次取平均值。

$$O_2^- \cdot \text{清除率} = [(\Delta A_0 - \Delta A_i) / \Delta A_0] \times 100\%$$

式中 ΔA_0 、 ΔA_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管吸光度值随时间的变化率, 其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.1.2 过氧化氢清除能力

1.0 mL 0.1 mmol/L H_2O_2 分别加入 0~3 号管中, 再依次加入 0.1 mL 3% 的钼酸铵, 10 mL 硫酸(2 M), 7.0 mL KI(1.8 mM), 混合溶液用硫代硫酸钠(5 mM)滴定, 直到黄色消失。平行测定 3 次取平均值。

$$H_2O_2 \text{ 清除率} = [(V_0 - V_i) / V_0] \times 100\%$$

式中 V_0 、 V_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管消

耗硫代硫酸钠溶液的体积, 其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.1.3 羟自由基清除能力

采用抗脱氧核糖氧化法, 在 Vc 存在条件下, 双氧水、EDTA 和三价铁作用产生 $\cdot OH$ 氧化脱氧核糖, 硫代巴比妥酸(TBA)与该脱氧核糖产物在酸性条件下可缩合成有色物质, 加入黄酮会与脱氧核糖竞争 $\cdot OH$, 通过测定有色物质减少量可得羟自由基清除率。0~3 号管中依次加入 1.04 mM EDTA、1.0 mM $FeCl_3$ 、蒸馏水各 0.1 mL 混匀后, 再加 10 mM 双氧水、3.36 mM 脱氧核糖各 0.1 mL 和 0.2 mM 抗坏血酸 0.5 mL, 反应体系在 pH7.4 混匀后 37℃ 水浴保温 30 min。然后加入 0.33% TBA-HCl 2.0 mL, 混匀置沸水浴中 15 min, 流水冷却, 535 nm 处测吸光度。平行测 3 次取平均值。

$$OH \cdot \text{清除率} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%$$

式中 A_0 、 A_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管的吸光度值, 其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.1.4 烷氧基清除能力

基于 Zeisel 反应, 甲基醚用浓盐酸处理时, 分子发生裂解, 生成氯甲烷和醇(或酚), 把氯甲烷借蒸馏从生成物中分出, 再通过重量法测定加入黄酮前后的重量差即可知烷氧基的清除效果。0~3 号管中均加入 5.4 g 苯甲醚和 1.8 g 浓盐酸, 混匀后加热至不再沸腾为止。测定加热前后的质量差, 平行测定 3 次取平均值。

$$RO \cdot \text{清除率} = [(\Delta m_i - \Delta m_0) / \Delta m_0] \times 100\%$$

式中 Δm_0 、 Δm_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管加热前后的质量差, 其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.1.5 氮氧自由基清除能力

通过测定加入黄酮提取液前后, 亚硝酸盐与 Griess 试剂混合溶液吸光度的变化反映氮氧自由基的清除率。0~3 号管中均加入 5 $\mu g/mL$ 亚硝酸钠标准液 5.0 mL, 放入 50 mL 容量瓶中, 再加 2 mL 0.4% 对氨基苯磺酸, 摇匀静置 5 min, 加 1 mL 0.2% N-(1-萘基)-乙二胺溶液, 蒸馏水定容, 摇匀静置 20 min, 540 nm 处测吸光度。平行测定 3 次取平均值。

$$NO \cdot \text{清除率} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%$$

式中 A_0 、 A_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管的吸光度值, 其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.2 其他抗氧化性能测定

2.2.1 总抗氧化性能测定

根据 Jayaprakash 等^[15]的方法, 采用 β -胡萝卜素-亚油酸乳化液体系中加入松针黄酮前后 β -胡萝卜素过氧化损失的不同进行抗氧化能力

评价。将 0.2 mg β -胡萝卜素溶于 0.2 mL 氯仿中,加入 20 mg 亚油酸及 200 mg 吐温-40,混匀后于 40℃ 水浴中除去氯仿,加 50 mL 蒸馏水剧烈震荡,即配成反应介质溶液,同时设置空白,除不加 β -胡萝卜素氯仿溶液,其他步骤同前。于 0~3 号管中逐一加入 4.0 mL 反应介质溶液,混匀后置于 50℃ 水浴中恒温,在 470 nm 波长下每隔 30 min 测定一次吸光度,直至 0 号管中 β -胡萝卜素颜色消失为止。平行测定 3 次取平均值。

$$\text{抗氧化活性} = [1 - (A_0 - A_i) / (A_0^0 - A_i^0)] \times 100\%$$

式中 A_0 、 A_0^0 分别表示初始时 1~3 号管和 0 号管的吸光度; A_i 、 A_i^0 分别表示终止时 1~3 号管和 0 号管的吸光度。

2.2.2 金属离子螯合作用测定

人体内产生有害氧族基团往往需要铁作催化剂。二价铁离子和邻菲罗啉可以形成复合物,测定加入松针黄酮前后复合物的多少,可得其对金属离子的螯合作用。0~3 号管中加入 0.05 mL 四水氯化亚铁(0.2 mM)、0.2 mL 的邻菲罗啉(5.0 mM)和 1.6 mL 蒸馏水,0 号管再加入 0.03mg Na_2EDTA ,混合溶液达到平衡后(10 min),在 562 nm 测定吸光度。平行测定 3 次取平均值。

$$\text{金属离子螯合能力} = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%$$

式中 A_0 、 A_i 分别表示 0 号管和 1~3 号管的吸光度值,其中 $i=1, 2, 3$ 。

2.2.3 抗蛋白质氧化测定

测定加入黄酮前后蛋白质中羰基的数量,以评价其对蛋白质氧化的作用。双氧水处理牛血清白蛋白(BSA)将其氧化后逐一加入到 0~3 号管中,室温下,0.05% DNPH 处理 BSA 原样和 0~3 号管中溶液,30 min,加入 5% 三氯乙酸,样品置于冰水中 15 min,5000g 力下离心分离 10 min,蛋白质球用乙醇-乙酸乙酯(1:1)冲洗 3 次,之后溶解到 6 M 盐酸胍(pH 2.3)中,以 0 号管作空白调零,370 nm 下测定吸光度。平行测定 3 次取平均值。

$$\text{抗蛋白质氧化能力} = (A_i / A_{BSA}) \times 100\%$$

式中 A_i 、 A_{BSA} 分别表示 1~3 号管和 BSA 原样管的吸光度值,其中 $i=1, 2, 3$ 。

3 结果与讨论

3.1 不同条件对松针黄酮抗氧化性能的影响

基于松针黄酮独特的抗氧化机理,其抗氧化活性受外界条件的影响较大,需测定其在不同浓度、温度等条件下的抗氧化能力。

3.1.1 浓度对松针黄酮抗氧化性的影响

采用 2.2.1 的试验方法测定不同浓度条件下松针黄酮总抗氧化性能,选取浓度值为 0.191 mg/mL、0.286 5 mg/mL、0.382 mg/mL、0.573 mg/mL、0.955 mg/mL、1.337 mg/mL、1.91 mg/mL,结果见图 1。

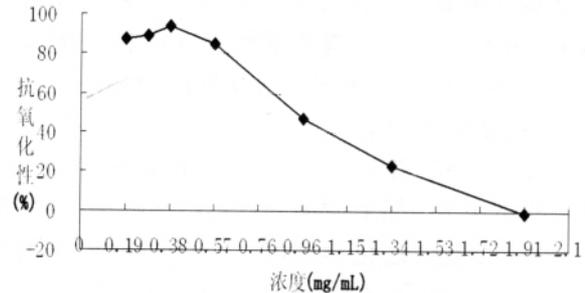


图 1 不同浓度的松针黄酮抗氧化能力

从图 1 看出,随着浓度的增大,松针黄酮的抗氧化能力并未呈现持续增长的趋势,在低浓度时其抗氧化能力较强,但当浓度大于 0.573 mg/mL 后,抗氧化能力反而快速下降。特别是浓度太大超过 1.91 mg/mL 时,其抗氧化性能完全被抑制,浓度再大可能反而会出现助氧化的效果。这可能是因为影响黄酮类化合物抗氧化活性的因素,主要是羟基化的程度和羟基的位置。处于低浓度时,随浓度增大,可利用羟基增多,抗氧化能力增强。但当浓度过大时,羟基间更易形成氢键,反而抑制了羟基的作用^[16-17]。其中具体原理还需进一步实验探究验证,但选择松针黄酮用于抗氧化作用时,要注意其溶液的浓度,控制在 0.4 mg/mL 为宜。

3.1.2 温度对松针黄酮抗氧化性的影响

采用 2.2.1 的试验方法,选择温度在 0、25、30、35、40、50、65℃ 的条件下进行抗氧化性能测定,结果见图 2。

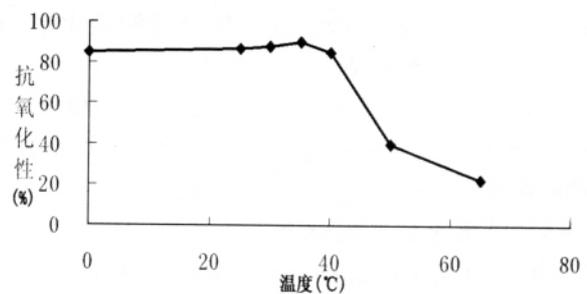


图 2 不同温度下松针黄酮的抗氧化能力

由图 2 发现,温度对松针黄酮抗氧化活性的影响并不呈线性趋势。在 0~40℃ 左右时,其抗氧化能力较强,这部分温度正是由低温保藏到人体内的温度,说明松针黄酮在体内作用时抗氧化作

用较强,并且应该采取低温冷藏的方式储存。随着温度的进一步上升,其抗氧化能力大幅下降,说明高温会破坏其抗氧化作用。这在松针黄酮成品的储藏和杀菌过程中都是值得注意的。

3.1.3 pH 值对松针黄酮抗氧化性的影响

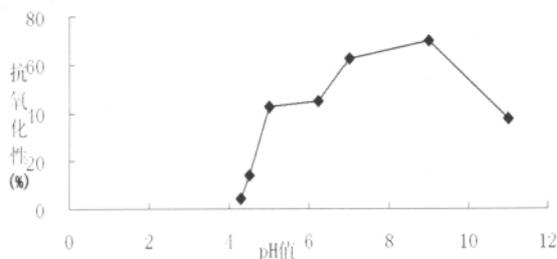


图3 不同 pH 值的松针黄酮的抗氧化能力

调节松针黄酮溶液 pH 值分别为 4、4.3、4.5、5、6.23(松针黄酮溶液原始 pH 值)、7、9、11 的条件下,基于 2.2.1 的方法进行抗氧化性能测定,结果

见图 3。

松针黄酮溶液本身表现微弱酸性,但在酸性条件下,抗氧化能力受很大影响。pH 值接近 4 时,其抗氧化活性几乎降为零。特别是酸度低于 4 时,更表现出了助氧化的性质。这可能与起主要抗氧化作用的羟基基团在酸性条件下遭到破坏有关,其具体机理待进一步论证^[16-17]。实验中发现,随 pH 值上升,其抗氧化能力增强,pH 值为 7~9 的弱碱性条件最为适宜。但碱性过强抗氧化能力也会受到抑制。所以控制反应体系为弱碱性条件有利于增强其抗氧化能力。

3.1.4 加热时间对松针黄酮抗氧化性的影响

设置温度在 100℃ 条件下,使松针黄酮溶液分别加热煮沸 10 s、30 s、1 min、5 min、10 min 和 30 min,采用 2.2.1 的方法测定其抗氧化性能的变化,分析其热稳定性,结果见表 1。

表 1 不同加热时间的松针黄酮抗氧化能力

加热时间	10 s	30 s	1 min	5 min	10 min	30 min
抗氧化活性	73.33%	6.67%	-	-	-	-

一般情况下,杀菌是在温度高于 115℃ 条件下,加热 30 min 左右。从表中可看出,松针黄酮对热稳定性很差,在 100℃ 时加热超过 30 s,就不再具有抗氧化性能。其中原因有待进一步的研究,但分析黄酮抗氧化机理,发现可能是其受热后发生分解或异构,不再具有可抗氧化的化学结构^[17-18]。所以对松针黄酮制品的检测等过程都应该在低温

下进行,而且应采用高温瞬时灭菌。

3.2 松针黄酮抗氧化活性及其与 Vc 协同作用

采用 2.1 及 2.2 的试验方法,对松针黄酮的抗氧化活性进行了系统的测定。将各组试验平行数据取平均值分析计算,即可得到松针黄酮对各种自由基的清除能力及其各种抗氧化性能,并与 Vc 进行比较,测定了二者的协同作用,数据见表 2。

表 2 松针黄酮抗氧化性能及其与 Vc 的协同作用

测试指标	松针黄酮(%)	Vc(%)	协同作用(%)
O ₂ ^{·-} 清除率	81.01	82.52	98.99
H ₂ O ₂ 清除率	24.25	52.16	87.71
OH [·] 清除率	20.09	5.02	25.85
RO [·] 清除率	46.97	9.36	57.06
NO [·] 清除率	30.35	29.30	32.09
总抗氧化活性	83.33	6.67	88.33
金属离子螯合作用	50.36	38.41	65.58
抗蛋白质氧化作用	20.15	15.67	23.88

综合表 2 数据发现,松针黄酮与 Vc 都具有较强的抗氧化能力,且二者在系统试验中均表现出了良好的协同作用。二者独立的抗氧化性能和协同作用对比情况如图 4 所示。

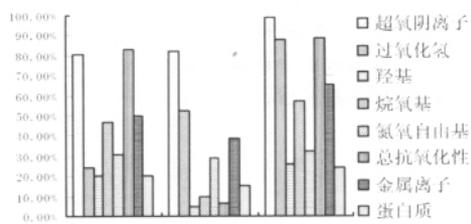


图 4 松针黄酮与 Vc 抗氧化性能柱状对比图及其协同作用

分析图表可以看出,松针黄酮对各种自由基均有较强清除能力,可较好的抵抗蛋白质羰基化氧化,对金属离子的螯合作用也很好,在系统的研究中表现出了较强的抗氧化活性。

松针黄酮抗氧化性能总体强于 Vc,对超氧阴离子、羟自由基和烷氧基的清除效果尤其显著。特别是,松针黄酮的总抗氧化活性高达 83.33%,是 Vc 的 12.5 倍。在二者的协同作用中松针黄酮起主要作用。虽然其对过氧化氢的清除效果不及 Vc,但在二者共同作用下,对过氧化氢的清除能力显著提升。

4 分析与展望

通过实验系统的分析测定,表明松针黄酮具有良好的抗氧化活性,对各种导致氧化的因素都有很好的抑制作用。

综合不同条件对松针黄酮的抗氧化活性的影响,可归纳出松针黄酮溶液在其浓度为 0.4 mg/mL,温度 35~40℃,pH 值在 7~9 之间的弱碱性条件下有最强的抗氧化活性。且其对热的稳定性很差,应该低温保藏,并只能采用高温瞬时灭菌对其制品进行杀菌处理。同时实验还验证了它与 Vc 有着较强的增效作用。可以按照上述条件调节松针黄酮溶液,使其表现出最强的抗氧化活性,并向其中添加一定量的 Vc,再通过均质及喷雾干燥法,二者相互协同制得天然松针黄酮抗氧化剂制品。

试验仅证明了松针黄酮与 Vc 的协同作用,其与 V_E 等其他抗氧化剂的协同作用是否存在,仍需进一步验证。而且食品是一个复杂体系,添加其中是否会与一些物质相互影响,甚至产生不良效果,都是下一阶段研究亟需关注的方向。另外,由于多种原料中黄酮类物质的热敏性都很强^[19],而多数食品都有热加工过程,研究它的热稳定性影响因素,或寻找合适的保护剂也是接下来需要研究的问题。

5 结 论

松针黄酮对各种自由基均有较强清除作用,对金属离子有较好螯合作用,并可抵抗蛋白质一定程度的羰基化氧化,对各种导致氧化的因素都有良好抑制作用。此次研究以松针落叶为原料提取黄酮类抗氧化剂,原料属废弃物,来源经济、广泛。成品松针黄酮抗氧化剂经过安全性评价后即可作为天然防腐剂用于食品等的保藏,或进一步制成保健食品抵抗衰老和机体氧化。整个研究达到了变废为宝、低碳环保的理念,也使得最终制得的抗氧化剂成品具有了更高的经济和科研价值。

参考文献:

[1] Ramful D, Aumjaud B, Neergheen V S, et, al. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems [J]. *Food Research International*, 2011, 44(5): 1190-1196.

[2] Stefkov Gjoshe, Kulevanova Svetlana, Miova Biljana, et, al. Effects of *Teucrium polium* spp. capitatum flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2011, 49(9): 885-892.

[3] Garcia-Lafuente Ana, Guillamon Eva, Villares Ana, et, al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease [J]. *Inflammation Research*, 2009, 58(9): 537-552.

[4] Philips Neena, Bynum David, Hwang Hyeondo. Counteraction of skin inflammation and aging or cancer by polyphenols and flavonoids from *Polypodium leucotomos* and xanthohumol[J]. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2010, 9(2): 142-149.

[5] Cushnie T P Tim, Lamb Andrew J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38 (2): 99-107.

[6] Ogawa Yuko, Oku Hisae, Iwaoka Emiko. Allergy-preventive flavonoids from *Xanthorrhoea hastilis* [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 55(4): 675-678.

[7] 汪春军,陈红艳,宋可珂.植物黄酮类化合物的提取分离研究进展[J].*广东化工*,2011,38(6):91-92.

[8] 李征.染料木黄酮生物学功能的研究进展[J].*环境与健康杂志*,2008,25(3):279-281.

[9] Kelka V M, Geils V M, Becker D R. How to recover more value from small pine trees [J]. *Essential oils and resins Biomass and Bioenergy*, 2006(30): 316-320.

[10] 方应权,全哲山,蔡兴东.松针饮料制备工艺[J].*食品研究与开发*,2010,31(2):113-115.

[11] 殷涌光,闫琳娜.松针有效成分提取技术的研究进展[J].*农业机械学报*,2006,37(8):218-220,213.

[12] 张霞.油松松针黄酮的分离提纯及其抗氧化活性研究[D].北京林业大学,2010.

[13] 徐丽珊,章海文.松针提取液的抗氧化活性[J].*食品科学*,2011,32(7):97-99.

[14] 闫琳娜.松针落叶总黄酮的提取、纯化及抗氧化性能分析[D].吉林大学,2009.

[15] Jayaprakasha G K, Singh R P, Sakariah K K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinefera*) extracts on peroxidation models in vitro[J]. *Food Chem*, 2001, 73(3): 285-290.

[16] 郭玉蓉,韩舜愈,刘鹏,等.苦荞麦黄酮类化合物的提取分离及结构鉴定[J].*食品科学*,2004,25(11):133.

[17] 朗娜,罗红霞.黄花菜中黄酮类物质抗氧化性的研究[J].*食品研究与开发*,2007,128(3):74-77.

[18] Zhong Jian-qing, Li Bo, Jia Qi, et, al. Advances in the structure-activity relationship study of natural flavonoids and its derivatives[J]. *Yaohue Xuebao*, 2011, 46(6): 622-630.

[19] 张雁.葛根保健饲料中黄酮类化合物稳定性的初步研究[J].*华南师范大学学报*,2001,11(4):59-62.