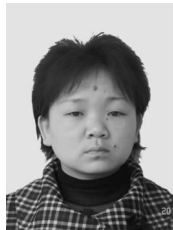


## 流动注射化学发光法测定茜草总黄酮清除羟自由基能力的研究



TIAN Chun-lian

田春莲<sup>1</sup>, 康炼常<sup>2</sup>

(1. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000;

2. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 以茜草叶醇提取的茜草总黄酮为原料, 采用流动注射化学发光法, 以Vc为对照, 考察不同浓度、时间、光照及加热处理下茜草总黄酮清除·OH的能力。在0.0005~0.1 g/L质量浓度范围内, 茜草总黄酮对·OH的清除能力与其浓度呈正相关, 在质量浓度为0.1 g/L时, 对·OH清除率高达97.23%; 放置58 h后, 茜草总黄酮对·OH的清除率(94.18%)比Vc(17.6%)高了76.58个百分点; 132 W灯照58 h后, 茜草总黄酮对·OH的清除率下降了2.79个百分点, Vc对·OH的清除率下降了88.55个百分点; 在加热煮沸处理10 h后, 茜草总黄酮的耐热性较强, 10 h处理后, 其对·OH的清除率(88.4%)比Vc(65.07%)高了23.33个百分点。因此, 茜草总黄酮的天然抗氧化能力较强, 具有一定的开发应用价值。流动注射化学发光法灵敏度高、测定快速、操作简单和重现性好, 可应用于茜草总黄酮清除超氧阴离子的能力评价及精制茜草总黄酮的抗氧化效果研究。

**关键词:** 茜草总黄酮; 流动注射化学发光法; 羟基自由基; 清除率

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)05-0100-05

## Determining the Ability of Madder Flavonoids Scavenging Hydroxy Radical Using Flow Injection Chemiluminescence Method

TIAN Chun-lian<sup>1</sup>, KANG Lian-chang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

2. Institute of Chemical Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The influences of concentration, time, light and heating processing on scavenging ·OH were investigated by flow injection chemiluminescence method comparing with Vc. In the concentration of 0.0005~0.1 g/L, the scavenging ability to ·OH was a positive correlation with the concentration of madder flavonoids, when the concentration was 0.1 g/L, the clearance rate of ·OH was 97.23%; After 58 h of storage, the scavenging rate of ·OH by madder flavonoids was higher than the Vc by 76.58 percentage points; After irradiated by a 132 W lamp for 58 h, the scavenging rate of ·OH by madder flavonoids decreased by 2.79 percentage points, Vc decreased by 88.55 percentage points; After the treatment in boiling water for 10 h, madder flavonoids have strong heat resistance, the scavenging rate of ·OH was higher than the Vc by 23.33 percentage points. Therefore, madder flavonoids have good ability of natural antioxidant, and possess a certain value of development and applications. Flow injection chemiluminescence method has the advantages of high sensitivity, rapid determination, simple operation and good reproducibility, and it can be used to evaluate the capacity assessment of superoxide anion and antioxidant effect of madder flavonoids.

**Key words:** madder flavonoids; flow injection chemiluminescence method; hydroxy radical; scavenging rate

茜草(*Rubia cordifolia* L.)为茜草科多年生攀援草本, 又名活血草、拉拉藤、活血丹等, 主产于湖南、安徽、陕西等地, 具有凉血、止血、祛瘀、通经之功效, 主治吐血, 崩漏, 外伤出血, 经闭瘀阻, 关节痹痛, 跌扑肿痛等。近年来, 药理研究发现具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒和升高白细胞等作用<sup>[1]</sup>。黄酮类物质是一类

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 湖南省高校科技创新团队支持计划资助(湘教通(2010)212号); 湖南省科技计划资助项目(2010TP4007-1); 林产化工工程湖南省重点实验室开放基金资助项目(JDZ200906)

作者简介: 田春莲(1970-), 女, 湖南张家界人, 副教授, 硕士, 主要从事资源植物保护与利用研究工作。

有多种生物学功能特性的物质,广泛用于医药、保健食品中,具有防癌抗癌、调节免疫、抗菌抗病毒、抗炎抗过敏和很好的抗氧化等作用<sup>[2]</sup>。经文献数据库检索,对于茜草成分,多见于多糖类、萜类、茜草素、茜草酸、水溶性的肽类、脂溶性的蒽醌及其糖苷类等<sup>[3]</sup>的研究,而茜草总黄酮却鲜有报道,目前仅见斯琴毕力格对茜草总黄酮的提取方法进行了对比研究,斯琴毕力格报道茜草中的黄酮类物质主要为双氢黄酮和黄酮醇类<sup>[1]</sup>,双氢黄酮存在 C4 羰基,黄酮醇类存在 C2,3 双键及 C4 羰基,2002 年刘莉华等报道表明,C2,3 双键及 C4 羰基的存在可延长共轭体系,有利于黄酮类形成更稳定的自由基中间体,从而有利于抗氧化活性<sup>[4]</sup>。因此,本实验采用流动注射化学发光法探讨茜草总黄酮的抗氧化能力和稳定性,旨在为深度开发茜草资源提供理论依据。

## 1 实验

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 材料** 茜草于 2010 年 6 月采于张家界,采集后经吉首大学廖博儒研究员鉴定为茜草科茜草属茜草,取其叶洗净,80 °C 烘干,粉碎,过筛得 16 mm 粗细的原材料,干燥,备用。鲁米诺(苏州工业园区亚科化学试剂有限公司,纯度 > 98 %),芦丁(纯度 > 98 %),Vc、NaNO<sub>2</sub>、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、NaOH、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、无水 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、无水乙醇,均为 AR。

**1.1.2 仪器** IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪,西安瑞迈;UV-160A 紫外分光光度计,日本岛津;CH-100-RD 人工气候箱,日本东京;KQ-250E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;HH-6 电子恒温水浴锅,苏州威尔实验用品有限公司。

### 1.2 总黄酮的提取

称取粉碎处理后的茜草叶 5 g,按 1:20(g:mL)的料液比加入 95 % 乙醇,60 °C 下提取 3 次,分别提取 3、3 和 2 h,合并滤液,真空浓缩至 200 mL,定容至 250 mL,得茜草叶提取液。

### 1.3 茜草叶中总黄酮含量的测定方法

**1.3.1 吸收峰的确定** 称取芦丁标准品 12.5 mg,加少量 95 % 乙醇超声波溶解后,定容至 50 mL,摇匀,得质量浓度为 0.25 g/L 芦丁标准溶液。精确移取 2.4 mL 标准液于 10 mL 的比色管中,加入 5 % NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.4 mL 混匀,放置 6 min,加入 10 % Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.4 mL 混匀,放置 6 min,再加入 4.3 % NaOH 溶液 4 mL,用水稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,以 95 % 乙醇溶液做空白参比,在分光光度计 200~700 nm 处测吸收度,结果表明在 506 nm 波长处有最大吸收值,与文献[1]的结果一致。

**1.3.2 标准曲线的绘制** 分别准确移取 0.25 g/L 芦丁标准溶液 0.00、0.40、0.80、1.20、1.60、2.00 和 2.40 mL 于 10 mL 比色管中,按 1.3.1 节方法在波长 506 nm 处测吸光度,以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得出芦丁质量浓度(C, g/L)与吸光度(A)的关系曲线(图 1),回归方程为  $A = 11.523C + 0.0312$ ,  $R^2 = 0.9994$  ( $n = 6$ )。

**1.3.3 样品总黄酮含量的测定** 准确移取 0.60 mL 1.2 节得到的茜草叶提取液于 10 mL 的比色管中,加水稀释至 2.4 mL。以不加样品管做空白参比,参照 1.3.1 节中的方法在 506 nm 处测吸光度。

### 1.4 茜草总黄酮清除·OH能力的测定方法

**1.4.1 茜草总黄酮样品的制备** 准确称取 30 g 茜草叶干粉,按照 1.2 节方法提取茜草总黄酮,浓缩,干燥得茜草叶中总黄酮的质量为 1.218 g,贮存备用。

**1.4.2 鲁米诺溶液和羟自由基产生体系的配置** 鲁米诺溶液的配置方法参考文献[5],羟自由基产生体系的配置参考文献[6]。

**1.4.3 流动注射化学发光体系的建立** 副蠕动泵将分别载流 Fenton 羟自由基产生体系试剂和 pH 值

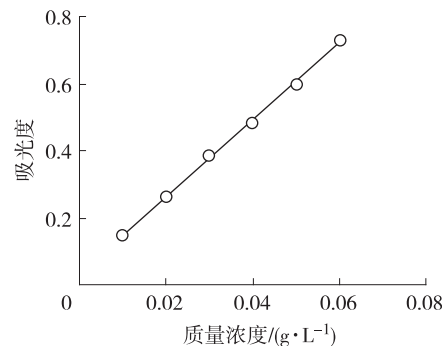
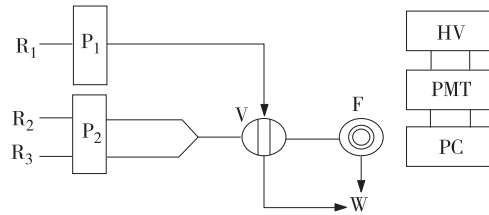


图 1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Standard curve of rutin

10.28 的碳酸盐缓冲溶液(含 0.1 mmol/L 的鲁米诺)输入分析系统。待基线稳定后,主蠕动泵将茜草总黄酮(或 Vc)溶液通过十六通注射阀注入于载流中,与其混合。按运行程序(表 1)进行流动注射化学发光分析(图 2),以 500 V,50 Hz,扩增 1 倍信号值条件,进行 20 次/秒不自动归零数据采集<sup>[7]</sup>。



R<sub>1</sub>. 测试样品 sample; R<sub>2</sub>. 羟自由基产生体系 hydroxyl radical generating system; R<sub>3</sub>. 碳酸盐缓冲溶液 carbonate buffer solution; P<sub>1</sub>. 主蠕动泵 main peristaltic pump; P<sub>2</sub>. 副蠕动泵 vice peristaltic pump; V. 三通汇合 three-way convergence; F. 流通池 flow cell; HV. 负高压 negative high voltage; PMT. 光电倍增管 photomultiplier tubes; PC. 电脑控制 computer controller; W. 废液 waste

图 2 流动注射化学发光系统示意图

Fig. 2 Sketch map of the flow injection chemiluminescence system

表 1 流动注射化学发光仪运行参数程序

Table 1 The process of running parameters for flow injection chemiluminescence instrument

步号 step	泵运行时间/s running time	主泵速度/ (r·min <sup>-1</sup> ) main pump speed	副泵速度/ (r·min <sup>-1</sup> ) vice pump speed	重复次数/次 repetition/times	阀位 valve	数据读取 data read	主泵方向 main pump direction	副泵方向 vice pump direction	跳转 jump
1	5	20	30	1	左 left	是 Yes	前 front	右 back	2
2	5	10	30	1	右 right	是 Yes	前 front	右 back	3
3	15	5	20	6	左 left	是 Yes	前 front	右 back	1

1.4.4 茜草叶中总黄酮清除·OH能力的测定 按上述所采用的发光体系,测定茜草总黄酮、Vc 经各种处理后的发光强度,取光强平均值进行计算。以鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-FeSO<sub>4</sub>-蒸馏水发光体系的发光强度为空白,计算出加入茜草总黄酮(或 Vc)后对·OH的清除率。

$$y = (F_a - F_b) / F_a \times 100 \%$$

式中:  $F_a$ —鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-FeSO<sub>4</sub>-蒸馏水的发光强度, Lux;  $F_b$ —鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-FeSO<sub>4</sub>-样品的发光强度, Lux。

## 2 结果与分析

### 2.1 茜草叶中总黄酮含量的测定结果

按 1.3 节测定方法测得 250 mL 茜草叶提取液中总黄酮质量浓度为 0.812 g/L,可知 5 g 茜草叶中总黄酮的得率为 4.06%。

### 2.2 不同条件对·OH清除率的影响

2.2.1 茜草总黄酮质量浓度 称取 10 mg 1.4.1 节制备的茜草总黄酮,用 95% 的乙醇定容至 100 mL,得质量浓度为 0.1 g/L 的茜草总黄酮溶液,用蒸馏水稀释成 0.000 5、0.001、0.005、0.01、0.05 和 0.1 g/L 不同的质量浓度,以 Vc 作对照,对·OH的清除率测定结果如图 3(a)所示。由图可见,0.000 5~0.1 g/L 范围内,茜草总黄酮、Vc 对·OH的清除率都与质量浓度呈正相关,当茜草总黄酮质量浓度为 0.1 g/L 时,清除率高达 97.23%。茜草总黄酮、Vc 的半数抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)依次为: 2.57、0.69 mg/L。

2.2.2 放置时间 将质量浓度为 0.05 g/L 的茜草总黄酮分别放置 0、10、24、34、48 和 58 h 后评价清除·OH的能力,以 Vc 为对照,结果如图 3(b)所示。由图可见,放置时间对茜草总黄酮清除·OH影响程度较小,58 h 后,清除率为 94.18%,仍维持在 90% 以上;但 Vc 相反,放置 58 h 后,·OH清除率下降至 17.6%,比茜草总黄酮的清除率低了 76.58 个百分点。因此,茜草总黄酮的稳定性强于 Vc。

**2.2.3 光照** 选择不经放置处理 0.05 g/L 的茜草总黄酮进行光照实验,以 Vc 为对照。将配置好的茜草总黄酮溶液和 Vc 溶液放置在 132 W 和避光条件下,定时测定其清除  $\cdot\text{OH}$  的能力,以清除率为指标,结果见图 3(c)和图 3(d)。由图可知,茜草总黄酮在 132 W 光照和避光下,  $\cdot\text{OH}$  的清除率都较 Vc 高,且下降幅度小。光照 58 h 后,总黄酮  $\cdot\text{OH}$  清除率为 94.26%,比未处理样的清除率只下降了 2.79 个百分点,Vc 光照 58 h 后的  $\cdot\text{OH}$  清除率为 9.18%,比未处理样的清除率下降了 88.55 个百分点。同时光照和避光处理 48 h 后的总黄酮对  $\cdot\text{OH}$  清除率分别为 94.46% 和 94.29%,相对于未处理样的清除率下降幅度小;光照和避光处理 48 h 后的 Vc 对  $\cdot\text{OH}$  清除率分别为 36.62% 和 43.32%,避光处理比光照处理下降幅度小。说明,茜草总黄酮耐光性较 Vc 强。

**2.2.4 加热** 配置 0.05 g/L 的茜草总黄酮和 Vc 溶液 100 °C 水浴加热,定时测定清除  $\cdot\text{OH}$  的能力,结果见图 3(e)。由图可知,在实验时间范围内,水浴加热到 6 h 后,Vc 对  $\cdot\text{OH}$  的清除率开始明显下降,相对于未处理样,其清除率下降了 18.32 个百分点,而茜草总黄酮只下降 6.18 个百分点,加热 10 h 后,茜草总黄酮和 Vc 对  $\cdot\text{OH}$  的清除率分别为 88.4%、65.07%,茜草总黄酮比 Vc 的清除率高了 23.33 个百分点,明显看出茜草总黄酮的热稳定性强于 Vc。茜草总黄酮对  $\cdot\text{OH}$  的半数抑制质量浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 虽比 Vc 大,但稳定性较 Vc 强,抗氧化剂耐热性能的大小直接决定抗氧化剂的使用范围和使用效果,尤其对于天然抗氧化剂而言,其耐热性能更具有重要性,因为其可能会在某一温度以上活性降低甚至失活,从而失去其功能效用,茜草总黄酮在 100 °C 的沸水浴条件下,清除率仍维持相对稳定,因此,茜草总黄酮可以考虑开发成为天然抗氧化剂。

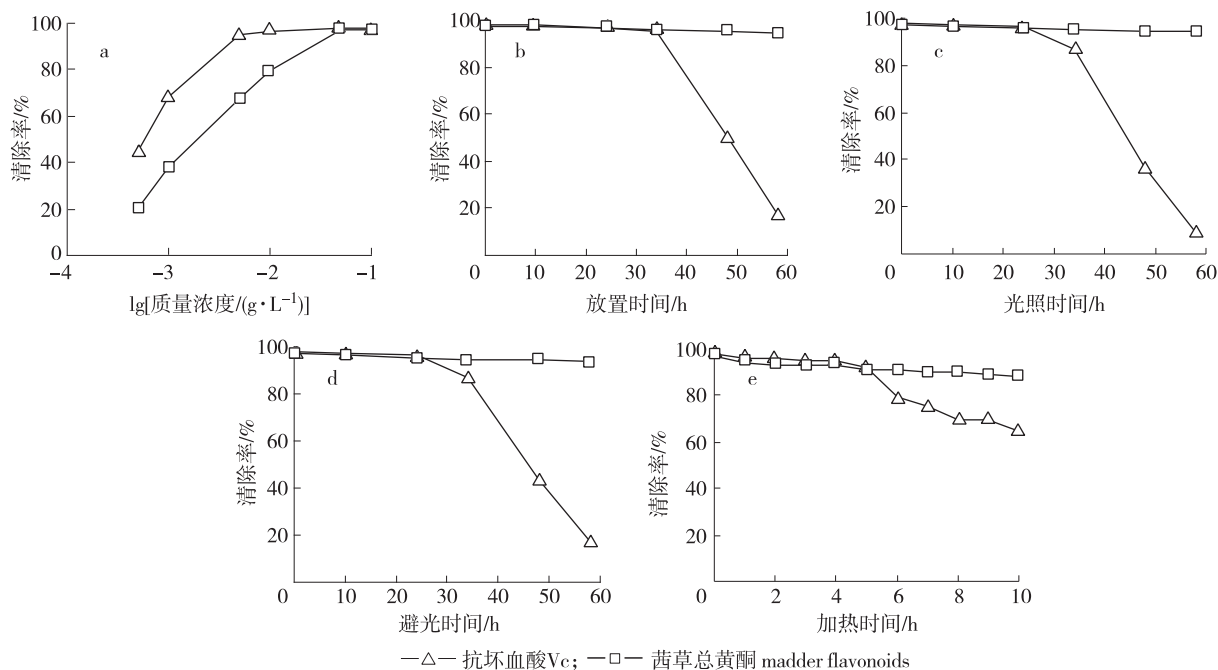


图3 不同条件下各样品对清除率的影响

Fig. 3 The influences of different conditions and samples on scavenging rate of  $\cdot\text{OH}$  of sample

### 3 结论

**3.1** 茜草总黄酮清除  $\cdot\text{OH}$  能力较强,在 0.000 5~0.1 g/L 质量浓度范围内,质量浓度与  $\cdot\text{OH}$  的清除能力呈正相关,在质量浓度 0.1 g/L 时,清除率达 97.23%,半数抑制质量浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 2.57 mg/L,仅次于 Vc ( $\text{IC}_{50}$  为 0.69 mg/L);但茜草总黄酮比 Vc 的稳定性好,强光照射 (132 W 灯) 34 h 后,茜草总黄酮对  $\cdot\text{OH}$  的清除率比 Vc 高,下降幅度比 Vc 小;茜草总黄酮的耐热性较强,加热处理 10 h 后,对  $\cdot\text{OH}$  的清除率比 Vc 高了 23.33 个百分点。

3.2 主副泵的泵速大小及泵速比对发光强度有很大影响,实验中选择进样时主副泵的泵速分别为 10 和 30 r/min。此时具有较高的发光强度和稳定性。

3.3 硫酸亚铁和过氧化氢浓度对测定结果有影响,浓度过大时,会使得谱图跑不出波峰来,影响实验结果,因此应选择合适的浓度,使光强度较大且重现性好。

3.4 流动注射化学发光法灵敏度高、测定快速、操作简单和重现性好,可应用于茜草总黄酮清除超氧阴离子的能力评价及精制茜草黄酮的抗氧化效果研究。

#### 参考文献:

- [1] 斯琴毕利格,曲长明,李增春. 茜草中提取总黄酮实验微型法与常规法的比较[J]. 内蒙古民族大学学报,2008,23(3):269-271.
- [2] 李楠,刘元,侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):140.
- [3] 杨连荣,周庆华. 茜草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药医药信息,2007,24(1):21-23.
- [4] 刘莉华,宛晓春,李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(3):265-270.
- [5] 孙涛,周冬香,毛芳,等. 流动注射化学发光法对超氧阴离子自由基  $O_2^-$  和羟基自由基  $\cdot OH$  的检测[J]. 食品工业科技,2006(11):182-184,187.
- [6] 吴拥军,石杰,屈凌波,等. 流动注射化学发光法及光度法用于巴戟天提取液抗氧化活性的研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(9):1688-1690.
- [7] 王元颖,郝再彬,李子院,等. 不同花中总黄酮的提取及其抗氧化强度的比较[J]. 现代食品科技,2008,24(11):1145-1147.

## 《生物质化学工程》征订启事

《生物质化学工程》是由国家林业局主管、中国林科院林产化学工业研究所主办的,由原《林产化工通讯》杂志改版的、面向国内外公开发行的全国生物质化工行业的技术类刊物。《生物质化学工程》是美国《化学文摘》(CA)收录期刊、《乌利希国际期刊指南》收录、RCCSE 中国核心学术期刊(A)、2010 年中国农业核心期刊、“中国期刊全文数据库”、“中文科技期刊数据库”、“万方数据-数字化期刊群”、“CEPS 中文电子期刊服务”全文收录期刊、“中国学术期刊综合评价数据库”统计刊源期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊。主编蒋剑春,名誉主编宋湛谦,编辑部主任王艳。期刊的其他参数为:双月刊,A4 开本,56 页,期订价 10.00 元,全年 60 元,邮发代号 28-205,国内刊号 CN 32-1768/S,ISSN 1673-5854。

**办刊宗旨** 认真执行国家的有关方针政策,及时反映林产化工和生物质化工科学技术成就,报道重要科学实验和学术研究成果,评述国际国内发展动向,促进学术交流。

**办刊方针** 理论与实践相结合,普及和提高相结合,引导技术潮流,促进行业发展。

**主要栏目** 研究报道、综述评论、博士生、硕士生毕业论文介绍、国内简讯等。

**报道范围** 是可再生的木质和非木质生物质资源的化学加工与利用,包括生物质能源、生物质化学品、生物质新材料、生物质天然活性成分和制浆造纸等。主要报道内容为松脂化学、生物质能源化学、生物质炭材料、生物基功能高分子材料、胶黏剂化学、森林植物资源提取物化学利用、环境保护工程、木材制浆造纸为主的林纸一体化和林产化学工程设备研究设计等方面的最新研究成果。

**读者对象** 适于从事生物质化学工业、林产化学工业、林业、农业、森工、能源、轻工、化工、环保、医药、食品、土产、商检、外贸等行业从事科研、教学、生产、经营、设计工作等相关人士阅读。

**地址:**210042 南京市锁金五村 16 号 林产化工研究所内《生物质化学工程》编辑部

**电话:**025-85482492

**传真:**025-85482492

**E-mail:**bce@vip.163.com

**http://**www.bce.ac.cn