

# 金银花提取物的抗氧化作用 与其绿原酸含量的相关性研究

关炳峰, 谭 军<sup>\*</sup>, 周志娣

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 研究了金银花提取物、绿原酸的抗氧化作用。用  $K_3[Fe(CN)_6]$  测定了它们的还原力; 采用脱氧核糖-铁体系、超氧阴离子自由基体系、二苯代苦味酰基自由基 (DPPH $\cdot$ ) 体系进行抗氧化活性的研究, 并同 Vc 进行了比较。结果表明: 金银花提取物的抗氧化活性与绿原酸含量密切相关, 具有较强的还原力, 其中清除羟基自由基能力比 Vc 好, 浓度 1mg/mL 时可以达到 53.18%; 清除超氧阴离子自由基的能力很好, 略低于 Vc 浓度 0.2mg/mL 时清除率大于 90%; 清除 DPPH $\cdot$  的能力高于 Vc 浓度 0.2mg/mL 时清除率大于 90%。

**关键词:** 金银花提取物, 抗氧化, 绿原酸, 相关性

**Abstract** The antioxidant effect of honeysuckle extraction and the chlorogenic acid was studied. Comparing with Vc, the antioxidant activity was studied by DNA-Fe, superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) and DPPH $\cdot$  system, with  $K_3[Fe(CN)_6]$  evaluating their capacity of deoxidizing, all the results above showed that the antioxidant of honeysuckle extraction was closely correlated with its content of the chlorogenic acid. Their capability of scavenging hydroxyl radical was better than that of Vc, and 53.18% of scavenging rate could be obtained with the concentration of chlorogenic acid 1mg/mL. Their capability of scavenging  $O_2^{\cdot-}$  was lower than that of Vc, while their capability of scavenging DPPH $\cdot$  was better than that of Vc, and 90% of scavenging  $O_2^{\cdot-}$  and scavenging DPPH $\cdot$  could be obtained with the concentration of chlorogenic acid 0.2mg/mL respectively.

**Key words** extraction of honeysuckle; antioxidant chlorogenic acid; correlation

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)10-0127-03

金银花 (*Honeysuckle*) 为忍冬科多年生半常绿缠绕植物忍冬 (*Lonicera Japonica Thunb*) 的花蕾及初开的花, 又名忍冬花、银花、双花等, 具有抗菌和增强机体免疫的作用, 其味甘、性寒、清热解毒、凉散风热, 保健和医疗作用十分广泛<sup>[1]</sup>。同时金银花含有多种对人体有利的植物活性成分, 如绿原酸、异绿原酸、木犀草素 (*Luteolin*) 等黄酮类化合物, 具有抗衰老、强身健体的良好功效<sup>[2-4]</sup>。金银花提取物是以绿原酸为主并且含有多种其它的黄酮类物质的化合物, 其本身的酚羟基结构极易与自由基反应, 提供质子和电子使其失去反应活性, 故具有显著的抗氧化特性<sup>[5-8]</sup>。国内长期以来对金银花的研究主要集中在提取物和它的一些单独成分的研究上, 而对某些重要成分在总的提取物里面所起的作用没有做过相关研究。本实验是用一些典型的抗氧化体系, 分析金银花提取物和与其所含的等量的绿原酸的抗氧化能力的差异, 揭示其抗氧化作用与绿原酸含量的内在关系及其抗氧化作用的物质基础, 为进行金银花类的保健品和药品的开发提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

金银花提取物 本实验室自制, 原料由浙江省温州市瑞安九潭金银花加工基地提供; 脱氧核糖、绿原酸、DPPH $\cdot$  均购自 Sigma 公司; 磷酸二氢钾、氢氧化钾、EDTA、三氯化铁、抗坏血酸、过氧化氢、磷酸二氢钠、盐酸、硫代巴比妥酸 (TBA)、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸、邻苯三酚、氯化钠、硫酸亚铁 均为分析纯。

752 紫外光栅分光光度计 上海分析仪器厂; HH-4 恒温水浴锅 国华电器有限公司; SD-250 涡轮式粉碎机 浙江省嵊县特种粉碎设备厂; RE52-99 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 低温高速离心机 Hitachi Japan

### 1.2 实验方法

1.2.1 金银花提取物的制备 将金银花粉碎后过 40 目筛, 用 60% 乙醇提取, 料液比 1:15, 60℃ 提取 3 次, 然后于 45℃ 旋转蒸发, 浓缩液于 10000r/min 1~4℃

收稿日期: 2007-03-05 \* 通讯联系人

作者简介: 关炳峰 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工化学。

离心 30min 收集上清液, 冷冻干燥后备用。

1.2.2 还原能力的测定 按参考文献 [9] 方法, 并略作改进。取 2.5mL 的不同样品 (空白用 1mL 蒸馏水代替, 其他试剂依次同下) 溶液, 加入 2.5mL 的磷酸盐缓冲液 (0.2mol/L, pH = 6.6) 及 1% 的  $K_3Fe(CN)_6$  溶液 2.5mL, 于 50℃ 水浴反应 20min 后急速冷却, 加入 10% 的三氯乙酸溶液 2.5mL, 取反应液 5mL, 加入 5mL 的  $H_2O$  和 0.10% 的  $FeCl_3$  溶液 1mL, 混合均匀, 10min 后于 700nm 处测定其吸光度值, 以水为空白。以上实验均以抗坏血酸作阳性对照。浓度设计: 0.005 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2mg/mL (样品浓度指加入反应体系前样品的浓度, 以下同)。

1.2.3 对羟基自由基的清除作用 采用 D-脱氧核糖-铁体系法<sup>[10-11]</sup>。在洁净干燥的试管中依次加入 0.4mL 50mmol/L 的  $KH_2PO_4$ -KOH 缓冲液, 一定浓度的样品, 0.1mL 1.04mmol/L 的 EDTA 溶液, 0.1mL 20mmol/L 的  $FeCl_3$  溶液, 0.1mL 10mmol/L 的  $H_2O_2$ , 0.1mL 60mmol/L 的 DR (其中对照不加), 0.1mL 20mmol/L 的  $V_c$  保证每管最终体积为 1mL, 于 37℃ 下保温 1h 取出迅速加入 25% 的盐酸 1mL 终止反应, 加 1mL 1% 的 TBA, 于沸水浴上煮沸 15min 立即冷却, 若有混浊加入 3mL 正丁醇萃取, 于 532nm 下比色, 测吸光度。清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

其中  $A_0$ —空白吸光度;  $A_1$ —加入清除剂和 DR 后吸光度;  $A_2$ —样品本身吸光度 (不加 DR)。

1.2.4 对超氧阴离子的清除作用 参照邻苯三酚自氧化法<sup>[12]</sup>。邻苯三酚在弱碱条件下发生自氧化反应产生  $O_2^{\cdot-}$ ,  $O_2^{\cdot-}$  清除剂能使邻苯三酚自氧化产物在  $\lambda = 325nm$  处吸收峰受抑制。取 2.25mL pH 8.34 的 50mmol/L 的磷酸盐缓冲液 PBS 再加蒸馏水 2mL, 0.25mL 10mmol/L 的邻苯三酚, 即总体积 4.5mL。混匀后 25℃ 保温, 在第 4min 时加入 10mmol/L 盐酸 1 滴终止反应。在 325nm 处测 A 值 (以 pH 8.34 的 PBS 作参比) 得空白管光吸收值 (即  $A_{\text{空}}$ )。测定样品清除能力时, 所取试剂同前, 只是在加入邻苯三酚前, 分别加 2mL 样液代替蒸馏水 (2mg/mL)。终止反应后测 A 值 (用同浓度样液作为参比), 即为待测管光吸收值 (即  $A_{\text{样}}$ )。清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}} \times 100\%$$

1.2.5 对二苯代苦味酰基自由基的清除作用 二苯代苦味酰基自由基 (DPH·) 是一种很稳定的自由基, 在乙醇溶液中呈深紫色, 在 517nm 处有最大吸收峰, 当有自由基清除剂存在时其颜色减退, 褪色程度与清除剂的清除能力及数量呈定量关系。因此, 可用分光光度法进行定量分析, 从而评价抗氧化物质的抗氧化能力<sup>[13-14]</sup>。

将 2mL 溶剂与 2mL 20mmol/L DPH· 溶液加入同一试管中, 摇匀, 放置 30min 用溶剂作参比测定

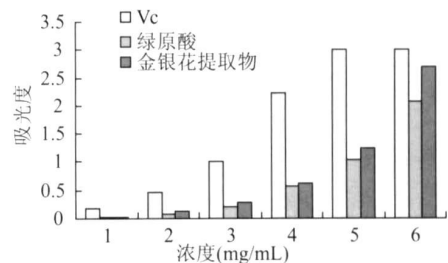
其吸光度 (即  $A_{\text{空}}$ ), 测定样品清除能力时, 所取试剂同前, 只是分别加 2mL 样液代替 2mL 溶剂, 静止 30min 后测 A 值 (用同浓度样液作为参比) 即为待测管光吸收值 (即  $A_{\text{样}}$ )。清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 还原能力的结果

$V_c$  是较好的抗氧化剂, 在实验选取的浓度范围内, 在低浓度范围内, 还原能力较弱, 随浓度增加, 还原能力逐渐增大, 说明  $V_c$  在适宜的浓度范围内有较好的还原能力。绿原酸和金银花提取物在低浓度下,  $A_{700}$  值比较小, 说明低浓度下还原能力比较差; 但当浓度大于 0.05mg/mL 时, 随着浓度的增大,  $A_{700}$  值也增大, 还原能力增加幅度较大。由图 1 可以看出, 在金银花提取物中, 绿原酸起主要的还原作用。以相同起始浓度比较  $A_{700}$  值, 低浓度下绿原酸和金银花提取物的还原能力低于  $V_c$  的还原能力, 但随着浓度增大, 两者还原能力增大, 并且接近  $V_c$ 。



1—0.005mg/mL; 2—0.01mg/mL; 3—0.02mg/mL;  
4—0.05mg/mL; 5—0.1mg/mL; 6—0.2mg/mL

图 1  $V_c$  绿原酸和金银花提取物的还原能力

### 2.2 对羟基自由基的清除作用

由图 2 可以看出, 在实验浓度范围内 (0.005~1.00mg/mL),  $V_c$  对脱氧核糖-铁体系产生的  $\cdot OH$  均表现出一定的抑制作用, 并随着浓度的增加, 清除率增大, 在 1.00mg/mL 时清除率为 12.72%。绿原酸和金银花提取物在低浓度下清除率有上升的情况, 即在浓度小于 0.1mg/mL 时清除效果则不理想, 甚至产生促氧化作用, 而在浓度高于 0.1mg/mL 时产生明显而且稳定的清除作用, 可能是低浓度的绿原酸, 在  $\cdot OH$  浓度较小时促进  $\cdot OH$  的产生,  $\cdot OH$  浓度达到一定程度时, 又对其产生清除作用。但当浓度大于 0.1mg/mL 时, 在实验浓度的范围内清除率可达 32.09% 和 53.18%, 与  $V_c$  对羟基自由基的清除作用趋势一致。

### 2.3 对超氧阴离子的清除作用

如图 3 所示,  $V_c$  绿原酸和金银花提取物对邻苯三酚自氧化体系产生的  $O_2^{\cdot-}$  有一定的清除作用, 且随加入量的增加, 清除率上升, 量效关系明显。  $V_c$  所选浓度 (0.005~0.2mg/mL) 范围内, 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除作用随浓度增加, 清除率上升, 在浓度高于 0.1mg/mL

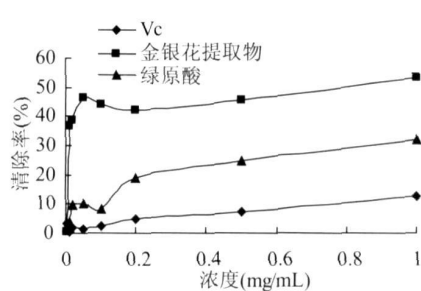


图 2 Vc 绿原酸和金银花提取物对羟自由基的清除作用

时,清除率接近 100%,增加趋于平缓。绿原酸和金银花提取物对  $O_2^{\cdot -}$  的清除作用从图 3 可以看出,在实验剂量范围内,最大清除超氧阴离子可达 95.25% 和 97.58%,说明绿原酸和金银花提取物对超氧阴离子有很强的清除作用,并且绿原酸在金银花提取物中起主要作用。

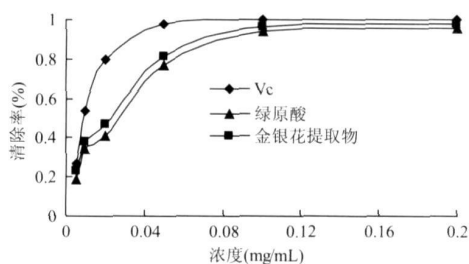


图 3 Vc 绿原酸、金银花提取物对超氧阴离子的清除作用

## 2.4 对 DPPH· 的清除作用

从图 4 可以看出,在实验的剂量范围内, Vc 绿原酸和金银花提取物对 DPPH· 的清除作用随浓度升高逐渐增强,在 0.2mg/mL 时,清除率约 95%,基本将 DPPH· 清除完全,而且绿原酸、金银花提取物的清除作用比 Vc 强。由此可以看出,绿原酸和金银花提取物对 DPPH· 有很强的清除作用,并有可能反应生成更稳定的物质,且绿原酸在金银花提取物的抗氧化能力中起主要的作用。

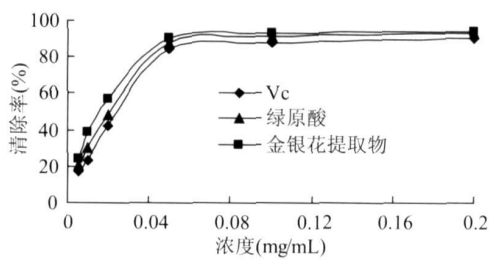


图 4 Vc 绿原酸和金银花提取物对 DPPH· 的清除作用

## 3 结论

本文用化学模拟体系对金银花提取物及其主要

活性成分绿原酸的抗氧化作用进行了评价,以合成抗氧化剂 Vc 做为阳性对照,通过测定金银花提取物和绿原酸的还原能力、在化学模拟体系中的抑制  $\cdot OH$ 、清除超氧阴离子和 DPPH· 的能力,证明金银花提取物和绿原酸都有较强的抗氧化活性,从化学本质上证实了金银花的抗氧化能力及其与绿原酸含量的关系,为进行金银花提取物和绿原酸的生物活性或相关的保健品的研究提供理论基础,为以后的深入研究提供了科学依据。

## 参考文献:

[1] Meng D S, Wang S L. Antitumor effect of quercetin [J]. Chin J Nat Herbs Drugs, 2001, 32: 186-188.  
[2] 王发国,叶华谷,马其侠,等.金银花及其药理作用[J].生物学通报,2004,39(5):17-18.  
[3] 利君,吴振辉,蔡创海,等.金银花中黄酮类物质最佳提取工艺的研究[J].食品科学,2002,23(2):62-66.  
[4] 黄西峰.金银花的研究概况及展望[J].中国中药杂志,1997,22(4):247-249.  
[5] 赵国玲,刘佳佳,林丹,等.金银花化学成分及药理研究进展[J].中成药,2002,24(12):973-976.  
[6] 张名位,郭宝江,池建伟,等.不同品种黑米的抗氧化作用及其与总黄酮和花色苷含量的关系[J].中国农业科学,2005,38(7):1324-1331.  
[7] 孙玲,张名位,池建伟.黑米的抗氧化性及其与黄酮和种皮色素的关系[J].营养学报,2000,22(3):246-249.  
[8] 胡宗福,于文利,赵亚平.绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化物的研究[J].食品科学,2006,27(2):128-130.  
[9] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidant reaction prepared from glucosamine [J]. 1986, 44: 307.  
[10] Barry Halliwell et al. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. Analytical biochemistry, 1987, 165: 215-219.  
[11] 刘彬,黄文,张洁,等.家蝇幼虫提取物清除氧自由基的作用[J].昆虫知识,2006,43(1):85-88.  
[12] 贾之慎,杨贤强.茶多酚清除活性氧自由基  $O_2^{\cdot -}$  和  $\cdot OH$  的分光光度法研究[J].中国茶叶,1993,19(1):25.  
[13] 金杰,李志西,张锋,等.桑椹醋提取物对二苯基苦味酰基自由基(DPPH·)的清除作用[J].西北农林科技大学学报,2006,34(3):135-137.  
[14] 张泽生,乌兰.金银花中绿原酸的体外抑菌和抗氧化性的研究[J].天津科技大学学报,2005,20(2):5-8.