

# *In Vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Total Flavonoids from the Leaves of *Pugionium cornutum*

Jinpeng Wu<sup>1,2</sup>, Can Tan<sup>1,2</sup>, Baobao Hao<sup>1,2</sup>, Chong Zhou<sup>1,2</sup>, Shicai Xu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Yan'an University, Yan'an Shaanxi

<sup>2</sup>Engineering Technology Research Center for Conservation and Utilization of Biological Resources in Shaanxi Province, Yan'an Shannxi

Email: 547934203@qq.com, \*shicaixu@163.com

Received: Mar. 20<sup>th</sup>, 2018; accepted: Apr. 4<sup>th</sup>, 2018; published: Apr. 11<sup>th</sup>, 2018

---

## Abstract

We extracted the total flavonoids from leaf mustard leaf with mustard leaf as raw material. Compared the crude extract and the purified material of the total flavonoids from the leaves of *Pugionium cornutum* in the ability to eliminate hydroxyl free radical ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) and DPPH radical, and to restore  $\text{Fe}^{3+}$ , its antioxidant capacity of total flavonoids was analyzed systematically. It showed that the total flavonoids from the leaves of *Pugionium cornutum* have antioxidant capacity. The order of the overall antioxidant capacity is: purified material > BHT > crude extract.

## Keywords

Leaves of *Pugionium cornutum*, Total Flavonoids, Antioxidant Capacity

---

## 沙芥叶总黄酮的体外抗氧化研究

吴金澎<sup>1,2</sup>, 谭 灿<sup>1,2</sup>, 郝宝宝<sup>1,2</sup>, 周 翀<sup>1,2</sup>, 徐世才<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>延安大学生命科学学院, 陕西 延安

<sup>2</sup>陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安

Email: 547934203@qq.com, \*shicaixu@163.com

收稿日期: 2018年3月20日; 录用日期: 2018年4月4日; 发布日期: 2018年4月11日

---

\*通讯作者。

## 摘要

本文以沙芥叶片为原料,提取沙芥叶片总黄酮。从沙芥叶总黄酮的粗提物与纯化物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )和DPPH自由基的清除能力和对 $\text{Fe}^{3+}$ 的还原能力,比较系统的剖析了沙芥叶总黄酮的抗氧化能力。实验表明沙芥叶片总黄酮在化学本质上具有一定的抗氧化能力,整体抗氧化能力大小顺序为:纯化物> BHT >粗提物。

## 关键词

沙芥叶, 黄酮, 抗氧化能力

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物,是植物在长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物[1]。它广泛存在于高等植物及羊齿植物的根、茎、叶、花、果实等中[2]。不仅数量种类繁多,而且结构类型复杂多样。黄酮类化合物因其独特的化学结构而对哺乳动物和其它类型的细胞具有许多重要的生理、生化作用[3]。一方面,它具有很强的药理作用。大量研究表明,黄酮类化合物可广泛影响心血管系统、神经系统和消化系统[4][5]。另一方面,黄酮类化合物具有高度的化学反应性。黄酮作为一种天然抗氧化剂,对自由基有一定的清除能力[6]。李淑珍等发现黄酮作为一种天然的抗氧化剂对自由基有较强的清除能力[7]。人体内自由基过多,常常会引起动脉粥样、心脑血管疾病、糖尿病、中枢神经系统障碍等一系列疾病[8]。且超氧阴离子 $\text{O}_2^-$ 与羟基 $\text{OH}^-$ 结合后的产物会导致细胞DNA被破坏,从而破坏人体机能[9]。目前治疗相关疾病的抗氧化药物大部分是人工合成,它对人体或多或少会造成一定的危害。杨楠等发现黄酮类化合物是一类天然产物,在自然界中普遍存在,具有生理活性广泛,毒副作用低的特点[10]。黄酮是一种低成本的天然抗氧化剂,符合现在医学治疗理念。

沙芥,十字花科植物沙芥属[11]。目前沙芥的开发利用已初步实现产业化,系列产品包括软包装成品沙芥、沙芥罐头、沙芥汁等,且其药用产品的研发仍在继续[12]。沙芥体内富含黄酮类化合物[13]。

本研究通过对沙芥叶片总黄酮的抗氧化进行探究,希望能够为今后抗氧化药物的研发与自由基相关疾病的防治提供依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料与试剂

本实验所用材料为沙芥叶叶片,采自陕西省榆林市榆阳区新开沟野生沙芥(由延安大学生命科学学院植物学实验室鉴定)。用清水将采集到的叶片清洗干净,待叶片体内水分阴干,将其粉碎,选择80目筛,塑封并于 $4^\circ\text{C}$ 进行保存,待用。

芦丁标准品、BHT(中国药品生物制品检定所);无水乙醇、三氯化铁、硫酸亚铁、过氧化氢、1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)、水杨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸均为分析纯,由国药

集团化学试剂公司提供。

## 2.2. 实验仪器

电子天平(自赛多利斯天平公司制造)、循环水式真空泵(型号: SHZ-D, 子华仪器公司制造)、旋转蒸发仪(型号: RE-52B, 亚荣生化仪器厂制造)、数显恒温水浴锅(型号: HH-6B, 国华电器公司制造)、台式高速离心机(TG16-WS 型, 湘仪离心机仪器公司制造)、紫外可见分光光度计(型号: UV-2550, 岛津企业管理公司制造)、植物粉碎机(FZ102 微型, 中兴有限责任公司制造)、数控超声波清洗器(KQ-300DE 型, 超声仪器有限公司制造)。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 沙芥叶总黄酮的制备

#### 1) 粗提物的制备

粉碎沙芥叶片, 经 80 目筛, 使用石油醚溶液脱脂处理, 在以下条件下超声处理 42 min: 乙醇(80%), 料液比(1:26 ml·g<sup>-1</sup>), 超声(300 W), 水浴(70℃); 重复 3 次, 通过旋蒸将乙醇除去, 于干燥、冷冻环境中, 制成粉末, 保持到-20℃超低温冰箱内, 待用。

#### 2) 纯化物的制备

让粗提物样本在流速为 2 mL/min、pH 为 5 的条件下进行回流; 再用浓度为 80% 的乙醇洗脱, 洗脱速度为 2.0 mL/min, 洗脱体积达到 4 BV, 将洗脱液经旋蒸浓缩后冷冻干燥成粉末备用。

### 2.3.2. 铁离子还原能力的测定[14] [15] [16] [17]

1) 测定原理: 自由基可与抗氧化物质提供的电子反应稳定的络合物, 在 700 nm 下有最大吸收峰, 吸光值的大小反应了还原力的大小, 从而间接反应了抗氧化性的强弱[18] [19]。

2) 取 BHT, 样品, 分别稀释为浓度是 0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L、0.8 mg/L 的溶液, 在 1.0 mL 不同浓度的液体中加 1 mL 铁氰化钾(1%)和 1.0 mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, PBS pH 6.6), 充分混和, 放置到水浴锅(50℃)内处理 20 min, 取出快速冷却后再加入 1.0 mL 10%三氯乙酸, 于 4℃ 下转速为 3000 r/min 的离心机中处理 10 min, 取 2.0 mL 上清液, 加 2 mL 三氯化铁(0.02%), 充分混和, 放置 10 min, 于波长为 700 nm 时对其吸光值(OD 值)进行测定, 阳性对照组选用 BHT, 如果测得 OD 越大表明该物质具有越强的还原力。

### 2.3.3. 羟自由基(·OH)清除活性的测定[20] [21]

1) 测定原理: 羟自由基的氧化性很强, 能够很好的和抗氧化物质反应, 其作用机理为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 Fe<sup>2+</sup> 发生反应产生 OH 自由基后进一步与水杨酸反应后生成有色物质[22] [23], 在 510 nm 下测吸光值, 抗氧化物质能够抑制或减弱 OH 自由基从而使有色物质的颜色变浅, 使得吸光值减弱。

#### 2) 实验步骤:

将样品与对照品 BHT 梯度稀释成 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL、2.5 mg/mL, 分别取 1 mL 溶液, 分别加 1.0 mL 邻二氮菲(7.5 mmol/L), 2.0 ml PBS 缓冲液(0.2 mol/L, pH = 7.4), 混合充分后, 再加入 1.0 mL 7.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液, 每加一管立即混匀, 最后加入 1.0 mL 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 通过加蒸馏水将溶液定容到 10 mL。恒温(37℃)水浴处理 1 h, 于 510 nm 的波长时对其吸光值(OD 值)进行测定。空白组中通过蒸馏水替代样品液; 损伤组通过蒸馏水替代 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、样液, 阳性对照为 BHT, 参比液选择蒸馏水, 清除率公式如式(2)所示。

$$I(\%) = \left[ \frac{(A_x - A_1)}{(A_0 - A_1)} \right] \times 100 \quad \text{式(2)}$$

其中： $A_x$  表示样品组 OD； $A_0$  表示损伤组 OD； $A_1$  表示空白组 OD。

### 2.3.4. 超氧阴离子( $O_2^-$ )清除能力测[18] [19] [22] [24]

1) 测定原理：最常使用的是邻苯三酚自氧化法，反应过程为邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生  $O_2^-$  和有色物质，有色物质在 322 nm 有最大吸收峰，同时  $O_2^-$  可以进一步促进自氧化，当抗氧化物质存在时能清除  $O_2^-$  从而抑制自氧化反应。根据 322 nm 处的吸光值可以测得  $O_2^-$  清除率。

2) 实验步骤：

取 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.2, 0.05 mol/L)加到试管内，再加蒸馏水 2.0 mL，水浴(25℃)预热处理 20 min，再向其中加浓度不同的各样液(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/mL) 0.2 mL，再加入 25 mmol/L 的邻苯三酚 0.4 mL，混匀后，于水浴(25℃)内处理 6 min，迅速加入 2 滴 HCl (8 mmol/L)将反应终止，于波长为 320 nm 处对其吸光值(OD 值)进行测定，空白组中通过蒸馏水替代样品液，阳性对照为 BHT。自由基活力的计算式为式：

$$I(\%) = \{1 - (A_1 - A_2) / A_3\} \times 100\% \quad \text{式(3)}$$

式中： $A_1$ ：加邻苯三酚和加抗氧化提取物，

$A_2$ ：不加苯三酚但加抗氧化提取物，

$A_3$ ：加邻苯三酚但不加抗氧化提取物。

### 2.3.5. DPPH 自由基清除能力的测定[23] [25] [26]

1) 测定原理：1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)能够在有机溶剂中以自由基的形式存在。DPPH 自由基含有三个苯基，其中一个氮具有一对电子从而形成自由基，因为其包含了 3 个共振苯环，使其具有十分稳定的结构。观察 DPPH 自由基为紫色，在 517 nm 下有最大吸收值。当溶剂中加入抗氧化物质时，抗氧化物质可以提供电子或者是氢原子与自由基结合后形成淡黄色的稳定物质，因此在 517 nm 处吸收值也随之降低，并且抗氧化剂的强弱与吸光值的减小程度呈线性关系。

2) 实验步骤

将样液配成 0.005, 0.01, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 mg/mL 不同浓度的溶液，取样品 2 mL，加 1 mL DPPH (0.08 mg/mL)，充分混合，于常温条件下，放置 30 min，取上清，阳性对照为 BHT，于 517 nm 处对其吸光值  $A_x$  进行测定。2 mL 不同浓度样品溶液与 1 mL 乙醇混合后于 517 nm 测吸光值  $A_2$ ，然后对乙醇混合液 2 mL 和 DPPH 1 mL 混合液的吸光值  $A_1$  进行测定，由公式 5 对抑制率进行计算。

$$I(\%) = [1 - (A_x - A_2) / A_1] \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中： $A_x$  表示样品溶液 2 mL + DPPH 1 mL； $A_2$  表示样品溶液 2 mL + 乙醇 1mL； $A_1$  表示乙醇 2 mL + DPPH 1 mL。

## 3. 结果分析

### 3.1. 铁离子还原力的测定

由图 1 可以看出，黄酮的浓度在 0.05 mg/mL 到 1.5 mg/mL，无论是粗提物、纯化物还是 BHT 的还原能力都随着浓度的升高而加强。但沙芥叶片粗提物与纯化物的还原力差异显著，表现为纯化物的还原力强于粗提物，且两者的还原力都强于 BHT。在沙芥叶片总黄酮的浓度 < 1.5 mg/mL 时，原力的大小顺序为：纯化物>粗提物> BHT。当沙芥叶片总黄酮的浓度 > 1.5 mg/mL 时，纯化物的还原能力有所下降，出现了低于粗提物的趋势，还原力的大小顺序为：纯化物> BHT >粗提物。

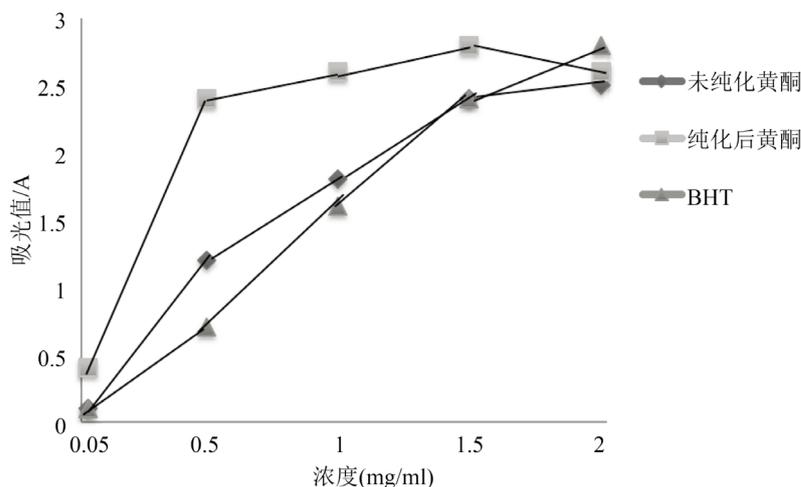


Figure 1. The reducing power on ferric ion  
图 1. 为还原能力的测定

### 3.2. 对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除作用的测定

沙芥叶片总黄酮对自由基的清除作用如图 2 所示。对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除作用随着黄酮浓度的增大而逐渐增强并具有明显的量效关系。但在高浓度时,清除效果增加较平缓,最大清除率为 39.69%。当浓度为 0.5 mg/mL 时纯化物与阳性对照 BHT 清除作用相当,当黄酮浓度大于 1.2 mg/mL 时,情况出现了变化,黄酮纯化物的清除能力明显大于 BHT,还原能力大小顺序为:纯化物>粗提物> BHT。

### 3.3. 对超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )清除作用的测定

对超氧阴离子清除作用测定结果如图 3 所示。三者对超氧阴离子清除作用在 0.5~4 mg/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系。结果表明纯化物与粗提物对超氧阴离子也有一定的清除作用,最大清除率为 19.75%,当浓度为 1.0 mg/mL 时,三者具有相当的清除能力。当浓度是 2.0 mg/mL 时,纯化物与 BHT 的清除效果相差微小比粗提物稍好些。当浓度大于 2.0 mg/mL 时,清除自由基作用强弱为:纯化物> BHT > 粗提物。

### 3.4. 对 DPPH 自由基清除作用的测定

DPPH 自由基清除作用结果如图 4 所示。可以发现三者均能较好的清除 DPPH,并且随着浓度的增加,清除能力也增加。由图可知在任何情况下纯化物的清除作用都强于 BHT、粗提物。当浓度在 0.005~0.06 mg/mL 之间时,与 BHT 相比,粗提物具有更好的清除效果。若浓度在 0.06 mg/mL 以上,与粗提物相比,BHT 具有更好的清除效果,可能是随着粗提物浓度的增大,粗提液中的其他成分对自由基的清除起到了一定的抑制作用。

## 4. 讨论

黄酮类化合物广泛存在于植物体中,是天然的抗氧化物质来源。本文通过预试验确定了沙芥中含有黄酮类化合物,并且得知沙芥叶片中的黄酮类化合物明显高于沙芥的其他器官。由于不同的物质抗氧化活性的机制有所不同[27],因此物质的抗氧化性需要通过多种方法来评判,使用任何一种单一的方法来评判是不够全面不够客观的。本研究不仅通过总抗氧化活性、清除超氧阴离子( $\text{O}_2\cdot^-$ )、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )和 DPPH 自由基的能力这四种化学方法,并以 BHT 与粗提物作为对照组,比较全面的考察了沙芥叶黄酮的抗氧化

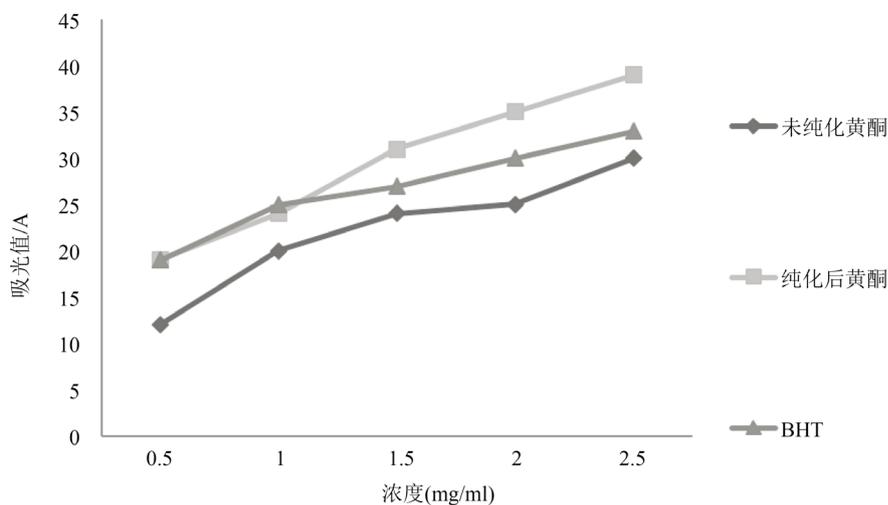


Figure 2. The ·OH scavenging capacity of MTS

图 2. 羟自由基(·OH)的清除能力

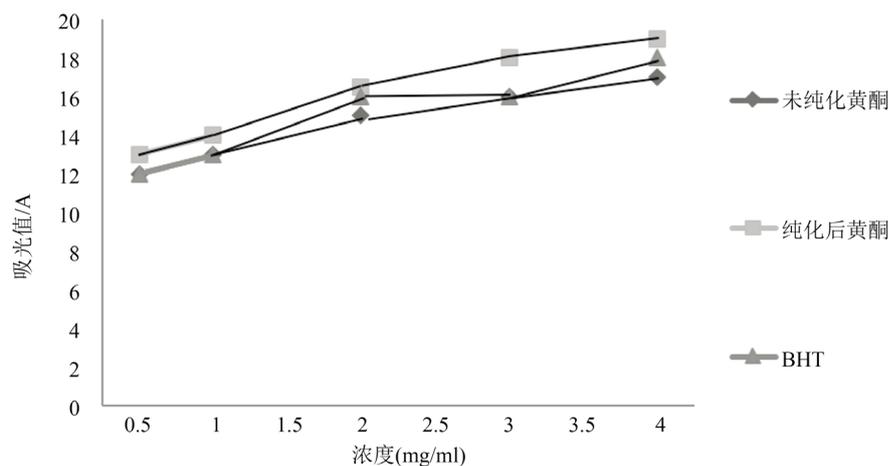


Figure 3. The O<sub>2</sub><sup>·-</sup> scavenging capacity of MTS

图 3. 超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)的清除能力

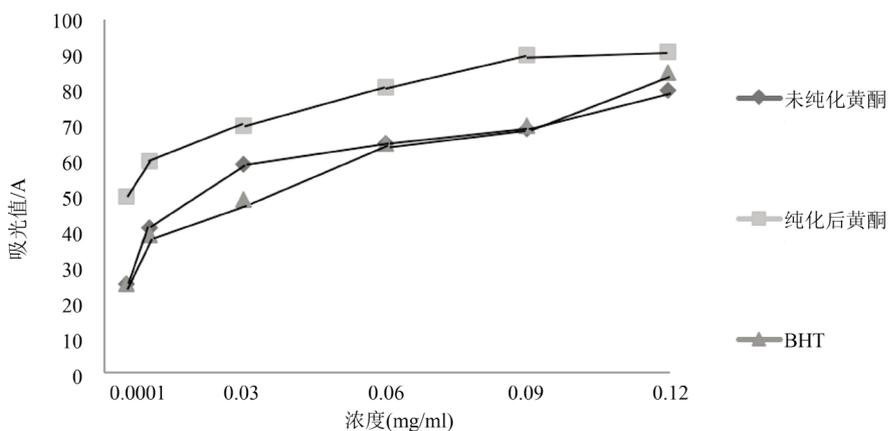


Figure 4. The DPPH· scavenging capacity of MTS

图 4. PPH 自由基(DPPH·)的清除能力

活性和清除能力。沙芥叶片总黄酮的粗提物和纯化物都具有较强的还原能力,对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )和 DPPH 自由基均具有较强的清除作用。当浓度在一定范围内时,随着浓度的上升,纯化物与粗提物的清除效果增强,特别是对于 DPPH 自由基的清除能力有大幅度的上升。

由实验得出沙芥叶片总黄酮的纯化物在四种抗氧化体系中的总体效果均优于粗提物;整体抗氧化能力大小顺序为:纯化物>BHT>粗提物。这充分说明了沙芥叶片总黄酮经 AB-8 大孔吸附树脂纯化后,随着纯度变高,其抗氧化能力变强;且纯化物对各种自由基的清除力较阳性对照 BHT 的区别较为显著。因此,沙芥叶片总黄酮的纯化物的抗氧化能力优于粗提物,今后能够作为一类优质的天然抗氧化剂使用,并为防治自由基相关疾病与黄酮资源的开发利用做出依据,在食品工业中也具有广泛的开发利用前景。

## 基金项目

陕西省高水平大学建设专项资金生态学(2012SXTS03);延安市科学技术惠民项目(2014HM-04);陕西省大学生创新创业训练计划项目(1546)资助。

## 参考文献

- [1] Morimoto, M., Tanimoto, K., Nakano, S., Ozaki, T., Nakano, A. and Komai, K.J. (2003) Insect Antifeedant Activity of Flavones and Chromones against *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 389. <https://doi.org/10.1021/jf025627a>
- [2] Yong, Y., Shin, S.Y., Jung, Y., et al. (2017) Erratum to: Flavonoids Activating Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase. *Applied Biological Chemistry*, **60**, 223. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0247-7>
- [3] 延玺, 刘会青, 邹永青, 任占华. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学, 2008, 28(9): 1534-1544.
- [4] 龙春, 高志强, 陈凤鸣, 等. 黄酮类化合物的结构-抗氧化活性关系研究进[J]. 重庆文理学院学报(自然科学版), 2006, 5(2): 13-17.
- [5] 张丹萍, 丁丁. 黄酮类化合物药理作用的研究[J]. 北方药学, 2015, 12(8): 150-151.
- [6] 李淑珍, 李进, 杨志江, 原惠. 黑果枸杞类黄酮的提取和精制工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(8): 82-87.
- [7] 李淑珍, 李进. 黑果枸杞总黄酮降血脂作用[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1072-1074.
- [8] 李云. 综述自由基对人体健康的影响及目前的预防措施[J]. 内蒙古石油化工, 2011, 37(1): 87-89.
- [9] 邹林强. 自由基清除剂类药物治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 药物研究进展, 2016, 30(11): 156-158.
- [10] 杨楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.
- [11] 唐志红. 沙芥属(十字花科)的分类与进化研究进展[J]. 西北植物学报, 2014, 34(8): 1714-1720.
- [12] 杨楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.
- [13] 徐世才, 谢铁博, 杨晓燕, 等. 响应面法优化沙芥叶总黄酮提取工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(5): 875-881.
- [14] 陶大勇, 陈佳娟, 陈瑛, 等. 黑果枸杞色素对小鼠抗衰老作用的研究[J]. 中兽医医药杂志, 2008, 27(1): 11-13.
- [15] 白红进, 汪河滨, 罗锋, 等. 黑果枸杞色素的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 190-192.
- [16] 白红进, 汪河滨, 褚志强, 等. 不同方法提取黑果枸杞多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 145-146.
- [17] 李进, 瞿伟菁, 张素军, 等. 黑果枸杞色素的抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1179-1183.
- [18] 豆海港, 陈文学, 仇厚援, 等. 花椒提取物抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 14-16.
- [19] 黄慧芳, 王丽萍, 黄秋伟, 等. 超声提取广西白木香叶黄酮的工艺研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(10): 2366-2370.
- [20] 杨安树, 邓丹雯. 藜蒿中黄酮类物质抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 67-80.
- [21] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 313.
- [22] 胡钢亮, 吕秀阳, 罗玲, 徐铸德. 近红外光谱法同时测定银杏提取液中总黄酮和总内酯含量[J]. 分析化学, 2004, 32(8): 1061-1063.

- [23] Kim, B.J., Kim, J.H., Kim, H.P., *et al.* (1997) Biological Screening of 100 Plant Extracts for Cosmetic Use (II): Anti-Oxidative Activity and Free Radical Scavenging Activity. *International Journal of Cosmetic Science*, **19**, 299-307. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1997.tb00194.x>
- [24] Su, Y.-L., Lai, K.L., Bi, Y.-R., *et al.* (2000) Antioxidant Activity of Navonoids Isolated from *Scutellaria rehderiana*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77**, 807-812.
- [25] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.
- [26] 王燕, 王儒彬, 孙磊, 等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 109.
- [27] 杨云舒, 姜子涛, 李荣, 等. 广枣黄酮清除自由基能力及抗氧化性能的细胞模型法评价[J]. 食品科学, 2016, 9(37): 92-97.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)