

樱桃叶黄酮的体外抗氧化活性

王垣芳¹, 修金霞¹, 赵峰¹, 李祖成², 郑珊¹

(1. 滨州医学院药学院, 山东烟台 264003; 2. 滨州医学院烟台附属医院, 山东烟台 264003)

摘要: 考察樱桃叶黄酮的体外抗氧化活性, 为樱桃叶黄酮在医药、食品方面的应用提供理论依据。从樱桃叶中提取黄酮, 体外检测樱桃叶黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用, 以及对 H_2O_2 诱发小鼠红细胞氧化溶血和肝脂质过氧化反应的抑制作用。结果显示, 樱桃叶黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 具有清除作用, 且呈现质量浓度依赖性, $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的黄酮溶液对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率分别达到 85.67% 和 72.45%, 并且对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力优于维生素 C; 樱桃叶黄酮对肝匀浆脂质过氧化反应和过氧化氢(H_2O_2)诱发红细胞氧化溶血具有抑制作用, 当终质量浓度为 $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率分别为 79.82% 和 75.54%。表明樱桃叶黄酮具有质量浓度依赖性的体外抗氧化活性。

关键词: 樱桃叶; 黄酮; 抗氧化活性; 体外

中图分类号: R 931.71; R 963 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)09—0966—05

Antioxidant Activity of Flavonoids from Cherry Leaf in Vitro

WANG Yuanfang¹, XIU Jinxia¹, ZHAO Feng¹, LI Zucheng², ZHENG Shan¹

(1. Pharmacy College of Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 2. Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

Abstract: This study was undertaken to extract flavonoids from cherry leaves and to investigate the anti-oxidative activity in vitro. Total flavonoids were extracted from cherry leaves. The antioxidant activities of the flavonoids were evaluated by the scavenging power on free radicals $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ and inhibiting effects on erythrocytes hemolysis and lipid peroxidation of hepatic homogenate in vitro system. The flavonoids showed concentration-dependent scavenging power on $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$. The scavenging rates for $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ of $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ flavonoids solution were 85.67% and 72.45% respectively, and the scavenging capacity for $\cdot\text{OH}$ was stronger than Vitamin C. Cherry leaves flavonoids also showed inhibition on lipid peroxidation of hepatic homogenate and on hydrogen peroxide-induced erythrocyte hemolysis in a concentration-dependent manner. The inhibition rates were 79.82% and 75.54% in final concentration $30\text{ }\mu\text{g/mL}$. Cherry leaves flavonoids have concentration-dependent antioxidant activity in vitro, which can be used as natural plant antioxidants or food additives for the development and utilization.

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2011HM059); 烟台市科学技术发展计划项目 (2009168); 滨州医学院大学生科技创新项目 (BY2010DKCX60)。

作者简介: 王垣芳(1963—), 女, 山东烟台人, 医学硕士, 教授, 主要从事天然药物活性研究。E-mail: bytywyf@163.com

Keywords: cherry leaves, flavonoids, antioxidant activity, in vitro

人体内自由基产生过多可导致组织细胞氧化损伤,诱发各种疾病、加速衰老^[1]。来源于植物的黄酮类、苯酚类、多糖类等物质具有很强的抗氧化活性。因此,近年来从植物中挖掘具有实际应用价值的天然抗氧化剂已成为研究的热点之一。大量的研究表明,中草药来源的黄酮具有较强的抗氧化活性^[2],能有效地清除体内过多的自由基,防止脂质过氧化,保护细胞和线粒体的正常结构与功能,在预防和治疗自由基诱发的疾病和抗衰老方面具有广泛的应用前景^[3-4]。

樱桃(*Cerasus pseudocerasus* L.)为蔷薇科李亚科的多年生木本植物,在我国分布极为广泛,其叶、根、核及鲜果皆可入药。樱桃叶味辛苦、性温、无毒,具有温胃、健脾、止血、解毒等功效,还能降压、治胃寒食积、腹泻、吐血、疮毒等病症^[5]。研究表明,樱桃叶中含有丰富的黄酮类物质^[6],但对樱桃叶黄酮的抗氧化活性研究国内尚有限。作者采用碱提酸沉法从樱桃叶中提取总黄酮,考察其对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用,对 H_2O_2 诱发小鼠红细胞氧化溶血及肝脂质过氧化的抑制作用,为樱桃叶黄酮的开发利用提供理论依据。

1 器材

1.1 主要仪器设备

KQ5200DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司制造;TU-1901 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司制造;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司制造;Waters 600E 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司制造;电子天平, Metter-Toledo 仪器公司制造;RE-52-05 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂制造;DL-5000B 型低速冷冻多管离心机,上海安亭科学仪器厂制造;层析柱,盐城泓宇玻璃仪器厂制造。

1.2 材料与试剂

樱桃叶,初秋采自烟台市牟平区高陵镇;硫代巴比妥酸 TBA, 国药集团化学试剂有限公司产品;芦丁对照品,中国药品生物制品检定所提供;D101 大孔吸附树脂,上海开平树脂有限公司产品;体积分数 95% 植物乙醇,以及石油醚、七水和硫酸亚铁、

抗坏血酸、三氯乙酸、邻苯三酚、葡萄糖、邻二氮菲、无水乙醇,均为国产分析纯。

2 方法

2.1 樱桃叶黄酮的提取

取干燥的樱桃叶样品适量,粉碎,60 目过筛。准确称取樱桃叶干粉约 5 g,按料液比 1 g:30 mL 加入体积分数 80% 的乙醇 150 mL,70 °C 回流浸提 1.5 h 后立即抽滤并收集滤液。将滤液转至蒸发瓶中,减压浓缩以除去提取溶剂。收集浓缩液转移至 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度。然后将提取液以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,除去叶绿素和其他水不溶性杂质,取上清液移至分液漏斗中,加入等体积的石油醚充分振荡,静置分层后分离收集下层液,即为样品提取液,反复萃取直至上层液(石油醚)为无色,冷冻干燥,即得樱桃叶粗黄酮干燥粉末。称取樱桃叶粗黄酮粉末 0.1 g,用蒸馏水溶解,然后定容于 100 mL 的容量瓶中,得到 1.0 mg/mL 的樱桃叶粗黄酮溶液。详见文献[7]。

2.2 樱桃叶中黄酮含量测定

精密称取芦丁 5 mg 置于 5 mL 的量瓶中,配制 1 mg/mL 的芦丁对照品储备溶液,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色体系,以 510 nm 波长比色法测定芦丁系列浓度对照溶液的吸光度,以浓度 C 为横坐标、吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程

$$A = -0.0183 + 0.0523C \quad (R = 0.9998, n = 6) \quad (1)$$

取 1.0 mL 樱桃叶黄酮溶液,按上述方法显色后,以试剂空白作为参比液测定吸光度,根据芦丁直线回归方程计算出溶液中黄酮的含量。详见文献[8]。

2.3 樱桃叶黄酮的纯化及其溶液配制

选用 D101 大孔树脂对樱桃叶粗黄酮溶液进行纯化^[9]。将上述 1.0 mg/mL 粗黄酮溶液 pH 值调为 4.0,以每小时 2 倍体积的上样流量进行吸附,再用体积分数 70% 乙醇、3 倍柱体积进行洗脱,洗脱流量为每小时 2 倍体积。收集洗脱液减压浓缩至浸膏,经真空干燥得到黄色粉末,加蒸馏水配制成 1.0 mg/mL 的樱桃叶黄酮溶液,作为样品储备液,并配制 1.0 mg/mL 维生素 C 溶液的样品储备液。

2.4 樱桃叶黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

取 0.75 mol/L 邻二氮菲溶液 1 mL 于试管中, 加入 400 mmol/L 的 PBS(pH 7.4) 缓冲液 2 mL 和蒸馏水 1 mL, 充分混匀后, 加 2.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL, 混匀, 加 20 mmol/L 的 H_2O_2 1 mL, 置于 37 °C 水浴 1.5 h, 在 536 nm 处测其吸光度, 记作 A_1 ; 用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL H_2O_2 , 测得吸光度记作 A_2 ; 用黄酮溶液 1 mL 代替 1 mL 蒸馏水, 测得吸光度记作 A_3 。按公式(2)计算 $\text{OH}\cdot$ 自由基清除率

$$\text{SI} = ((A_3 - A_1) / (A_2 - A_1)) \times 100\% \quad (2)$$

2.5 樱桃叶黄酮对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用

于各试管中分别加入 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.2) 缓冲液 4.6 mL, 加入 1.0 mL 黄酮溶液, 混匀, 在 25 °C 水浴 10 min, 取出后立即加入经 25 °C 温浴的 0.06 mol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL, 对照管加入 10 mmol/L 的 HCl 0.3 mL。各管充分混匀, 准确反应 3 min(加入邻苯三酚时开始计时)后加入质量分数 5% 维生素 C 溶液 0.1 mL 终止反应。10 min 后, 在 420 nm 处测定吸光度, 记作 A'_1 ; 对照管以 1 mL 蒸馏水代替待测样品, 记作 A'_2 。按公式(3)计算 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率

$$\text{SI}' = ((A'_2 - A'_1) / A'_2) \times 100\% \quad (3)$$

2.6 樱桃叶黄酮对 H_2O_2 诱发小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用

将受试小鼠断头取血, 用肝素抗凝, 2 000 r/min 离心 10 min 得红细胞, 用 4 倍量生理盐水洗涤并离心 3 次, 然后用生理盐水稀释成质量分数 0.5% 的红细胞悬浮液备用。取红细胞悬浮液 1 mL, 加入 100 mmol/L H_2O_2 (空白管不加 H_2O_2) 及黄酮溶液 1 mL, 37 °C 温浴 1 h, 加入 4 倍量生理盐水稀释, 3 000 r/min 离心 6 min, 取上清液于 415 nm 处测定吸光度, 按公式(4)计算溶血抑制率

$$\text{IR} = ((A_C - A_K) / (A_D - A_K)) \times 100\% \quad (4)$$

式(4)中: A_C 为加入样品后的 H_2O_2 诱导管的吸光度; A_K 为 H_2O_2 诱导管的吸光度; A_D 为不加 H_2O_2 的正常管的吸光度。

2.7 樱桃叶黄酮对小鼠肝组织脂质过氧化反应的抑制作用

按文献[10]方法, 将受试小鼠颈椎脱臼后立即打开腹腔, 从门静脉注入预冷的生理盐水冲洗后取出肝脏, 称质量, 按 1 g : 9 mL 的质量与体积比加入预冷的生理盐水, 制成 10 g/dL 的肝匀浆液备用。取

肝匀浆液 1 mL 加入试管中, 分别加入 0.5 mL 不同质量浓度的樱桃叶黄酮溶液, 空白对照加入等体积生理盐水, 混匀后 37 °C 温浴 1 h, 加入体积分数 20% 三氯乙酸溶液 1 mL, 混匀后再加质量分数 0.7% 的硫代巴比妥酸溶液 1.5 mL, 沸水浴 15 min 后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于波长 532 nm 处测定各管的吸光度 A 。按公式(5)计算抑制率

$$\text{IR}' = ((A'_C - A'_K) / (A'_D - A'_K)) \times 100\% \quad (5)$$

式(5)中: A'_C 为加入样品管的吸光度; A'_K 为体积分数 60% 乙醇管的吸光度; A'_D 为生理盐水管的吸光度。

3 结果

3.1 樱桃叶粗黄酮的提取及其含量

按照实验方法 2.1, 从 5 g 樱桃叶样品中提取粗黄酮 0.28 g, 产率为 5.6%。按照实验方法 2.2 对樱桃叶粗黄酮纯化干燥后, 得到黄酮干燥粉末 0.18 g。

3.2 樱桃叶黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

由图 1 可知, 樱桃叶黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 具有清除作用, 且随着黄酮质量浓度的增加, 其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用逐渐增强, 呈现较明显的质量浓度依赖性。在黄酮终质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率达到 85.67%, 其对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力优于维生素 C。

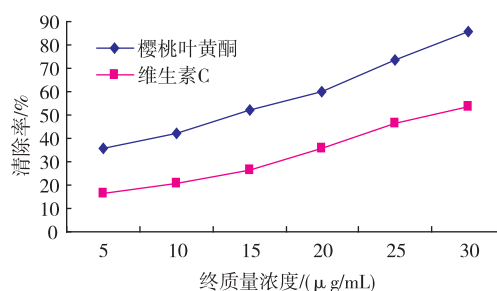


图 1 樱桃叶黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Fig. 1 Scavenging effect of cherry leaves flavonoids on free radicals $\cdot\text{OH}$

3.3 樱桃叶黄酮对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用

从图 2 可知, 不同质量浓度的樱桃叶黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均具有清除作用, 且随质量浓度增大, 样品吸光度下降, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率呈上升趋势, 在终质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率达到 72.45%, 其对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力稍弱于维生素 C。

3.4 樱桃叶黄酮对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血的抑制作用

小鼠红细胞悬液加入 H_2O_2 后吸光度值增大, 表

明 H_2O_2 可以氧化红细胞膜,导致红细胞溶血。从图 3 可以看出,随着樱桃叶黄酮质量浓度的增加,样品吸光度逐渐增加,对红细胞氧化溶血抑制率逐渐增加,当终质量浓度达到 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,其溶血抑制率为 79.82%, 其对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血的抑制率优于维生素 C。

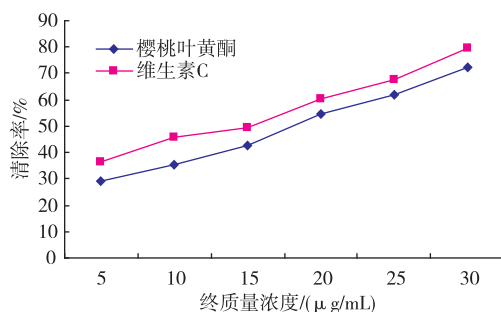


图 2 樱桃叶黄酮对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect of cherry leaves flavonoids on free radicals $\text{O}_2\cdot^-$

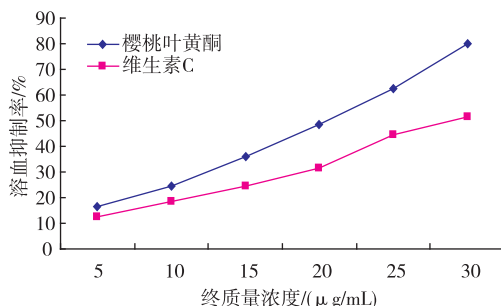


图 3 樱桃叶黄酮对 H_2O_2 诱发小鼠红细胞氧化溶血的影响

Fig. 3 Inhibition of cherry leaves flavonoids on hydrogen peroxide-induced erythrocyte hemolysis

3.5 樱桃叶黄酮对肝匀浆脂质过氧化反应的影响

由图 4 可以看出,随着黄酮质量浓度的增加,样品吸光度逐渐增加,对肝脂质过氧化的抑制率相应增高,当终质量浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,抑制率可达 75.54%,其对肝组织脂质过氧化反应的抑制与维生素 C 接近。

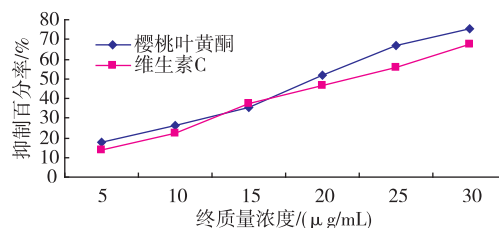


图 4 樱桃叶黄酮对肝匀浆脂质过氧化反应的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of cherry leaves flavonoids on lipid peroxidation of hepatic homogenate

4 讨论

$\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 等活性氧自由基可对机体产生一系列的损害,如损伤蛋白质的巯基和氨基,使蛋白质变性、交联,导致酶的活性丧失;损伤 DNA,导致细胞突变;破坏多不饱和脂肪酸,导致生物膜结构和功能改变等。大量的研究表明,炎症、衰老、肿瘤等多种疾病的起因和发展都与自由基损伤和脂质过氧化有关^[11-12]。因此,近年来寻找安全有效的天然抗氧化剂一直倍受医学界的关注。

本实验结果表明,樱桃叶黄酮能有效地清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$,其活性呈现质量浓度依赖性,当樱桃叶总黄酮质量浓度达到 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,对 $\cdot\text{OH}$ 及对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除率分别达到 85.67% 和 72.45%,并且对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力优于维生素 C,而对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除能力稍弱于维生素 C;樱桃叶黄酮对 H_2O_2 诱发小鼠红细胞氧化溶血的抑制率强于维生素 C,当终质量浓度达到 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率为 79.82%;樱桃叶黄酮对肝脂质过氧化反应的抑制作用与维生素接近,当终质量浓度达到 $30 \mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率为 75.54%。

5 结语

本实验结果提示,樱桃叶黄酮具有较强的体外抗氧化活性,有可能具备防治自由基相关性疾病的天然抗氧化药物、保健品或食品抗氧化剂的开发潜力。

参考文献:

- [1] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84.
- [2] Soobrattee M A, Neergheen V S, Luximon-Ramma A, et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions [J]. *Mutat Res*, 2005, 579(1-2): 200-213.
- [3] 田永利, 许志宇, 葛林, 等. 总黄酮类化合物含量测定方法和药理作用研究进展 [J]. *河北医药*, 2010, 8(15): 2094-2096.

- TIAN Yongli, XU Zhiyu, GE Lin, et al. Advances in methods of measuring and pharmacological effects of total flavonoids[J]. **Hebei Medical Journal**, 2010, 8(15):2094–2096. (in Chinese)
- [4] 程秋月, 郭菁, 张成义. 黄酮类化合物药理作用的研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12(2): 180–183.
CHENG Qiuyue, GUO Jing, ZHANG Chengyi. On the pharmacologic effect of flavanoids [J]. **Journal of Beihua University: Natural Science**, 2011, 12(2): 180–183. (in Chinese)
- [5] 张杰, 付佳, 焦淑清. 超临界 CO₂ 萃取樱桃叶中总黄酮的研究[J]. 黑龙江医学, 2009, 32(2): 10–11.
ZHANG Jie, FU Jia, JIAO Shuqing. Extraction of flavonoids from cherry leaves with supercritical CO₂[J]. **Heilongjiang Medicine And Pharmacy**, 2009, 32(2): 10–11. (in Chinese)
- [6] 李晨, 姜子涛, 李荣. 樱桃叶黄酮的微波提取及抗氧化性质的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012(4): 103–108.
LI Chen, JANG Zitao, LI Rong. Study on microwaveassisted extraction of flavones from *prunus pseudocerasus* leaves and its antioxidant activities[J]. **China Food Additives**, 2012(4): 103–108. (in Chinese)
- [7] 潘进权, 张世英, 何敏婷, 等. 竹叶总黄酮提取工艺及抗氧化特性的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(3): 39–44.
PAN Jinqun, ZHANG Shiying, HE Minting, et al. Extracting process and antioxidation charater of flavonids from bamboo leaves [J]. **Jounal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012, 12(3): 39–44. (in Chinese)
- [8] 林冠宇, 姚楠, 何蓉蓉, 等. 淡竹叶总黄酮对拘束负荷所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 177–179.
LIN Guanyu, YAO Nan, HE Rongrong, et al. Protective effects of *Herbal lophatheri* flavonoids on restraint Stress–Induced liver damage in mice[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2010, 16(7): 177–179. (in Chinese)
- [9] 廖春燕, 杨欣绿. D101 型大孔树脂纯化鸡骨草总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 38–40.
LIAO Chunyan, YANG Xinlv. Optimization of purification technology of total flavonoid from *Abrus cantoniensis* by D101 macroporous resin[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2013, 19(2): 38–40. (in Chinese)
- [10] 黄一泓, 刘雅莉, 武文斌, 等. 藏红花花瓣体外抗氧化活性部位的筛选与研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25: 1489–1493, 1567.
HUANG Yihong, LIU Yali, WU Wenbin, et al. Bioactivity–Guided fractionation of petals of *Crocus sativus* and their antioxidant activity investigation[J]. **Nat Prod Res Dev**, 2013, 25: 1489–1493, 1567. (in Chinese)
- [11] Dalle–Donne I, Giustarini D, Colombo R, et al. Protein carbonylation in human diseases[J]. **Trends Mol Med**, 2003, 9(4): 169–176.
- [12] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birinciodu M, et al. Free medical–induced damage to DNA: Mechanisms and measurement [J]. **Free Radic Biol Med**, 2002, 32(11): 1102–1115.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第二届中国国际生物微量元素大会

开始日期: 2014–11–06

结束日期: 2014–11–09

所在城市: 浙江省 杭州市

具体地点: 浙江大学紫金港校区医学院辅楼会议厅

主办单位: 浙江大学公共卫生学院(营养与健康研究中心), 浙江大学西湖营养团队

协办单位: 中国医科大学, 郑州大学, 清华大学, 河北师范大学, 青岛大学, 国家纳米科学中心, 中科院生态环境研究中心, 复旦大学

会议主席: 王福倬 教授/中科院百人学者/国家“杰出青年”获得者 浙江大学

联系人: 赵璐

联系电话: 0571–88206429

E–MAIL: Bio_Metal@163.com

会议网站: http://www.phs.zju.edu.cn/redir.php?catalog_id=6837&object_id=10264