

# 柳花提取物总黄酮含量及抗氧化活性的研究

王苗苗,韩飞,李慕春\*

(新疆维吾尔自治区分析测试研究院,新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:**采用70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水6种不同极性的溶剂对柳花进行提取,对各溶剂提取物的总黄酮含量进行测定,同时以总抗氧化能力、DPPH自由基清除率为指标,研究所得6种柳花提取物的抗氧化能力。结果表明,总黄酮含量由大到小依次为乙酸乙酯提取物(108.71%)>70%乙醇提取物(39.84%)>正丁醇提取物(34.36%)>氯仿提取物(23.39%)>石油醚提取物(20.97%)>水提取物(6.21%);总抗氧化能力由强到弱依次为乙酸乙酯提取物(16.9 U/mL)>正丁醇提取物(15.79 U/mL)>70%乙醇提取物(14.92 U/mL)>水提取物(13.94 U/mL)>氯仿提取物(6.04 U/mL)>石油醚提取物(4.56 U/mL),DPPH自由基清除率由高到低依次为70%乙醇提取物(93.8%)>乙酸乙酯提取物(93.22%)=正丁醇提取物(93.22%)>水提取物(89.75%)>氯仿提取物(78.07%)>石油醚提取物(58.3%)。因此,不同柳花提取物均具有抗氧化作用,且抗氧化能力与其提取溶剂和总黄酮含量有关。

**关键词:**柳花;总黄酮;芦丁;分光光度法;抗氧化活性

## Comparison of Total Flavonoids and the Antioxidant Activity in Flowers of Willow with Different Solvents

WANG Miao-miao, HAN Fei, LI Mu-chun\*

(Xinjiang Academy of Instrumental Analysis, Urumqi 830011, Xinjiang, China)

**Abstract:** The components of flowers of willow were extracted by 70% ethanol, petroleum ether, chloroform, ethylacetate, n-butyl alcohol and water ether with different polarity respectively. The research made items like the total flavonoid content, the total antioxidant ability, DPPH·clearance rate, as indexes and evaluated the antioxidant ability of six kinds of extracts of flowers of Willow. The results showed that the order sequenced by the total flavonoid content from strong to weak was: ethyl acetate extract (108.71%) > 70% ethanol extract (39.84%) > n-butyl alcohol extract (34.36%) > chloroform extract (23.39%) > petroleum ether extract (20.97%) > water extract (6.21%); and the order sequenced by the total antioxidant ability from strong to weak was: ethyl acetate extract (16.9 U/mL) > n-butyl alcohol extract (15.79 U/mL) > 70% ethanol extract (14.92 U/mL) > water extract (13.94 U/mL) > chloroform extract (6.04 U/mL) > petroleum ether extract (4.56 U/mL), and the order sequenced by the DPPH·clearance rate from strong to weak was: 70% ethanol extract (93.8%) > ethyl acetate extract (93.22%) = n-butyl alcohol extract (93.22%) > water extract (89.75%) > chloroform extract (78.07%) > petroleum ether extract (58.3%). Therefore, the flowers of willow's extracts in different kinds of solvents all have antioxidant effects, and the antioxidant capacity is related to the extraction solvent and the total flavonoid content.

**Key words:** the flowers of willow; total flavone; rutin; spectrophotometry; antioxidant activity

柳树为杨柳科(Salicaceae)柳属(*Salix*)木本植物,种类繁多,不仅是园林绿化的重要植物之一,而且其根、

作者简介:王苗苗(1988—),女(汉),中级实验师,硕士,研究方向:天然产物。

\*通信作者:李慕春,男,副研究员,硕士,研究方向:天然产物。

皮、嫩枝及叶的药用,在民间也有相当长的历史<sup>[1-2]</sup>。文中所用到的试验材料柳花是一种名为准噶尔柳的柳树上结的花。准噶尔柳主要分布在新疆乌苏市的四棵柳树河、古尔图河和奎屯河流域一带。它属于灌木,不吐絮,却开花,朵朵如菊,干而不谢。《乌苏县志》记载:柳

花为本境特产,系老柳丛生,结花,入夏碧绿,花小榻叠,似含苞之菊,可当茗,性至凉,能解暑,人称柳花茶。尽管柳花茶的制作工艺 2010 年被列入自治区级非物质文化遗产名录,但随着准噶尔柳树面积逐年减少,传统的柳花茶制作技艺正濒临灭绝。通过本文研究,为柳花茶产业的可持续发展提供理论依据。

植物类黄酮具有清除自由基、提高抗氧化酶活性和抑制脂质过氧化活性等抗氧化能力,是一种天然抗氧化剂,能够预防多种由氧化损伤导致的疾病,包括癌症、心血管疾病、骨质疏松症、糖尿病以及神经退行性疾病,对体内能量代谢也有一定的作用<sup>[3-4]</sup>。研究资料表明,柳属植物中普遍含有黄酮类化合物。这类物质广泛分布于蔬菜、水果和药用植物中,其天然物以游离态或甙的形式存在于植物体的各个部分。近年来,不断发现这类物质具有多方面的功能,例如芦丁、槲皮素等能够增强心脏收缩,减少心脏搏动数,杜鹃素具有止咳祛痰作用;黄芩苷具有抗菌消炎作用;汉黄芩素具有抑制肿瘤细胞作用;水飞蓟素具有保肝作用等<sup>[5-8]</sup>。

机体氧化反应可以产生自由基,在生理情况下自由基不断产生,也不断被清除,其浓度保持着动态平衡,但是过量的自由基对机体有损伤效应<sup>[9-11]</sup>。传统化学合成抗氧化剂的安全性问题越来越受到人们的重视,在使用上受到限制,很多研究已表明天然提取物有较强的抗氧化能力。Mehmet 发现薄荷提取物的清除 DPPH 自由基的活性优于阳性对照 BHT<sup>[12]</sup>。Masoumeh 等在研究艾菊提取物的抗氧化活性时发现其 DPPH 自由基清除活性比阳性对照 BHT 好<sup>[13]</sup>。叶汉侠等研究表明杭白菊乙醇提取液对 DPPH 自由基的清除率高达 93.17%<sup>[14]</sup>,其抗氧化能力是人工合成的 TBHQ(叔丁基对苯二酚)的 1/10。因此寻求人体容易吸收、能清除体内过量自由基的天然抗氧化剂具有非常重要的意义,但是天然抗氧化剂由于提取工艺落后,资源利用率低,我国天然植物的研究主要集中在其溶剂提取部位,对固体残渣的研究比较少;研究方法不全面,同时药理研究实验主要是体外实验,难以评价其体内功效;在有效成分的协同作用、抗氧化机理、构效关系等方面的研究也比较欠缺,加强这些方面研究可为天然植物开发抗氧化剂的应用奠定理论基础<sup>[15-16]</sup>。

本研究测定柳花 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水等 6 种不同极性溶剂提取物的总黄酮含量,采取清除 DPPH·和总抗氧化能力两种体外模型,综合评价柳花 6 种不同极性溶剂提取物的抗氧化能力及其与总黄酮含量的相关性,这些含不同极性成

分的浸出物其抗氧化能力的表现对于综合开发柳花资源具有重要的指导意义,另外本研究也可为不同萃取剂对天然植物有效成分的提取效果提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 材料与试剂

无水乙醇(AR):西安化学试剂厂;甲醇(AR)、石油醚(AR)、乙酸乙酯(AR)、氯仿(AR)、正丁醇(AR):天津富宇精细化工有限公司;三氯化铝(AR):天津市盛奥化学试剂有限公司;抗坏血酸(V<sub>C</sub>):郑州市化学试剂三厂;DPPH:上海安普有限公司;芦丁(标准品):中检所;总抗氧化能力检测试剂盒 A015:南京建成生物工程研究所;柳花:新疆乌苏市。

#### 1.1.2 仪器

UV-2700 紫外分光光度计:日本岛津公司;RT-02A 碎样机:北京开创同和科技发展有限公司;TE612-L 电子天平:赛多利斯科学仪器有限公司;XMTD-204 HSS 型电热恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司;H50 冷却水循环机:莱博科泰公司;ALPHA 2-4 LD Plus 冷冻干燥机:德国 CHRIST;AE163 分析天平:梅特勒-托利多;P-12 联用型平行蒸发器:瑞士步琦公司;Milli-Q A10 超纯水系统:美国密理特公司;751 石英比色皿:大连市日普利科技仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柳花提取物的制备

准确称取 10.0 g 柳花粉末若干份,置锥形瓶中,以 70%的乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水为提取液,在料液比为 1:20 (g/mL)条件下提取,分别得到 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物。旋转蒸发浓缩回收溶剂,真空冷冻干燥后分别得到 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水的柳花提取物,密封保存备用。

#### 1.2.2 柳花提取物中总黄酮含量的测定

##### 1.2.2.1 芦丁对照品溶液的配制

准确称取芦丁对照品 7.5 mg,加入适量甲醇溶解,用甲醇定容至 25 mL,摇匀备用,配成质量浓度为 300 μg/mL 的芦丁对照溶液。准确吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,加入 1%的三氯化铝溶液 4 mL,以甲醇定容至 10 mL,充分混匀后,40℃水浴显色 20 min 后,于 410 nm 波长处测定吸光度。

##### 1.2.2.2 测定柳花提取物的总黄酮含量

准确吸取浓度为 200 μg/mL 的 70%乙醇、石油

醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水的柳花提取物 1 mL,加入 1% 的三氯化铝溶液 4 mL,以甲醇定容至 10 mL,充分混匀后,40℃水浴显色 20 min 后测定吸光度,于 410 nm 波长处测定吸光度。

### 1.2.3 柳花提取物中抗氧化性能的测定

#### 1.2.3.1 总抗氧化能力(T-AOC)的测定

按照总抗氧化能力检测试剂盒 A015(南京建成生物工程研究所)要求准备各工作液。取 0.1 mL 浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  的 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水的柳花提取物及  $V_c$  溶液置于 10 mL 比色皿中,加入检测试剂 3.5 mL,混合均匀,在 37℃恒温水浴箱反应 30 min,再加入其它检测试剂 0.1 mL,充分混匀,放置 10 min,在 516 nm 处测定吸光值,用无水乙醇调零, $V_c$  作为阳性对照。每样品重复实验 3 次,取平均值。按以下公式计算总抗氧化能力。

计算公式:

总抗氧化能力(U/mL)=(测定管 OD-对照管 OD) $\times$ 反应液(mL) $\times$ 样品测试前稀释倍数 $\div$ 0.01 $\div$ 30 $\div$ 取样量(mL)

#### 1.2.3.2 DPPH 自由基清除法

准确称量 7.2 mg DPPH 溶解到乙醇溶液中,定容到 250 mL,现配现用。0.5 mL 浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  的 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水的柳花提取物分别加到 3.0 mL DPPH 乙醇溶液中,避光反应 30 min 后在 516 nm 处测定吸光值,用无水乙醇调零。对照组用 3.0 mL 无水乙醇代替 DPPH 溶液,空白组为 3.0 mL DPPH 溶液与 0.5 mL 无水乙醇混合, $V_c$  作为阳性对照,每样品重复试验 3 次,取平均值。按以下公式计算 DPPH 自由基清除率。

计算公式:

清除率/%=[1-( $A_i - A_j$ )/ $A_c$ ] $\times$ 100

式中: $A_c$  为未加抗氧化剂时 DPPH 溶液的吸光度,即空白组吸光度; $A_i$  为加抗氧化剂后 DPPH 溶液的吸光度,即样品组吸光度; $A_j$  为提取液在测定波长的吸光度,即对照组吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 柳花提取物总黄酮含量测定比较

以芦丁对照品配置成不同梯度浓度,每个浓度重复测定 3 次,取吸光值平均值,以对照品浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线见图 1,得回归方程( $A$  为吸光度, $C$  为浓度  $\mu\text{g/mL}$ ) $A = 0.0316C - 0.0266$ , $R^2 = 0.9969$ ;相关系数  $R^2$  表明标准曲线在对照品浓度范围内线性良好。

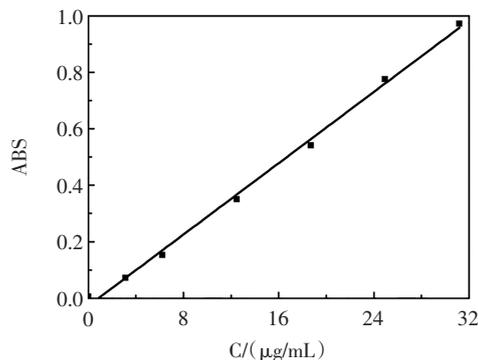
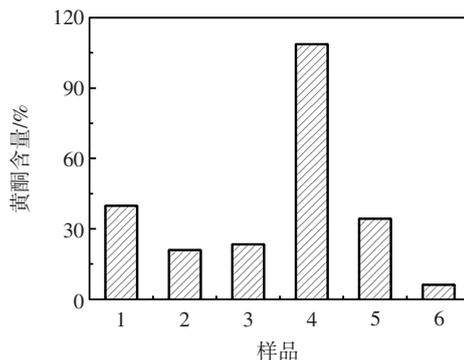


图 1 芦丁测定标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin



1.70%乙醇的柳花提取物;2.石油醚的柳花提取物;3.氯仿的柳花提取物;4.乙酸乙酯的柳花提取物;5.正丁醇的柳花提取物;6.水的柳花提取物。

图 2 柳花提取物总黄酮含量测定结果

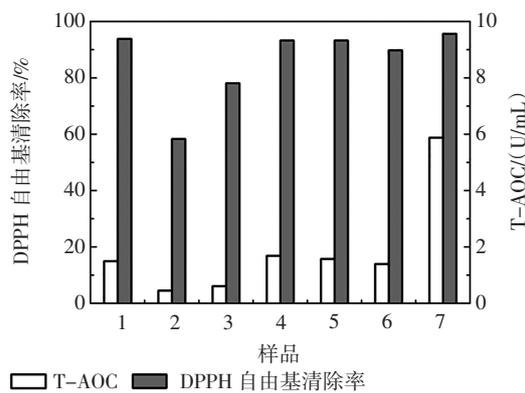
Fig.2 The results of flavonoid content in flowers of willow extracts

柳花提取物总黄酮含量测定结果见图 2。由图 2 可知,乙酸乙酯的柳花提取物总黄酮含量最高,而水的柳花提取物总黄酮含量最低,柳花不同溶剂提取物总黄酮含量大小顺序为:乙酸乙酯提取物(108.71%)>70%乙醇提取物(39.84%)>正丁醇提取物(34.36%)>氯仿提取物(23.39%)>石油醚提取物(20.97%)>水提取物(6.21%)。

### 2.2 柳花提取物抗氧化性能比较

柳花提取物的总抗氧化能力及 DPPH 自由基清除率测定结果见图 3。由图 3 可知,乙酸乙酯的柳花提取物总抗氧化能力最高,而石油醚的柳花提取物总抗氧化能力最低,柳花不同溶剂提取物总抗氧化能力大小顺序为:乙酸乙酯提取物(16.9 U/mL)>正丁醇提取物(15.79 U/mL)>70%乙醇提取物(14.92 U/mL)>水提取物(13.94 U/mL)>氯仿提取物(6.04 U/mL)>石油醚提取物(4.56 U/mL),而阳性对照  $V_c$  的总抗氧化能力为 58.71 U/mL。

由图 3 可知,70%乙醇提取物的柳花提取物 DPPH 自由基清除率最高,而石油醚的柳花提取物 DPPH 自



1. 70%乙醇的柳花提取物;2. 石油醚的柳花提取物;3. 氯仿的柳花提取物;4. 乙酸乙酯的柳花提取物;5. 正丁醇的柳花提取物;6. 水的柳花提取物;7.  $V_c$ 。

图3 柳花提取物的总抗氧化能力及 DPPH 自由基清除率测定结果

Fig.3 The total antioxidant capacity and DPPH radicals scavenging activity of flowers of willow extracts

由基清除率最低,柳花不同溶剂提取物 DPPH 自由基清除率大小顺序为:70%乙醇提取物(93.8%)>乙酸乙酯提取物(93.22%)=正丁醇提取物(93.22%)>水提取物(89.75%)>氯仿提取物(78.07%)>石油醚提取物(58.3%),而阳性对照  $V_c$  的 DPPH 自由基清除率为 95.63%。

### 3 结论与讨论

本研究采用 70%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水 6 种不同极性的溶剂对柳花进行提取,对各组分的总黄酮含量进行测定,同时以总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率为指标,研究了 6 种柳花粗提取物的抗氧化能力。结果表明,乙酸乙酯提取物的总黄酮含量、总抗氧化能力均是最高,而 70%乙醇提取物的 DPPH 自由基清除率是最强的;乙酸乙酯提取物、70%乙醇提取物和正丁醇提取物的总黄酮含量、总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率都比较高,抗氧化活性较强;而萃取所得的水提取物、氯仿提取物和石油醚提取物的总黄酮含量、总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率都比较低,这一趋势也说明,总黄酮的含量与抗氧化能力或有正相关的关系。由此可见,不同柳花提

取物均具有抗氧化作用,且抗氧化能力与其提取溶剂和总黄酮含量有关。

### 参考文献:

- [1] 赵红娟,韩立芹,姜盼,等.柳属植物化学成分研究概况[J].中国野生植物资源,2010,29(3):10-14
- [2] 刘墨祥,刘海英,郑毅男,等.柳属植物化学成分及其生物活性研究的新进展[J].吉林农业大学学报,1997(2):115-122
- [3] 安代志,张琪,韦京豫,等.大鼠槲皮素灌胃后门脉血浆代谢组学研究[J].营养学报,2007,29(6):591-595
- [4] 步文磊,王茵,蔺士安,等.植物类黄酮改善认知功能方面的动物实验研究进展[J].中华预防医学杂志,2009,43(9):817-820
- [5] 曹纬国,刘志勤,邵云,等.黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].西北植物学报,2003,23(12):2241-2247
- [6] Merken H M, Beecher G R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(3):577-599
- [7] Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases.[J]. Phytochemistry, 2005, 66(20):2399 - 2407
- [8] 梁英,韩鲁佳.黄芩中黄酮类化合物药理学作用研究进展[J].中国农业大学学报,2003(6):9-14
- [9] 李君珂,姜子涛,李荣,等.首乌叶黄酮抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J].中国食品添加剂,2012(2):69-74
- [10] 谭冰,严焕宁,廖慧娟,等.广西茉莉花叶总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究[J].食品科技,2012,37(6):244-246
- [11] 袁建梅,郭伟云,汪应灵.合欢花中总黄酮的提取工艺及对羟自由基清除作用的研究[J].中国食品添加剂,2012(1):87-91
- [12] MEHMET O. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra L.*) with identified major terpenes of the essential oil[J]. Food Chemistry, 2012, 134: 48-54
- [13] MASOUMEH F, ZAHRA T, ALI S. Essential oil composition and antioxidant of the various extracts of *Tanacetum sonbolii* Mozaff. (Asteraceae) from Iran [J]. Nature Product Research, 2012, 26 (23): 2204-2207
- [14] 叶汉侠,王甫才. 18 种中草药抗氧化活性的比较研究[J]. 浙江万里学院学报, 2004, 17(5): 111-113
- [15] VLADIMIRO C, THADDAO W, MARIA T, et al. Antioxidant and prooxidant activity behavior of phospholipids in stripped soy bean oil-in-water emulsions [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011, 88(9): 409-416
- [16] 张桂芝,耿莎,杨海燕,等.植物抗氧化成分的研究进展[J].食品科学,2007,28(12):551-553

收稿日期:2016-11-17