

三种松针活性成分含量及清除自由基能力的比较

张桂芳¹,张东杰^{2*},郭希娟²,于伟¹,张丽萍²

¹国家杂粮工程技术研究中心;²黑龙江八一农垦大学食品学院,大庆 163319

摘要:选择黑龙江省鹤北林业局区域内常见的松针品种为研究对象,利用不同的溶剂萃取其中的黄酮类和多酚类化合物,并测定了其对 DPPH 自由基的清除效果。结果显示,醇提法获得的松针样品中总黄酮含量、总多酚含量和对 DPPH 自由基的清除效果明显优于水提法,测定不同品种间活性物质含量和 DPPH 自由基清除能力的结果显示如下的顺序:红松 > 落叶松 > 樟子松。

关键词:松针;黄酮;多酚;DPPH 自由基

中图分类号:R282

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.014

Comparison of Main Bioactive Components and Free Radicals Scavenging Activities of Three Pine Needles

ZHANG Gui-fang¹,ZHANG Dong-jie^{2*},GUO Xi-juan²,YU Wei¹,ZHANG Li-ping²

¹National Coarse Cereals Engineering Research Center;

²Food College of Heilongjiang Bayi Agriculture University, Daqing 163319, China

Abstract: Common varieties of pine needles from Heilongjiang province were selected as the research subject, the flavonoids and polyphenols compound were extracted by different solvents, and DPPH free radical scavenging activities were determined. Results showed that the total flavonoids content, total polyphenol content and DPPH free radical scavenging activities of pine needles extracted by ethanol was better than that by water. The contents of bioactive compounds and DPPH free radicals scavenging activities were significant different between different varieties of pine needles, and showed in following order: *Pimcs koraiensis* > *Larix geelinii* > *Pinus sverstris*.

Key words: pine needles; flavonoids; polyphenols; DPPH free radical

松针(Pine needles)为松科植物(Pinaceae)松属(Pinus)植物的叶子,因其形状似针,故名松针。文献资料显示,松针的主要功效有抗血小板聚集活性^[1]、降血脂^[2]、降血糖^[3]、镇痛抗炎、止咳祛痰平喘、治疗风寒痹症,具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗突变效应、抗疲劳等药理作用^[4]。

现代研究表明,松针的主要化学成分有挥发油、黄酮类、木脂素、多元酚类、色素和维生素等^[5,6]。其中黄酮类化合物和多酚类化合物作为松针中的主要活性物质,因含有活泼的羟基氢而具有抗氧化性,其在医药领域,在延缓衰老、防治心脑血管疾病等方面具有积极地作用。松针是松属植物的主副产物之一,因松属植物一年四季常青,是可持续利用的再生资源^[7]。本研究选择小兴安岭东麓的鹤北林业局林场作为松针原料采集地,鹤北林业局辖区拥有全

国第二大原始红松母树林,松针资源非常丰富,本研究测定辖区内三种常见松针中的总黄酮和总多酚含量,并初步评价其抗氧化生物活性,筛选适宜加工松针系列产品的原料,为开发利用黑龙江省丰富的松针资源提供试验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

样品 A:红松的新鲜松针;样品 B:红松的松针落叶;样品 C:落叶松的新鲜松针;样品 D:落叶松的松针落叶;样品 E:樟子松的新鲜松针;样品 F:樟子松的松针落叶。

松针样品均采摘自黑龙江省鹤岗市鹤北林业局境内的松树林,除红松采摘自人工红松树林外,其余品种松针均采摘自 20 年以上野生松树。由黑龙江省鹤北国有林管理分局管理员鉴定红松品种为 *Pimcs koraiensis*,落叶松品种为 *Larix geelinii*,樟子松品种为 *Pinus sverstris*。

收稿日期:2016-04-19 接受日期:2016-05-24

基金项目:黑龙江省教育厅项目(12546045)

* 通讯作者 E-mail:byndzlj@126.com

芦丁标准品(批号 130120,上海融禾医药科技有限公司);没食子酸标准品(Sigma 分装 G7384-100 g);亚硝酸钠、硝酸铝、酒石酸钾钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、碳酸钠、石油醚,无水乙醇等均为国产分析纯;实验用水为蒸馏水。

1.2 实验仪器

Adventurer TM 电子分析天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;FW100 型高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;DK-S24 型恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;Vortex-Genie2 型涡旋振荡器,上海纳兹仪器有限公司;索氏提取器,上海豫明仪器有限公司;T6 系列紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;减压干燥箱,上海森信实验仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

松针样品采摘后去除树枝、叶梗和表面灰尘,测定松针样品的水分含量。然后放入减压干燥箱内烘干,50 ℃干燥 12 ~ 16 h,水分含量控制在 5.0% ~ 6.0%,干燥后粉碎过 40 目筛制成松针粗粉备用。

精确称取松针粗粉样品 2.00 g,加入一定量的石油醚在 70 ℃下回流提取 2 h,除去其中的色素等杂质,然后晾干样品中残留的石油醚。

1.3.2 蒸馏水提取法

将处理后的样品置于索氏提取器内,加入蒸馏水 100 mL,沸水浴中加热回流萃取 2 h。再将提取液过滤,残渣再重复抽提 30 min,合并两次提取液,过滤后定容至 200 mL,作为样品供试液备用(4 ℃保存,不超过 24h)。

1.3.3 乙醇提取法

将处理后的样品置于索氏提取器内,加入 60% 的乙醇水溶液 100 mL,在 65 ℃的水浴中加热回流萃取 2 h,再将提取液过滤,残渣再重复抽提 30 min,合并两次提取液,利用快速滤纸过滤后定容至 200 mL,作为样品供试液备用(4 ℃保存,不超过 24 h)。

1.3.4 水分含量测定

本实验样品中的水分含量测定方法参考《SN/T 0919-2000 进出口茶叶水分测定方法》进行。

1.3.5 总黄酮含量检测

样品中总黄酮含量的测定方法,参考 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法进行^[8],略作修改。

标准曲线绘制:精确称取芦丁标准品 20 mg,用

60%乙醇水溶液充分溶解并定容至 100 mL,制成 0.2 g/L 的芦丁标准品工作液。精密吸取芦丁标准品工作液(0.2 g/L)0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL 和 3.0 mL 分别置于 10.0 mL 刻度试管中,然后加 60%乙醇至总体积为 5.0 mL,依次加入亚硝酸钠水溶液(50 g/L)0.3 mL,摇匀,加入硝酸铝溶液(100 g/L)0.3 mL,摇匀,静置 6 min 后加入氢氧化钠水溶液(40 g/L)4.0 mL,用 60%乙醇定容至 10.0 mL,静置 15 min。用 1 cm 比色杯于 510 nm 处测定吸光度,做三组平行试验。以 10.0 mL 中芦丁质量(mg)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,线性工作范围 0.1 ~ 0.6 mg(10.0 mL)。

测试步骤:分别精确吸取样品供试液 1.0 mL 按照上述步骤进行操作,供试液溶剂做空白对照,做三组平行试验。利用绘制的芦丁标准曲线的回归方程计算,求出样品供试液中的总黄酮类化合物含量,以芦丁当量计。

精密度检验:精密吸取芦丁对照品溶液 1.0 mL,6 份,按上述测定吸光度,结果吸光度的 RSD 值为 0.18%,表明仪器精密度良好。

重复性试验:按醇提法和水提法制备样品供试液各 6 份,精密吸取样品供试液 1.0 mL,按上述方法测定吸光度,分别计算总黄酮含量,其含量的 RSD 值为 2.67% 和 2.24%。

稳定性试验:按醇提法和水提法制备样品供试液,分别精密吸取样品供试液 1.0 mL,按上述方法反应 15 min 后,室温放置,每隔 2 min 测定一次吸光度,求得其 RSD 值分别为 0.96% 和 1.17($n = 11$),表明供试品溶液在显色反应 35 min 内稳定。

1.3.6 总多酚含量检测

样品中总多酚含量的测定方法,参考 Folin-Ciocalteu 法进行^[9],略作修改。

标准曲线绘制:精确称取没食子酸标准品 25 mg,用蒸馏水充分溶解并定容至 250 mL,制成 0.1 g/L 的没食子酸工作液。精密吸取没食子酸工作液 0.2、0.4、0.6、0.8 mL 和 1.0 mL 于 10.0 mL 容量瓶中,加入福林酚试剂 1.0 mL,摇匀后,加入碳酸氢钠水溶液(150 g/L)2.0 mL,定容至 10.0 mL,室温下反应 2 h 后,在 760 nm 处测定吸光度值,做三组平行试验。以 10.0 mL 中没食子酸质量(mg)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,线性工作范围 0.02 ~ 0.10 mg(10.0 mL)。

测试步骤:分别精确吸取样品供试液 1.0 mL 按

照上述步骤进行操作,样品供试液溶剂做空白对照,做三组平行试验。利用绘制的没食子酸标准曲线的回归方程计算,求出供试液中的总多酚类化合物含量,以没食子酸当量计。

方法精密度、重复性和稳定性检验同总黄酮含量测定方法,此处不再赘述,精密度 RSD 值为 0.33%,重复性 RSD 值为 2.44% 和 2.97%,稳定性 RSD 分别为 1.87% 和 1.95%。

1.3.7 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除率检测方法见参考文献^[10,11]。分别吸取样品供试液各 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mL 和 2.0 mL,用样品供试液的溶剂定容到 2.0 mL。然后分别加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液 2.0 mL,充分混匀,室温下在黑暗处静置培养 30 min,在 517 nm 处检测吸光度 A_s 。加入样品供试液溶剂做空白对照,按照测定 A_s 的方法测定 A_0 。用无水乙醇代替 DPPH 按照测定 A_s 的方法测定 A_c 。同时用 V_c 做阳性对照。

自由基清除率(%)计算公式:
$$K = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中,K 为自由基清除率,%; A_s 为 2 mL 样品供试液 + DPPH 溶液的吸光度值; A_c 为 2 mL 样品供试液 + 无水乙醇的吸光度值; A_0 为 2 mL 样品供试液溶剂 + DPPH 溶液的吸光度值。

1.3.8 数据处理及分析

试验中的数据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的形式记录($n \geq 3$),数据分析利用 SPSS18.0 进行单因素的方差分析($P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为极显著)。

2 实验结果

2.1 水分含量测定结果

采摘的松针样品的水分含量如图 1 所示,各组松针样品的原始水分含量差异显著($P < 0.01$),新鲜松针样品的含水量明显高于松针落叶样品的含水量。为了去除样品因含水量不同引起的误差,在实验开始前将松针样品进行干燥处理,干燥后水分含量如图 2 所示,各组间水分含量控制在 5.0% ~ 6.0% 范围内,无显著性差异。

2.2 总黄酮含量测定结果

2.2.1 芦丁标准曲线的绘制

芦丁标准曲线在 0 ~ 0.8 mg/10 mL 的浓度范围内芦丁浓度与吸光度呈现良好的线性关系,相关系

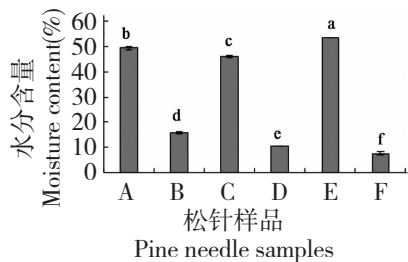


图 1 松针样品原始水分含量

Fig. 1 Original moisture content of pine needle

注:a-f 表示各组间的统计学差异($P < 0.01$)

Note:a-f indicated statistical differences among the groups

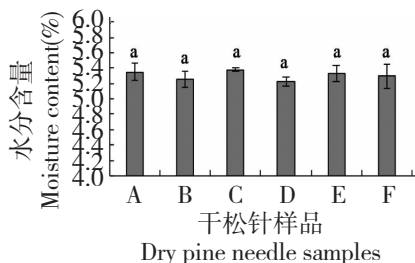


图 2 松针样品干燥后水分含量

Fig. 2 The moisture content of pine needle after drying

注:a 表示各组间无显著性差异

Note:a indicated no significant differences among the groups

数 $R^2 = 0.9879$,回归方程为 $Y = 1.3436X + 0.0582$ 。

2.2.2 松针样品中的总黄酮含量

试验中分别采用蒸馏水和 60% 乙醇水溶液的方法萃取松针样品中的黄酮类化合物,不同提取方法获得的供试样品的总黄酮含量结果如图 3 所示。结果显示,相同样品间不同提取方法比较可以发现,醇提法得到的样品供试液总黄酮含量均高于水提法,说明乙醇水溶液比仅用纯净水能够更好的将样品中的黄酮类化合物萃取出来。另一方面,比较相同提取溶剂不同品种间样品供试液总黄酮含量可以发现,不同品种间样品供试液总黄酮含量存在较大差异($P < 0.01$),醇提法获得的样品供试液总黄酮含量从高到低的顺序为:C > A > E > B > F > D;水提法获得的样品供试液总黄酮含量从高到低的顺序为:A > C > B > E > F > D。此外,比较新鲜松针和松针落叶样品供试液的总黄酮含量不难发现,松针落叶中的总黄酮含量明显低于新鲜松针,特别是落叶松的松针差异较大。

2.3 总多酚含量测定结果

2.3.1 没食子酸标准曲线绘制

没食子酸标准曲线在 0 ~ 0.12 mg/10 mL 的浓

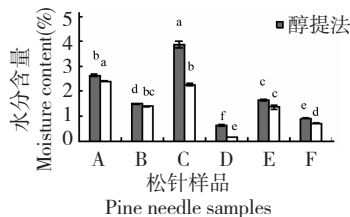


图3 松针样品中总黄酮含量

Fig. 3 Total flavonoids content of pine needle

注: a-f 表示各组间的统计学差异 ($P < 0.01$)

Note: a-f indicated statistical differences among the groups ($P < 0.01$)

度范围内没食子酸浓度与吸光度呈现良好的线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.9824$, 回归方程为 $Y = 5.2067X + 0.0518$ 。

2.3.2 松针样品中的总多酚含量

不同提取方法获得的供试样品中的总多酚含量结果如图4所示。结果显示, 比较相同样品间不同提取方法获得的样品供试液发现, 醇提法获得的样品供试液总多酚含量均高于水提法, 这个结果与总黄酮测定结果一致。另一方面, 比较相同提取溶剂不同品种样品供试液总多酚含量发现, 不同品种的样品供试液总多酚含量存在较大差异 ($P < 0.01$), 醇提法和水提法获得的样品供试液总多酚含量从高到低的顺序均为: $A > C > B > E > F > D$ 。

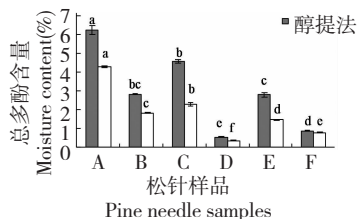


图4 松针样品中总多酚含量

Fig. 4 Total polyphenol content of pine needle

注: a-f 表示各组间的统计学差异 ($P < 0.01$)

Note: a-f indicated statistical differences among the groups ($P < 0.01$)

2.4 DPPH 自由基清除能力测定结果

醇提法和水提法获得的样品供试液对 DPPH 自由基清除效果分别如图5和图6所示, 相同提取方法不同品种样品供试液对 DPPH 自由基清除率差异较大 ($P < 0.01$)。醇提法获得的样品供试液对 DPPH 自由基的清除率高于水提法。醇提法获得的样品供试液对 DPPH 自由基清除率由高到低的顺序为: $A > V > C > B > E > F > D$, 水提法获得的样品供试液对 DPPH 自由基清除率由高到低的顺序为: $V > A > C > E > B > F > D$ 。样品供试液对 DPPH 自由

基清除率的结果与总多酚含量的测定结果基本一致。

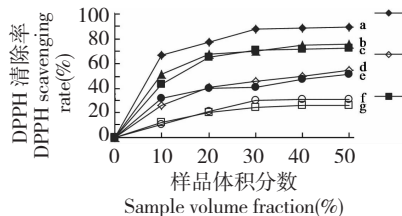


图5 醇提法松针样品中 DPPH 自由基清除效果

Fig. 5 DPPH radical scavenging activity of pine needle extracted by ethanol

注: a-g 表示各组间的统计学差异 ($P < 0.01$)

Note: a-g indicated statistical differences among the groups ($P < 0.01$)

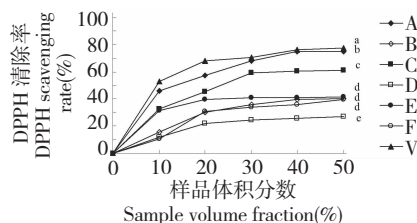


图6 水提法松针样品中 DPPH 自由基清除效果

Fig. 6 DPPH radical scavenging activity of pine needle extracted by water

注: a-e 表示各组间的统计学差异 ($P < 0.01$)

Note: a-e indicated statistical differences among the groups ($P < 0.01$)

3 讨论

本试验利用 60% 乙醇水溶液和纯净水两种溶剂分别萃取 3 个松针品种 6 个样品中的活性物质, 测定其总黄酮含量、总多酚含量和对 DPPH 自由基的清除率。结果显示, 醇提法获得的样品供试液无论是总黄酮含量, 总多酚含量和对 DPPH 自由基的清除效果均优于水提法, 结果提示 60% 乙醇水溶液更有利于松针中主要成分或清除自由基主要活性物质的溶解和萃取。

比较水提法获得的样品供试液总多酚含量、总黄酮含量和 DPPH 自由基清除率结果发现, 水提法获得的样品供试液总黄酮含量和总多酚含量结果存在一致性 (即均为 $A > C > B > E > F > D$), 而 DPPH 自由基清除率与其不同 (即 $A > C > E > B > F > D$), 但统计学结果显示 E、B、F 各组间差异不显著, 因此水提法获得的主要成分含量和 DPPH 自由基清除能

力存在一致性。

比较醇提法获得的样品供试液总多酚含量、总黄酮含量和 DPPH 自由基清除率结果发现,醇提法获得样品供试液总多酚含量和 DPPH 自由基清除能力结果存在一致性(即均为 $A > C > B > E > F > D$),而总黄酮含量与其不同($C > A > E > B > F > D$),并且各组存在统计学差异($P < 0.01$)。

比较相同品种新鲜松针和松针落叶获得的样品供试液多酚含量、总黄酮含量和 DPPH 自由基清除率结果发现,相同品种的新鲜松针萃取获得的样品供试液的活性成分含量和 DPPH 自由基清除能力均高于松针落叶。

比较不同品种新鲜松针水提法萃取得到的样品供试液测定结果发现,总黄酮含量、总多酚含量和对 DPPH 自由基的清除能力由高到低的顺序为: $A > C > E$,即红松 > 落叶松 > 樟子松;比较不同品种新鲜松针醇提法萃取得到的样品供试液测定结果发现,总多酚含量和 DPPH 自由基清除能力由高到低的顺序为 $A > C > E$,而总黄酮含量由高到低的顺序为 $C > A > E$ 。可以看出两种提取方法获得的样品供试液的总多酚含量和 DPPH 自由基清除能力结果存在一致性(即均为 $A > C > E$)。推测松针萃取得到的样品供试液的多酚类化合物是 DPPH 自由基清除作用的主要活性物质。本研究结果可望为松针的深度研究与开发利用提供试验依据。

参考文献

- 1 Chen XY(陈骁熠), Liu HJ(刘红建), Wei L(魏莲), *et al.* Separation and purification of shikimic acid in masson pine and determine the antiplatelet-aggregating activity. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2009, 30(7): 55-58.
- 2 Zheng XK(郑晓珂), Wang XL(王小兰), Feng WS(冯卫生). Research of pine needles extract on reducing blood lipids. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2008, 24(3): 81-82.
- 3 Du XX(杜兴旭), Qiu XD(邱旭东), Wang YD(王云东), *et al.* Hypoglycemic lipid-lowering effect of pine needle extract on type 2 diabetic rats. *Chin J Lab Diagn*(中国实验诊断学), 2011, 15: 1838-1840.
- 4 Xiong CM(熊春梅), Guo AW(郭爱伟). Progress on pharmacological actions of pine needle extract. *Progr Veterin Med* (动物医学进展), 2010, 31: 104-107.
- 5 Zhang ZQ(张志琴), Xiao PY(肖培云), Liu GM(刘光明). Advances in studies on chemical constituents and pharmacological of pine needle. *Drugs Clinic* (现代药物与临床), 2011, 26: 278-281.
- 6 Zhang X(张旭), Ji YQ(及元乔), Li P(李萍), *et al.* Study on chemical constituents of *Pinus massoniana* leaf. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 621-623.
- 7 Chen Y(陈英), Liu CG(刘成国), Zhao YZ(赵毓芝), *et al.* Advances in functional components of pine needles and its application. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40: 5994-5996.
- 8 Li XX(李秀信), Zhang YM(张院民). Studies on the determination method of total flavone content in *Toona sinensis*. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2010, 10: 243-248.
- 9 Zhang HH(张海晖), Duan YQ(段玉清), Ni Y(倪燕), *et al.* Cereals polyphenols extraction method and effect of antioxidant. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2008, 23: 107-111.
- 10 Wang J, Yuan XP, Jin ZY, *et al.* Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chem*, 2007, 104: 242-250.
- 11 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, *et al.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28(1): 25-30.