

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.04.023

牛东玲, 马婷婷, 张永梅, 等. 宁夏枸杞不同品种叶的总黄酮含量及清除自由基能力分析[J]. 广西植物, 2013, 33(4): 556-559

Niu DL, Ma TT, Zhang YM, et al. Analysis of total flavonoids and free radical scavenging activities in different *Lycium barbarum* cultivars[J]. *Guihaia*, 2013, 33(4): 556-559

## 宁夏枸杞不同品种叶的总黄酮含量及清除自由基能力分析

牛东玲, 马婷婷, 张永梅, 吴春丽, 张自萍\*

(宁夏大学 生命科学学院, 银川 750021)

**摘要:** 采用紫外分光光度法和 DPPH 法分别对宁夏枸杞不同品种叶的总黄酮含量及其清除自由基能力进行分析。结果表明: 宁夏枸杞不同品种的叶总黄酮含量和清除自由基能力之间均存在显著性差异。其中宁杞菜 1 号叶的总黄酮含量极显著高于其它几个品种 (\*\* $P < 0.01$ ) 并且其清除自由基能力也最强, 与其它品种之间差异显著 (\* $P < 0.05$ )。说明宁杞菜 1 号是开发枸杞茶的优良品种。

**关键词:** 宁夏枸杞叶; 品种; 总黄酮; 自由基清除能力

中图分类号: Q946.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)04-0556-04

## Analysis of total flavonoids and free radical scavenging activities in different *Lycium barbarum* cultivars

NIU Dong-Ling, MA Ting-Ting, ZHANG Yong-Mei,

WU Chun-Li, ZHANG Zi-Ping\*

(College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** The content of total flavonoids and free radical scavenging activities of different *Lycium barbarum* cultivars were respectively evaluated by ultraviolet spectrophotometry and DPPH. The results showed the content of total flavonoids of Ningqicai No. 1 was significantly higher than other cultivars (\*\* $P < 0.01$ ) and its free radical scavenging activity was much stronger than other cultivars (\* $P < 0.05$ ). It was suggested that Ningqicai No. 1 was an excellent cultivar to develop Gouqi tea.

**Key words:** leaves of *Lycium barbarum*; cultivars; contents of total flavonoids; free radical scavenging activities

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 为茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 落叶灌木植物, 其叶作为药用部位, 被收载于《宁夏中药材标准》(1993) 中, 称枸杞茶, 具有滋补肝肾, 养血益精, 明目润肺的功效。现代药理学研究也证明, 枸杞叶具有降血糖、增强机体耐缺氧及提高免疫调节等方面的活性 (杨涓等, 2009; 黄欣等, 2007)。枸杞叶具有较高含量

的黄酮类化合物, 且高于枸杞干果 (李国莉, 1995)。我们前期的研究结果显示, 枸杞叶总黄酮含量与其清除 DPPH 自由基的能力间存在正剂量关系, 并且其活性高于枸杞果实 (牛东玲等, 2012)。宁夏枸杞经过长期的人工驯化和培育, 已形成了多个品种 (安巍等, 2009)。但截止目前, 对于宁夏枸杞不同品种叶的总黄酮含量及抗氧化活性方面的比较研

收稿日期: 2012-11-16 修回日期: 2013-01-08

基金项目: 宁夏大学自然科学基金 (NDZR10-3); 国家科技支撑计划项目 (2009BAI72B03)

作者简介: 牛东玲 (1973-), 女, 陕西西安人, 博士, 副教授, 研究方向为植物资源化学 (E-mail) niudl@nxu.edu.cn。

\* 通讯作者: 张自萍, 博士, 教授, 研究方向为天然产物化学及生物活性研究 (E-mail) zpzhang@nxu.edu.cn。

究,尚未见有报道。本实验选取栽培于同一地区宁夏枸杞 5 个品种的叶为材料,比较研究了不同品种在同一时期的叶总黄酮含量及其清除自由基能力的差异,以期为枸杞叶的开发利用提供一些参考。

## 1 材料、仪器与试剂

实验材料为宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)的 5 个品种(宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞菜 1 号及新培育的两个品种宁杞 7 号和 0901)的叶,采于宁夏枸杞研究所种植基地。样品均采自盛花期枝条中上部的无病虫害的成龄叶,宁杞菜 1 号芽采自盛花期枝条中上部的新萌生的叶,采后 40℃ 烘箱烘干。

T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);XMTD-6000 型电热恒温鼓风干燥箱(上海佳胜实验设备有限公司),电子分析天平(郑州长城科工贸有限公司),KQ-500B 超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

芦丁对照品购自成都曼思特标准品公司,二苯基苦肼基(DPPH·)购自 Sigma 公司,NaOH、NaNO<sub>2</sub>、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、95% 乙醇、甲醇、三氯甲烷均为国产分析纯试剂。

## 2 实验方法

### 2.1 标准溶液的制备

精密称取芦丁标准品 5 mg(120℃ 干燥至恒重),加甲醇溶解,定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,即得 0.2 mg/mL 的芦丁对照液。

### 2.2 样品溶液的制备

将烘干至恒重的宁夏枸杞不同品种的叶粉碎,过 4 号筛,精密称定细粉 1.0 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,然后加入 50 mL 三氯甲烷,用索式提取器 80℃ 水浴脱脂 4 h(至滴下溶液为无色)。弃去氯仿,将样品晾干,加甲醇 20 mL,超声提取 30 min,重复二次,抽滤,合并滤液,浓缩,转移至 100 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,作为供试品保存,母液浓度为 10 mg/mL。

### 2.3 检测波长的确定

精密吸取芦丁对照液及样品溶液各 1 mL,按照标准曲线制备显色溶液,在 350~640 nm 波长间筛选最佳测定波长,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,芦丁的标准溶液和样品溶液

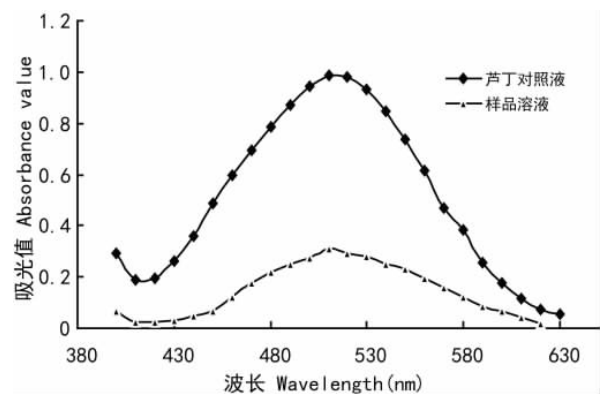


图 1 波长扫描图谱

Fig. 1 Spectrum of wavelength scanning

均在 510 nm 处具有最大吸收峰,故选取 510 nm 作为测定波长。

### 2.4 芦丁标准曲线的绘制

精密吸取芦丁对照液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 10 mL 刻度试管中,各加甲醇至 5 mL,加 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,再加 4% NaOH 溶液 4 mL,摇匀,放置 15 min,以空白为对照。在 510 nm 处分别测定吸光度,以吸光度为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘制标准曲线,如图 2 所示。

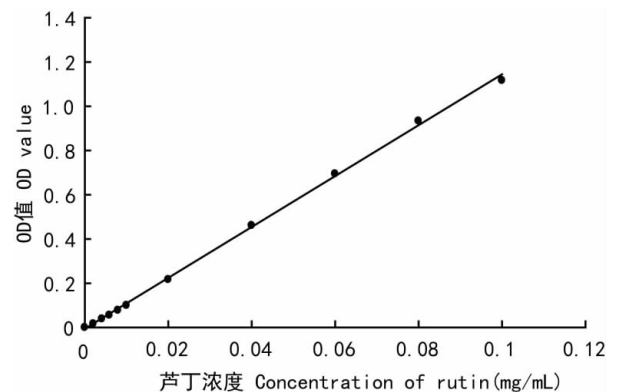


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 Standard curve of rutin

得到线性回归方程为  $y = 11.672x - 0.009$ ,  $R^2 = 0.9997$ ,其中  $x$  为芦丁浓度, $y$  为吸光值,线性范围为 0.002~0.1 mg/mL。

### 2.5 总黄酮含量的测定

总黄酮含量以芦丁为对照品,采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 比色法测定(叶菊等,2006;方圆

等 2010)。分别精密吸取各样品母液 1.0 mL 于试管中,分别加甲醇至 5 mL,加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.5 mL,混匀后放置 6 min,然后加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.5 mL,摇匀后放置 6 min。最后再加入 4% NaOH 溶液 4 mL,摇匀,放置 15 min。在 510 nm 处测定不同浓度的标准品的吸光值,按照公式 2-1 计算总黄酮含量(x)。

$$x = y \times V \times F / M \dots\dots\dots 2-1$$

式中 x: 样品中总黄酮含量(mg/g); y: 由回归方程算得的样液浓度(mg/mL); V: 定容体积(mL); F: 稀释倍数; M: 样品量(g)。

2.6 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 溶液的配制: 准确称取 0.0099 g DPPH, 用 95% 乙醇溶解,定容至 250 mL 棕色容量瓶中,充分混匀得 DPPH 溶液(约 1.0×10<sup>-4</sup> mol/L),保存于冰箱中备用。

清除 DPPH 自由基能力的测定: 将样品母液逐级稀释,配制成 10 个浓度梯度的溶液。参照文献方法(Larrauri *et al.*, 1998),在试管中依次加入 3.0 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 样品溶液,混匀,避光反应 30 min,在 517 nm 下测吸光度值(A),平行测定 3 次,测定吸光度值,记为 A<sub>s</sub>;在试管中加入 3.0 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 样品稀释溶剂,混匀,测定吸光度值,记为 A<sub>0</sub>;在试管中,加入 3.0 mL DPPH 溶液稀释溶剂和 0.5 mL 样品溶液,混匀,测定吸光度值,记为 A<sub>r</sub>。按 2-2 式计算清除率(Y):

$$Y = [1 - (A_s - A_r) / A_0] \times 100\% \dots\dots 2-2$$

不同品种叶清除 DPPH 自由基能力采用 SC<sub>50</sub> 值表示。以清除率对样品浓度进行回归分析,由方程计算出 DPPH 自由基清除率为 50% 时所需提取物溶液的浓度。用公式 [(半数清除率×反应加入的 DPPH 量) / 样品质量]求得单位质量的外源抗氧化剂或植物样品对 DPPH 的实际清除量。

以抗氧化剂 Vc 为阳性对照。首先准确称取 0.05g Vc 蒸馏水溶解定容至 50 mL 容量瓶中,浓度为 1.00 mg/mL,然后逐级稀释。

3 结果与分析

3.1 总黄酮含量的比较

由图 3 可以看出,宁夏枸杞不同品种的叶中总黄酮含量有明显差别,枸杞菜 1 号中的总黄酮含量最高,枸杞 2 号中的总黄酮含量最低。它们的含量

高低为: 枸杞菜 1 号>0901>枸杞 7 号>枸杞 1 号>枸杞 2 号。在枸杞菜 1 号中,其芽的总黄酮含量高于成熟叶中的总黄酮含量,达 55.77 mg/g。

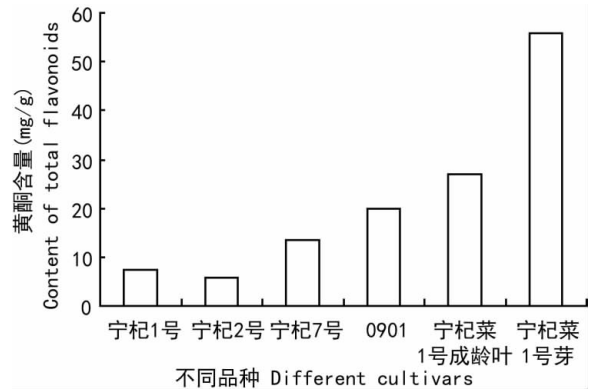


图 3 不同品种叶的总黄酮含量  
Fig. 3 Contents of total flavonoids of different cultivars' leaves

方差分析结果表明,除枸杞 1 号与枸杞 2 号之间无显著差异外,枸杞菜 1 号、0901、枸杞 7 号之间以及与枸杞 1 号、枸杞 2 号之间存在极显著差异 (\*\*P<0.01)。

3.2 清除 DPPH 自由基能力的比较

宁夏枸杞不同品种叶及 Vc 对 DPPH 自由基清除效果如图 4、图 5。从图 4 看出,样品清除 DPPH

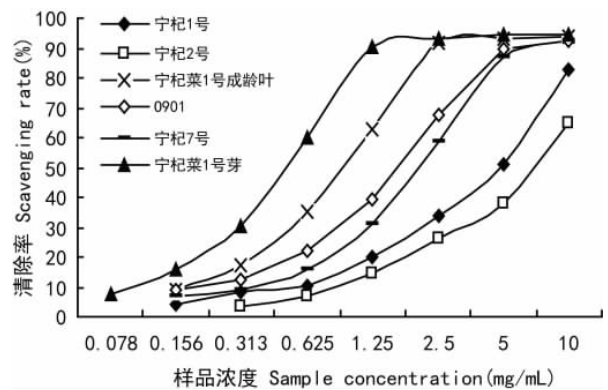


图 4 宁夏枸杞不同品种叶对 DPPH 自由基清除曲线  
Fig. 4 Curves of scavenging activities on DPPH radical of different cultivars' leaves

自由基的能力与其浓度呈正量效关系,即随着样品浓度增加,对 DPPH 自由基的清除率逐渐增大,浓度在 10 mg/mL 以下时,清除率几乎是随浓度的增大而呈线性增加。在相同浓度下,枸杞菜 1 号清除 DPPH 自由基的能力最高,其余清除率由高到低依

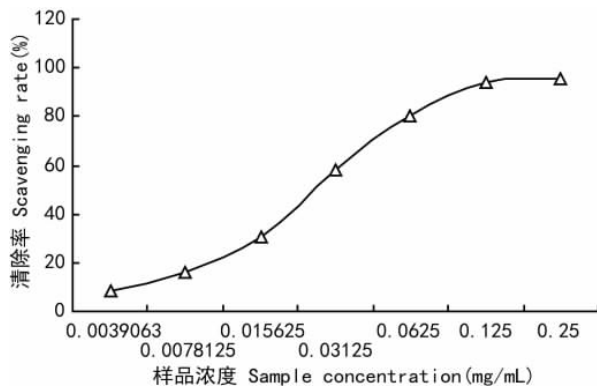


图5 Vc 对 DPPH 自由基清除曲线

Fig. 5 Curves of scavenging activities on DPPH radical of Vc

表 1 不同品种叶清除 DPPH 自由基能力

Table 1 Scavenging activities on DPPH radical of different cultivars' leaves

| 宁夏枸杞叶品种<br>Cultivar | DPPH 吸收降低 50% 时<br>抗氧化剂的量<br>SC <sub>50</sub> ( mg · mL <sup>-1</sup> ) | DPPH 实际清除量<br>Real amount of<br>scavenged DPPH ( mg · g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|---|---|
| 宁杞菜 1 号芽            | 1.0110  | 117.01  |
| 宁杞菜 1 号成龄叶          | 1.8714  | 63.21   |
| 0901                | 3.1437  | 37.63   |
| 宁杞 7 号              | 3.6053  | 32.81   |
| 宁杞 1 号              | 5.3661  | 22.05   |
| 宁杞 2 号              | 7.2755  | 16.26   |

次为 0901、宁杞 7 号、宁杞 1 号、宁杞 2 号。在宁杞菜 1 号成龄叶浓度为 2.5 mg/mL、其嫩芽浓度为 1.25 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除能力与 Vc 浓度在 0.125 mg/mL 时的清除率相当,均在 90% 以上。

宁夏枸杞叶不同品种叶清除 DPPH 自由基的 SC<sub>50</sub> 值见表 1。5 个不同品种叶中,宁杞菜 1 号的 SC<sub>50</sub> 值最小,即宁杞菜 1 号的抗氧化活性最强,并且该品种的芽的清除 DPPH 自由基能力要强于其成龄叶。5 个品种清除 DPPH 自由基能力为宁杞菜 1 号>0901>宁杞 7 号>宁杞 1 号>宁杞 2 号。

方差分析表明,宁杞菜 1 号清除 DPPH 自由基能力最强,与其它品种之间存在显著差异(\* P<0.05),宁杞菜 1 号芽与其成龄叶之间无显著差异(\* P>0.05)。

综合分析 5 个品种黄酮含量与它们的清除自由基能力之间的关系,黄酮类化合物的含量与清除 DPPH 自由基能力的变化趋势基本一致,表明黄酮类化合物的含量影响其清除 DPPH 自由基能力,对两者进行相关性分析,相关系数为 0.222,表明黄酮含量与清除自由基能力之间不存在显著性的相关。

## 4 结论

本研究结果表明,宁夏枸杞 5 个品种的叶总黄酮含量和清除自由基能力之间均存在显著性差异,但黄酮含量与清除自由基能力之间不存在显著性的相关关系。本研究材料均采自同一种质资源圃,它们的栽培条件和生长环境基本一致,表明 5 个品种在基因水平上存在明显差异。其中宁杞菜 1 号叶的总黄酮含量和清除自由基能力均最强,说明其可以作为枸杞茶开发利用的优质种源。对于宁杞菜 1 号不同发育程度的叶片而言,其嫩芽与成龄叶之间的清除自由基能力差异不显著,说明除了开发利用嫩芽外,资源丰富的成龄叶也可以被作为保健食品加以开发利用。

致谢 宁夏农科院枸杞工程中心秦垦研究员提供实验材料。

## 参考文献:

- 邢世瑞. 1993. 宁夏中药材标准[S]. 银川:宁夏人民出版社
- An W(安巍),Zhang HX(章惠霞),He J(何军) et al. 2009. Progress and prospects of wolfberry breeding(枸杞育种研究进展)[J]. *North Hortic*(北方园艺) (5): 125—128
- Fang Y(方圆),Wang XY(王雪彦),Chao RB(晁若冰). 2010. Study on the determination of astilbin and total flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae*(土茯苓药材中落新妇苷和总黄酮的含量测定方法研究)[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 30(9): 1738—1741
- Huang X(黄欣),Zhao HL(赵海龙). 2007. Study on effect of water extract in Qinghai medlar leaves on anti-anoxia and anti-tiredness in mice(青海枸杞叶水提取液对小鼠耐缺氧及抗疲劳作用的研究)[J]. *Chin J Pract Chin Mod Med*(中华实用中西医结合杂志) 20(15): 1334—1336
- Larrauri JA, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto A F. 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels [J]. *J Agric Food Chem*, 46(7): 2694—2697
- Li GL(李国莉),Huang YQ(黄元庆). 1995. Determination of flavone contents in different components of *Lycium barbarum* L.(宁夏枸杞不同组分黄酮含量分析)[J]. *Ningxia Med J*(宁夏医学院学报) 17(2): 114—115
- Niu DL(牛东玲),Ma TT(马婷婷),Zhang ZP(张自萍). 2012. Study on the correlation between total flavonoid contents and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. leaves(宁夏枸杞叶总黄酮含量与抗氧化活性关系)[J]. *J Ningxia Univ: Nat Sci Edit*(宁夏大学学报·自然科学版) 33(1): 55—57
- Yang J(杨涓),Wei ZQ(魏智清),Chen W(陈炜). 2009. Primary research of *Lycium barbarum* L. leaves in decreasing blood glucose(枸杞叶降血糖作用的初步研究)[J]. *J Sichuan Trad Chin Med*(四川中医) 27(4): 47—49
- Ye J(叶娟),Su YQ(苏印泉),Yu JR(吕建荣) et al. 2006. The comparison study of content of flavonoid of *Apocynum venetum*(罗布麻总黄酮含量的研究)[J]. *J Northwest For Univ*(西北林学院学报) 21(3): 114—115