

竹叶花椒黄酮抗氧化性及协同效应研究

Study on antioxidant activity and synergistic effect of flavonoids from *Zanthoxylum armatum* DC

周孟焦^{1,2} 何鑫柱^{1,2,3} 李朝俊^{1,2,3} 梁晓峰^{1,2,3}

ZHOU Meng-jiao^{1,2} HE Xin-zhu^{1,2,3} LI Chao-jun^{1,2,3} LIANG Xiao-feng^{1,2,3}

(1. 四川中医药高等专科学校绵阳市中药资开发利用重点实验室, 四川 绵阳 621010;

2. 四川中医药高等专科学校川西北中药材资源研究与开发利用实验室, 四川 绵阳 621010;

3. 西南科技大学材料与化学学院, 四川 绵阳 621010)

(1. Mianyang Key Laboratory for the Development and Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621010, China;

2. Laboratory of Research Development and Utilization on Traditional Chinese Medicine Resources in Northwest Sichuan, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621010, China;

3. School of Materials and Chemistry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

摘要:目的:研究竹叶花椒黄酮提取物的抗氧化性以及协同效应。方法:采用 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除法评价竹叶花椒黄酮提取物的抗氧化活性,并通过加和法研究竹叶花椒黄酮提取物与维生素 C 和芦丁复配物的协同作用。结果:竹叶花椒黄酮提取物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的半抑制浓度分别为 0.03, 0.062 mg/mL, 具有较强的抗氧化活性。竹叶花椒黄酮提取物与维生素 C 或芦丁组成的复配物抗氧化活性高,且在复配比例为 1:1 时抗氧化性最强,维生素 C+黄酮提取物组成的复配物的抗氧化活性较芦丁+黄酮提取物组成的复配物高。结论:竹叶花椒黄酮具有强抗氧化性,其与维生素 C 及芦丁组成的复配物可提高对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力,具有抗氧化协同作用,可作为天然抗氧化剂的潜在来源。

关键词:竹叶花椒;黄酮;抗氧化活性;协同效应

Abstract: Objective: This study aimed to investigate the antioxidation and synergistic effect of flavonoid extract of *Zanthoxylum armatum* DC. **Methods:** DPPH radical and ABTS

radical scavenging methods were used to evaluate the antioxidant activity of flavonoids extract from *Z. armatum*, and the synergies of flavonoids extract with vitamin C and rutin complex were studied by adding method. **Results:** The semi-inhibitory concentrations of DPPH free radical and ABTS free radical IC₅₀ were 0.03 and 0.062 mg/mL, respectively, showing strong antioxidant activity. The antioxidant activity of the complex composed of flavonoid extract and vitamin C or rutin was high, and the antioxidant activity of the complex composed of vitamin C and flavonoid extract was higher than that of rutin and flavonoid extract when the ratio was 1:1. **Conclusion:** The flavonoids of *Z. armatum* have strong antioxidant activity, and their complex composed of vitamin C and rutin can improve the scavenging capacity of DPPH free radical and ABTS free radicals. The extracted flavonoids have antioxidant synergistic effect, and can be used as a potential source of natural antioxidants.

Keywords: *Zanthoxylum armatum* DC; flavonoids; antioxidant activity; synergistic effect

基金项目:四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(编号:2020JC0120);绵阳市科技项目(编号:2020YFZJ004);四川省中医药重点学科建设项目(编号:川中医药函[2020]84号)

作者简介:周孟焦,女,硕士。

通信作者:梁晓峰(1975—),男,四川中医药高等专科学校教授,博士。E-mail: XFLiang@Swust.edu.cn

收稿日期:2022-09-18 **改回日期:**2023-03-08

竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC),又名藤椒,是中国花椒种质资源的优质品种,目前主要被用于调味品行业^[1-2]。研究^[3-4]表明,竹叶花椒果皮中含有丰富的活性物质,其中黄酮类物质具有抗氧化、抑菌、抗衰老、免疫调节等多种药理作用。从竹叶花椒中提取天然黄酮类化合物并研究其抗氧化性,有助于提高对其药用价值的认识。

现代研究^[5-7]表明,黄酮、维生素 C、维生素 E 和芦丁等多种抗氧化剂配伍后的抗氧化作用大多显著高于相同剂量下单一抗氧化剂的。研究拟以维生素 C 和芦丁作为阳性对照,采用 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除法研究竹叶花椒黄酮提取物的抗氧化活性,并在此基础上探究提取物与维生素 C 和芦丁复配物的协同抗氧化作用,以期作为竹叶花椒作为天然抗氧化剂良好来源以及其深入开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜竹叶花椒:采自四川省绵阳市某藤椒种植基地,经四川中医药高等专科学校王化东副教授鉴定为芸香科花椒属植物竹叶花椒;

芦丁:纯度>98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

聚酰胺(30~60 目)、大孔吸附树脂:上海麦克林生化科技有限公司;

维生素 C (AR)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(96%)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(98%):国药集团化学试剂有限公司;

无水乙醇、过硫酸钾:分析纯,成都科隆化学品有限公司。

1.2 仪器与设备

实验室微波合成仪:XH-MC-1 型,北京祥鹤科技发展有限公司;

电子分析天平:BSA124S 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-315 型,日本岛津公司;

红外吸收光谱仪:Nicolet-5700 型,美国热电仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 竹叶花椒黄酮的提取与纯化 根据文献[4]的方法制备竹叶花椒果皮黄酮粗提液,采用聚酰胺一大孔吸附树脂联用进行富集纯化。

1.3.2 红外光谱测定 利用红外光谱仪采集红外光谱图,扫描波长范围为 400~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 0.4 cm^{-1} 。

1.3.3 DPPH 自由基清除能力测定 参照文献[8]的方法并适当修改。以芦丁和维生素 C 为阳性对照,精密量取 2 mL 竹叶花椒黄酮提取液,再加入 2 mL 0.4 mmol/L 的 DPPH 溶液,混匀,黑暗处反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度,并按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——自由基清除率,%;

A_0 ——2 mL 无水乙醇+2 mL 自由基溶液的吸光度值;

A_1 ——2 mL 样品液+2 mL 自由基溶液的吸光度值;

A_2 ——2 mL 样品液+2 mL 无水乙醇的吸光度值。

1.3.4 ABTS 自由基清除能力测定 参照文献[9]的方法并适当修改。以芦丁和维生素 C 为阳性对照,将 7 mmol/L 的 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积混匀,黑暗条件下静置 14 h,形成 ABTS 工作液,蒸馏水稀释至 734 nm 处吸光度值为 0.7 ± 0.02 。精密量取 2 mL 竹叶花椒黄酮提取液,再加入 2 mL ABTS 工作液,混匀,静置 6 min,测定 734 nm 处吸光度。按式(1)计算 ABTS 自由基清除率。

1.3.5 复配物对 DPPH 自由基的清除能力测定 分别固定维生素 C、芦丁与黄酮提取液复配比例为 1:1,1:3,1:6,并稀释至复配物溶液浓度(c)的 0.2,0.4,0.6,0.8 倍,测定 517 nm 处吸光度,按式(1)计算复配物对 DPPH 自由基的清除作用。

1.3.6 复配物对 ABTS 自由基的清除能力测定 分别固定维生素 C、芦丁与黄酮提取液的复配比例为 1:1,1:2,1:4,并稀释至复配物溶液浓度的 0.2,0.4,0.6,0.8 倍,测定 734 nm 处吸光度,按式(1)计算复配物对 ABTS 自由基的清除作用。

1.3.7 协同抗氧化分析 采用加和法分析比较协同抗氧化作用,即通过比较相同浓度下单组分竹叶花椒黄酮提取物和维生素 C、芦丁抗氧化性的简单加和与竹叶花椒黄酮提取物+维生素 C、竹叶花椒黄酮提取物+芦丁复配抗氧化剂抗氧化活性大小,若单组分的总抗氧化活性高于复配物的,则为负协同作用,反之为协同作用。

1.4 数据处理

各试验均重复 3 次,结果以平均值和标准差表示。采用 SPSS statistics 24 计算自由基的半抑制浓度 IC_{50} 值,采用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 竹叶花椒提取物的红外光谱分析

黄酮类化合物母核上含有羟基、酚羟基、甲氧基、羟氧基、苯等基团,在 3 100~3 460,1 600~1 640,1 380,1 260,1 090 cm^{-1} 处具有红外特征吸收峰。由图 1 可知,3 385 cm^{-1} 处宽而强的吸收峰,表明存在大量酚羟基;2 917,2 853,1 380 cm^{-1} 处为— CH_3 ,— CH_2 的特征吸收峰,表明存在饱和碳上的氢;1 630,1 610,1 540,1 450 cm^{-1} 处为苯环特征峰;1 670 cm^{-1} 处为 C=O 伸缩振动吸收峰,其中羰基可能与羟基共轭导致其吸收峰向

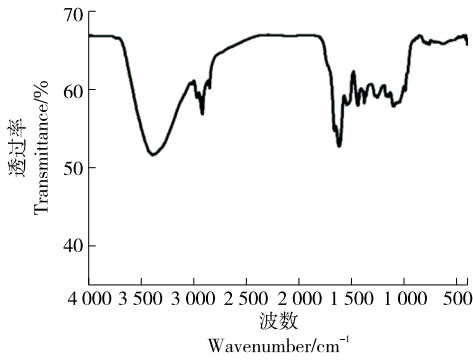


图1 竹叶花椒提取物的红外光谱

Figure 1 Infrared spectrum analysis of the extract from *Z. armatum*

低波数移动;1 260,1 090 cm^{-1} 处可归属于醚键的反对称和对称伸缩振动峰^[10],显示提取物为黄酮类物质。

2.2 竹叶花椒黄酮对 DPPH 自由基的清除能力

由图 2 可知,在试验浓度范围内,3 种物质清除 DPPH 自由基的能力与自身的质量浓度呈正相关,随着质量浓度的增加其所对应的自由基清除能力也增加。相同质量浓度下,各组分对 DPPH 自由基清除率大小为维生素 C > 芦丁 > 竹叶花椒黄酮提取物。当竹叶花椒黄酮提取物质量浓度为 0.09 mg/mL 时,IC₅₀ 为 0.03 mg/mL ,自由基清除率基本达到饱和,相较于阳性对照维生素 C 质量浓度为 0.05 mg/mL ,芦丁质量浓度为 0.06 mg/mL ,表明竹叶花椒黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力较强。

2.3 竹叶花椒黄酮对 ABTS 自由基的清除能力

由图 3 可知,在测试浓度范围内,3 种物质对 ABTS 自由基具有不同程度的清除作用,样品质量浓度较低时对 ABTS 自由基的清除能力不明显,随着样品浓度的不断增加,ABTS 自由基清除率表现出递增的趋势。当竹叶花椒黄酮提取物质量浓度为 0.18 mg/mL 时,IC₅₀ 为 0.062 mg/mL ,自由基清除率基本达到饱和,相较于阳性对照维生素 C 质量浓度为 0.08 mg/mL ,芦丁质量浓度为

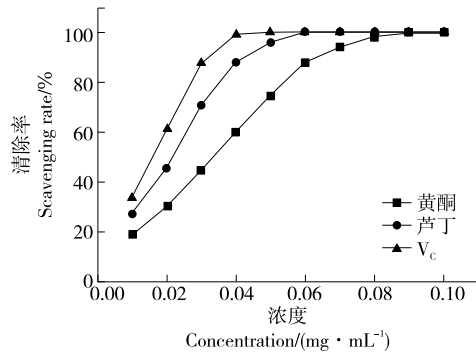


图2 竹叶花椒黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 2 Scavenging ability of flavonoids from *Z. armatum* to DPPH free radicals

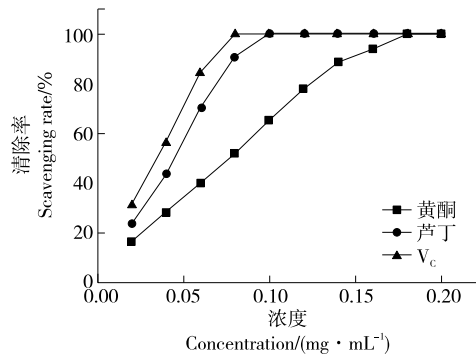


图3 竹叶花椒黄酮提取物对 ABTS 自由基清除能力

Figure 3 Scavenging ability of flavonoids from *Z. armatum* to ABTS free radicals

0.1 mg/mL ,表明竹叶花椒黄酮提取物对 ABTS 自由基的清除能力较强。

2.4 竹叶花椒黄酮+维生素 C 复合物对 DPPH 自由基的清除能力

由图 4 可知,维生素 C+竹叶花椒黄酮复合物对 DPPH 自由基的清除率大于同浓度下两者单独使用时的简单相加,说明二者存在协同增效作用。当复配比例为 1:1 时,复合物对 DPPH 自由基的清除率高,协同作用

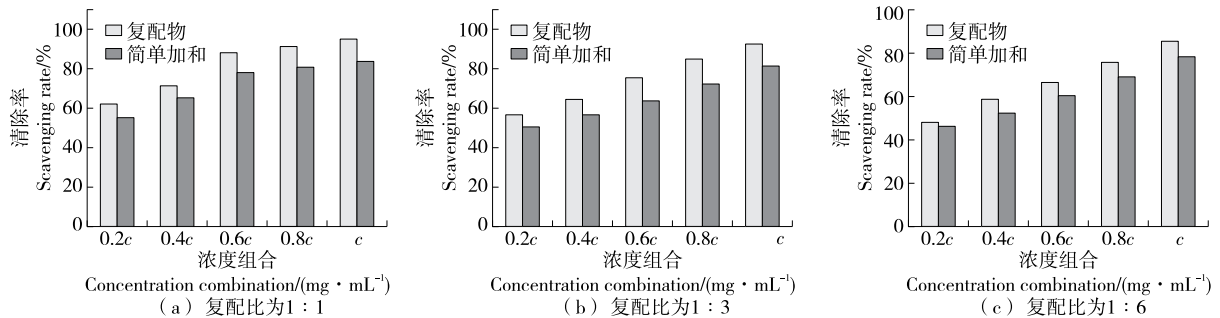


图4 不同浓度组合下维生素 C 和 黄酮复合对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 4 Scavenging ability of vitamin C and flavonoid complex on DPPH free radicals of different concentration combination

较明显;当复配比例为 1 : 3, 1 : 6 时,协同效果减弱,但当复配物稀释浓度过低时,复配物的抗氧化协同效果较低。复配物的抗氧化能力随维生素 C 比例的减小而减小,随复配物稀释倍数的增大而减小。综上,维生素 C 与竹叶花椒黄酮提取物复合时具有协同抗氧化作用,且这种作用与两种物质的浓度呈一定的关联性。

2.5 竹叶花椒黄酮 + 芦丁复配物对 DPPH 自由基的清除能力

由图 5 可知,芦丁 + 竹叶花椒黄酮提取物复配物具有协同抗氧化作用。复配物的抗氧化能力随黄酮比例的增大而减小,当复配比为 1 : 1 时,协同作用明显高于其他两组复配比例。芦丁 + 竹叶花椒黄酮在单独使用时均具有抗氧化能力,但复配物浓度过低,其协同效率低,协同抗氧化作用并不明显,与二者单独使用时的加和基基本一致。复配后有效地提高了竹叶花椒黄酮提取物整体抗氧化能力。

2.6 竹叶花椒黄酮 + 维生素 C 复配物对 ABTS 自由基的清除能力

由图 6 可知,维生素 C 与竹叶花椒黄酮提取物复配物的 ABTS 自由基清除率随复配物质量浓度的增大先上升后趋于平缓。当复配比例为 1 : 1, 1 : 2 时,复配物对 ABTS 自由基清除能力强,协同效果高,当复配比为 1 : 4

时,二者抗氧化效果弱于前两个比例,随着复配物稀释程度的增加,协同作用减弱,且稀释浓度最低时,二者呈叠加作用(既不协同也不拮抗),说明维生素 C 与竹叶花椒黄酮提取物具有协同抗氧化作用。

2.7 竹叶花椒黄酮 + 芦丁复配物对 ABTS 自由基的清除能力

由图 7 可知,芦丁 + 竹叶花椒黄酮提取物均表现出一定的抗氧化协同增效作用,可能是因为黄酮提取物是混合物,与芦丁复配后,发生了复杂的相互作用,抗氧化能力增强。当复配比为 1 : 1 时,复配物对 ABTS 自由基的清除率最强,但浓度较低时,增效作用不明显。同一复配比下,随着浓度的增加,芦丁和黄酮提取物的协同抗氧化作用增强,并随着复配物中芦丁的比例增大,协同效果更明显。综上,竹叶花椒黄酮提取物和芦丁具有协同抗氧化作用,且与复配物浓度有关,这与黄酮提取物和维生素 C 的复配物对 ABTS 自由基的清除作用具有一定的一致性。

3 结论

研究了竹叶花椒黄酮提取物的体外抗氧化活性及抗氧化协同作用。结果表明,竹叶花椒黄酮提取物具有较强的抗氧化活性,提取物与维生素 C 或芦丁组成的复配

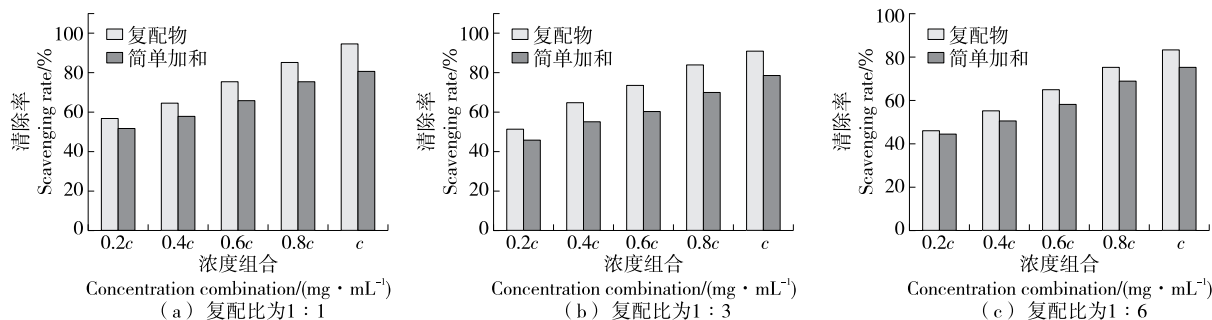


图 5 不同浓度组合下芦丁和黄酮复合对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 5 Scavenging ability of rutin and flavonoid complex on DPPH free radicals of different concentration combination

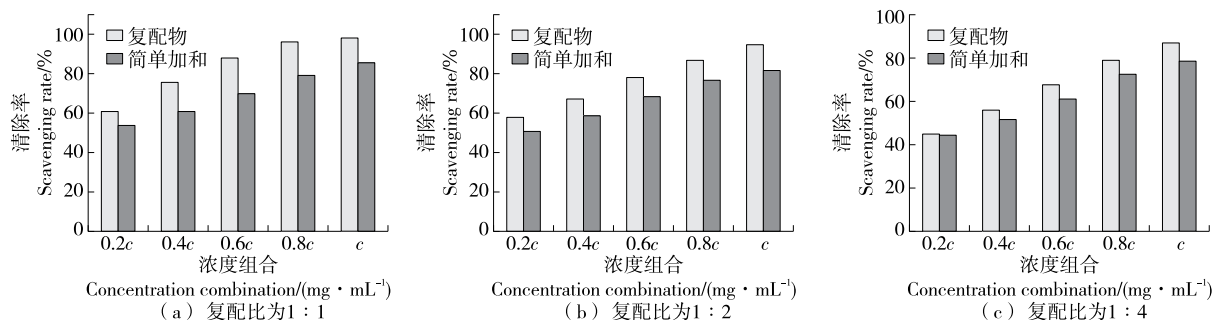


图 6 不同浓度组合下维生素 C 和黄酮复合对 ABTS 自由基的清除能力

Figure 6 Scavenging ability of vitamin C and flavonoid complex on ABTS free radicals of different concentration combination

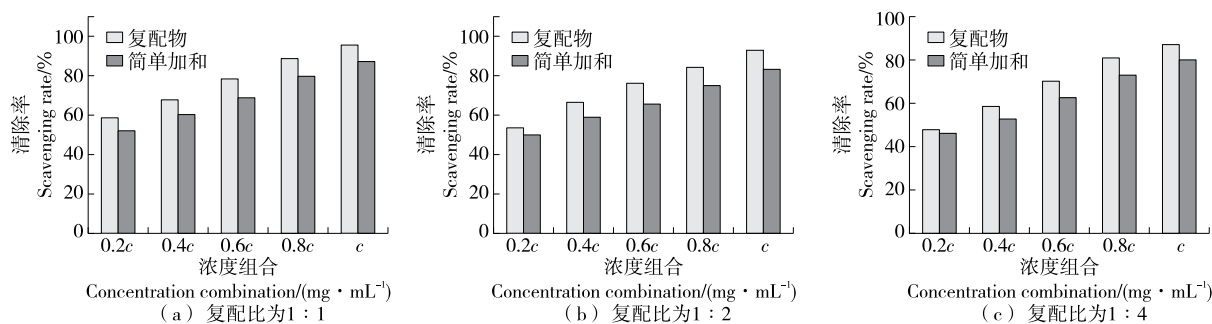


图7 不同浓度组合下芦丁和黄酮复合对ABTS自由基的清除能力

Figure 7 Scavenging ability of rutin and flavonoid complex on ABTS free radicals of different concentration combination

物具有抗氧化协同效果,且提取物与维生素C或芦丁复配比例为1:1时的抗氧化性最强。后续可研究竹叶花椒黄酮相关指纹图谱、抗氧化性能及其谱效关系,基于细胞系模型研究其协同抗氧化机理,通过动物模型验证协同效应在体内的表现,测试并研究黄酮主要代谢产物的抗氧化功效及协同作用,以丰富黄酮类化合物的抗氧化效应机制。

参考文献

- [1] 陈艳, 饶朝龙, 李美凤, 等. 藤椒的活性成分与开发应用研究[J]. 中国调味品, 2018, 43(3): 163-166.
CHEN Y, RAO C L, LI M F, et al. Research on the active ingredients and development and application of *Zanthoxylum armatum* DC[J]. China Condiment, 2018, 43(3): 163-166.
- [2] 赵容, 张萌萌, 陈茜, 等. 基于 DPPH、ABTS 法的竹叶花椒抗氧化谱效关系研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(5): 7-12.
ZHAO R, ZHANG M M, CHEN X, et al. Research on spectra-effect relationship of antioxidant activity of *Zanthoxylum armatum* DC. based on DPPH and ABTS methods[J]. China Condiment, 2020, 45(5): 7-12.
- [3] BHATT V, SHARMA S, KUMAR N, et al. Simultaneous quantification and identification of flavonoids, lignans, coumarin and amides in leaves of *Zanthoxylum armatum* using UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 132: 46-55.
- [4] 周孟焦, 陈凯, 史芳芳, 等. 微波辅助法从藤椒果皮中提取黄酮的工艺研究[J]. 农产品加工, 2020(15): 23-25.
ZHOU M J, CHEN K, SHI F F, et al. Experimental study on microwave-assisted extraction of flavonoids from the pericarp of *Zanthoxylum armatum* DC [J]. Farm Products Processing, 2020(15): 23-25.
- [5] RHMAN M A, DEVNARAIN N, KHAN R, et al. Synergism potentiates oxidative antiproliferative effects of naringenin and quercetin in MCF-7 breast cancer cells[J]. Nutrients, 2022, 14(16): 3437.
- [6] MYINT K Z, ZHOU Z Y, XIA Y M, et al. Stevia polyphenols: A stable antioxidant that presents a synergistic effect with vitamin C [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(4): e15317.
- [7] LI N, LIU J X, YANG L, et al. Synergistic effect of antioxidant systems enhance cadmium phytoextraction and translocation in *Amaranthus hypochondriacus* under rutin application [J]. South African Journal of Botany, 2022, 149: 582-590.
- [8] 夏陈, 向卓亚, 朱永清, 等. 不同品种青稞中总多酚、总黄酮含量及抗氧化性比较[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 162-165.
CHEN X, XIANG Z Y, ZHU Y Q, et al. Comparative analysis of total flavonoids, total polyphenols and antioxidant properties in different varieties of Hulless barley[J]. Food & Machinery, 2020, 36(6): 162-165.
- [9] 李娜, 燕平梅, 乔宏萍, 等. 南瓜果实黄酮提取工艺条件优化及其抗氧化性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(8): 24-30.
LI N, YAN P M, QIAO H P, et al. Study on optimization of extraction technology conditions for flavonoids from pumpkin fruits and their antioxidant activity [J]. China Condiment, 2020, 45(8): 24-30.
- [10] 周孟焦. 竹叶花椒中黄酮类物质提取及抗氧化性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021: 32-33.
ZHOU M J. Study on extraction of flavonoids from *Zanthoxylum armatum* DC and its antioxidant activity[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2021: 32-33.