

## 壳斗科植物种子的多酚类含量及抗氧化能力\* Content and Antioxidant Capacity of Polyphenols from the Seeds of Fagaceae Plants

王亚凤,黄永林\*\*,刘金磊,颜小捷,陈月圆,杨子明,何瑞杰,李典鹏

WANG Yafeng, HUANG Yonglin, LIU Jinlei, YAN Xiaojie, CHEN Yueyuan, Yan Ziming, HE Ruijie, LI Dianpeng

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所,广西植物功能物质研究与利用重点实验室,广西桂林 541006)

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

**摘要:**【目的】测定青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.、饭甗青冈 *Cyclobalanopsis fleuryi* (Hickel. et A. Camus) Chun ex Q. F. Zheng、大叶栎 *Quercus griffithii* Hook. f. et Thoms ex Miq.、栲 *Castanopsis fargesii*、稠木 *Lithocarpus thalassica* (Hance) Rehd. 种子中的多酚含量,评价其提取物的抗氧化能力,并分析多酚含量与抗氧化能力的关系。【方法】采用 Folin-酚法测定多酚含量,通过 DPPH·和 ABTS·自由基清除法评价种子提取物的抗氧化能力。【结果】在选取的 5 种壳斗科植物种子中,饭甗青冈的多酚含量最高(14.16%),其次为大叶栎(10.89%),栲的含量最低(0.44%);各提取物均表现出良好的抗氧化能力,其中青冈栎的半清除率质量浓度 IC<sub>50</sub> 均优于抗坏血酸(Vc),饭甗青冈 IC<sub>50</sub> 与 Vc 相当。【结论】青冈栎与饭甗青冈种子提取物可作为天然抗氧化剂应用于保健品、化妆品乃至药品等行业。

关键词:壳斗科 总酚 含量测定 抗氧化能力

中图分类号:TS255.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2016)02-0180-04

**Abstract:**【Objective】The content of polyphenols from the seeds of *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst., *Cyclobalanopsis fleuryi* (Hickel. et A. Camus) Chun ex Q. F. Zheng, *Quercus griffithii* Hook. f. et Thoms ex Miq., *Castanopsis fargesii* and *Lithocarpus thalassica* (Hance) Rehd. was determined, antioxidant capacities of their extract were compared, and the relationship between the content of polyphenols and antioxidant capacity was analyzed.【Meth-

ods】The content of polyphenols was determined by the method of Folin-phenol, and antioxidant capacities of their extract were compared by DPPH· and ABTS· radical scavenging.【Results】The content of polyphenols from *C. fleuryi* was the highest (14.16%), followed by *Q. griffithii* (10.89%), and *C. fargesii* was the lowest (0.44%), and all extracts showed good antioxidant capacity. The IC<sub>50</sub> value of *C. glauca* was better than that of Vc, and the IC<sub>50</sub> of *C. fleuryi* was similar to that of Vc.【Conclusion】

收稿日期:2015-11-12

修回日期:2016-01-18

作者简介:王亚凤(1990—),女,硕士研究生,主要从事天然产物化学研究。

\*广西自然科学基金项目(2014GXNSFCB118001),中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(科发人字[2013]165号),广西科学院基本科研业务费项目(15YJ22ZWS22),广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金项目(ZRJJ2013-7,ZRJJ2014-1)和广西壮族自治区八桂学者专项经费项目资助。

\*\*通信作者:黄永林(1974—),男,博士,研究员,硕士生导师,主要从事天然产物化学及开发利用研究,E-mail:hyl@gxib.cn.

The extracts from the seeds of *C. glauca* and *C. fleuryi* could be used in health care products, cosmetics and even pharmaceuticals.

**Key words:** Fagaceae, polyphenols, content determination, antioxidant capacity

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.011

## 0 引言

【研究意义】壳斗科植物因其种子均有包含种子的壳斗而得名,主要产于亚洲东南部及南部,中国分布的有栗属(*Castanea*)、锥属(*Castanopsis*)、水青冈属(*Fagus*)、柯属(*Lithocarpus*)、栎属(*Quercus*)、青冈属(*Cyclobalanopsis*)和三棱栎属(*Trigonobalanus*)等7属,约300种。除新疆维吾尔自治区有引种外,其它各省均为自然分布。壳斗科植物多为常绿或落叶乔木,稀灌木,是山地水源林的重要成分及主要用材树种<sup>[1]</sup>。【前人研究进展】现有的研究表明壳斗科植物树叶、树皮均富含多酚类成分,并具有很好的抗氧化活性<sup>[2-8]</sup>。关小丽等<sup>[4]</sup>对8种壳斗科植物叶中总酚的含量进行测定并进行抗氧化能力检测,表明研究的8种壳斗科植物叶中均含有多酚类成分并具有较好的抗氧化能力。Huang等<sup>[5]</sup>对大叶栎新鲜叶子提取物进行化学成分分离,得到大量多酚类化合物,并对主要成分进行脂肪酶抑制活性研究和ORAC值测定。Huang等<sup>[6-8]</sup>还从苦槠叶、米槠叶中分离得到多种多酚物质。【本研究切入点】目前对于壳斗科植物种子的研究主要集中在总脂肪、蛋白质、还原糖、淀粉、果胶等营养成分的比较分析上,还未见有关化学成分及药理活性方面的公开报道<sup>[9]</sup>。因此本文从种子的化学成分入手,研究其应用价值。【拟解决的关键问题】测定种子中多酚类成分的含量、类型及其抗氧化能力,为全面开发利用壳斗科植物资源提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

JA2003N 电子天平(上海菁海仪器有限公司); AS5150A 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);N-1100 旋转型蒸发仪(东京理化);CA-1111 冷却水循环(东京理化);十两装高速中药粉碎机(浙江瑞安市百信药机械机械厂);TDZ4A-WS 低速台式离心机(湘仪离心机有限公司);电子恒温不锈钢水浴锅(上海宜昌仪器纱筛厂);RT-9100 半自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

### 1.2 试剂

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所);2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS,

美国 Sigma 公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DP-PH, 美国 Sigma 公司);福林酚试剂(GOLD WHEAT);抗坏血酸(Vc, 中国药品生物制品检定所);纯净水;其它试剂均为分析纯。

### 1.3 样品

实验样品经广西植物研究所吕仕洪副研究员鉴定分别为青冈栎 *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.、饭甗青冈 *Cyclobalanopsis fleuryi* (Hickel. et A. Camus) Chun ex Q. F. Zheng、大叶栎 *Quercus griffithii* Hook. f. et Thoms ex Miq.、栲 *Castanopsis fargesii*、桐木 *Lithocarpus thalassica* (Hance) Rehd. 的种子。凭证标本保存于广西植物功能物质研究与利用重点实验室。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 含量测定方法

有关对照品溶液的配制以及标准曲线的制作均参考文献<sup>[10]</sup>。

##### 1.4.1.1 对照品溶液的配制

精密称取干燥至恒重的没食子酸对照品 10.5 mg,置于 100 mL 容量瓶中,用 50%(V/V)甲醇溶解并定容至刻度并摇匀,即得  $0.105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的没食子酸对照品溶液。

##### 1.4.1.2 标准曲线的建立

分别精确吸取 50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、150  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、250  $\mu\text{L}$ 、300  $\mu\text{L}$  对照品溶液于具塞试管中,加入蒸馏水稀释至 1 mL(同时以 1 mL 蒸馏水作对照),然后加入 0.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂摇匀,静置 10 min 后分别加入 1.5 mL 0.075 g/mL 的碳酸钠溶液及 2 mL 蒸馏水,摇匀,置于 40°C 水浴锅中反应 1 h,冷却,于 760 nm 波长处测定样品吸光值。以吸光度( $X$ )为横坐标,所测定样品的含量( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 0.0472X - 0.0008$  ( $R^2 = 0.9994$ ),表明在本实验条件下没食子酸在 0~31.5  $\mu\text{g}$  具有良好线性关系。

##### 1.4.1.3 供试品溶液的制备

将真空干燥的种子粉碎,过 40 目筛,精密称取粉末 1 g,按 1:25 的料液比加入 80%(V/V)的乙醇超声提取 2 次,每次 30 min,过滤,合并滤液并转移至 100 mL 容量瓶中,用 80%(V/V)的乙醇定容至 100 mL,摇匀,即得到供试品溶液。

#### 1.4.1.4 总多酚含量测定

分别精密取壳斗科植物种子样品各 3 份,按照 1.4.1.3 节中方法进行供试品溶液的制备,按照 1.4.1.2 节中方法显色及测定吸光度值,并由线性回归方程计算出样品中多酚的含量,并计算出各样品中多酚类物质的百分含量。

#### 1.4.1.5 方法学验证

##### (1) 精密度实验

精确吸取一定量青冈栎种子供试品溶液,按 1.4.1.2 节中方法显色,在 760 nm 波长处进行吸光度测定,连续测量 6 次,测得数据的 RSD 为 0.028%,表明仪器精密度良好。

##### (2) 稳定性实验

精确吸取一定量青冈栎种子供试品溶液,按 1.4.1.2 节中方法显色,测量 240 min 内吸光度值,每 30 min 测一次,测得数据的 RSD 为 0.46%,表明该样品在显色后 240 min 内稳定性良好。

##### (3) 重现性实验

参考文献[4,11],分别称取一定量青冈栎种子粉末,按 1.4.1.3 节中方法制备供试品溶液 6 份,从每份供试品溶液中精确吸取一定量的溶液,按 1.4.1.2 节中方法显色,在 760 nm 波长处测定吸光度值,可计算出青冈栎种子中多酚类物质的含量为 5.11%,其 RSD 为 0.44%,表示该提取方法重复性良好。

##### (4) 加样回收率实验

精密称取已知多酚含量样品 6 份,按 1.4.1.3 节中方法制备供试品溶液,再分别吸取一定量的供试品溶液,并加入一定量的对照品,按 1.4.1.2 节中方法显色并测定吸光度值,计算平均加样回收率为 100.87%,RSD 为 0.66%,说明该方法具有较高的准确性。

#### 1.4.2 抗氧化能力测定

实验方法参考文献[11-15],有所改动。

##### 1.4.2.1 供试品溶液的制备

将真空干燥的种子粉碎,过 40 目筛,精密称取粉末 10 g,按 1.4.1.3 节中方法进行提取,过滤,合并滤液并减压浓缩干燥,即得供试样品,然后通过 1.4.1.2 节中的方法测定提取物中多酚含量。

##### 1.4.2.2 DPPH·自由基清除实验

精密吸取不同浓度的样品溶液 0.5 mL 于具塞试管中,加入 0.5 mL DPPH 乙醇溶液(0.394 g · L<sup>-1</sup>)混匀(空白组用溶剂代替样品溶液,对照组用溶剂代替 DPPH 溶液)。以上 3 组在 37℃ 水浴中放置 30 min,于 517 nm 处测定其吸光度。按照同样方法以 Vc 作阳性对照,按照如下公式计算 DPPH·自由

基的清除率,并计算半清除率质量浓度(IC<sub>50</sub>),

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

##### 1.4.2.3 ABTS·自由基清除实验

精密吸取不同浓度的样品溶液 200 μL 于具塞试管中,然后加入 2 mL ABTS 溶液混匀(空白组用溶剂代替样品,对照组用溶剂代替 ABTS 溶液)。以上 3 组在室温下避光放置 30 min,于 734 nm 处测定吸光度。按照同样方法以 Vc 作阳性对照,按照如下公式计算 ABTS·自由基的清除率,并计算半清除率质量浓度(IC<sub>50</sub>),

$$\text{ABTS} \cdot \text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 总多酚含量

通过对壳斗科植物种子中多酚类含量测定结果(表 1)可知,壳斗科植物种子中均含有多酚类成分,饭甗青冈种子中的总多酚含量最高(14.16%),其次为大叶栎(10.89%),栲含量最低(0.44%),各植物种子间多酚类物质含量差异大。

表 1 不同样品多酚含量(n=3)

Table 1 Polyphenol content of samples(n=3)

样品 Samples	多酚含量 Polyphenol content(%)	RSD (%)
青冈栎种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis glauca</i>	5.11	1.43
饭甗青冈种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis fleuryi</i>	14.16	1.56
大叶栎种子 Seeds of <i>Quercus griffithii</i>	10.89	1.92
栲种子 Seeds of <i>Castanopsis fargesii</i>	0.44	2.10
桐木种子 Seeds of <i>Lithocarpus thalassica</i>	1.31	1.04

### 2.2 抗氧化能力

#### 2.2.1 DPPH·自由基清除能力

在同一质量浓度下,经 DPPH·自由基清除实验检测,吸光度越小说明样品消除能力越强。如表 2 所示,在一定质量浓度范围内,样品质量浓度与 DPPH·清除能力具有明显的量效关系。青冈栎种子、饭甗青冈种子提取物样品的 DPPH·清除能力与 Vc 相当,大叶栎种子提取物的 DPPH·清除能力最弱,这可能与植物的多酚类物质种类有关。

#### 2.2.2 ABTS·自由基清除能力

在一定质量浓度下,经 ABTS·自由基清除实验检测,吸光度越小说明样品消除能力越强。由表 3 可

知,在一定质量浓度范围内,样品质量浓度与 ABTS·清除能力具有明显的量效关系。样品中除桐木种子提取物外,其他提取物均表现出较强的 ABTS·清除能力,其中青冈栎种子提取物的 ABTS·清除能力最强,在同等质量浓度下青冈栎种子提取物  $IC_{50}$  优于 Vc,饭甑青冈  $IC_{50}$  与 Vc 相当。

表 2 样品清除 DPPH·自由基能力

Table 2 The capability of DPPH· radical scavenging of samples

样品 Samples	$IC_{50}$ (mg · ml <sup>-1</sup> )
青冈栎种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis glauca</i>	0.38
饭甑青冈种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis fleuryi</i>	0.43
大叶栎种子 Seeds of <i>Quercus griffithii</i>	4.88
栲种子 Seeds of <i>Castanopsis fargesii</i>	1.10
桐木种子 Seeds of <i>Lithocarpus thalassica</i>	3.84
Vc	0.41

表 3 样品清除 ABTS·自由基能力

Table 3 The capability of ABTS· radical scavenging of samples

样品 Samples	$IC_{50}$ (mg · ml <sup>-1</sup> )
青冈栎种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis glauca</i>	0.13
饭甑青冈种子 Seeds of <i>Cyclobalanopsis fleuryi</i>	0.61
大叶栎种子 Seeds of <i>Quercus griffithii</i>	2.17
栲种子 Seeds of <i>Castanopsis fargesii</i>	1.96
桐木种子 Seeds of <i>Lithocarpus thalassica</i>	4.97
Vc	0.31

### 3 结论

通过对壳斗科植物种子中多酚类含量的测定可知,饭甑青冈种子中的总多酚含量最高(14.16%),其次为大叶栎(10.89%),栲含量最低(0.44%),各植物种子间多酚类物质含量差异比较大。综合 2 种抗氧化能力试验结果表明,青冈栎种子提取物的还原能力均高于对照品 Vc,饭甑青冈种子提取物与对照品 Vc 相当。因此,壳斗科植物中,青冈栎与饭甑青冈种子提取物可作为天然抗氧化剂应用于保健品、化妆品乃至药品等行业。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 广西科学 2016 年 4 月 第 23 卷第 2 期

北京:科学出版社,1998.

Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1998.

- [2] 周伟,夏念和. 我国壳斗科植物资源——尚待开发的宝库林业资源管理[J]. 林业资源管理,2011,2:93-95.  
ZHOU W, XIA N H. Resources of Fagaceae—untapped treasure trove of forest resources management[J]. Forest Resources Management, 2011, 2: 93-95.
- [3] 周磊,许敏,杨崇仁,等. 壳斗科植物的化学成分及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012,24:260-273.  
ZHOU L, XU M, YANG C R, et al. Research of chemical and biological activity of constituents Fagaceae[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 260-273.
- [4] 关小丽,杨子明,颜小捷,等. 8 种壳斗科植物多酚含量及抗氧化能力[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):65-69.  
GUAN X L, YANG Z M, YAN X J, et al. Content and antioxidant capacity of polyphenol from eight Fagaceae plants[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional, 2015, 21(2): 65-69.
- [5] HUANG Y L, TSUJITA T, TANAKA T, et al. Triterpene hexahydroxydiphenol esters and a quinic acid purpurogallin carbonyl ester from the leaves of *Castanopsis fissa* [J]. Phytochemistry, 2011, 72(16): 2006-2014.
- [6] HUANG Y L, MATSUO Y, TANAKA T, et al. New phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols from the leaves of *Castanopsis sclerophylla* [J]. Heterocycles, 2011, 83(10): 2321-2328.
- [7] HUANG Y L, TANAKA T, MATSUO Y, et al. Two new phenolic glucosides and an ellagitannin from the leaves of *Castanopsis sclerophylla* [J]. Phytochemistry Letters, 2012, 5(1): 158-161.
- [8] HUANG Y L, TANAKA T, MATSUO Y, et al. Isolation of ellagitannin monomer and macrocyclic dimer from *Castanopsis carlesii* leaves[J]. Heterocycles, 2012, 86(1): 381-389.
- [9] 刘仁林,王娟,廖为明. 10 种壳斗科植物果实主要营养成分比较分析[J]. 江西农业大学学报,2009,31(5):901-905.  
LIU R L, WANG J, LIAO W M. Comparative analysis of main nutrients of fruit from 10 Fagaceae plants[J]. Jiangxi Agricultural University, 2009, 31(5): 901-905.

(下转第 188 页 Continue on page 188)

- [5] 李羿桥. 巨桉凋落叶分解过程中养分和化感物质释放及其对三种草种的化感效应研究[D]. 成都:四川农业大学, 2013.  
LI Y Q. Release of Nutrient and Allelochemical from Decomposing *Eucalyptus grandis* Leaf Litter and Its Allelopathic Effect on Three Grasses[D]. Chengdu, Sichuan Agricultural University, 2013.
- [6] 杨全. 广金钱草资源调查与药材质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3):147-151.  
YANG Q. Resource investigation and quality evaluation of *Desmodium styracifolium* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medica Formulae, 2013, 19(3): 147-151.
- [7] 张学文, 刘亦学, 刘万学. 植物化感物质及其释放途径[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7):295-297.  
ZHANG X W, LIU Y X, LIU W X. Allelochemicals and its releasing modes [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(7):295-297.
- [8] 张素中. 广金钱草及其煎剂 HPLC 指纹图谱的相关性研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(5):76-78.  
ZHANG S Z. Analysis on correlation of HPLC fingerprint on the decoction pieces and decoction of *Desmodii styracifolii* herba[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2010, 24(5):76-78.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:44-45.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:44-45.
- [10] 郭万祥, 李元华. 林草结合是长江上游地区保持水土的重要途径[J]. 四川草原, 1999, 2(2):12-13.  
GUO W X, LI Y H. Afforestation combined with planting grass an important way for water and soil conservation in upper areas of Yangzi River[J]. Journal of Sichuan Grassland, 1999, 2(2):12-13.
- [11] 樊魏, 高喜荣. 林草牧复合系统研究进展[J]. 林业科学研究, 2004, 17(4):519-524.  
FAN W, GAO X R. Research advances on the silvopastoral system [J]. Forest Research, 2004, 17(4): 519-524.

(责任编辑:竺利波)

(上接第 183 页 Continue from page 183)

- [10] 袁见萍, 张龙, 张前军, 等. 饿蚂蝗中多酚的含量测定[J]. 中国药房, 2013, 24(43):4078-4080.  
YUAN J P, ZHANG L, ZHANG Q J, et al. Content determination of polyphenols in *Desmodium sambuense* [J]. China Pharmacy, 2013, 24(43):4078-4080.
- [11] 刘顺航, 孟宪军, 牛涛, 等. 葡萄籽中总多酚成分的测定[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(10):715-716.  
LIU S H, MENG X J, NIU T, et al. Determination of total polyphenol ingredient from grape seed[J]. Chinese Medicine, 2007, 22(10):715-716.
- [12] 庞中磊, 唐文. 柚皮中活性物质的抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2012, 2:86-90.  
PANG Z L, TANG W. Anti-oxidative activity of active substances from *Citrus grandis* [J]. Food Industry, 2012, 2:86-90.
- [13] 徐怀德, 王临宾, 张立佳. 苹果叶多酚的纯化及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(20):72-78.  
XU H D, WANG L B, ZANG L J. Antioxidant activity and purification of polyphenols from apple leaves [J]. Food Science, 2010, 31(20):72-78.
- [14] 林格西, 吴圣迁, 江俊妮, 等. 羽衣甘蓝中多酚的提取与抗氧化活性研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(24):14-16.  
LIN G X, WU S Q, JIANG J N, et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenol from kale [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(24):14-16.
- [15] 朱丹, 牛广财, 蔡亚平, 等. 沙果渣多酚抗氧化活性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2010, 5:129-132.  
ZHU D, NIU G C, CAI Y P, et al. Antioxidant activity of polyphenol from pomace sand [J]. China Food Additives, 2010, 5:129-132.

(责任编辑:米慧芝)