

国槐槐角种胚愈伤组织黄酮粗提液的抗氧化性

王晨阳, 陈红贤, 王明梅, 张敏, 王意敏, 刘忠华

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 将国槐 *Sophora japonica* 槐角种胚细胞悬浮培养后, 对细胞生产的黄酮类化合物进行抗氧化特性研究, 测定黄酮粗提液对羟自由基($\cdot\text{OH}$), 超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和亚硝酸盐的清除能力, 测定黄酮粗提液对亚油酸过氧化和猪油自氧化的抑制能力, 从而为研究黄酮类化合物抗氧化活性的构效理论提供依据。结果表明: ①黄酮粗提液对羟自由基的清除能力随着黄酮质量浓度的增大而增强, 质量浓度为 $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 清除率可达到 96.58%, 抗氧化效果明显优于相同质量浓度的维生素C(VC)溶液; ②黄酮粗提液对超氧自由基的清除能力随着黄酮质量浓度的增大而增强, 清除率可达 61.54%, 但是抗氧化效果弱于相同质量浓度的 VC 溶液; ③黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除能力随着黄酮质量浓度的增大而增强, 清除率可达 79.91%, 在一定质量浓度范围内, 抗氧化效果优于相同质量浓度的 VC 溶液; ④黄酮粗提物对亚油酸自氧化有抑制作用, 但抗氧化效果没有相同质量的 VC 强; ⑤黄酮粗提物对猪油自氧化有抑制作用, 抗氧化效果优于相同质量的二丁基羟基甲苯。总体来看, 国槐槐角种胚细胞悬浮培养生产的黄酮类化合物具有明显的抗氧化活性, 且在一定的质量浓度范围内, 黄酮提取物的质量浓度越大, 其抗氧化性越好。图 5 表 3 参 25

关键词: 植物学; 槐角种胚; 悬浮培养; 黄酮类化合物; 抗氧化性

中图分类号: S718.43; Q946.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2017)05-0887-08

Antioxidant activity of *Sophora japonica* embryo cells in a suspension culture system

WANG Chenyang, CHEN Hongxian, WANG Mingmei, ZHANG Min, WANG Yimin, LIU Zhonghua

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To provide a theoretical basis for the structure-activity theory of antioxidant activity for extracted flavonoids, a study was conducted on the antioxidant activity of flavonoid production after a suspension culture of *S. japonica* embryo cells. Antioxidant activity of crude flavonoids extracted from callus of the *S. japonica* embryo was not only studied with the method of scavenging hydroxyls, superoxide radicals, and nitrites; but also with the method of inhibiting self-oxidation of linoleic acid and pig oil. Results revealed that when the mass concentration was $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, with an increasing concentration of flavonoids, the free radical scavenging activity (1) of a hydroxyl radical was reinforced with a scavenging ratio on the hydroxyl radical of 96.58%, which is significantly higher than the scavenging activity of vitamin C ($P=0.001$), (2) of the superoxide radical was reinforced with a scavenging ratio on the superoxide radical of 61.54%, which is much lower than the scavenging activity of vitamin C ($P=0.001$), and (3) of nitrite was reinforced with a scavenging ratio on nitrite of 79.91%, which is higher than the scavenging activity of vitamin C ($P=0.001$). (4) The crude flavonoid extract could inhibit the self-oxidation of linoleic acid, which is with an inhibitive effect lower than the scavenging activity of vitamin C ($P=0.001$) and (5) of the self-oxidation of pig oil was inhibited. Taken together, obvious antioxidant activity was shown in flavonoid production for a suspension culture system of fructus sophorae

收稿日期: 2016-09-18; 修回日期: 2017-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470668)

作者简介: 王晨阳, 从事药用植物及其次生代谢研究。E-mail: wangcy_1991@163.com。通信作者: 刘忠华, 副教授, 博士, 从事植物生长发育及系统进化研究。E-mail: liuzh6@bjfu.edu.cn

embryo cells with a greater concentration of flavonoid extract, for certain ranges of concentrations, having better antioxidant activity. [Ch, 5 fig. 3 tab. 25 ref.]

Key words: botany; fructus sophorae embryo; suspension culture; flavonoids; antioxidant activity

国槐 *Sophora japonica* 又名豆槐、白槐、家槐, 属于豆科 Leguminosae 槐属 *Sophora* 乔木, 喜光而稍耐荫, 在中国各省区广泛栽培。槐角即国槐的果实, 荚果, 念珠状, 其性寒、味苦, 有凉血止血、清肝明目的功效。槐角含有多种化学成分, 主要成分为黄酮类化合物^[1], 具有抑菌、抗病毒、降血压等一系列功能^[2-5], 并可作为质量鉴定、药材及其制剂的质量控制指标^[6], 引起了国内外的广泛研究。虽然国槐原产于中国并在中国广泛分布, 但多用作行道树或庭院树种, 并且容易受到环境污染及病虫害影响, 药用资源开发利用率较低, 难以满足需求^[7]。目前, 从国槐槐角中获取具有极高药用价值的黄酮产物, 通常是从槐角中直接提取, 由于经常受到季节、地区等因素影响, 限制了黄酮作为新型药剂的推广^[8]。液体悬浮培养是植物细胞生产次生代谢产物最简单有效并被广泛应用的方式^[9], 因此, 采用槐角愈伤组织悬浮培养技术生产黄酮类化合物可以有效解决药用植物资源有限的问题。利用细胞培养技术生产黄酮类化合物是一个比较常见的方法, 如采用杜仲 *Eucommia ulmoides*, 金荞麦 *Fagopyrum dibotrys*, 甘草 *Glycyrrhiza uralensis*^[10-12]等植物作为外植体进行细胞培养生产黄酮类化合物已有了一定的研究, 但是采用国槐槐角种胚进行细胞培养生产黄酮类化合物的研究报道还相对较少, 将国槐槐角种胚细胞悬浮培养生产的黄酮类化合物进行抗氧化性研究尚无报道。因此, 笔者在本实验室研究的基础上, 将国槐槐角种胚细胞悬浮培养后, 对其生产的代谢产物进行抗氧化特性研究, 采用了5种不同方法, 测定提取液对不同自由基、亚硝酸盐的清除能力及抑制脂肪、脂肪酸自氧化的能力, 可以为黄酮类化合物的活性成分分析和开发利用提供理论依据, 也能为其抗氧化活性的构效理论提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

实验所用国槐槐角采自北京八家郊野公园内, 国槐槐角愈伤组织来自国槐种胚的诱导, 筛选生长快、分散性好的槐角愈伤组织, 将它们在 B5 固体培养基上继代 5 次以上, 获得稳定的愈伤组织后将其转接到 B5 液体培养基中, 在液体培养基中进行悬浮培养, 继代 6 次后得到愈伤组织即为本实验所需材料^[8,13]。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 固体培养基为: B5 + 1.00 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.20 mg·L⁻¹ 6-BA(6-苄氨基嘌呤), 蔗糖 30.00 g·L⁻¹, 琼脂 6.00 g·L⁻¹, 灭菌前 pH 6.60。液体培养基为: B5 + 2.00 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.50 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA(萘乙酸), 蔗糖 30.00 g·L⁻¹, 灭菌前 pH 6.17。培养基均在 121 °C 高压条件下灭菌 30 min。固体培养基放置于温度为(25±1) °C 的环境下培养, 30 d 继代 1 次。获得稳定愈伤组织后, 接种到装液量为 50.00 mL B5 液体培养基的三角瓶中培养, 接种量为 40.00 g·L⁻¹, 该液体培养基悬浮体系在温度为(25±1) °C, 转速为 110 r·min⁻¹ 的摇床上全程暗培养, 25 d 继代 1 次^[7-8,13]。

1.2.2 槐角苷标准曲线的绘制 黄酮类化合物含量的测定采用紫外分光光度法^[14], 选用槐角苷为标准品, 绘制标准曲线。精确称取 2.00 mg 槐角苷标准品, 用体积分数 70%乙醇溶解后定容至 100.00 mL 容量瓶中, 得到质量浓度为 0.02 mg·L⁻¹ 的槐角苷标准溶液; 依次量取配制好的槐角苷标准溶液 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 mL 定容至 10.00 mL, 得到质量浓度分别为 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 12.00 mg·L⁻¹ 的槐角苷溶液, 以体积分数为 70%乙醇溶液为空白对照, 在 261.5 nm 处测定槐角苷的吸光度。以吸光度为横坐标, 槐角苷质量浓度为纵坐标绘制标准曲线(之前已测定过仪器的精密度、稳定性、重复性)(图 1)。槐角苷标准品在 0~12.00 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好, 线性回归方程为 $y=8.0905x+0.0905$, $R^2=0.9989$, x 为不同质量浓度

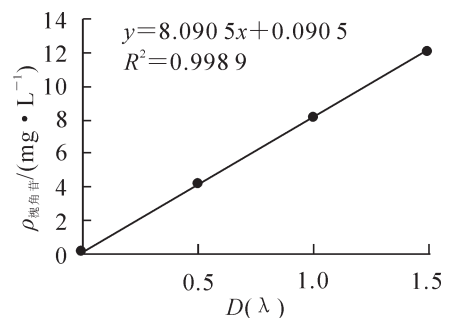


图 1 槐角苷标准曲线

Figure 1 Standard curve of sophoricoside

溶液的吸光度, y 为槐角苷溶液质量浓度。

1.2.3 槐角细胞黄酮粗提液的提取 将烘干后的愈伤组织研磨, 过 80 目筛, 备用。称取 0.10 g 粉末于 10.00 mL 离心管中, 加入 4.00 mL 体积分数为 70% 乙醇, 室温下超声提取 40 min。提取后离心 5 min, 收集其上清液, 合并到 50.00 mL 的鸡心瓶, 在 $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $60 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下进行旋蒸, 得到槐角细胞黄酮粗提液。

1.2.4 黄酮化合物产量的测定 取上述提取液稀释 30 倍后测定在 261.5 nm 处的吸光度, 重复 3 次。总黄酮的含量(X)以槐角苷计, 用 Y 代表黄酮化合物产量。计算公式如下:

$$X(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=30cv/(1\ 000m)。(1)$$

$$Y(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})=20X\times w_{\text{DW}}。(2)$$

式(1)和式(2)中: c 为稀释后的提取液中槐角苷的质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); v 为所提取槐角苷溶液的体积(mL); m 为精确称取的供试材料的质量(g); w_{DW} 为收获的细胞干质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。结合槐角苷标准曲线, 经计算, 样品乙醇提取液中黄酮化合物的产量为 $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.5 不同质量浓度梯度细胞提取液的配制 采用二倍稀释法^[15]将黄酮化合物质量浓度为 $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞提取液进行稀释, 最终得到质量浓度分别为 354.00, 177.00, 88.50, 44.25, 22.13, 11.06, 5.53 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 7 个质量浓度的黄酮粗提液。

1.2.6 水杨酸 fenton 试剂法测定羟自由基清除率 称取 0.083 4 g 七水合硫酸亚铁溶于少量蒸馏水中, 然后转移到 50.00 mL 容量瓶中, 定容, 得到 $6.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁溶液; 称取 0.041 4 g 水杨酸, 加入少量乙醇, 搅拌, 然后转移到 50.00 mL 容量瓶中用无水乙醇准确定容, 得到 $6.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸-乙醇体系(避光保存); 用移液枪量取 $333.40 \mu\text{L}$ 质量分数为 30% 的过氧化氢用蒸馏水定容至 100.00 mL 容量瓶中, 得到质量分数为 0.1% 的过氧化氢。在 10.00 mL 具塞试管中先后加入质量浓度为 $6.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁溶液、 $6.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸-乙醇、不同质量浓度样品, 最后加入过氧化氢启动反应, 设置 8.00 mL 反应体系(表 1)。 $37 ^\circ\text{C}$ 水浴反应 30 min 后, 在 510.0 nm 处测定吸光度。计算公式为: 清除率($\%$) = $[1-(A-B)/C]\times 100\%$ 。其中: A 为加入抗氧化剂后溶液的吸光度, B 为提取液在测定波长下的吸光度(消除提取液本身的颜色对结果的干扰), C 为未加入抗氧化剂时溶液的吸光度。

1.2.7 邻苯三酚自氧化法测定超氧自由基清除率 称取三羟甲基氨基甲烷 12.11 g, 用蒸馏水溶解定容至 1 000.00 mL, 得到 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液; 量取 50.00 mL 浓度为 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液与 22.90 mL, $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化氢溶液混匀并用蒸馏水定容至 100.0 mL, 得到 pH 8.2($25 ^\circ\text{C}$)浓度为 $50.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液; 称取 0.315 0 g 邻苯三酚固体, 用 $10.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化氢溶液定容至 100.00 mL, 得到 $25.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯三酚溶液(避光保存)。在 10.00 mL 具塞试管中设置 9.00 mL 反应体系, 先后加入 50.00 mL 浓度为 $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液、不同质量浓度样品, 混匀后在 $37 ^\circ\text{C}$ 水浴中保温 20 min, 取出后立即加入在 $37 ^\circ\text{C}$ 预热过的 $25.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液, 混匀后于 $37 ^\circ\text{C}$ 水浴中反应 5 min 后加入 $1.00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸终止反应(表 2), 在 420.0 nm 处测定吸光度。计算公式为: 清除率($\%$) = $[1-(A-B)/C]\times 100\%$ 。其中: A 为加入抗氧化剂后溶液的吸光度, B 为提

表 1 反应体系各物质的添加量

Table 1 Dosage of each solution in the reaction system

添加物	添加量/mL		
	A 组	B 组	C 组
$6.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁(FeSO_4)溶液	2.00	2.00	2.00
水杨酸-乙醇	2.00	2.00	2.00
不同质量浓度样品	2.00	2.00	0
体积分数为 70% 乙醇	0	0	2.00
质量分数为 0.1% 过氧化氢	2.00	0	2.00
蒸馏水	0	2.00	0

表 2 反应体系各物质的添加量

Table 2 Dosage of each solution in the reaction system

添加物	添加量/mL		
	A 组	B 组	C 组
$50.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液	5.50	5.50	5.50
不同质量浓度样品	2.00	2.00	0
$25.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚溶液	0.50	0	0.50
$10.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化氢(HCl)	0	0.50	0
体积分数为 70% 乙醇	0	0	2.00
$1.00 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化氢(HCl)	1.00	1.00	1.00

取样液在测定波长下的吸光度(消除提取液本身的颜色对结果的干扰), C 为未加入抗氧化剂时溶液的吸光度。

1.2.8 盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐的清除率 分别量取 1.00 mL 不同质量浓度样品移入 25.00 mL 的容量瓶中, 各加入 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚硝酸钠标准溶液 5.00 mL, 在室温下反应 60 min; 加 2.00 mL 质量分数为 0.4% 的对氨基苯磺酸溶液, 摇匀, 静置 5 min; 加入 1.00 mL 质量分数为 0.2% 的盐酸萘乙二胺溶液, 摇匀, 定容至刻度线, 静置 15 min; 另用以上相同步骤做一空白对照; 在 540.0 nm 处测定吸光度, 计算亚硝酸盐的清除率。计算公式为: 清除率(%) = $[(B_{\text{空白对比吸光度}} - B_{\text{加入黄酮吸光度}}) / B_{\text{空白对比吸光度}}] \times 100\%$ 。

1.2.9 硫代巴比妥酸法测定亚油酸自氧化抑制作用 称取愈伤组织粉末 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 g, 各用 4.00 mL 无水乙醇溶解; 用无水乙醇配制体积分数为 0.5% 的亚油酸乙醇液, 将愈伤组织粉末分别加入 50.00 mL 体积分数为 0.5% 的亚油酸乙醇液中混匀, 以仅在 50.00 mL 体积分数为 0.5% 的亚油酸乙醇液中加 4.00 mL 无水乙醇为对照; 在 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ 烘箱中强化保存, 定时搅拌, 采用硫代巴比妥酸法测定吸光度; 以相同质量的 VC 做阳性对照, 重复以上步骤。

1.2.10 碘量法测定猪油自氧化抑制作用 将猪油放在烧杯中, 用文火熬炼; 称取研磨后的愈伤组织粉末 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 g, 各用 8.00 mL 无水乙醇溶解, 分别加入 50.00 g 温热猪油中, 搅匀, 以仅在猪油中加 8.00 mL 无水乙醇为对照; 在 $(70 \pm 1)^\circ\text{C}$ 烘箱中强化保存, 定时搅拌, 测其过氧化值; 以相同质量的二丁基羟基甲苯做阳性对照, 重复以上步骤。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 软件对试验数据进行分析。

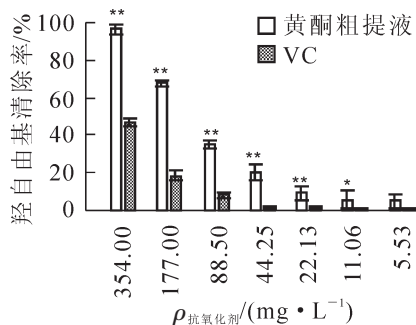
2 结果与分析

2.1 愈伤组织黄酮粗提液对羟自由基的清除能力

图 2 显示了不同质量浓度的槐角种胚愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液对羟自由基的清除能力。由图 2 可知: 这 2 种抗氧化剂对羟自由基都具有清除作用, 且随着质量浓度的增大, 清除能力增强, 说明对羟基自由基的清除能力与样品的质量浓度呈现较好的量效关系。两者对羟自由基的清除能力有一定的差距: 当质量浓度为 $354.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (即未稀释) 时, 黄酮粗提液对羟自由基的清除能力达到了 96.58%, 而 VC 溶液只有 46.79%; 当质量浓度较小, 为 11.06 和 $5.53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黄酮粗提液对羟自由基的清除率仍然在 5.00% 左右, 而 VC 溶液却不到 1.00%。对其抗氧化性进行显著性分析发现, 在 $354.0 \sim 22.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内, 黄酮粗提液对羟自由基的清除率极显著高于相同质量浓度的 VC 溶液; 在质量浓度为 $11.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黄酮粗提液对羟自由基的清除率也显著高于 VC 溶液; 在质量浓度为 $5.53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黄酮粗提液和 VC 溶液对羟自由基的清除率差异性不显著, 但高于 VC 溶液。

2.2 愈伤组织黄酮粗提液对超氧自由基的清除能力

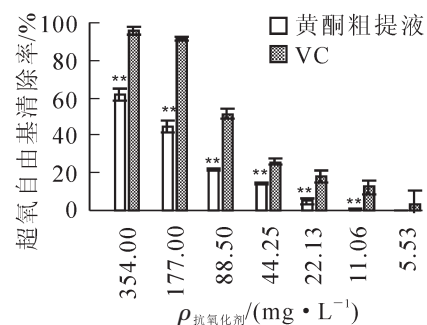
不同质量浓度的槐角种胚愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液对超氧自由基的清除作用见图 3, 与清除



**表示 $P < 0.01$, 差异性极显著;
*表示 $P < 0.05$, 差异性显著

图 2 愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液清除羟自由基的能力

Figure 2 Hydroxyl radical scavenging activity of callus crude flavonoids extract and VC solution



**表示 $P < 0.01$, 差异性极显著

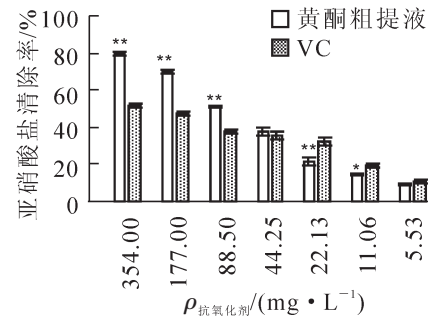
图 3 愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液清除超氧自由基的能力

Figure 3 Superoxide radical scavenging activity of callus crude flavonoids extract and VC solution

羟自由基的作用相似，随着黄酮粗提液和 VC 溶液质量浓度的升高，对超氧自由基的清除能力也越强。但是 2 种抗氧化剂对超氧自由基的清除能力不同，当质量浓度为 $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (即未稀释) 时，黄酮粗提液对超氧自由基的清除能力为 61.54% ，而 VC 达到了 95.75% ；当质量浓度较小，为 11.06 和 $5.53 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，黄酮粗提液对超氧自由基的清除率不到 1.00% ，而 VC 溶液的清除率仍在 3.00% 以上。对其抗氧化性进行显著性分析发现，在 $354.00 \sim 11.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内，VC 溶液对超氧自由基的清除率极显著高于相同质量浓度的黄酮粗提液；在质量浓度为 $5.53 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，黄酮粗提液和 VC 溶液对超氧自由基的清除率虽然差异性不显著，但低于 VC 溶液。

2.3 愈伤组织黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除能力

图 4 显示了不同质量浓度的槐角种胚愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液对亚硝酸盐的清除作用。由图 4 可知：这 2 种抗氧化剂对亚硝酸盐都具有清除作用，与清除羟自由基、超氧自由基的作用相似，随着黄酮粗提液和 VC 溶液质量浓度的升高，对亚硝酸盐的清除能力也随之增强。但是 2 种抗氧化剂对亚硝酸盐的清除能力不同，当质量浓度为 $354.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (即未稀释) 时，黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除能力为 79.91% ，而 VC 溶液只有 51.60% ；在 $354.00 \sim 44.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内，黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除作用要高于相同质量浓度的 VC 溶液；而当质量浓度继续减小至 $5.53 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，2 种抗氧化剂对亚硝酸盐的清除作用均在 10.00% 左右，但 VC 溶液对亚硝酸盐的清除作用更强。对其抗氧化性进行显著性分析发现在 $354.00 \sim 88.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内，黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除率极显著高于相同质量浓度的 VC 溶液；在质量浓度为 $22.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除率极显著低于相同质量浓度的 VC 溶液；当质量浓度低于 $22.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，黄酮粗提液和 VC 溶液对亚硝酸盐的清除率差异性不显著，黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除率稍低于 VC 溶液。



**表示 $P < 0.01$ ，差异性极显著；
*表示 $P < 0.05$ ，差异性显著

图 4 愈伤组织黄酮粗提液和 VC 溶液清除亚硝酸盐的能力

Figure 4 Nitrite scavenging activity of callus crude flavonoids extract and VC solution

2.4 黄酮粗提物对亚油酸自氧化的抑制作用

黄酮类化合物抑制亚油酸的自氧化作用是基于不饱和脂肪酸的自由基反应，反应过程中产生过氧化自由基，进而氧化生成环氧化物，环氧化物生成丙二醛，丙二醛与硫代巴比妥酸(TBA)作用生成 TBA 染料，其最大吸收波长为 532.0 nm 。因此，生成 TBA 染料的多少反映了 532.0 nm 处吸光度的大小，是衡量自由基链反应进程的标志。抗氧化剂可抑制自由基链反应，最终表现为 TBA 染料生成较少，吸光度变小^[16]。表 3 显示了不同质量的槐角种胚愈伤组织黄酮粗提物和 VC 对亚油酸自氧化的抑制作用，添加抗氧化剂后，样品的吸光度与对照组相比均减小。从实验结果看：这 2 种抗氧化剂对亚油酸自氧化都具有抑制作用，且随着抗氧化剂添加量增加，吸光度越小，抗氧化性越好。从实验数据可以看出：黄酮粗提物及 VC 抑制亚油酸自氧化的能力相差不大，而黄酮粗提物抑制亚油酸自氧化的能力没有相同质量的 VC 强。

表 3 2 种抗氧化剂对亚油酸自氧化的抑制能力

Table 3 Inhibition of self oxidation of linoleic acid by two kinds of antioxidants

编号	处理	$D(\lambda)$ 吸光度	
		4 d	8 d
1	黄酮粗提物 0.05 g	0.047 ± 0.002	0.077 ± 0.002
2	黄酮粗提物 0.10 g	0.044 ± 0.003	0.074 ± 0.003
3	黄酮粗提物 0.20 g	0.033 ± 0.005	0.059 ± 0.004
4	黄酮粗提物 0.50 g	0.024 ± 0.003	0.041 ± 0.003
5	VC 0.05 g	0.042 ± 0.003	0.054 ± 0.003
6	VC 0.10 g	0.036 ± 0.001	0.039 ± 0.002
7	VC 0.20 g	0.028 ± 0.002	0.035 ± 0.002
8	VC 0.50 g	0.023 ± 0.002	0.030 ± 0.002
9	空白对照(ck)	0.054 ± 0.003	0.082 ± 0.002

2.5 黄酮粗提物对猪油自氧化的抑制作用

猪油在腐败过程中，会产生过氧化物，过氧化物值的大小，反映了过氧化物的多少。抗氧化剂可以消除过氧化物的存在，最终表现为过氧化物值的下降^[16]。不同质量的黄酮粗提物和二丁基羟基甲苯对猪油自氧化的抑制作用见图 5，与抑制亚油酸自氧化的作用相似，不同质量的黄酮粗提物和二丁基羟基甲苯可

消除猪油腐败过程中产生的过氧化物,对猪油自氧化均具有明显的抑制作用,随着黄酮粗提物和二丁基羟基甲苯质量的增加,过氧化值的下降的程度也增大,即对猪油自氧化的抑制作用也越强。另外从实验结果看,愈伤组织的黄酮粗提物抑制猪油自氧化的效果优于相同质量的二丁基羟基甲苯。

3 结论与讨论

羟基自由基被认为是具有较强毒性的自由基^[17],得电子能力极强,可以和大部分细胞内物质发生反应,甚至能氧化损伤基因,对衰老和癌症有着极大的影响。超氧自由基是代谢过程中生成的第1个自由基,同时也是其他部分氧自由基的来源,因为它可以进一步转化成其他自由基^[18]。亚硝酸盐广泛存在于环境中,但较多亚硝酸盐摄入,可将人体血红蛋白中的二价铁离子氧化成三价铁离子,使血红蛋白失去携氧能力,同时它还是形成强致癌物亚硝胺的前体物质,及时清除亚硝酸盐是食品安全的保障^[19]。因此,本实验测定槐角种胚细胞黄酮粗提液对羟自由基、超氧自由基、亚硝酸盐的清除能力是研究其抗氧化活性必不可少的。油脂或油脂食品在储存过程中,由于长时间接触空气,会产生危害人体健康的氢过氧化物,另外油脂在炸制过程中,既受热又氧化,其过氧化物形成及分解成自由基的速度加快,对人体危害程度还会大大增加^[20],而人工合成的抗氧化剂有一定毒性,所以有必要选择合适的抗氧化剂削弱过氧化物的产生。本实验选择槐角种胚细胞黄酮粗提液测定其对亚油酸和猪油自氧化的抑制作用,既能反应黄酮粗提物抗氧化性活性的强弱,又能为食品安全提供必要保障。

结果显示:槐角种胚细胞黄酮粗提液对羟自由基、超氧自由基、亚硝酸盐都具有清除能力,具有较强的抗氧化活性,且在一定质量浓度范围内,清除能力随着黄酮粗提液质量浓度的增大而增强,但是对各种自由基的清除能力有所不同。黄酮粗提液对羟自由基的清除能力极强,最高可达到96.58%,极显著高于相同质量浓度的VC溶液;对超氧自由基的清除能力也较强,最高可达到61.54%,但是其清除率极显著低于相同质量浓度的VC溶液,这说明槐角种胚细胞黄酮粗提液对羟自由基的清除能力大于对超氧自由基的清除能力。而对于亚硝酸盐的清除能力,最高可达到79.91%,极显著高于相同质量浓度的VC溶液,但较低质量浓度的黄酮粗提液对亚硝酸盐的清除能力却不及VC溶液。同时,槐角种胚细胞提取物可以去除亚油酸和猪油在自氧化过程中产生的过氧化物,对其自氧化有明显的抑制作用,可见槐角种胚细胞提取物的应用范围较广泛,可以在食品生产中有独特的用处。这些抗氧化能力作用的发挥,主要是由于国槐种胚细胞悬浮培养后黄酮粗提液中所含的黄酮类化合物产生作用的结果,对不同物质的清除能力的不同可能与提取液所含黄酮类化合物的种类和结构不同有关^[21],测定它们对不同自由基的清除能力及对亚油酸过氧化和猪油自氧化的抑制能力可以为研究黄酮粗提液的成分及其抗氧化活性的构效理论提供依据。

结合前人研究,在不同植物体内提取的黄酮类化合物有着不同强度的抗氧化活性,其中在杜仲雄花、银杏 *Ginkgo biloba* 叶、玫瑰茄 *Hibiscus sabdariffa* 花萼等提取的黄酮粗提物分别对羟基自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基等有较强的清除效果,并且其抗氧化活性均优于相同质量浓度的VC溶液^[22-24],与本实验中国槐种胚细胞悬浮液黄酮粗提物的抗氧化性研究结果相似。在相同质量浓度下,黄酮粗提物具有更优的抗氧化活性,可能与黄酮类化合物本身的化学结构和特性有关,一方面黄酮类化合物电子自旋密度分布的均匀性,同时在分子内形成半醌式自由基时所需能量较低,其形成的自由基较稳定,从而具有较高的抗氧化活性^[25];另一方面,黄酮类化合物可以直接清除反应链中的自由基,切断自由基链反应,从而起到防止和断裂链反应的两重功效^[23]。

总体来看,国槐槐角种胚细胞悬浮培养生产的黄酮类化合物具有明显的抗氧化活性,且在一定质量

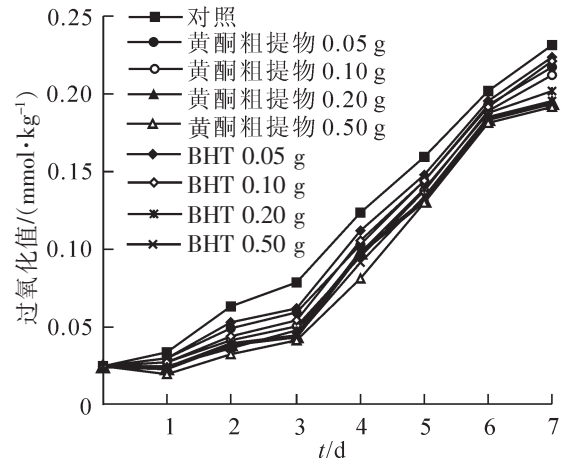


图5 愈伤组织粗提物和二丁基羟基甲苯抑制猪油自氧化的能力

Figure 5 Inhibition of self oxidation of pig oil by callus flavonoids extract and BHT

浓度范围内, 黄酮提取物质量浓度越大, 其抗氧化性越好。国槐槐角种胚细胞悬浮培养生产的黄酮类化合物是细胞培养技术的产物, 是一种具有抗氧化活性的天然绿色食品抗氧化剂, 具有用量少、安全无毒等优点。当今, 食品工业发展迅速, 含有天然活性成分的保健食品越来越受到现代人的推崇, 而同时国槐槐角作为药材存在原料不足、易受环境污染、病虫害等影响, 难以满足需求, 运用细胞培养技术生产的槐角种胚细胞具有明显的抗氧化活性, 可以有效解决药用植物资源有限的问题, 应用前景广阔。

4 参考文献

- [1] 王景华, 唐于平, 楼凤昌. 槐角化学成分与药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2002, **17**(2): 58 - 60.
WANG Jinghua, TANG Yuping, LOU Fengchang. The chemical composition and pharmacological effects of *Sophora japonica* fruits [J]. *World Phytomed*, 2002, **17**(2): 58 - 60.
- [2] 吕鹏, 黄晓舞, 吕秋军. 黄酮类化合物吸收、分布和代谢的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, **32**(19): 1961 - 1964.
LÜ Peng, HUANG Xiaowu, LÜ Qiujun. Advances in studies on absorption, distribution, metabolism of flavonoids [J]. *China J Chin Mat Med*, 2007, **32**(19): 1961 - 1964.
- [3] TANG Shunan, HUANG Wei, JI Shuai, *et al.* Prenylated flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* as promising anti-cancer agents: a preliminary structure-activity study [J]. *J Chin Pharmac Sci*, 2016, **25**(1): 23 - 29.
- [4] GASPAR A, SILVA T, YÁÑEZ M, *et al.* Chromone, a privileged scaffold for the development of monoamine oxidase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(14): 5165 - 5173.
- [5] 刘晓艳, 张伟良, 陈海光, 等. 荸荠皮中黄酮类物质的提取及抑菌特性研究[J]. 广东农业科学, 2012, **39**(16): 109 - 112.
LIU Xiaoyan, ZHANG Weiliang, CHEN Haiguang, *et al.* Extraction and antibacterial activity of falconoids in the water chestnuts peel [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2012, **39**(16): 109 - 112.
- [6] HE Xirui, BAI Yajun, ZHAO Zefeng, *et al.* Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, **187**(1): 160 - 182.
- [7] 魏振园, 汤若风, 王晋飞, 等. pH对槐角愈伤组织黄酮类化合物产量的影响[J]. 广西植物, 2013, **33**(2): 203 - 207.
WEI Zhenyuan, TANG Ruofeng, WANG Jinfei, *et al.* Effects of pH value on yield of flavonoids in callus tissues of *Sophora japonica* fruits [J]. *Guihaia*, 2013, **33**(2): 203 - 207.
- [8] 陈红贤, 于笑笑, 王晨阳, 等. 国槐槐角种胚细胞悬浮培养的动力学研究[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(2): 272 - 279.
CHEN Hongxian, YU Xiaoxiao, WANG Chenyang, *et al.* Kinetics of *Sophora japonica* embryo cells in a suspension culture system [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2016, **33**(2): 272 - 279.
- [9] CAI Zhenzhen, KASTELL A, KNORR D, *et al.* Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, **31**(3): 461 - 477.
- [10] 李琰, 王冬梅, 姜在民, 等. 培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J]. 西北植物学报, 2004, **24**(10): 1912 - 1916.
LI Yan, WANG Dongmei, JIANG Zaimin, *et al.* Effects of basic media and culture conditions on growth of calluses and production of secondary metabolites of *Eucommia ulmoides* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, **24**(10): 1912 - 1916.
- [11] 林静, 刘群, 李艳冬, 等. 金荞麦愈伤组织诱导及其总黄酮含量测定方法的建立[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2010, **36**(2): 230 - 234.
LIN Jing, LIU Qun, LI Yandong, *et al.* Study on callus induction of the *Fagopyrum dibotrys* and determining total flavonoids in callus by spectrophotometry [J]. *J Southwest Univ National Nat Sci Ed*, 2010, **36**(2): 230 - 234.
- [12] 杨英, 何峰, 季家兴, 等. 4种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价[J]. 武汉植物学研究, 2007, **25**(5): 484 - 489.
YANG Ying, HE Feng, JI Jiaying, *et al.* The effect of precursor feeding on flavonoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* Bat. [J]. *J Wuhan Bot Res*, 2007, **25**(5): 484 - 489.

- [13] 溥丽华. 国槐种胚细胞培养生产异黄酮物质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
PU Lihua. *A Study on Production of Isoflavones by Embryos of Sophora japonica L. Cell* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [14] 溥丽华, 刘忠华, 魏振园, 等. 国槐种胚愈伤组织培养与异黄酮量的分析[J]. 中草药, 2013, **43**(14): 1984 – 1989.
PU Lihua, LIU Zhonghua, WEI Zhenyuan, *et al.* Callus culture of embryos in *Sophora japonica* and analysis on isoflavones content [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, **43**(14): 1984 – 1989.
- [15] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1063 – 1114.
- [16] 刘昌平. 金银花黄酮的抗氧化活性分析[J]. 安徽农业科学, 2009, **37**(20): 9483 – 9484, 9505.
LIU Changping. Analysis on anti-oxidized activity of flavonoid from honeysuckle [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, **37**(20): 9483 – 9484, 9505.
- [17] 刘文颖, 徐亚光, 刘艳, 等. 液相法微量检测胶原肽清除羟基自由基能力[J]. 食品科技, 2011, **36**(1): 265 – 268.
LIU Wenying, XU Yaguang, LIU Yan, *et al.* Microdetermination of hydroxyl radical scavenging activity of collagen peptide by HPLC [J]. *Food Sci Technol*, 2011, **36**(1): 265 – 268.
- [18] 李全国, 楚杰, 陈锡强, 等. 枣叶黄酮体外及皮肤荧光斑马鱼体内抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, **35**(5): 58 – 61.
LI Quanguo, CHU Jie, CHEN Xiqiang, *et al.* Study on the antioxidant activity evaluation of jujube (*Ziziphus*) leaf flavonoids in vitro and zebrafish (*Danio rerio*) with fluorescent skin [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, **35**(5): 58 – 61.
- [19] 刘军海. 微波辅助提取花椒叶黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2015, **40**(7): 16 – 20.
LIU Junhai. Study on microwave-assisted extraction technology and antioxidant activity of flavonoids from *Zanthoxylum bungeanum* leaves [J]. *China Condiment*, 2015, **40**(7): 16 – 20.
- [20] 梅约, 何小莲, 任世宣. VC破坏、抑制油脂中过氧化物及其生成的研究[J]. 食品科技, 2000(1): 37 – 39.
MEI Yue, HE Xiaolian, REN Shixuan. Study on destroying and depressing peroxide of oils by VC [J]. *Food Sci Technol*, 2000(1): 37 – 39.
- [21] 吴春, 陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, **17**(5): 553 – 556.
WU Chun, CHEN Linlin. Study on scavenging activity of free radicals by semen cuscuteae flavonoids [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2006, **17**(5): 553 – 556.
- [22] 杨海涛, 曹小燕. 不同方式处理杜仲雄花总黄酮的提取及抗氧化性研究[J]. 应用化工, 2006, **45**(6): 1053 – 1057.
YANG Haitao, CAO Xiaoyan. Study on extraction of total flavonoids from male flowers of *Eucommia ulmoides* in different ways and its antioxidant [J]. *Appl Chem Ind*, 2006, **45**(6): 1053 – 1057.
- [23] 李保同. 银杏叶总黄酮的提取纯化及其抗氧化性能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
LI Baotong. *Study on Extraction, Purification and Antioxidant Activity of Flavonoids from Ginkgo biloba Leaves* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.
- [24] 王丽岩, 荆哲华, 王晶晶, 等. 玫瑰茄黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性[J]. 吉林农业大学学报, 2016, **38**(1): 117 – 121.
WANG Liyan, JIN Zhehua, WANG Jingjing, *et al.* Ultrasonic-aided extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Hibiscus sabdariffa* [J]. *J Jilin Agric Univ*, 2016, **38**(1): 117 – 121.
- [25] 赵继红, 梁宇, 颜达予. 黄酮类化合物抗氧化活性的结构因素[J]. 北方工业大学学报, 2001, **13**(1): 37 – 44.
ZHAO Jihong, LIANG Yu, YAN Dayu. Structure-antioxidation relationship of flavonoid antioxidants [J]. *J North China Univ Technol*, 2001, **13**(1): 37 – 44.