

石榴皮和石榴叶的总黄酮含量及变化研究

程江华,任 琪,丁之恩*
(安徽农业大学,安徽合肥 230036)

摘 要:用分光光度法对石榴皮、石榴叶定期测量总黄酮含量,并分析其在不同时间的变化趋势。结果表明:石榴皮的总黄酮含量随时间变化而呈逐步下降趋势,在六月底石榴皮黄酮含量达到峰值,为 12.47mg/g,到九月底十月初果实成熟时,石榴皮总黄酮含量基本稳定,为 6.48mg/g。石榴叶的总黄酮含量变化不大,在九月下旬有一个高峰期,达到 3.04mg/g。通过组织培养的愈伤组织的总黄酮含量和石榴皮的平均水平相当,高于石榴叶的总黄酮含量。

关键词:石榴皮,石榴叶,总黄酮,变化规律

Study on pomegranate peel and pomegranate leaf's total flavanone content and change

CHENG Jiang-hua, REN Qi, DING Zhi-en*

(Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The pomegranate peel's and the pomegranate leaf's total flavonoids content were detected with the spectrophotometer method, and the change tendency of different time was analyzed. The result indicated that, the pomegranate peel total flavonoids content gradually dropped the tendency assumes along with the time variation. The crest value of total flavonoids content achieved in the end of June, was 12.47mg/g. When the end of September and the beginning of October fruit mature, granatum total flavonoids content basic stable, was 6.48mg/g. The pomegranate leaf's total flavonoids content change was not big, had a peak in the late September, the density achieved 3.04mg/g. Injuries the organization through the tissue culture the total flavonoids content corresponded with the pomegranate peel's average level, was higher than the total flavonoids content of the pomegranate leaf.

Key words: pomegranate peel; pomegranate leaf; total flavonoids; change law

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)03-0068-03

石榴(*Punica granatum* L.),是石榴科石榴属植物。它是一种经济价值很高的经济林木^[1-3]。石榴皮是我国的传统中药,在我国传统医药中主要有涩肠止泄、止血、杀虫等功效。现代药理研究证明,石榴皮、石榴叶中含有黄酮和总鞣质等多种物质,黄酮(Flavonoids)是其中一类较为重要的化合物^[4-7]。黄酮类物质广泛存在于植物界,几乎分布于所有的绿色植物中。它可分为多种类型,其化合物是有效活性成分之一,它是一类具有 C₆—C₃—C₆ 基本母核的天然产物。近年来发现黄酮类化合物(HlavoecomLxnmmd)的生理活性较为广泛,具有抗癌防癌作用;有很强的抗氧化效果,可防止或延缓食品发生氧化反应,饲料出现酸败变质等,能防止机体脂质过氧化反应;还有抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂等药用保健功能。已经研究证明,黄酮类化

合物是一类安全可靠、成本低、来源广、具有强抗氧化活性的抗氧化剂,因此有很好的应用前景^[3]。近年来,黄酮的需求量越来越大,已研究与开发的黄酮类产品仍属极少数。本文利用分光光度法测量石榴皮和石榴叶在不同季节的含量及其变化规律,以及与石榴叶的组织培养的愈伤细胞总黄酮含量相对照,用以更好地研究和开发利用石榴黄酮,为我们在石榴细胞培养工厂化生产黄酮提供理论基础和实验经验。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

石榴皮 取自安徽农业大学种质资源圃。从石榴果实直径 3cm 开始每月 1、15 号取两次(避免下雨天取样),均切成小片置烘箱中 50℃ 下烘干,粉碎,过 40 目筛,储于棕色品种,避光保存,备用;石榴叶 取自石榴皮同一株植株,从展叶到 2cm 长度完全叶的时候开始每月 1、15 号取样,快速洗净,晾干,处理方法同石榴皮的处理方法;石榴的愈伤组织 来自安徽农业大学林学与园林学院遗传育种室,其外植体

收稿日期:2009-05-25 * 通讯联系人

作者简介:程江华(1982-),男,在读硕士,研究方向:经济林。

基金项目:国家自然科学基金项目部分内容(30571520)。

是有石榴皮、石榴叶相同植株的嫩叶;标准品芦丁 080-9303,中国药品生物制品检定所;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、醋酸钠、氢氧化钠 均为分析纯。

T6 新世纪紫外可见分光光度计,电子分析天平,干燥箱,电热恒温水浴箱,粉碎机。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

1.2.1.1 标准溶液的配制 用电子天平准确称取在 120℃ 恒温干燥至恒重的芦丁标准品 60mg,置 100mL 容量瓶中,加 70% 乙醇 35mL 置水浴锅上微热使其溶解,放冷,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,得 0.6mg/mL 的溶液。

1.2.1.2 标准曲线的绘制^[8-9] 吸收上述标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0mL 分别加入到 50mL 容量瓶中,再分别加入 3mL 0.1mol/L 三氯化铝溶液、5mL 1mol/L 醋酸钠,用 70% 的乙醇稀释至刻度,然后放置 40min。以加 0.00mL 标准品为空白,置 1cm 比色杯中,于 425nm 波长处测定吸光度。于 425nm 处以溶剂为空白测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标绘制标准曲线,如图 1 所示。所得回归方程: $C = 35.167A + 0.0046$, 其中 $R^2 = 0.9968$ 。

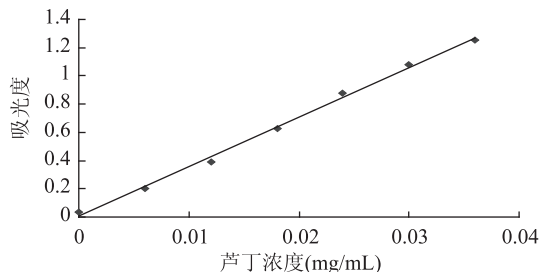


图1 芦丁标准曲线

1.2.2 样品总黄酮的测定 分别准确称量 1.00g 石榴皮、石榴叶和愈伤组织于锥形瓶中,加 40mL 70% 乙醇溶液,密封 45h,过滤,然后精密吸取 0.84mL 分别放置 50mL 容量瓶,用 70% 乙醇稀释,然后加入 3mL 0.1mol/L 三氯化铝溶液、5mL 1mol/L 醋酸钠溶液,放置 40min 后在 425nm 处测定吸光度。每份样品 7 份,第一份作空白对照,不吸取样品,其他各种溶液同样添加,用 75% 乙醇定容,摇匀,其他 6 份步骤按 1.2.1 项操作,得到吸光度后代入回归方程,得总黄酮含量,计算平均值即为该样品的总黄酮含量。

总黄酮含量 = (提取液浓度 × 稀释倍数 × 体积) / 样品重

2 结果与分析

2.1 石榴皮总黄酮含量的变化趋势

石榴皮的总黄酮含量较高,从石榴果实慢慢成型,黄酮含量逐步上升,达到一定高峰期后,随着果实的逐步成熟,石榴皮总黄酮含量开始下降,到成熟时总黄酮含量趋于平稳。如图 2 所示,石榴皮的总黄酮含量在 6 月下旬有一个高峰后呈逐步下降的趋势,直到石榴果实在 9 月中下旬采摘。在 6 月下旬石榴皮的黄酮含量最高,达到 12.47mg/g,7 月份石榴皮总黄酮含量下降趋势明显,到 8 月份逐渐平稳,到 9 月底

10 月份采摘的时候含量基本稳定,为 6.48mg/g。

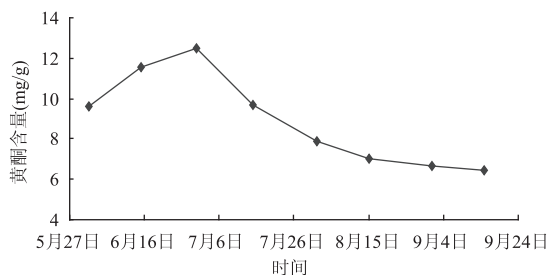


图2 石榴皮黄酮含量的动态变化趋势

2.2 石榴叶黄酮的变化趋势

石榴叶中总黄酮含量的变化较为平缓,在变化过程中有两个小高峰期。如图 3 所示,在 6 月份的时候有一个小高峰,7~8 月份石榴果实迅速膨大,导致石榴叶总黄酮的略微下降,到 9 月中旬,果实成熟期中,石榴叶黄酮又有上升趋势,到十月上旬果实采摘后有一个高峰期,最高值为 3.04mg/g,其后较为稳定,这与吴静等在《石榴叶中总黄酮的测量》中测量的含量为 3.59mg/g 的数据基本相同^[14]。

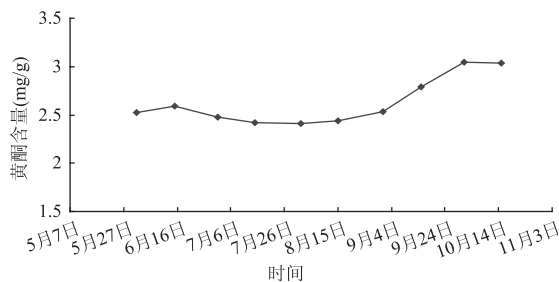


图3 石榴叶黄酮含量的动态变化趋势

2.3 不同来源石榴组织总黄酮含量的比较

如图 4 所示,石榴皮的总黄酮含量最高,达到 12.47mg/g,是石榴叶总黄酮的 4 倍,有石榴叶经组织培养所获得的愈伤组织的总黄酮含量是 7.31mg/g,高于石榴叶的总黄酮含量,和成熟的石榴皮中总黄酮含量不相上下。这种迹象表明,石榴叶经过组织培养以后,其组织的总黄酮含量有上升,这为我们以后在做石榴细胞培养生产黄酮提供了理论基础和实践经验。

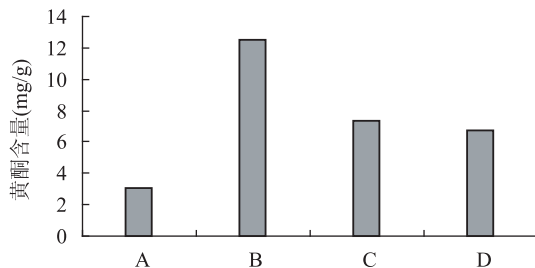


图4 石榴叶、石榴皮和石榴叶愈伤组织的黄酮含量

注:A:石榴叶;B:石榴皮总黄酮最高水平;

C:愈伤组织的黄酮含量;D:石榴皮平均黄酮含量。

3 讨论

实验结果表明,石榴皮中黄酮类物质含量非常高。测定的成熟的石榴皮总黄酮含量的结果与许宗运的石榴皮总黄酮含量相近,后者为 6.23mg/g^[13]。但略低于吕琴测量的结果,后者测量的石榴皮总黄酮的范围在 6.77 ~ 10.02mg/g,平均为 8.17mg/g^[15]。

但是在本实验中,石榴皮的黄酮含量在6月份底有一个高峰,若要利用石榴皮总黄酮,此时段的黄酮量最高。因此,石榴皮很具有深入研究的价值,今后将继续进行黄酮类成分单体化合物的分离及抗氧化性的实验研究探索。讨论其原因:随果实成熟,石榴皮的营养成分逐步向果粒转移,导致石榴皮的总黄酮含量下降,并且石榴皮有变薄的趋势,当果实达到一定的成熟度的时候,石榴皮的总黄酮含量和石榴籽粒的黄酮相当,但一般情况下经采摘储藏以后,石榴皮的总黄酮含量比石榴果汁的要高。

石榴叶的总黄酮含量的变化大体趋于平缓,这与程水源、王燕等在《银杏叶黄酮含量变化及其分布规律的研究》的结果基本相似,后者描述银杏叶黄酮有两个高峰值,一个在6月份,一个在10月份,且10月份的值是6月份值的3倍之多,而且的峰值明显^[15]。但刘景东等在国槐叶不同生长时间总黄酮的含量变化研究中描述为,国槐叶虽然也有两个高峰期,但是最高峰在5月,随后含量下降,虽在9月份有上升,但上升的值较小^[17]。石榴叶的总黄酮大体变化较小,可能与不同部位光照强度有关,并且生长势、树龄、繁殖的方式、叶片发育进程、树体的大小、营养水平与缓冲能力不同,以及是否有挂果、挂果的多少等因素综合影响所致^[19]。

石榴愈伤组织的总黄酮含量与石榴皮的平均水平持平,但是要高于自然情况下的石榴叶的总黄酮含量,并且明显高于银杏叶黄酮和山楂叶黄酮,对于用生物技术研究、生产和开发生物总黄酮有一定的实际应用价值。对石榴细胞培养生产黄酮有一定的指导意义。

总之,石榴皮、叶、愈伤的总黄酮含量的高低不仅与遗传因素有密切关系,而且与所生存的环境、气候条件等生态因子有着很大的关系,环境及其环境应力的改变也会影响总黄酮的合成与积累。

4 结论

石榴皮的总黄酮含量在6月份有最高值,总黄酮含量能达到12.47mg/g,在其后黄酮含量下降。石榴叶总黄酮含量明显低于石榴皮总黄酮,而且在随时间变化量较小,在果实采摘后有一个相对的高峰

值。石榴愈伤的总黄酮高于石榴叶,和石榴皮总黄酮含量相当,能达到7.31mg/g。作为天然植物,我国石榴资源丰富,如能把石榴相关组织大量开发利用,不但可以提高经济效益,而且对于利用、开发保健制品具有参考价值。

参考文献

- [1] 江苏医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海: 科学技术出版社, 1986: 619.
- [2] 李海霞, 王钊, 刘延泽, 等. 石榴科植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(8): 765-768.
- [3] 武云亮. 石榴资源的开发利用与产业化发展. 资源开发与市场[J]. 1999, 15(4): 208-209.
- [4] Chidambare Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts using in vitro models[J]. Phytochemistry, 2004, 65(2): 233-241.
- [5] 李云峰, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮抗氧化物质提取及其体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2): 144-147.
- [6] 林佳, 李琰, 徐丽珍. 石榴叶的化学成分研究[J]. Central South Pharmacy April, 2005, 3(2): 70-73.
- [7] Lin J, Li D, Xu L Z. Chemical constituents from leaves of *Punica granatum* L[J]. Central South Pharmacy April, 2005, 3(2): 70-72.
- [8] 王选东, 刘利林, 许宗运. 正交设计研究石榴皮总黄酮提取工艺[J]. 塔里木农垦大学学报, 2003, 15(2): 11-16.
- [9] 刘姗. 正交法优选石榴皮中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 广州化工, 2008, 36(3): 22-23.
- [10] Hussein SAM, Barakat HH, Irmgard Merfort, et al. Tannins from the leaves of *Punica Granatum* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 819-820.
- [11] Li H X, Wang Z, Liu YZ. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 33(8): 765-767.
- [12] 陈红梅, 丁之恩. 石榴皮黄酮类化合物的最佳提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 263-264.
- [13] 许宗运, 蒋慧, 吴静, 等. 石榴皮和石榴渣总黄酮含量的测定[J]. 中国农学通报, 2003, 19(3): 73-75.
- [14] Kimura S, Zhu X P, Matsui R, et al. Characterization of fish muscle type I collagen[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(5): 1315-1318.
- [15] Zhang Y, Liu W T, Li G Y, et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912.
- [16] Cui F X, Xue C H, Li Z J, et al. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1120-1125.
- [17] Komsa-Penkova R, Koynova R, Kostov G, et al. Thermal stability of calf skin collagen type I in salt solution[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1297: 171-181.

(上接第67页)

- [10] 陈静涛, 赵玉萍, 徐政, 等. 重组胶原蛋白与牛源I型胶原蛋白红外光谱研究[J]. 材料导报, 2008, 22(3): 119-121.
- [11] Barbara Brodsky Doyle Egberb. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937.
- [12] Lin Wang, Xinxin An, Fangmei Yang, et al. Isolation and characterisation of collagen from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*) [J]. Food chemistry, 2008, 108: 616-623.
- [13] Fathima N N, Madhan B, Rao J R, et al. Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34: 241-247.