

落叶松松塔多酚成分和抗氧化能力与海拔的相关性研究

郭庆启¹ 张 娜² 李梦云¹ 张 智¹ 王振宇^{1,3}

(1 东北林业大学林学院 2 哈尔滨商业大学食品科学与工程黑龙江省高校重点实验室 3 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院)

摘要:通过测定不同海拔条件下落叶松松塔中的多酚类物质含量及抗氧化能力,探讨了二者与海拔变化的相关性。结果表明:高海拔下落叶松松塔的多酚含量、原花青素含量、总还原能力以及 DPPH 自由基清除能力均高于低海拔条件下。相关性分析表明:原花青素含量与多酚、总还原能力之间存在着显著的相关性,决定系数 R^2 分别为 0.949 和 0.899。

关键词:落叶松松塔;多酚;原花青素;抗氧化

中图分类号:S718.43 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2013)01-0059-05

GUO Qing-qi¹; ZHANG Na²; LI Meng-yun¹; ZHANG Zhi¹; WANG Zhen-yu^{1,3}. **Relationship between polyphenols and antioxidation in larch pine cones and altitude.** *Journal of Beijing Forestry University* (2013)**35**(1)59-63[Ch, 19 ref.]

- 1 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, P. R. China;
2 Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Province, Harbin University of Commerce, 150076, P. R. China;
3 College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150086, P. R. China.

The polyphenol compound content and antioxidation ability in the larch pine cones were determined at different altitudes, and their relationships with altitude were discussed. The results showed that polyphenol content, procyanidin content, total reducing power and DPPH radical scavenging ability at high altitude were significantly higher than those at lower altitude. The procyanidin content has significant correlation with polyphenol content ($R^2=0.949$) and total reducing power ($R^2=0.899$), respectively.

Key words larch pine cones; polyphenol; procyanidin; antioxidation

天然功能食品不仅具有良好的抗氧化和清除自由基能力,而且对机体没有任何毒副作用,已经成为抗氧化活性物质领域研究的新方向^[1-2]。植物多酚是一类在自然界广泛分布的植物次生代谢产物^[3],是一类具有苯环并结合多个羟基化学结构的化合物的总称,其主要存在于植物的皮、根、叶、壳和果肉中,是许多药用植物的主要活性成分^[4]。目前,对植物多酚的研究主要集中在茶、苹果(*Malus pumila*)、石榴(*Punica granatum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、荞麦(*Fagopyrum esculentum*)、烟(*Nicotiana tabacum*)叶等植物,对松多酚的研究通常关注的是松树皮^[5-6],而对落叶松(*Larix gmelinii*)松塔多酚的研究未见报道。

近年来对于松科(Pinaceae)植物的研究表明,

其含有大量的多酚化合物。研究表明,松多酚可以在机体内不同的微环境和代谢生化链中起到抗氧化的作用,具有较强的捕集和清除氧自由基的能力^[7],能有效防止各种自由基引发的多种疾病,降低中风、肿瘤、癌症等发病危险,延缓衰老^[8-9]。以茶多酚为代表的植物多酚因其高效的抗氧化及抑菌、抗癌、抗心血管疾病作用已经受到了国内外广泛的关注^[10-11]。松塔多酚作为一种资源丰富、廉价易得的天然抗氧化多酚,有着广泛的应用前景。本文以落叶松松塔为研究对象,分析了海拔对松多酚类化合物的组成与抗氧化能力的影响,摸清生态环境因素与松多酚含量及抗氧化能力的相关性,为松多酚资源林的优选、调控以及高效利用提供理论基础。

收稿日期:2012-07-12 修回日期:2012-09-07
基金项目:国家自然科学基金项目(31170510)。
第一作者:郭庆启,博士,讲师。主要研究方向:天然产物化学。Email:qingqigu@nefu.edu.cn 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学林学院。
责任作者:王振宇,博士,教授。主要研究方向:植物资源开发利用。Email:wzy219001@yahoo.com.cn 地址:同上。
本刊网址: http://journal.bjfu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

落叶松松塔取自黑龙江省苇河林业局,采集时间为 2011 年 9 月,按照山上和山下分为高低 2 种海拔,对应海拔分别为(790 ± 2) m 和(330 ± 2) m,同一海拔条件下分别按南北 2 个坡面随机采集 7 个松塔样本,共计 28 个样本。松塔样品低温干燥后粉碎过 40 目筛备用。

没食子酸标准品和 DPPH 自由基标准品购自 Sigma 公司,儿茶素标准品购自中国食品药品鉴定研究院,所用化学试剂均为分析纯。TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);TGL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 多酚及原花青素含量的测定方法

1.2.1 松塔多酚的提取

称取 2.0 g 试样于具塞三角瓶中,加入 70 ℃ 预热过的 70% 甲醇溶液 50 mL,充分振荡湿润,立即移入 70 ℃ 水浴中,避光条件下浸提 10 min(隔 5 min 振荡 1 次),浸提后冷却至室温,离心机 3 500 r/min 条件下离心 10 min,上清液转移至 100 mL 容量瓶。残渣收集后再用 50 mL 70% 甲醇溶液提取 1 次,重复以上操作。合并提取液定容至 100 mL,摇匀,过 0.45 μm 膜后待用。

1.2.2 多酚含量的测定方法

采用福林酚法测定多酚含量,准确移取 1.0 mL 测试液于 10 mL 容量瓶中,加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂,摇匀。反应 5 min 后加入 4.0 mL 7.5% 碳酸钠溶液,加蒸馏水定容至刻度,摇匀。室温下放置 60 min,765 nm 波长下测定溶液吸光度值^[12-13]。多酚含量计算公式如下:

多酚质量分数 = $\frac{A V d}{10^6 \varepsilon m_1} \times 100\%$ (1)

式中:A 为样品溶液的吸光度值;V 为提取液的体积,100 mL;d 为稀释因子;ε 为没食子酸标准曲线的斜率,0.118 2;m 为样品干物质质量分数,0.94;m₁为样品质量,g。

1.2.3 原花青素含量的测定方法

采用香草醛-浓盐酸法测定原花青素含量,准确移取 1.0 mL 测试液于 10 mL 容量瓶中,分别加入 6.0 mL 3% 香草醛-甲醇溶液及 3.0 mL 浓盐酸溶液,混合均匀后,在 20 ℃ 水浴锅中反应 15 min,以儿茶素为标准品,500 nm 波长下测定溶液吸光度值^[14]。原花青素质量分数计算公式如下:

原花青素质量分数 = $\frac{A V d}{10^6 \varepsilon' m m_1} \times 100\%$ (2)

式中:ε'为儿茶素标准曲线的斜率,0.030 1。

1.3 总还原能力和清除 DPPH 自由基能力的测定

1.3.1 总还原能力的测定

准确移取 1.0 mL 样液于试管中,分别加入 2.5 mL、0.2 mol/L pH6.6 磷酸缓冲液和 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液,于 50 ℃ 水浴中保温 20 min,快速冷却,再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,依次加入 2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液,充分振荡,静置 10 min 后在 700 nm 波长下测其吸光度值。取 1.0 mL 70% 甲醇为空白对照液同以上操作参比调零,以吸光度值表示总还原能力的大小^[11]。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力的测定

准确移取 1.0 mL 测试液于试管中,加入 2.0 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液振荡摇匀,1.0 mL 70% 甲醇溶液与 2.0 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液混合作为空白对照,常温避光反应 60 min 后在 517 nm 波长下测其吸光度值,以 70% 甲醇参比调零^[11]。DPPH 自由基清除率的计算式为

DPPH 自由基清除率 = $\frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$ (3)

式中:A₀ 为 517 nm 下对照样品的吸光度;A 为样品的吸光度。

1.4 数据分析

采用 SPSS16.0 软件对数据进行单因素方差分析及差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 海拔对落叶松松塔多酚、原花青素含量影响的研究

不同海拔条件下落叶松松塔多酚及原花青素含量的变异情况、单因素方差以及原花青素占总多酚比例对海拔的响应及多酚、原花青素的增率如表 1~3 所示。

表 1 不同海拔下松塔多酚、原花青素含量的变异分析
Tab.1 Variance analysis of polyphenol and procyanidin contents in pine cones at different altitudes

样 品	样本数	平均值/%	标准差/%	变幅/%	变异系数/%
低海拔多酚	14	2.20	0.578	1.34~3.38	26.27
高海拔多酚	14	2.88	0.650	1.98~4.11	22.57
低海拔原花青素	14	1.47	0.540	0.87~2.69	36.73
高海拔原花青素	14	2.33	0.715	1.33~3.71	30.69

海拔对生物来说是一个强烈的综合性环境因子。海拔的变化带来一系列环境因子的改变,包括降雨、平均温度、日温变化幅度、土壤肥力、极端温度、大气压、积雪覆盖时间、植物生长期和辐射强

度^[15-16]。生长在高海拔地区的植物经常要经受低温、低土壤肥力和紫外辐射等环境因子的考验。研究表明,以酚类物质为主的次生代谢物质是植物抵御紫外辐射胁迫、低温的一种主要的分子防御机制^[17]。生长在我国东北小兴安岭地区的落叶松,由于受到这些海拔因子的考验,引起相关多酚类化合物含量的变化。

表 2 单因素方差分析结果

Tab. 2 One-way analysis of variance

参量	变异来源	SS	df	s^2	F	P
多酚	处理间	3. 841	1	3. 841	10. 151	0. 004
	处理内	9. 837	26	0. 378		
	总变异	13. 677	27			
原花青素	处理间	5. 151	1	5. 151	12. 823	0. 001
	处理内	10. 445	26	0. 402		
	总变异	15. 596	27			
原花青素/ 多酚	处理间	0. 099	1	0. 099	8. 566	0. 007
	处理内	0. 299	26	0. 402		
	总变异	0. 397	27			

表 3 原花青素占总多酚比例对海拔的响应及多酚、原花青素的增率

Tab. 3 Response of the proportion of procyanidin in total polyphenols to altitude and the increasing ratio of polyphenols and procyanidins %

参量	低海拔	高海拔	增率
多酚	2. 20	2. 88	30. 91
原花青素	1. 47	2. 33	58. 50
原花青素/多酚	66. 82	80. 90 **	

注: **表示差异极显著 ($P < 0. 01$), 下同。

从方差分析结果中可见,较高海拔下,总多酚含量和原花青素含量都极显著($P < 0. 01$)的高于较低海拔下的含量。较高海拔下,多酚含量比低海拔下增加了 30. 91%,而原花青素含量则比低海拔下增加了 58. 50%。低海拔时,松塔原花青素含量占总多酚量的 66. 82%,高海拔下这一比例增加到了 80. 80%,并且方差分析显示海拔对原花青素比例的提高效应是极显著的。较高海拔下,多酚含量和原花青素含量的变异系数都较低海拔下小。但无论是多酚还是原花青素,在高海拔和低海拔下,它们的变异系数较大。从总体来看,多酚和原花青素含量的最大值都出现在较高海拔下,最小值也都出现在较低海拔下;因此,高海拔有利于多酚原花青素含量的提高,而这种提高的贡献者主要来自于原花青素所占比例的提高。

本研究中,高海拔条件下,落叶松松塔的总多酚和原花青素含量比低海拔条件下极显著地增加了,这与以往的大多数研究结果是一致的,如 Alonso 等^[18]对委内瑞拉的安第斯山脉的 *Pteridium* 属植物的低分子质量酚类物质 (LMP) 和高分子质量酚类

物质 (HMP) 含量随海拔梯度变化的研究表明,这 2 种酚类物质含量随着海拔的升高而增加。高海拔下,原花青素在总多酚中所占的比例极显著增加。这是由于高海拔下,酚类物质的种类组成往往会发生变化,以适应环境条件恶劣所带来的影响。Chaves 等^[19]研究表明,黄酮类物质含量与光照强度有关。Alonso 等^[18]研究中亦发现高海拔下,LMP 相对于 HMP 大量积累,作者认为这是植物抵御紫外辐射增强的需要。事实上,原花青素就是一类黄酮类物质,并且包含不同种类和不同分子量的低聚原花青素,这是一种具有很强的抗氧化活性的酚类物质,这就解释了高海拔下原花青素比例大幅增加的原因。相关分析也显示,原花青素与总还原力之间有着很强的相关关系,原花青素的大量积累与植物需要更强的抗氧化活性是密不可分的。

不同海拔下多酚和原花青素含量都有着很大的变幅,这反映的是同一海拔下不同松塔采集地点之间的差异性。这种差异是与落叶松所处的微环境密切相关的,包括水分、光照、养分条件在空间上的差异性。另一方面,即使是同一株落叶松,冠层顶部与冠层下部的松塔,其生长环境也是差异很大的。在那些环境适宜的条件下生长的松塔,其生产的次生代谢物质自然也会较低,这是植物对环境条件适应的一种权衡。

2. 2 海拔对落叶松松塔总还原能力和 DPPH 自由基清除能力影响的研究

不同海拔条件下落叶松松塔总还原能力和 DPPH 自由基清除能力的变异情况、单因素方差如表 4 ~ 5 所示。

表 4 不同海拔下松塔多酚总还原力和 DPPH 自由基清除能力的变异分析

Tab. 4 Variance analysis of total reducing power and DPPH radical scavenging ability in pine cones at different altitudes

样 本	样本数	平均值/ %	标准差/ %	变幅/ %	变异系数/ %
低海拔总还原力	14	0. 36	0. 053	0. 250 ~ 0. 449	14. 76
高海拔总还原力	14	0. 42	0. 050	0. 332 ~ 0. 486	11. 68
低海拔 DPPH 自由基清除能力	14	59. 09	6. 779	44. 03 ~ 66. 62	11. 47
高海拔 DPPH 自由基清除能力	14	61. 51	6. 672	49. 01 ~ 68. 32	10. 85

表 5 单因素方差分析结果

Tab. 5 One-way analysis of variance

参量	变异来源	SS	df	s^2	F	P
总还原力	处理间	0. 028	1	0. 028	10. 556	0. 003
	处理内	0. 069	26	0. 003		
	总变异	0. 097	27			
DPPH 自由基清除能力	处理间	40. 874	1	40. 874	0. 904	0. 351
	处理内	1 176. 031	26	45. 232		
	总变异	1 216. 905	27			

方差分析表明:较高海拔下,落叶松松塔提取物的总还原能力极显著增强($P < 0.01$),但 DPPH 自由基清除能力并没有随着海拔增加而显著地增强($P > 0.05$)。高海拔对松塔提取物总还原力的促进作用为 16.67%,而 DPPH 自由基的清除能力则仅仅提高了 4.10%。总还原力和 DPPH 自由基清除能力的变异系数也都是高海拔下较低。相比多酚、原花青素含量在不同海拔下的变异,总还原力和 DPPH 自由基清除能力的变异要小的多,但最大值和最小值之间仍有较大的差距,变异最大的低海拔下总还原力的最大值是最小值的 1.8 倍;差异最小的高海拔下 DPPH 自由基清除能力最大值也比最小值高了 40%。

2.3 多酚、原花青素含量与抗氧化能力间的相关性分析

相关性分析表明,原花青素含量与多酚、总还原力之间有极显著的的相关关系,相关系数 R^2 分别达到 0.949 和 0.899。总多酚含量与总还原力之间的相关性稍差,但也是极显著地相关关系, $R^2 = 0.786$ 。但无论总多酚、原花青素含量,还是总还原力与 DPPH 自由基清除能力之间都有很弱的正相关关系,分别为 0.266、0.276 和 0.367。

表 6 多酚、原花青素含量与抗氧化能力间的相关性分析

Tab.6 Correlation analysis between polyphenol and procyanidin contents and antioxidant function

参量	多酚	原花青素	总还原力	DPPH 自由基清除能力
多酚	1	0.949**	0.786**	0.266
原花青素		1	0.899**	0.276
总还原力			1	0.367
DPPH 自由基清除能力				1

注:pearson 相关,双尾检验。

研究中发现的另一个现象是,高海拔下不仅多酚含量、抗氧化活性高,而且它们的变异系数也更低。这还是不同海拔下环境条件的巨大差异引起的:低海拔下,往往具有更好的养分水分条件,环境胁迫大大低于高海拔植物,植物之间的竞争比高海拔更加激烈。养分水分条件在空间上的分布差异和植物之间竞争的强弱,可能会造成低海拔下较高的变异性。而高海拔下,由于水分养分条件本来就比较受限,而同时又常常遭受到低温和高光强或紫外辐射的胁迫,植物产生更多的次生代谢物质来适应恶劣的环境条件,个体之间差异从而相对较小。试验中,海拔对多酚、原花青素含量和总还原力的提高有很明显的促进作用,但对 DPPH 自由基清除能力的提高却影响很小。如低海拔条件下 DPPH 自由基的清除能力为 59.09%,而高海拔条件下清除能力

仅提升至为 61.51%,另一方面,相关分析中,DPPH 自由基清除能力与其他三者的相关性都很弱。

3 结 论

- 1)高海拔条件下,落叶松松塔中的总酚与原花青素的含量要显著性的高于低海拔条件下的,说明海拔增加有利于落叶松松塔中总酚含量的增加,而这种增加主要来源于原花青素所占比例的增加。
- 2)对比于低海拔条件下,在高海拔条件下的落叶松松塔提取物的总还原能力显著性增强,而 DPPH 自由基清除能力增加不显著。相关性分析表明,原花青素含量与多酚、总还原力之间存在显著的相关性。

参 考 文 献

[1] 牛鹏飞,仇农学,杜寅. 苹果渣中不同极性多酚的分离及体外抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2008,24(3):238-242.

[2] 龚钢明,张赞彬,王化田. 红景天多酚物质抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2008,29(2):91-93.

[3] 黄阿根,董瑞建,鲁茂林,等. 茶树花多酚粗提物分离纯化及抗氧化性[J]. 农业机械学报, 2008,39(12):107-111.

[4] 郭金英,李松彪,侯玉泽,等. 牡丹不同部位多酚含量研究[J]. 食品科学, 2008,29(11):348-350.

[5] 薄采颖,郑光耀,陈琰,等. 松树皮多酚的亚临界水提取及抗氧化活性初探[J]. 林产化学与工业, 2011,31(6):73-77.

[6] 王婧,李淑君. 落叶松树皮乙醇提取物的抗氧化性能研究[J]. 林产化学与工业, 2009,29(增刊):143-147.

[7] DANILA D M, MAURIZIO L G, SANTO G, et al. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents[J]. Food Chemistry, 2008(111):45-49.

[8] FRANKEL E N, WATERHOUSE A L, TEISSEDRE P L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995,43(4):890-894.

[9] 赵会纳. 不同地区烤烟多酚类物质的分布特点及与其他化学成分的关系[D]. 郑州:河南农业大学, 2009:15-20.

[10] GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, et al. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(2):361-367.

[11] 苏晓雨,王振宇. 红松种子壳多酚物质的提取及抗氧化特性[J]. 农业工程学报, 2009,25(增刊):198-203.

[12] 江慎华,王书源,马海乐,等. 丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2010,41(1):132-138.

[13] LANDRAULT N, POUCHERET P, RAVEL P, et al. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001,49:3341-3348.

[14] 江慎华,吴士云,马海乐,等. 诃子抗氧化活性物质提取工艺与抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2011,42(4):120-

126.

[15] 赵海田,王振宇,程翠林,等. 松多酚类活性物质抗氧化构效关系与作用机制研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(2): 458-461.

[16] ZIDORN C. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the asteraceae: Trends and causes [J]. Phytochemistry Reviews, 2010, 9(2) :197-203.

[17] KÖRNER C. Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems[M]. Heideberg:Springer-Verlag,2003.

[18] ALONSO A M, OLIVEROS B A, CALCAGNO P M. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, 35(1) :1-10.

[19] CHAVES N, ESCUDERO J C, GUTIERREZ M C. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate[J]. Journal of Chemical Ecology, 1997, 23(3) :579-603.

(责任编辑 赵 勃)



欢迎订阅《中国林业教育》

《中国林业教育》是经国家新闻出版总署批准、由北京林业大学和中国林业教育学会共同主办的全国性林业教育刊物。本刊主要宣传党和国家的教育方针、政策,贯彻国家有关林业教育工作的指示精神,密切联系实际,探索林业教育的规律,交流推广林业教育、教学、管理、科研等方面的改革经验,介绍国内外林业教育的现状、发展趋势和教育科学研究动态。本刊是全国各级各类林业院校教师和学生、教育行政部门广大干部及其他关心林业教育的人员进行学术交流的主要园地。本刊一直被国家级图书馆、中国知网、中国核心期刊(遴选)数据库、华艺线上图书馆等收录,连续 2 届获得国家部委级“梁希林业图书期刊奖”。

《中国林业教育》刊号为 ISSN-7232(国际标准连续出版物号)、CN11-2729/S(国内统一连续出版物号),双月刊,80 页,全年定价 180 元。邮发代号为 82-201,全国各地邮局均可订阅。未订到本刊的读者,还可直接汇款到本刊编辑部购买。

编辑部地址:北京海淀区清华东路 35 号北京林业大学
邮编:100083
电话:010-62338090
在线投稿网址: <http://journal.bjfu.edu.cn/jy/>
电子邮箱: liuxiaoling@bjfu.edu.cn