

牡丹花发育过程中花瓣抗氧化活性的变化

史国安^{1,2}, 郭香凤¹, 高双成¹, 范丙友¹, 包满珠^{2*}

(¹河南科技大学农学院, 洛阳市牡丹生物学重点实验室, 河南洛阳 471003; ²华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 测定了牡丹品种‘洛阳红’和‘胡红’花发育过程中花瓣多酚类功能成分与抗氧化活性的变化。结果表明: 两个品种牡丹花瓣富含多酚、类黄酮与花色素苷, 花发育过程中花瓣总酚含量呈下降趋势。开花前期花瓣提取液在卵磷脂蛋白 PUFA 过氧化体系中维持较高的抗氧化活性和自由基清除能力, 开花后抗氧化活性和自由基清除能力明显下降。牡丹花瓣多酚含量与清除 DPPH 自由基活性之间呈现显著的正相关。

关键词: 牡丹; 花瓣; 抗氧化活性; DPPH 自由基; 多酚

中图分类号: S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 11-1685-06

Changes of Antioxidative Activity During Florescence and Flower Senescence of Peonies Petal

SHI Guo-an^{1,2}, GUO Xiang-feng¹, GAO Shuang-cheng¹, FAN Bing-you¹, and BAO Man-zhu^{2*}

(¹College of Agriculture, Luoyang Key Laboratory of Peony, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ²College of Horticultural and Forestry Science, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Changes of poly phenolics and antioxidative activities in petals during florescence and flower senescence of two tree peony cultivars were analyzed. The results showed that there were rich with total phenolics, flavonoids and anthocyanin of petal in ‘Luoyanghong’ and ‘Huhong’, while content of total phenolics decreased in petal during florescence and flower senescence of peonies. The antioxidative activity in the peroxidation system of polyunsaturated fatty acid from lipoprotein induced by iron and scavenging radical ability in three radical detective systems was at a high level during florescence and declined rapidly after blooming. Significantly positive correlation existed between content of total phenolics and IC₅₀ of DPPH scavenging ability in both the peony cultivars. It was proposed that decrease of content of poly phenolics and antioxidative activity was a main physiological reason for petal senescence of peonies. Tree peonies flowers from early bloom stage to full opening stage possess the high functional benefit and thus would be the appropriate stage in view of the nutritional consideration.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; petal; antioxidative activity; DPPH radical; poly phenolics

牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 为原产中国的名贵花卉, 品种繁多, 栽培面积大, 除了具有重要的观赏功能外, 还可食用。牡丹花作为抗氧化食品或医药原材料的应用与开发, 将大大增加其经济价值。Que 等 (2007)、冯志文等 (2009) 分别指出百合花、牡丹花具有很强的抗氧化活性。作者 (2008)

收稿日期: 2009-05-13; 修回日期: 2009-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30740013); 河南省自然科学基金项目 (0611030600); 洛阳市科技支撑计划项目 (0901063A)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn)

研究了牡丹开花与衰老过程中膜脂过氧化代谢的变化,指出 $O_2^{\cdot -}$ 是影响牡丹开花和衰老过程中花瓣内膜脂过氧化作用的最主要因素。

作者进一步探讨牡丹花发育过程中抗氧化能力的变化,比较不同发育状态牡丹花瓣总的抗氧化能力的变化趋势,从细胞保护功能的角度,说明牡丹开花和衰老过程中花瓣的抗氧化特性变化,为牡丹的切花保鲜及其综合利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于 2006—2007 年在河南科技大学实验室进行。牡丹品种‘洛阳红’和‘胡红’采于洛阳土桥花木有限公司苗圃。从同一花圃 5 年生牡丹植株上采切露色期 ()、绽口期 ()、初开期 ()、半开期 ()、盛开期 () 和开始衰败期 () (史国安等, 2008) 花枝各 30 枝,保湿运回实验室,插在盛有自来水的桶中恢复 1 h,剥去花萼和最外一层花瓣,取内层花瓣称重后,经液氮速冻贮存于 -80°C 超低温冰箱。

1.2 牡丹花 50%乙醇提取液的制备

取 2.00 g 冷冻牡丹花瓣样品,用 30 mL 50%乙醇加热浸提 15 min,反复浸提 3 次,合并滤液定容于 100 mL 容量瓶中,制成 2% 的牡丹花乙醇粗提液 (每 mL 相当 20 mg 鲜样),置于 4°C 冰箱中备用,用时再逐级稀释。

1.3 总酚、类黄酮和花色苷含量的测定

用 1% 的盐酸甲醇溶液进行提取,按林植芳等 (1988) 的方法测定。

1.4 卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系中抗氧化活性的测定

按照张尔贤等 (1996) 方法,建立以 Fe^{2+} 诱发卵黄磷脂 C-2 上的极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白 PUFA 的过氧化模型。

取新鲜的鸡蛋黄加等体积的无菌蒸馏水,搅拌均匀制备蛋黄悬浮液。反应体系中包含 0.2 mL 蛋黄悬浮液, 0.2 mL $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 , 1.5 mL PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7.0), 0.1 mL 50%粗提液,将试管置于 37°C 水浴中温浴 60 min,然后加入 2.0 mL 质量分数为 0.5% TBA - 20% TCA 溶液,沸水浴 15 min,迅速冷却,于 $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,以空白管调零 (以等量的蒸馏水代替),测定 532 nm 处的吸光值。对照管以等量的提取介质代替,其他同样品管。

样品抗氧化活性 (AOA) 用卵黄脂蛋白 LPO 的抑制率 (%) 表示。 $\text{AOA}(\%) = (\text{对照管 } A_{532} - \text{样品管 } A_{532}) / \text{对照管 } A_{532} \times 100$ 。

1.5 $\cdot\text{OH}$ 的产生与检测

按 Snimoff 和 Cumbes (1989) 的方法加以改进。3 mL 反应液中含 $0.15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 , $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 , $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸钠及不同体积的牡丹花乙醇提取液。加入 H_2O_2 启动反应, 37°C 保温 1 h 后,加 $0.12\text{ mL } 11.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 终止反应,水杨酸羟基化产物萃取入乙醚中,测定 510 nm 处的吸光值。4 次重复,以牡丹花乙醇提取液竞争性抑制 $\cdot\text{OH}$ 引发的水杨酸羟基化作用的效应表示其清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力。

1.6 $O_2^{\cdot -}$ 的产生和检测

按 Stewart 和 Bewley (1980)、史国安等 (2000) 的方法进行测定。3 mL 反应液中含 $13\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Met (甲硫氨酸), $75\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBT (氮蓝四唑), $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-Na (乙二胺四乙酸

钠), $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 B_2 (核黄素), $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.8) 及不同体积的牡丹花乙醇粗提液。于 25℃ 下照光 20 min 后, 测定 560 nm 处的吸光值。4 次重复。以牡丹乙醇粗提液抑制 NBT 光还原的效应表示其清除 O_2^- 的能力。

1.7 对 DPPH 自由基的清除能力的测定

参考 Larrauri 等 (1998) 和彭长连等 (2000) 的方法加以改进。把 $2.5 \text{ mL } 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液加入一定剂量的待测试样中, 以相同剂量双蒸水代替试样为对照, 用 50% 乙醇作空白。25℃ 放置 30 min 后, 测定 517 nm 处的吸光值, 重复 3 次。结果以清除百分率 (%) 表示。

1.8 数据统计处理

采用软件 DPS (v 6.01 版) 及 Microsoft Office Excel 2003 处理。

2 结果与分析

2.1 牡丹花瓣中总酚、类黄酮与花色素苷含量的变化

牡丹开花和衰老过程中花瓣多酚类生理活性物质含量见表 1。

‘洛阳红’和‘胡红’露色期 () 花瓣总酚含量最高, 随着花朵的开放呈现下降趋势, 开始衰败期 () 分别比露色期下降了 41.7% 和 25.8%。

‘洛阳红’花瓣类黄酮含量随着花朵开放呈现下降趋势, 盛开 () 到开始衰败期 () 又重新回升; ‘胡红’则在开花前期积累类黄酮, 花瓣迅速开放时下降到最低, 盛开 () 到开始衰败期 () 表现出与‘洛阳红’相似的变化特点。

深红色品种‘洛阳红’花瓣花色素苷含量显著高于浅红色品种‘胡红’, 开花过程中两者花色素苷不断累积。开始衰败期 () ‘洛阳红’花瓣边沿开始发生膨压下降引起的萎蔫与蓝变, ‘胡红’花瓣边缘花色变淡, 两个牡丹品种的衰老特性有明显差异。

表 1 牡丹开花和衰老过程中花瓣总酚、类黄酮与花色素苷含量的变化
Table 1 Changes of total phenolics, flavonoids and anthocyanin contents of
peonies petal at different developmental stages

发育时期 Development stage	总酚 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) Total phenolic		类黄酮 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) Flavonoid		花色素苷 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) Anthocyanin	
	洛阳红 Luoyanghong	胡红 Huhong	洛阳红 Luoyanghong	胡红 Huhong	洛阳红 Luoyanghong	胡红 Huhong
	107.5 \pm 3.2a	98.2 \pm 0.8a	254.7 \pm 3.1a	369.3 \pm 21.6b	94.5 \pm 0.9de	25.6 \pm 1.3cd
	82.3 \pm 1.4b	84.1 \pm 8.2b	257.2 \pm 2.8a	401.1 \pm 25.0b	109.9 \pm 0.6d	30.2 \pm 0.5c
	71.7 \pm 2.5c	80.3 \pm 5.0bc	234.0 \pm 3.8b	446.6 \pm 14.8a	156.5 \pm 0.5b	39.0 \pm 0.6c
	69.7 \pm 4.4c	80.4 \pm 0.8bc	239.8 \pm 4.4b	372.7 \pm 3.4b	130.8 \pm 2.5c	59.7 \pm 3.3a
	66.2 \pm 5.3c	74.3 \pm 0.8c	261.6 \pm 7.7a	400.0 \pm 48.9ab	282.7 \pm 7.7a	56.3 \pm 0.8a
	62.7 \pm 2.2cd	72.9 \pm 7.0cd	262.0 \pm 19.8a	418.2 \pm 44.3a	302.3 \pm 49.1a	50.5 \pm 1.6ab

注: 不同字母表示 0.05 水平上的差异。

Note: Different letters indicate significance at the 0.05 level

2.2 卵磷脂蛋白 PUFA 过氧化体系中 AOA 的变化

在牡丹花开放和衰老过程中, 花瓣提取液的 AOA 呈现逐渐下降的趋势。‘洛阳红’开始衰败期的 AOA 较露色期减少了 35.3%, 而胡红减少的幅度仅为 18.6% (图 1)。

结果说明牡丹花瓣含有丰富的抗氧化物质, 具有较高的清除脂质过氧化产物形成的能力, 花朵开放后抗氧化活性明显降低。

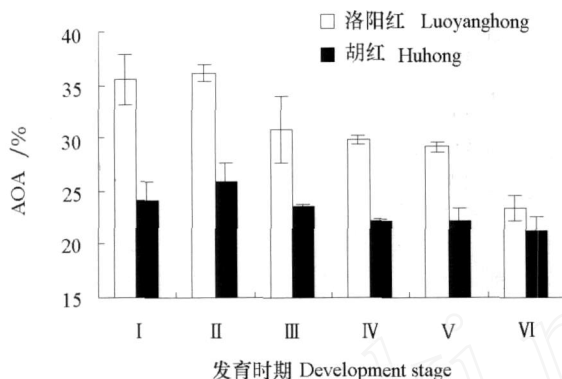


图 1 牡丹花提取液在卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系中抗氧化活性的变化

Fig. 1 Change of peonies extracts on AOA level in PUFA of yolk lipoprotein

2.3 清除 DPPH 自由基活性的变化

从表 2 可以看出, 随着反应体系中牡丹花提取液质量浓度的提高, 清除 DPPH 自由基的能力逐渐增强, 呈现出明显的量效关系, 当质量浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 清除率达 80% 左右。‘洛阳红’和‘胡红’不同发育时期花瓣提取液的最大清除能力均达到 80% 以上, 表现为开花过程中清除能力逐渐增加, 开始衰老后又重新下降的特征, 但品种间差异不显著。

IC_{50} (达到最大抑制活性一半时的底物用量) 的值与某种物质的抗氧化性能呈反比, IC_{50} 值越小, 该种物质的抗氧化性能越强。牡丹开花过程中花瓣提取液清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 变化有显著差异, 露色期 () IC_{50} 最小, 清除自由基的能力最强, 开始衰败期 IC_{50} 最大, 清除自由基的能力迅速下降, ‘洛阳红’的变化幅度显著大于‘胡红’。

表 2 牡丹花提取液清除 DPPH 能力的变化

Table 2 The scavenging effect of peonies extracts on DPPH radical

品种 Cultivar	发育时期 Flower stage	DPPH 清除率 / % DPPH scavenging effect							$\text{I}_{\text{max}} / \%$	$\text{IC}_{50} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
		0.015	0.030	0.060	0.125	0.250	0.500	1.000		
洛阳红 Luoyanghong		4.67	12.76	28.32	54.99	79.50	80.58	80.69	80.49b	0.075e
		1.25	7.46	18.66	48.31	81.43	84.28	85.36	84.94a	0.122d
		8.45	12.97	20.56	45.08	76.07	86.89	87.07	86.79a	0.149bc
		7.20	14.42	21.66	40.97	70.58	85.63	86.46	86.00a	0.160b
		9.01	11.95	17.83	31.09	50.00	77.44	88.64	85.32a	0.210a
		9.98	15.17	20.13	30.94	49.38	76.01	80.68	80.80b	0.225a
胡红 Huhong		11.43	17.93	25.69	55.76	72.10	87.29	88.34	87.87a	0.107d
		11.66	16.34	24.17	46.65	74.59	88.92	89.35	88.84a	0.126cd
		13.00	16.98	21.66	40.32	71.09	88.27	87.96	88.13a	0.147c
		10.94	14.47	19.06	40.44	65.42	87.40	88.05	87.37a	0.158c
		7.90	12.71	19.02	35.16	60.76	85.81	86.57	86.01a	0.189b
		9.56	12.78	19.25	33.24	57.56	86.80	86.18	86.76a	0.193a

注: 不同字母表示 0.05 水平上的差异。

Note: Different letters indicate significance at the 0.05 level

2.4 清除超氧阴离子和羟自由基活性的变化

2.4.1 清除超氧阴离子活性

由图 2 可以看出, 露色期 ‘洛阳红’ 花瓣提取液清除超氧阴离子的活性最大值为 62.5%, 随花朵的开放逐渐下降; ‘胡红’ 开花前期逐渐升高, 初开期达到最大值 56.04%, 开放后迅速下降; 开花后 ‘洛阳红’ 明显高于 ‘胡红’, 开始衰败期比 ‘胡红’ 高 25.65%。

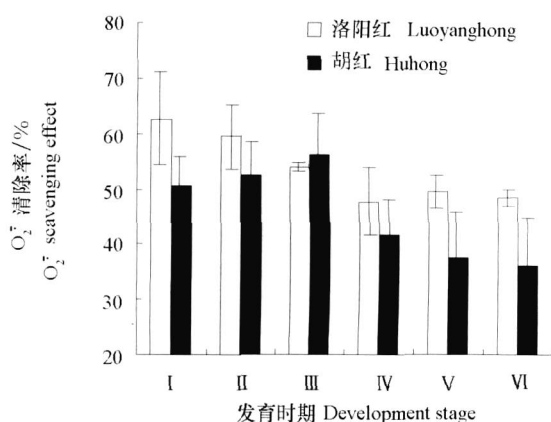
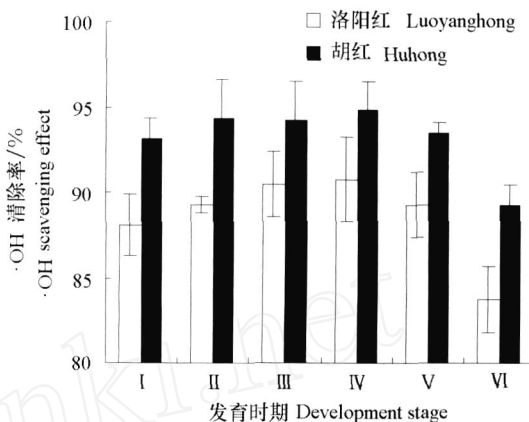
图2 牡丹花提取液清除 O₂^{·-} 活性的变化Fig. 2 Scavenging activity of peonies extracts on O₂^{·-}

图3 牡丹花提取液清除 ·OH 活性的变化

Fig. 3 Scavenging activity of peonies extracts on ·OH

2.4.2 清除羟自由基活性

由图 3 可以看出, ‘洛阳红’ 和 ‘胡红’ 开花期之前清除羟自由基活性逐渐升高, 半开期达到最大后迅速下降, ‘胡红’ 在各个发育时期均显著高于 ‘洛阳红’。

2.5 多酚含量与清除 DPPH 自由基活性的关系

‘洛阳红’ 和 ‘胡红’ 花瓣多酚含量与清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 之间呈现量效关系。相关分析表明多酚含量与 IC_{50} 之间存在显著负相关, 即多酚含量与清除 DPPH 自由基的活性存在显著正相关, 相关系数分别达到 0.990 和 0.963 ($P < 0.05$)。这一结果与曾佑炜等 (2004)、冯志文等 (2009) 的结论相一致。

3 讨论

本研究结果表明, 牡丹花瓣富含黄酮和酚类化合物, 其提取液初步显示出良好的抗氧化功效, 可以作为天然的抗氧化剂来源。本研究结果为进一步探讨牡丹花瓣的生物活性提供了科学依据。

有许多研究将植物体内的某一种酶或某一种非酶成分作为其衰老的指标, 显然具有很大的局限性。反映机体防御氧化损伤能力的总抗氧化活性的变化, 可表示机体总的保护能力的变化。植物开花后总抗氧化活性的逐渐下降, 则可说明其内部总的防御能力的下降。通过测定牡丹花提取液在卵磷脂蛋白 PUFA 过氧化体系中 AOA 的变化、清除 DPPH 自由基、清除超氧阴离子和羟自由基活性的变化, 表明牡丹花发育过程中抗氧化活性发生了显著变化, 两个品种总的趋势是开花后抗氧化活性明显降低。目前, 通过含抗氧化剂、自由基清除剂的各种综合保鲜剂的研究与应用已经取得显著成效 (高勇和吴绍锦, 1989; 郭秀璞等, 2005; 陈健辉等, 2006)。而从营养学上考虑, 牡丹花瓣作为天然抗氧化剂的原料, 应在生物学产量和抗氧化活性比较高的初开期到盛开期采收为宜。

References

- Chen Jian-hui, Chen Run-jian, Xie Hong 2006 Study the preservative effect of sodium benzoate on the cut flowers Guangxi Sciences, 13 (1): 65 - 70. (in Chinese)
- 陈健辉, 陈润坚, 谢 鸿. 2006 含苯甲酸钠保鲜剂对切花的保鲜效果研究. 广西科学, 13 (1): 65 - 70.
- Feng Zhi-wen, Yang Xia-guang, Pan Jian, Ren Guang-hui, Zhang Er-xi, Fan Bing-you, Shi Guo-an 2009. Antioxidation analysis of extracts from petals of 6 tree peonies *in vitro* J Northwest A & F University: Nat Sci Ed, 37 (1): 205 - 210. (in Chinese)
- 冯志文, 杨霞光, 潘 剑, 任光辉, 张二喜, 范丙友, 史国安. 2009. 6个品种牡丹花瓣的抗氧化活性分析. 西北农林科技大学

学报: 自然科学版, 37 (1): 205 - 210.

Gao Yong, Wu Shao-jin 1989. A review of cut flower preservatives. *Acta Horticulturae Sinica*, 16 (2): 139 - 145. (in Chinese)

高 勇, 吴绍锦. 1989. 切花保鲜剂研究综述. *园艺学报*, 16 (2): 139 - 145.

Guo Xiu-pu, Shi Guo-an, Li Xue-ying 2005. Effect of freshness-retention agent on water metabolism in peony cut flowers. *Economic Forest Researches*, 23 (2): 27 - 29. (in Chinese)

郭秀璞, 史国安, 李雪英. 2005. 保鲜剂对牡丹切花水分状况及衰老的影响. *经济林研究*, 23 (2): 27 - 29.

Larrauri J A, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *J Agric Food Chem*, 46 (7): 2694 - 2697.

Lin Zhi-fang, Li Shuang-shun, Zhang Dong-lin, Lin Gui-zhu, Li Yue-biao, Liu Shu-xian, Chen Mian-da 1988. The changes of pigments, phenolics contents and activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in pericarp of postharvest litchi fruit. *Acta Botanica Sinica*, 30 (1): 40 - 45. (in Chinese)

林植芳, 李双顺, 张东林, 林桂珠, 李月标, 刘淑娴, 陈绵达. 1988. 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化. *植物学报*, 30 (1): 40 - 45.

Peng Chang-lian, Chen Shao-wei, Lin Zhi-fang, Lin Gui-zhu 2000. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH. *Prog Biochem Biophys*, 27 (6): 658 - 661. (in Chinese)

彭长连, 陈少薇, 林植芳, 林桂珠. 2000. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力. *生物化学与生物物理进展*, 27 (6): 658 - 661.

Que F, Mao L C, Zheng X J. 2007. *In vitro* and *vivo* antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16 (Suppl 1), 196 - 203.

Shi Guo-an, Guo Xiang-feng, Zhang Guo-hai, Zhang Yin-min 2000. Analysis of contents of poly-phenolic active ingredients and antioxidant activities in fruits of *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai. *J Plant Resource & Environment*, 9 (3): 57 - 58. (in Chinese)

史国安, 郭香凤, 张国海, 张益民. 2000. 沙梨果实多酚类活性成分及抗氧化活性分析. *植物资源与环境学报*, 9 (3): 57 - 58.

Shi Guo-an, Guo Xiang-feng, Bao Man-zhu 2008. Correlation analysis of lipid peroxidation metabolism during florescence and flower senescence of peony. *J Northwest A & F University: Nat Sci Ed*, 36 (8): 183 - 189. (in Chinese)

史国安, 郭香凤, 包满珠. 2008. 牡丹花不同发育时期脂质过氧化代谢的相关性研究. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 36 (8): 183 - 189.

Smimoff N, Cumbes Q J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem*, 28 (4): 1057 - 1060.

Stewart R C, Bewley J D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 65 (2): 245 - 248.

Zeng You-wei, Xu Liang-xiong, Peng Yong-hong 2004. Comparative study on free radical scavenging activities of 45 fresh flowers. *Chin J Appl Environ Biol*, 10 (2): 699 - 702. (in Chinese)

曾佑伟, 徐良雄, 彭永宏. 2004. 45种花卉清除自由基能力的比较. *应用与环境生物学报*, 10 (6): 699 - 702.

Zhang Er-xian, Yu Li-jun, Zhou Yi-lin, Xiao Xiang 1996. Studies on the peroxidation of polyunsaturated fatty acid from lipoprotein induced by iron and the evaluation of the anti-oxidative activity of some natural products. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 28 (2): 218 - 222. (in Chinese)

张尔贤, 俞丽君, 周意琳, 肖 湘. 1996. Fe^{2+} 诱发脂蛋白 PUFA 过氧化体系及对若干天然产物抗氧化作用的评价. *生物化学与生物物理学报*, 28 (2): 218 - 222.