

Free Radical Scavenging Activity and Quantification of Flavonoids in Eagle Tea

by

Meng Qiong

Master of Science

2010



**Institute of Chinese Medical
Sciences
University of Macau**

Free Radical Scavenging Activity and Quantification of Flavonoids in Eagle Tea

by

Meng Qiong

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau

2010

Approved by _____
Supervisor

Date _____

In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address:

Telephone:

Fax:

E-mail:



Signature _____

Date _____

硕士学位论文

老鹰茶黄酮类成分抗氧化活性及定量测定

研究生姓名：孟 琼
导 师：李绍平 教授
专 业：中 药 学
日 期：2010. 6



澳门大学中华医药研究院

致 谢

值此论文完成之际,衷心感谢导师李绍平教授在实验研究期间给予的悉心指导。导师精益求精的科学作风、严谨的治学态度和忘我的工作精神都使我终生难忘,更是我在今后工作中学习的榜样。在此,衷心地向导师李绍平教授表示感谢!

衷心感谢澳门大学中华医药研究院院长王一涛教授给予我在这里学习的机会,使我增长了知识和实验技能,更使我提高了研究事物及解决问题的能力,再次感谢王一涛教授在澳门大学学习期间对我的指导和关怀。

感谢澳门大学中华医药研究院指导老师张庆文博士、燕茹博士、李铭源博士、郑颖博士、许贝文博士和赵静博士在基础理论知识和技能的传授与指导;特别感谢黎畅明老师在仪器操作和仪器维修上的指导和帮助,使得实验能够顺利完成。

特别感谢澳门大学中华医药研究院的钱正明师兄在实验上的帮助及在论文修改上给予的指导。感谢杨丰庆师兄、管佳师兄、冯昆师兄、陈肖家师姐、李德强师兄、黄卫华师兄、李静师姐、孟兰贞师姐对实验的帮助;特别怀念在澳门大学中华医药研究院和我一起共同度过两年学习生涯的吕广萍、胡德俊、许军、杨静,与他们的交流使我受益匪浅,感谢他们对我的关心和真诚的帮助!

特别衷心感谢父母的养育之恩及对我到澳门大学学习的支持与鼓励,感谢家人对我无微不至的关心和照顾!

最后,再次向所有关心帮助过我的老师、同学、朋友致以最诚挚的谢意!

摘要

老鹰茶始载于《本草纲目》，是樟科木姜子属植物毛豹皮樟 *Litsea coreana* Levl. var. *lanuginosa* (Migo) Yang et. P. H. Huang 的干燥叶，具有止咳、祛痰、平喘、解毒消肿、提神益智、散瘀止痛、明目益思、生津止渴、解表防暑等功效。老鹰茶是中国西南地区（贵州、云南、四川）和华东地区（安徽）民间广泛饮用的一种饮品，应用已有数百年历史。由于其具有其它茶饮品所不具备的止咳平喘功效，为了阐明其药效物质基础，从二十一世纪初期，人们就开始对老鹰茶的化学、药理进行了研究。然而目前对于老鹰茶的药效基础研究只局限于总黄酮或者总提物的药理活性，其具体活性成分尚未阐明。因此本课题以老鹰茶为研究对象，应用现代化学分离技术对老鹰茶进行植物化学的研究，并在植物化学研究的基础上运用高效液相色谱技术对老鹰茶黄酮类成分进行了定量分析；此外，通过 HPLC 生物活性检测联用的方法分析了老鹰茶中的抗氧化活性成分。

本论文包括四个章节。第一章介绍本课题的研究背景，并在已有报导的研究方法和数据基础上，从化学成分、药理作用等方面对老鹰茶进行了总结，提出本课题的立题基础和研究可行性。

第二章老鹰茶黄酮类成分的分离和鉴定。利用硅胶色谱，凝胶色谱和制备高效液相色谱技术对老鹰茶进行了系统分离，从而得到了 5 个单体黄酮。并通过紫外光谱、质谱、核磁共振氢谱和碳谱的方法对其进行了结构鉴定。5 个黄酮分别被鉴定为金丝桃苷（槲皮素-3-O- β -D-半乳糖苷），异槲皮苷（槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷），山柰酚-3-O- β -D-半乳糖苷，槲皮苷（槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷）和紫云英苷（山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖苷）；其中，槲皮苷为首次在老鹰茶中分离得到。

第三章运用加压溶剂提取和高效液相色谱技术对老鹰茶中 7 个黄酮类成分（金丝桃苷，异槲皮苷，山柰酚-3-O- β -D-半乳糖苷，槲皮苷，紫云英苷，槲皮素，山柰酚）进行了定量分析，为老鹰茶的质量控制提供了稳定可靠的分析方法。

第四章是基于 HPLC 与 ABTS 在线抗氧化联用技术对老鹰茶中黄酮类成分的抗氧化活性成分进行了筛选，结果显示金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮

苷、槲皮素和山柰酚均具有抗氧化活性。

关键词：老鹰茶，黄酮类，化学分离，HPLC，质量控制，ABTS，抗氧化



Abstract

Eagle tea, the leaf of *Litsea coreana* Levl. var. *lanuginosa* (Migo) Yang et. P. H. Huang (family Lauraceae), is a well-known traditional beverage in south of China. Since first recorded in compendium of materia medica (*bencao gangmu*), Eagle tea had been used for antitussive, antiasthmatic prescriptions, detoxification, detumescence, refreshment, improving eyesight, promoting blood circulation therapy, relief heatstroke for hundreds years. Furthermore, as routine beverage, Eagle tea is widely used in southwest (Guizhou province, Yunnan province, Sichuan province) and east (Anhui province) of China. In recent years, Eagle tea had attracted more attention because of its beneficial health effects and special taste. However, the study of pharmacological activities was limited to total extracts and total flavonoids of Eagle tea, and bioactive compound of Eagle tea was still unclear. Thus, the objective of present study was to investigate the chemical components in Eagle tea and develop a valid method for quality control of Eagle tea. In addition, antioxidants in Eagle tea was also investigated in present study.

The dissertation consists of four chapters. **Chapter I** reviewed the chemical and pharmacological of Eagle tea.

Chapter II showed the chemical study of flavonoids in Eagle tea. The separation of Eagle tea extract was carried out by using silica gel column, pre-HPLC and sephadex chromatography. Five compounds were isolated from Eagle tea extract and their structures were identified as hyperin (quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside), isoquercitrin (quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside), kaempferol-3-O- β -D-galactopyranoside, quercitrin (quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside), astragalin (kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside) by MS, UV and NMR data. The quercitrin was firstly isolated from Eagle tea.

Chapter III A pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography coupled with diode array detection method was developed for simultaneous determination of seven flavonoids (hyperin, isoquercitrin, kaempferol-3-O- β -D-galactopyranoside, quercitrin, astragalin, quercetin and kaempferol) in Eagle tea. This method is help to control the quality of eagle

tea.

In **Chapter IV**, online HPLC–DAD-MS couple with 2,2’-Azinobis (3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) diammonium salt (ABTS) assay were established for investigating antioxidant activity of flavonoids in Eagle tea, and hyperin, isoquercitrin, quercitrin, quercetin and kaempferol showed the activity.

Key words: Eagle tea; Flavonoids; Chemical isolation; HPLC; Quality control; ABTS; Antioxidants.



论文目录

英文缩略词对照表	16
第一章 老鹰茶化学成分及药理作用的研究进展	17
1. 老鹰茶化学成分的研究现状	17
1.1 黄酮类成分	17
1.2 挥发油类成分	18
1.3 氨基酸及维生素类成分	18
1.4 矿物质类成分	18
1.5 其它成分	19
2. 老鹰茶药理研究	19
2.1 抗癌、抗突变作用	19
2.2 治疗佐剂性关节炎作用	20
2.3 保肝作用	20
2.4 免疫调节作用	21
2.5 降血糖作用	22
2.6 抗炎作用	22
2.7 抗氧化作用	22
第二章 老鹰茶黄酮类成分的化学分离与鉴定	24
1. 仪器、试药与样品	24
1.1. 仪器	24
1.2. 试药	24
1.3. 样品	25
2. 分离流程	25
2.1. 老鹰茶黄酮类成分的提取	25
2.1.1. 石油醚萃取	25
2.1.2. 硅胶柱分离	25
2.1.3. 单体分离	25
3. 结构鉴定	27
4. 讨论	31

第三章 HPLC 法同时测定老鹰茶中 7 个黄酮类成分的含量	32
1. 仪器、试药与样品	33
1.1. 仪器	33
1.2. 试药	33
1.3. 样品	34
2. 方法与结果	34
2.1. 对照品溶液的制备	34
2.2. 供试品溶液的制备	34
2.3. 色谱条件	35
2.4. 标准曲线的制备	35
2.5. 精密度考察	37
2.6. 重复性考察	39
2.7. 加样回收率考察	40
2.8. 样品测定	41
3. 讨论	43
3.1. PLE 提取方法的优化	43
3.2. 检测波长的选择	44
3.3. 分离条件的选择	45
3.3.1. 色谱柱的选择	45
3.3.2. 流动相的选择	45
3.4. 样品分析	45
1.2 老鹰茶抗氧化活性的体外测定	47
1.1. 仪器与试药	47
1.1.1. 仪器	47
1.1.2. 试药	48
1.1.3. 样品	48
1.1.4. 数据处理	48
1.2. 方法与结果	48
1.3.1 DPPH 自由基清除实验	48
1.3.1.1 DPPH 溶液的配制	48

1.3.1.2 样品溶液和阳性对照 Vc 的制备	48
1.3.1.3 样品测定	49
1.3.1 ABTS 自由基清除实验	52
1.3.1.1 ABTS•+反应液的制备	52
1.3.1.1 样品溶液和阳性对照 Vc 的制备	52
1.3.1.1 样品测定	52
1.3. 讨论与小结	55
1.3.1 DPPH 自由基清除实验	55
1.3.1.1 检测波长的选择	55
1.3.1.2 测定时间的选择	55
1.3.1.3 样品测定结果	55
1.3.2 ABTS 自由基清除实验	55
1.3.2.1 检测波长的选择	55
1.3.2.2 测定时间的选择	56
1.3.2.3 样品测定结果	56
2. HPLC-ABTS 联用检测老鹰茶抗氧化活性成分	56
2.1 仪器与试药	56
2.1.1 仪器	56
2.1.2 试药	57
2.1.3 样品	57
2.2 方法与结果	57
2.2.1 实验装置	57
2.2.2 ABTS•+反应液的制备	58
2.2.3 老鹰茶样品的 HPLC-ABTS 在线活性检测及抗氧化成分的鉴定	58
2.3 讨论与小结	61
2.3.1 在线抗氧化系统检测试剂的选择	61
2.3.2 HPLC-DAD-ABTS 在线抗氧化色谱条件的选择	61
2.3.3 抗氧化物质的确定	61
2.3.4 黄酮类化合物抗氧化作用的构效关系	61
2.3.4.1 羟基的位置	62

2.3.4.2 羟基的数目	62
2.3.4.3 C2、C3 双键的作用	63
结语	64
参考文献	65
附录 化合物的结构式、MS、UV 数据和 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图 ..	74
硕士期间论文及出版物发表情况	94



论文图表目录 (1)

图 2.1	老鹰茶化合物分离流程图	27
图 3.1	我国老鹰茶的主要产地	33
图 3.2	老鹰茶 7 个待测成分标准曲线	37
图 3.3	对照品(A)和老鹰茶样品(B、C、D、E)的 HPLC 色谱图	42
图 3.4	PLE 参数优化	44
图 4.1	老鹰茶样品浓度及其与 DPPH 自由基清除率(%)的关系	50
图 4.2	老鹰茶样品浓度及其与 ABTS 自由基清除率(%)的关系	53
图 4.3	HPLC-ABTS 在线抗氧化系统结构示意图	57
图 4.4	对照品(A)和老鹰茶样品(B)的 HPLC-DAD-ABTS 色谱图	59
图 4.5	黄酮类化合物结构图	62



论文图表目录 (2)

表 3.1	7 个待测成分回归方程及检测限和定量限	36
表 3.2	7 个待测成分日内精密度	38
表 3.3	7 个待测成分日间精密度	39
表 3.4	样品重复性	40
表 3.5	7 个待测成分加样回收率	41
表 3.6	样品测定结果	43
表 4.1	样品浓度及其对 DPPH 自由基的清除率(%)	51
表 4.2	样品对 DPPH 自由基清除率(%)的线性方程、线性范围、回归系数、 IC_{50}	51
表 4.3	样品浓度及其对 ABTS 自由基的清除率(%)	54
表 4.4	样品对 ABTS 自由基清除率(%)的线性方程、线性范围、回归系数、 IC_{50}	54
表 4.5	老鹰茶化学成分的 MS 和 UV 数据	60

英文縮略詞對照表

縮寫	英文全稱	中文全稱
ABTS	2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) Diammonium Salt	2,2'-連氮基-雙(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸) 雙銨鹽
ASE	Accelerated Solvent Extraction	加壓溶劑提取
CL	Chemiluminescence Detection	化學發光檢測器
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	二苯代苦味酰自由基
DAD	Diode Array Detector	二極管陣列檢測器
pre-HPLC	Preparative High Performance Liquid Chromatography	制备高效液相色譜
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色譜
IC ₅₀	The Concentration that Providing 50% Inhibition	清除率為 50%時所需的 抗氧化劑的濃度
LOD	Limit of Detection	最低檢測限
LOQ	Limit of Quantitation	最低定量限
MS	Mass Spectrometry	質譜
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振
PDA	Photo Diode Array Detectors	光电二極管陣列檢測器
PLE	Pressurized Liquid Extraction	加壓溶劑提取
RSD	Relative Standard Deviation	相對標準偏差
SD	Standard Deviation	標準偏差
UV-VIS	Ultraviolet-Visible Spectrophotometry	紫外-可見分光光度
Vc	Vitamin C, L-Ascorbic acid	維生素 C