

赖红芳,潘立卫. 翠云草不同溶剂提取物的抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):307-309.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.101

翠云草不同溶剂提取物的抗氧化性

赖红芳,潘立卫

(河池学院化学与生命科学系,广西宜州 546300)

摘要:为研究不同溶剂提取翠云草(*Selaginella uncinata*)的总酚、黄酮含量及提取液的抗氧化性,分别用水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯提取翠云草中的活性物质,采用普鲁士蓝法、三氯化铝显色法分别测定不同提取物中总酚、黄酮的含量;应用清除 DPPH 自由基、Marklund 法、水杨酸法、铁氰化钾还原法考察不同溶剂提取物的抗氧化活性。试验结果表明:水提取物中总酚含量最高,为 (118.19 ± 0.27) mg/g;甲醇提取物中黄酮含量最高,为 (354.08 ± 0.21) mg/g,甲醇提取物的抗氧化性最好。得出结论:60% 甲醇可作为翠云草抗氧化活性物质提取的优选溶剂,而总酚、黄酮含量可作为翠云草抗氧化提取物的质量评价指标。

关键词:翠云草;黄酮;总酚;抗氧化;还原能力

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0307-03

翠云草(*Selaginella uncinata*)为卷柏科卷柏属植物,具有清热利湿、止血、止咳等功效,可用于治疗急性黄疸型传染性肝炎、胆囊炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿、泌尿系统感染、风湿关节痛、肺结核咯血,并可外用治疗肿毒、烧烫伤、外伤出血、跌打损伤^[1]。主要成分为黄酮类、多糖、少量糖苷类等物质^[2-3],其中黄酮类成分有抗肿瘤、抗氧化、抗血栓、扩张血管等作用^[4-5]。生物体在自身新陈代谢过程中会产生大量活性氧自由基,若这些自由基无法通过正常途径及时清除,就会引发各种疾病。而天然抗氧化成分通过捕捉自由基来停止其连锁反应,从而避免对活细胞的进一步伤害。通过研究黄酮类抗氧化剂的作用机制发现,它通过酚羟基与氧自由基反应生成较稳定的半醌式自由基,从而中止链式反应^[6]。许多植物都具有抗氧化活性和清除氧自由基的能力,主要抗氧化成分是多酚类化合物和类黄酮等。本试验以不同溶剂提取翠云草中酮、酚含量的测定及提取物抗氧化性的研究为目标;以芸香苷和没食子酸为对照绘制标准曲线,采用 UV 法对黄酮、总酚含量进行测定;以提取物为研究对象,研究不同溶剂提取物对 DPPH、羟基、过氧基的清除率以及提取物的还原能力。本试验为翠云草提取物的抗氧化性研究提供一定的参考。

1 试验材料与仪器

1.1 试验材料

翠云草采自宜州市,经鉴定为翠云草。

1.2 试剂

芸香苷标准品(上海源叶生物科技有限公司);无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、NaOH、没食子酸、

FeCl_3 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、浓 HCl、DPPH、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、水杨酸、3% H_2O_2 、Tris-HCl、 Cl_3CCOOH 、维生素 C、BHT、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾均为分析纯。

1.3 试验仪器

AE240S 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);2802 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER 型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

2 试验方法

2.1 预处理过程

置翠云草于真空干燥箱中 40 ℃ 干燥 24 h 后,用粉碎机粉碎,称取 50 g 翠云草粉末于大烧杯中,用无水乙醇浸泡 12 h,进行脱脂、除叶绿素,抽滤并收集滤渣,晾干备用。

2.2 样品溶液的制备

准确称取 4 份翠云草,每份 10 g,按料液比 1 g:30 mL 分别加入水、60% 甲醇、60% 乙醇、乙酸乙酯于 500 mL 圆底烧瓶中,回流 2 次,每次 1.5 h。趁热抽滤并合并滤液,得不同溶剂的提取液,用旋转蒸发仪旋转滤液浓缩近干,用少量 60% 乙醇转移至小烧杯中,真空干燥不同溶剂的提取物。称取干燥后的各提取物,用 60% 乙醇溶解,配成质量浓度为 5.0 mg/mL 的母液,置于 -4 ℃ 冰箱保存备用。

2.3 黄酮含量的测定

芸香苷标准曲线的绘制:依据文献[7]绘制芸香苷标准曲线,得到芸香苷浓度(mg/mL)与吸光度值的回归方程: $D = 10.518C - 0.0029$ ($r = 0.9996$)。表明线性范围在 0.000 ~ 0.024 mg/mL。

黄酮含量的测定:精确吸取 2.5 mL 不同溶剂翠云草待测液于 25 mL 容量瓶中,按照上述标准曲线进行测定,可得翠云草不同提取物黄酮的质量浓度,从而得到不同溶剂提取翠云草中黄酮的含量。

收稿日期:2014-09-29

基金项目:广西教育厅科研项目(编号:201106LX584);河池学院科研重点项目(编号:2013ZA-N004)。

作者简介:赖红芳(1975—),女,广西柳州人,副教授,主要从事天然产物提取及化学成分分析研究。Tel:(0778)3141892;E-mail:laihongfang263@163.com。

2.4 多酚含量的测定

没食子酸标准曲线的绘制:依据文献[8]绘制没食子酸标准曲线,得回归方程: $y=238.57x+0.0155(r=0.9995)$,式中: y 为吸光度值; x 为没食子酸浓度(mg/mL)。表明线性范围在0.000~0.004 mg/mL。

精确吸取0.25 mL不同溶剂翠云草待测液于25 mL容量瓶中,按照上述标准曲线进行测定,可得翠云草不同提取物多酚的质量浓度,从而得到不同溶剂提取翠云草中多酚的含量。

2.5 抗氧化活性的测定

2.5.1 不同质量浓度提取物的配制 分别吸取2.5、5.0、10.0、20.0 mL不同提取物的母液,用60%乙醇稀释,转移至25 mL容量瓶中,并用60%乙醇定容至刻度,摇匀,静置。分别得到0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mg/mL不同质量浓度的样液。

2.5.2 清除 DPPH 自由基的测定 采用 DPPH 法:准确吸取2 mL一定浓度的翠云草提取液于5 mL比色管中,加入浓度为0.1 mmol/mL的DPPH溶液2 mL,用无水乙醇定容至刻度,摇匀后置于室温密闭静置30 min,用无水乙醇作空白校正,在517 nm波长处测定吸光度,将各提取液的清除率与BHT对比。根据下列公式计算不同质量浓度的翠云草提取液对DPPH自由基的清除率:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{D_1 - D_2}{D_0}) \times 100\%。$$

式中: D_1 为加提取液后DPPH溶液的吸光度; D_2 为提取液的吸光度; D_0 为未加提取液时DPPH溶液的吸光度^[9]。

2.5.3 清除过氧自由基的能力测定 采用 Marklund 法:分别向比色管中加入3 mL、pH值8.2、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液,以及0.2 mL不同浓度的提取液,置于25℃恒温10 min,然后加入0.2 mL、25℃预温的60 mmol/L没食子酸,并用60%乙醇定容至5 mL,摇匀后静置15 min,进行比色测定。以蒸馏水为空白对照,波长为420 nm,隔30 s测定1次,连续测3 min。将各提取液的清除率与维生素C对比,以过氧自由基的抑制率表示样品清除过氧自由基的能力^[10],计算公式为:

$$\text{抑制率} = (\frac{v_0 - v}{v_0}) \times 100\%。$$

式中: v_0 为没食子酸自氧化速率,即 D_0-t 曲线拟合斜率; v 为添加提取液的氧化速率,即 $D-t$ 曲线拟合斜率; D_0 为不添加提取液的吸光度; D 为添加提取液的吸光度; t 为测定时间(s)。

2.5.4 清除羟自由基的能力测定 采用水杨酸法^[11]:准确吸取2 mL不同浓度提取液于10 mL比色管中,依次加入1 mL的3% H₂O₂、1 mL 9 mmol/L的Fe²⁺、1 mL 9 mmol/L的水杨酸-乙醇溶液,用60%乙醇定容,摇匀并静置10 min。与试剂空白液作比较,在510 nm处测吸光度以得到各提取液的清除率,并将其与BHT对比,计算公式为:

$$\text{清除率} = (\frac{D_0 - D_x}{D_0}) \times 100\%。$$

式中: D_0 为试剂空白液的吸光度; D_x 为加有提取液的吸光度。

2.5.5 还原能力测定 采用铁氰化钾还原法:向3.0 mL、pH值6.6的磷酸缓冲溶液中分别加入1 mL提取物溶液、1 mL

1%铁氰化钾,置于50℃恒温下加热20 min。之后急速冷却,加入2.5 mL 10%三氯乙酸,离心分离10 min。取上层清液5 mL,加入5 mL水、1 mL 0.1% FeCl₃,均匀混合,静置10 min后于波长700 nm处测吸光度。将各提取液的还原性与BHT对比,A值越大则样品的还原能力越强^[12]。

3 结果与分析

3.1 翠云草提取物中的有效成分含量

由表1可知,随提取溶剂的不同,翠云草中总酚、黄酮含量也不同。对于多酚的提取,水提取物的含量最高,为(188.19±0.27) mg/g。多酚含量随提取剂极性的减小而逐渐降低,依次为甲醇提取物、乙醇提取物,乙酸乙酯提取物的含量最低,仅为(5.15±0.15) mg/g。对于黄酮的提取,甲醇提取物的含量最高,为(354.08±0.21) mg/g,其次为乙醇提取物、水提取物、乙酸乙酯提取物,含量分别为(225.79±0.15)、(200.73±0.32)、(9.90±0.18) mg/g。

表1 不同提取溶剂的翠云草黄酮和多酚测定结果(n=3)

提取溶剂	总酚含量 (mg/g)	黄酮含量 (mg/g)
水	188.19±0.27	200.73±0.32
甲醇	112.53±0.38	354.08±0.21
乙醇	81.37±0.19	225.79±0.15
乙酸乙酯	5.15±0.15	9.90±0.18

3.2 提取物清除 DPPH 自由基能力的测定

由图1可知,不同溶剂提取物都有较好的DPPH自由基清除能力,清除率随浓度的增大而增大,在浓度0.2~2.0 mg/mL范围内呈量效关系,各不同溶剂提取物清除率均低于BHT,各提取物清除DPPH自由基能力顺序为:BHT>甲醇提取物>乙醇提取物>水提取物>乙酸乙酯提取物。

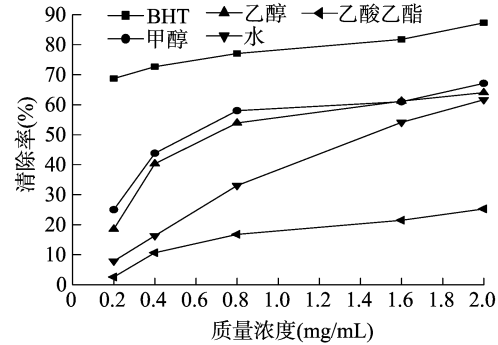


图1 不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基的能力

3.3 提取物清除过氧自由基能力的测定

由图2可知,不同溶剂提取物对过氧自由基的抑制能力强弱不一,在浓度0.02~0.20 mg/mL范围内呈现一定量效关系,其中维生素C对过氧自由基的抑制率最高,乙酸乙酯提取物抑制率最低。各物质对过氧自由基的抑制能力顺序为:维生素C>甲醇提取物>乙醇提取物>水提取物>乙酸乙酯提取物。

3.4 提取物清除羟自由基能力的测定

由图3可知,不同溶剂提取物对羟自由基均有一定的抑制能力,除水提取物外,其他各提取物对羟自由基抑制率与浓

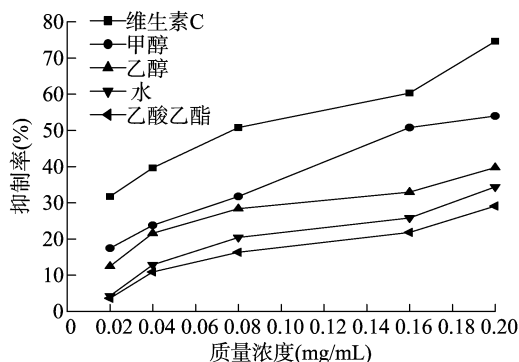


图2 翠云草提取物对过氧自由基的抑制率

度的关系并不明显。其中,甲醇提取物、乙醇提取物具有较高的抑制率,但均低于 BHT,而水提取物在浓度 0.1 ~ 1.0 mg/mL 范围内呈明显的量效关系。各物质对羟自由基的抑制能力顺序为: BHT > 甲醇提取物 > 乙醇提取物 > 水提取物 > 乙酸乙酯提取物。

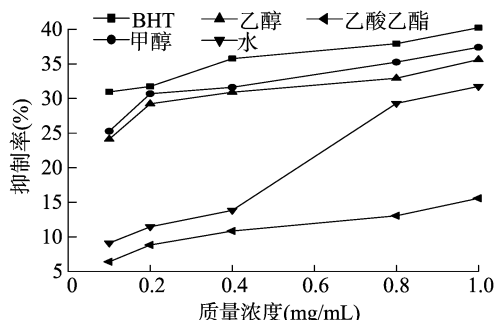


图3 翠云草提取物对羟自由基的抑制率

3.5 提取物还原能力的测定

由图 4 可知,翠云草的不同溶剂提取物均具有一定的还原能力,并随浓度的增大而增大,当浓度低至 0.05 ~ 0.20 mg/mL 时,甲醇、乙醇、水提取物的还原能力相当,乙酸乙酯提取物的还原能力最差。还原能力大小依次为: BHT > 甲醇提取物 > 乙醇提取物 > 水提取物 > 乙酸乙酯提取物。

4 结论与讨论

本研究以不同溶剂对翠云草回流的方法提取黄酮和总酚,采用邻苯三酚自氧化法、DPPH 法、清除羟基法、铁氰化钾还原法^[13] 4 种国内外常用体外抗氧化活性检测方法,对宜州翠云草水提取物、60% 乙醇提取物、60% 甲醇提取物、乙酸乙酯提取物的抗氧化性进行化学评价。结果表明,翠云草提取物具有一定的抗氧化性,虽然清除 DPPH 基、羟基、过氧基的能力以及还原能力各不相同,但其能力趋势大致相同。翠云

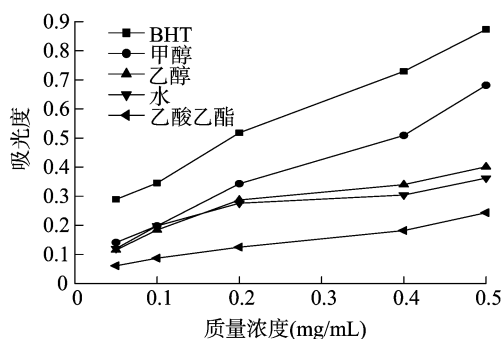


图4 翠云草提取物的还原能力

草在我国分布较广,本身具有一定药用价值,且在食品抗氧化添加剂、化妆品等方面均有应用,因此,对翠云草抗氧化性的进一步研究将具有重要科学意义。

参考文献:

- [1] 王钢力. 春根藤化学成分的研究,翠云草等卷柏属植物的黄酮类成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2001:1-78.
- [2] 赖红芳,温晓娟. 果胶酶法提取翠云草中总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):34-36.
- [3] 郑俊霞,王乃利,陈海峰,等. 翠云草中酚性成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2007,17(5):302-305.
- [4] 宋慧,李勇. 黄酮类化合物的保健作用[J]. 中国食物与营养,2004(11):45-47.
- [5] 赵军. 黄酮类化合物的抗氧化作用机制[J]. 华北煤炭医学院学报,2003,5(3):306-307.
- [6] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [7] Awah F N, Ifeonu P. Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants[J]. Food Chemistry, 2012, 131(4):1279-1286.
- [8] 赖红芳,韦瑞松,黄秀香. 扶芳藤多酚的微波辅助提取和含量测定[J]. 河池学院学报,2008,28(5):109-111.
- [9] Huang H L, Li D L, Li X M, et al. Antioxidative principals of *Jussiaea repens*: an edible medicinal plant[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42(10):1219-1227.
- [10] 谢佳,张静,柳红. 南瓜多糖硫酸酯化衍生物的制备及抗氧化研究[J]. 食品工业科技,2008,29(9):60-62.
- [11] 张昊,任发政. 羟基和超氧自由基的检测研究进展[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(4):1093-1099.
- [12] 何健,黄占旺,吴进菊,等. 曲霉型豆豉类黑精的抗氧化活性研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(5):776-779.
- [13] 余海忠,刘统,林丹洁,等. 鄂西北产鱼腥草提取物体外抗氧化性的四种化学方法评价[J]. 中国野生植物资源,2012,31(1):22-25.