

绞股蓝有效成分的提取及抗氧化能力的研究

刘鑫燕, 魏金美, 周蓉 (南通大学生命科学学院, 江苏南通 226007)

摘要 [目的] 比较2种绞股蓝提取物的抗氧化能力。[方法] 采用不同溶剂对2种绞股蓝进行有效成分的提取, 对提取物中总黄酮进行鉴定, 并对其含量进行测定, 同时对不同提取物清除超氧阴离子自由基的能力进行研究。[结果] 最优提取方案为无水乙醇于90℃回流提取2 h。据初步鉴定, 绞股蓝提取物中含有黄酮以及其他黄酮类化合物。无论是野生型绞股蓝还是栽培型绞股蓝, 无水乙醇提取物对超氧阴离子自由基的清除作用强于其他溶剂提取物, 且野生型绞股蓝中无水乙醇提取物清除能力较强, 在浓度为0.6 ng/ml时反应30 min, 对超氧阴离子自由基的清除率可达51.20%。无水乙醇、浓度75%乙醇和水的提取物对超氧阴离子自由基的清除能力均强于维生素C。[结论] 野生绞股蓝提取物抗氧化性稍高于人工栽培的绞股蓝, 但2种绞股蓝抗氧化效果差异并不大, 说明南通地区的土壤等环境适合绞股蓝的生长。

关键词 绞股蓝; 超氧阴离子自由基; 清除能力

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13670-03

Study on Effective Components Extraction and Antioxidant Capacities of *Gynostemma pentaphyllum Makino*

LIU Xin-yan et al (School of Life Science, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226007)

Abstract [Objective] The research aimed to compare antioxidant capacities of two kinds of extracts in *Gynostemma pentaphyllum Makino*. [Method] Scavenging effects on free oxygen radicals of the active fractions, which were extracted with different solvents from two kinds of *Gynostemma pentaphyllum Makino*, were studied and the total flavones of the extracts were assayed. [Result] The extracting results were optimal when the solvent was 100% ethanol at the temperature of 90℃ for 2 hours. Initial appraisal indicated that there were flavones and other flavonoids in the extracts of *Gynostemma*. 100% ethanol extracts of two kinds of *Gynostemma* had significant effects to the others, and the scavenging effect of 100% ethanol extract of *Gynostemma* was more fantastic. After 30 minutes' reaction with the concentration at 0.6 ng/ml, the scavenging activity of the extract could reach 51.20%. Scavenging effects on free oxygen radicals of the extracts of 100% ethanol, 75% ethanol and water were all stronger than that of vitamin C. [Conclusion] Antioxidant capacity of wild *Gynostemma* extract was slightly higher than that of artificial cultivation of *Gynostemma*, but the difference was not big. It showed that the environment in Nantong was suitable for cultivation *Gynostemma*.

Key words *Gynostemma pentaphyllum Makino*; Superoxide anion radical; Scavenging activity

绞股蓝系葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物, 雌雄异株, 耐阴喜湿, 广泛分布于亚热带, 全世界约有16种和3个变种, 我国有15种和3个变种^[1]。作为绞股蓝主要成分之一的黄酮类化合物, 广泛存在于植物界, 有很高的药用价值。在自然界中最常见的有黄酮和黄酮醇, 还有双氢黄酮、异黄酮等^[2]。天然来源的生物黄酮分子量小, 可被人体迅速吸收, 能消除疲劳、抗脂肪氧化、抗衰老等^[3]。随着分子生物学和医学的发展, 人们逐渐认识各种各样外源性和内源性自由基。健康机体内自由基的形成和清除总处于一种动态平衡中, 一旦失衡, 就会引起疾病的发生^[4], 如癌症、衰老、心血管疾病、代谢失调^[5-6]甚至疲劳^[7-8]等。超氧阴离子自由基是氧气在生物体内电子传递和一些生物分子的还原作用下得到1个电子而生成的, 有着很强的活性, 可直接导致细胞内DNA损伤, 还能转化为氧化性更强的羟基自由基, 从而引发含有大量不饱和脂肪酸的细胞膜的脂质过氧化, 形成链式反应, 破坏膜结构, 造成细胞损伤^[5-6]。适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物, 有利于体内自由基的平衡。目前, 食品中常用的抗氧化剂大多是合成的。试验证明, 它有蓄积致癌的作用。因此, 研究开发天然抗氧化剂势在必行。绞股蓝作为药食同源植物, 不仅分布广泛, 且人工种植易活, 防病力强, 产量高, 所含化学成分多, 药理活性广泛, 副作用轻微, 价格低廉。笔者拟用不同溶剂对2种类型的绞股蓝进行有效成分提取, 并研究不同提取物清除超氧阴离子自由基的能力, 同时对提取物

中总黄酮含量进行测定, 旨在对绞股蓝保健茶、保健药品开发提供一定的科学依据, 同时为绞股蓝开发为天然高效的食品抗氧化剂提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料 野生型绞股蓝购于南通福临堂药房(野生型, 产地浙江); 栽培型绞股蓝采于南通大学内人工栽培的绞股蓝(种子来源于浙江天目山)。

1.2 药品与试剂 芦丁(标准样品); 亚硝酸钠; 硝酸铝; 氢氧化钠; 蒸馏水; 无水乙醇; 浓度95%乙醇; 羧甲基纤维素钠; 苯; 甲醇; 醋酸; 核黄素; L-甲硫氨酸; 氯化硝基四氮唑蓝; 薄层层析硅胶(GF254, 化学纯)。

1.3 仪器 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); DHG系列9140A电热恒温鼓风干燥箱(上海华连医疗器械有限公司); DS-1高速组织捣碎机(上海标本模型厂制造); 722光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); DK-S26型电热恒温水浴锅(上海华连医疗器械有限公司); 回流装置(上海玻璃仪器厂); RE52-3旋转蒸发器(上海沪西分析仪器厂有限公司); 层析缸; 调节式万用电炉(南通市长江光学仪器有限公司); 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司); BCD-212KAN海尔冰箱(青岛海尔股份有限公司)等。

1.4 试验方法

1.4.1 绞股蓝有效成分的提取^[9-10]。采摘人工种植的新鲜绞股蓝叶, 洗净, 装入由牛皮纸折成的袋中, 置于60℃的电热恒温鼓风干燥箱中(2 d), 烘干。分别粉碎野生型绞股蓝和栽培型绞股蓝, 过40目筛, 各称取绞股蓝2 g, 分别加入水、无水乙醇、浓度75%乙醇、浓度50%乙醇20 ml, 于90℃的水浴锅中回流提取2 h, 其中加水组用酒精灯加热至沸腾。过滤后取滤液, 用RE52-3旋转蒸发器于80℃下浓缩干燥, 称得提取物

基金项目 南通大学校级课题(06Z109)。

作者简介 刘鑫燕(1978-), 女, 江苏海门人, 硕士, 讲师, 从事植物生理及遗传学方面的研究。

收稿日期 2008-08-14

干重(精确至0.000 1 g),分别用浓度95%乙醇溶解提取物,定容于50 ml容量瓶中,放置4 h的冰箱中备用。

1.4.2 不同提取物中总黄酮的初步鉴定^[11]。采用薄层层析法。配制浓度0.5%羧甲基纤维素钠(CMC),用调节式万用电炉加热溶解,称取硅胶,将硅胶和浓度0.5%羧甲基纤维素钠以1:3的比例加入研钵中研磨,制备薄板,先让其自然风干,再置于110℃的烘箱中活化2 h。将展开剂苯-甲醇-醋酸(体积比为45:1:1)倒入密闭的层析缸中,让其充满整个层析缸。取薄板2片,在一端距边缘2.5 cm处用铅笔划1条直线,在直线上每隔2 cm处做记号。取已定容的8个样品溶液各10 μl,分别点在记号处,每个薄板上点4个样,每点在薄板上扩散的直径最大不超过2 mm。将薄板放入层析缸中进行层析(点样的一端在下,展开剂的液面需低于点样线约1 cm),待溶剂上升12 cm时取出薄板,晾干后喷上浓度2%硝酸铝-甲醇溶液显色,吹干后置于紫外分析仪中在254 nm波长下观察。

1.4.3 不同提取物中总黄酮含量的测定。称取无水芦丁0.01 g(精确至0.000 1 g),加无水乙醇定容至50 ml,制成浓度为0.2 ng/ml的芦丁溶液,吸取不同体积,配制成不同浓度梯度,加浓度5%亚硝酸钠溶液2 ml,摇匀,静置6 min;加浓度10%硝酸铝溶液2 ml,摇匀,静置6 min;加浓度4.3%氢氧化钠溶液20 ml,加水稀释至刻度,摇匀,静置15 min,在波长500 nm处测定吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,3次重复,对所得数据的平均值进行回归,绘制芦丁标准曲线^[12]。各取已定容的8个样品2 ml,分别置于50 ml容量瓶中,加水至12 ml,对照组直接加水12 ml置于50 ml容量瓶中,以下操作同上。

1.4.4 体外设计产生超氧阴离子自由基体系。采用Hassan的光化学方法^[13]。在体外设计产生超氧阴离子自由基体系,反应体系包括0.01 mol/L L-甲硫氨酸、 2.4×10^{-6} mol/L核黄素分子(RFV)、 1.67×10^{-4} mol/L氯化硝基四氮唑蓝、0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH值8.0)和一定浓度的绞股蓝各提取物溶液。将反应体系的溶液放置光下5 min,使其产生超氧阴离子自由基和有色产物(深蓝色),利用光反应前后体系溶液在波长560 nm处吸光值的差值可以算出超氧阴离子自由基的量。

1.4.5 不同提取物对超氧阴离子自由基清除能力的测定。分别吸取一定体积的8个样品溶液,用浓度95%乙醇配成一定浓度的溶液,即0.6 ng/ml。取8支试管,编号,向每只试管中加入对应的绞股蓝提取物溶液40 μl,再加入4 ml光反应后体系溶液,放置室温(25℃)下,在波长560 nm处以浓度95%乙醇为对照组,每间隔5 min测1次吸光值,以30 min为界限,则其对超氧阴离子自由基的清除能力可用下列公式表示:

$$\text{清除率} = (1 - \text{OD}_{\text{样品}} / \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中,OD_{样品}为样品与反应体系溶液反应后的吸光度;OD_{空白}为未加样的反应体系溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 2种类型绞股蓝提取物得率 从表1可以看出,不同溶剂的提取物得率不同,且型绞股蓝相同溶剂的提取物得

率均高于型绞股蓝。型和型绞股蓝中无水乙醇和浓度75%乙醇提取物得率高于浓度50%乙醇和水提取物得率,2种绞股蓝水提取物的得率最低。

2.2 不同提取物中总黄酮的初步鉴定结果 经薄层层析,在紫外分析仪中可观察有黄色、紫红色的荧光斑点,说明绞股蓝提取物中可能含有黄酮以及其他黄酮类化合物。

2.3 不同提取物中总黄酮得率 按照标准曲线的制备方法,测出绞股蓝不同提取物的吸光度。根据芦丁标准曲线,得到回归方程:

$$Y = 10.522 X - 0.016 \quad (2)$$

表1 型、型绞股蓝提取物得率

Table 1 The yield of extracts from -type and -type of *Gynostemma pentaphyllum*

溶剂 Solvent	型 type		型 type	
	净重 g Net weight	得率 % Yield	净重 g Net weight	得率 % Yield
水 Water	0.150 1	7.50	0.114 4	5.72
无水乙醇 Anhydrous ethanol	0.288 8	14.44	0.282 2	14.11
浓度75%乙醇 75% ethanol	0.304 7	15.24	0.156 8	7.84
浓度50%乙醇 50% ethanol	0.262 1	13.10	0.144 9	7.24

注:固液比为1:10。

Note: The solid-liquid ratio is 1:10.

表2 2种类型绞股蓝各提取物中总黄酮得率

Table 2 The yield of total flavone in each extract from 2 types of *G. pentaphyllum*

溶剂 Solvent	型绞股蓝 -type of <i>G. pentaphyllum</i>	型绞股蓝 -type of <i>G. pentaphyllum</i>
水 Water	2.849	1.765
无水乙醇 Anhydrous ethanol	8.556	8.462
浓度75%乙醇 75% ethanol	4.835	5.910
浓度50%乙醇 50% ethanol	5.122	3.034

从表2可以看出,不论是型绞股蓝还是型绞股蓝,无水乙醇提取物的总黄酮得率最高,水提取物的总黄酮得率最低。为进一步了解产生差异的原因,对不同处理的绞股蓝提取物总黄酮得率进行方差分析。方差分析结果表明,处理间的F测验达0.05显著水平,而类型间不显著,说明不同的处理方法对总黄酮得率的影响比较大。应用SSR法对处理间进一步作多重比较,无水乙醇提取物总黄酮的平均得率为8.509%,与其他处理相比均达到0.05显著水平,且与水提取物相比达到0.01显著水平。由此可知,从绞股蓝中提取黄酮类物质的最佳溶剂是无水乙醇,最优提取方案为无水乙醇于90℃回流提取2 h。

2.4 不同提取物清除超氧阴离子自由基能力的比较 采用Hassan光化学方法测定各提取物对超氧阴离子自由基的清除作用,以动态的方式每隔5 min测1次吸光值,即OD_{样品},由已测得的OD_{空白}=0.750计算出各提取物清除率的平均值。从图1可以看出,型绞股蓝各溶剂提取物清除超氧阴

离子自由基的能力大小依次为无水乙醇> 浓度75%乙醇> 水> 浓度50%乙醇。从图2可以看出,在前10 min 中 型绞股蓝无水乙醇提取物清除超氧阴离子自由基的能力并不强,

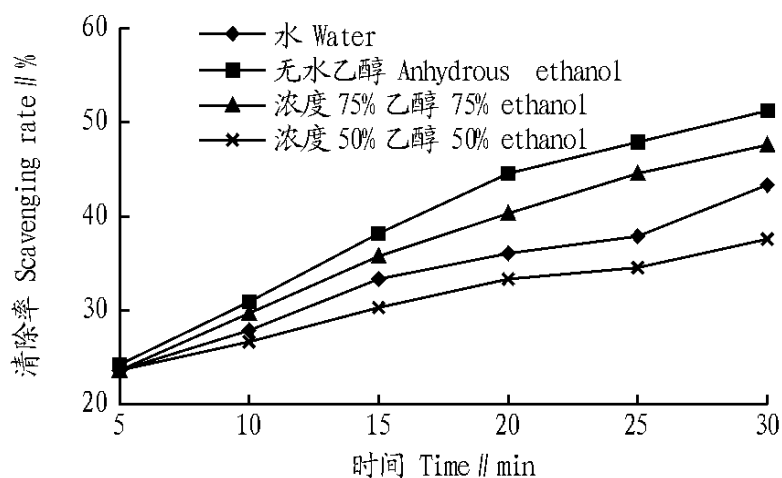


图1 型绞股蓝各提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.1 Scavenging effect of each extract from -type of *G. pentaphyllum* on superoxide anion free radical

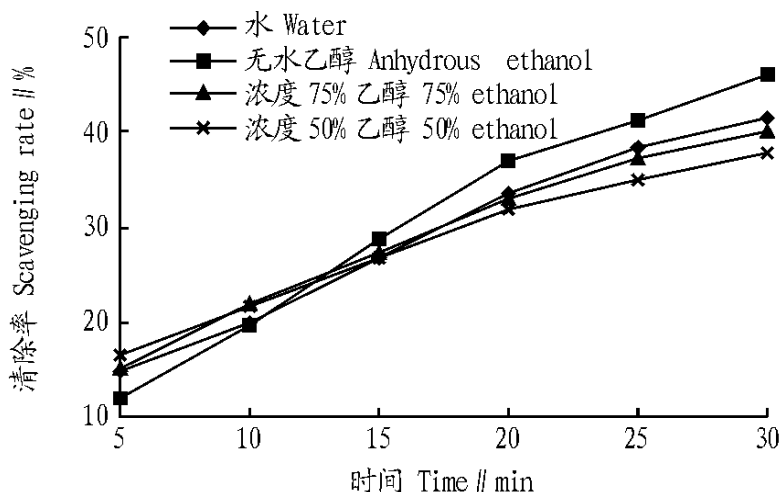


图2 型绞股蓝各提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.2 Scavenging effect of each extract from -type of *G. pentaphyllum* on superoxide anion free radical

约10 min 后清除能力逐渐超过其他溶剂提取物,在反应30 min 时 型绞股蓝提取物清除超氧阴离子自由基的能力大小依次为无水乙醇> 水> 浓度75%乙醇> 浓度50%乙醇。由此可知,各溶剂提取物对超氧阴离子自由基都有一定的清除作用,且在30 min 内随着时间的延长而增强,但不同溶剂提取物清除超氧阴离子自由基的能力是不同的。在反应30 min 时,不论是 型绞股蓝还是 型绞股蓝,无水乙醇提取物对超氧阴离子自由基的清除作用都强于其他溶剂提取物,且 型绞股蓝各溶剂提取物的清除能力普遍强于 型绞股蓝各溶剂提取物,但 型绞股蓝提取物的清除能力与 型绞股蓝提取物的清除能力之间差异并不大。型绞股蓝中无水乙醇的提取物清除能力最强,在浓度为0.6 mg/ml 时反应30 min 清除率达到51.20%。前人研究表明,0.50~0.75 mg/ml 维生素C 对超氧阴离子自由基的清除能力为30%~40%^[14]。研究表明,无水乙醇、浓度75%乙醇和水的提取物比维生素C 有更强的清除超氧阴离子自由基能力。对超氧阴离子自由基的清除

率越高,说明其抗氧化性越强。型和型绞股蓝清除超氧阴离子自由基能力的测定,为其抗氧化活性研究及开发提供了一定的依据。

3 结论

研究表明,绞股蓝提取物中含有清除超氧阴离子自由基的有效成分,可以作为天然的食物抗氧化剂。型绞股蓝无水乙醇的提取物对超氧阴离子自由基的清除能力最强,在浓度为0.6 mg/ml 时反应30 min 清除率达到51.20%。有效成分提取的最优方案为无水乙醇于90℃ 回流提取2 h。

同一类型绞股蓝不同溶剂的提取物抗氧化效果存在差别,与绞股蓝提取物中总黄酮的得率基本一致。个别不一致的原因可能是绞股蓝提取物中还含有皂甙、多糖类、酚类、甾醇等有效成分在清除超氧阴离子自由基的过程中发挥了一定的作用。由于试验时间和条件的限制,该研究只对绞股蓝提取物中黄酮类化合物进行了鉴定。2 种类型绞股蓝抗氧化效果有些差别。野生绞股蓝提取物抗氧化性稍高于人工栽培绞股蓝。这可能是由各自所处的环境和生态系统不同所致,且绞股蓝有效成分及含量也可能因采集时间以及雌株、雄株的不同而改变,从而引起抗氧化活性的差异。但2 种类型绞股蓝抗氧化效果差异并不大,说明南通地区土壤等环境适合绞股蓝的生长,可大面积种植,并且可通过组织培养等技术扩大繁殖。

参考文献

- [1] 潘峰,刘迪,黄翠霞,等.绞股蓝皂甙的药理学临床研究[J].现代中西医结合杂志,2006,15(5):674-676.
- [2] 夏杏洲,张辉,魏传晚.榕树叶中黄酮类化合物的提取条件研究[J].食品研究与开发,2002,23(5):35-37.
- [3] 罗建华,黄锁义.益母草总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用[J].右江民族医学院学报,2006(5):710-712.
- [4] 文汉,聂凡.绞股蓝提取物对自由基清除能力的初步研究[J].安徽农业科学,2001(1):121-122.
- [5] 赵晶,白云.自由基相关疾病研究进展[J].生物学教学,2003,28(4):6-9.
- [6] 崔剑,李兆陇,洪啸吟.自由基生物抗氧化与疾病[J].清华大学学报:自然科学版,2000,40(6):9-12.
- [7] 吴鹤群.自由基生物学理论与运动性疲劳[J].三明师专学报,2000(1):75-77.
- [8] 王林丽,汪洁筠.绞股蓝药理作用及临床应用进展[J].中医药信息,2002,19(4):11-14.
- [9] 于新,李远志,陈悦.绞股蓝成分的提取及提取液稳定性研究[J].广州食品工业科技,2002,18(1):7-10.
- [10] 张阿慧,安彩贤,侯鸿军,等.正交实验优选绞股蓝总皂甙的提取方法[J].西北药学杂志,2001,16(6):252-253.
- [11] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室.黄酮体化合物鉴定手册[M].北京:科学出版社,1981.
- [12] 毛丽珍,徐世芳.蜂胶口服液中黄酮类化合物的测定[J].中草药,1998,29(4):231-232.
- [13] HASSAN H M. Determination of microbial damage caused by oxygen free radicals, and the protective role of superoxide dismutase [C] // PACKER L. Methods Enzymology. New York: Academic Press, 1984, 105: 404-412.
- [14] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fraction of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Science Direct, 2007, 68: 54-58.