

广西小叶红叶藤不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性

吕金燕¹, 霍丽妮^{2*}, 廖艳芳³, 李培源², 陈睿¹, 张志翔²

(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001;
3. 广西化工研究院, 南宁 530001)

[摘要] **目的:** 研究小叶红叶藤 *Rourea microphylla* 不同溶剂提取物的抗氧化活性。**方法:** 用冷浸法制备小叶红叶藤乙酸乙酯提取物 (EAE)、丙酮提取物 (AE) 和乙醇提取物 (EE), 采用紫外分光光度法测定 DPPH (1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼) 自由基清除率, 2, 2'-连氨基-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS⁺) 自由基清除率和铁离子还原能力, 对小叶红叶藤 3 种提取物体外抗氧化活性进行考察。**结果:** 小叶红叶藤乙醇提取物 (EE) 抗氧化能力最强, 其 ABTS⁺ 自由基及 DPPH 自由基半清除浓度 (IC₅₀) 分别为 0.66, 0.60 g·L⁻¹, 还原能力强弱的顺序为 EE > EAE > AE, 与各提取物总黄酮含量一致。**结论:** 小叶红叶藤提取物特别是乙醇提取物具有作为天然抗氧化剂和功能性食品进行研究和开发的潜力。

[关键词] 小叶红叶藤; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼; 2, 2'-连氨基-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐; 还原能力; 总黄酮含量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0228-03

[doi] 10.11653/syfy2013080228

Antioxidant Activity of Different Extracts from *Rourea microphylla* in Guangxi

LV Jin-yan¹, HUO Li-ni^{2*}, LIAO Yan-fang³, LI Pei-yuan², CHEN Rui¹, ZHANG Zhi-xiang²

(1. College of Chinese Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China;
2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
3. Guangxi Research Institute of chemical Industry, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of different extracts from *Rourea microphylla* in Guangxi. **Method:** EE (95% ethanol), AE (acetone) and EAE (ethyl acetate) extracts were obtained by cold-extraction. The antioxidant activities were studied using DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-Diphenyl 1-1- (2, 4, 6-trinitrophenyl) hydrazyl) assay, 2, 2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS⁺) assay and reducing power assay by UV-VIS (Ultraviolet and visible spectrophotometry) spectrophotometry. **Result:** The EE of *R. microphylla* exhibited the most outstanding antioxidant activities. The IC₅₀ values of EE in DPPH assay and ABTS⁺ assay were 0.66, 0.60 g·L⁻¹, respectively. The reducing power of all extracts was in the sequence of EE > EAE > AE, which was in accordance with the total flavonoid (TF) content. **Conclusion:** All the extracts especially EE extract of *R. microphylla* could be employed as natural antioxidants and health care products.

[Key words] *Rourea microphylla*; DPPH; ABTS⁺; reducing power; total flavonoid content

[收稿日期] 20120910(012)

[基金项目] 广西教育厅课题 (201106LX266; 2012JGA247); 广西中管局课题 (gzcc1208); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院课题 (2012zr01)

[第一作者] 吕金燕, 硕士, 讲师, 从事中药药理学研究, Tel:13737089920, E-mail:175125710@qq.com

[通讯作者] * 霍丽妮, 硕士, 讲师, 从事中药有效成分分离提取和活性研究, Tel:15994365816, E-mail:huolini@126.com

目前具有本源性解释的衰老机制是自由基学说。自由基学说认为,过多的自由基可造成机体内的DNA、蛋白质和脂类的损伤^[1],损伤的积累导致细胞衰老或死亡,而合理补充抗氧化剂可有效减少自由基从而预防和治疗某些疾病延缓衰老^[2]。当前,我们使用的合成抗氧化剂,虽然能起到抗氧化作用,但有一定副作用,可能会导致癌症或损伤肝脏;因此在植物中寻找天然有效的抗氧化剂成为科研工作者关注的重点^[3]。

小叶红叶藤又名红叶秋树,为牛栓藤科红叶藤属植物,因其具有特殊的芳香气味,常用作清热解毒,美容养颜,延年益寿的保健茶饮品。本课题组已经对小叶红叶藤挥发油成分及其抗氧化活性进行研究^[4],其挥发油成分中薄荷酮含量较高,具有一定的抗氧化活性,但目前尚未见其不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究。因此,从多方面评价其抗氧化能力,有利于寻找一种新型天然抗氧化剂。本实验采用当前较为普遍的清除2,2-联氨-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸二铵盐($ABTS^+$)自由基、清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基和铁离子还原能力检测等方法对小红叶藤乙酸乙酯提取物(EAE)、丙酮提取物(AE)和乙醇提取物(EE)体外抗氧化活性进行了考察和评价。

1 材料

1.1 药材 小叶红叶藤购于广西德保县,经广西中医药大学壮医药学院韦松基教授鉴定为 *Rourea microphylla* (Hook. & Am.) Planch.

1.2 试剂 DPPH, ABTS, 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)均购于美国Sigma Aldrich公司;芦丁对照品(芦丁含量 $\geq 91.7\%$,中国药品生物制品检定所,批号(100080-200707);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 北京普析 Tu-1800 SPC 紫外-可见分光光度计,上海亚荣 RE-52AA 旋转蒸发器。

2 方法

2.1 部位提取 取小叶红叶藤干燥茎叶,粉碎后各称取50 g,用250 mL 95%乙醇冷浸2 d,过滤。重复上述操作3次,合并提取液。旋转蒸发回收溶剂,得小叶红叶藤乙醇提取物(EE),得率为12.93%。同法制备丙酮提取物(AE)和乙酸乙酯提取物(EAE),得率分别为7.14%和8.97%。

2.2 清除 $ABTS^+$ 自由基的能力测定^[5] 用蒸馏水将ABTS配制成7 mmol·L⁻¹准备液,然后往准备液中加入过硫酸钾固体,使此准备液的过硫酸钾的浓度变为2.45 mmol·L⁻¹,室温避光放置2 d备用;

将ABTS溶液用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,使其在732 nm下测得吸光度(A)在(0.7 \pm 0.05),将30 μ L药液与3 mL ABTS溶液混合,在室温下放置10 min后测其吸光度,取稳定时的A;PBS溶液作为参比,清除率计算公式如下:

$$SC = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

其中, A_{control} 为不加药液的ABTS的吸光度。

2.3 清除 DPPH· 自由基的能力测定^[5] 取0.3 mL各浓度药液,加入4 mL 0.002% (w/v) DPPH溶液中,室温放置20 min,在517 nm处测量,取稳定时的A。清除率计算公式如下:

$$SC = (1 - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

其中, $A_{\text{空白}}$ 为未加药液的DPPH溶液的吸光度, $A_{\text{样品}}$ 为加入药液的DPPH溶液的吸光度。

2.4 还原能力测定^[5] 取50 μ L各浓度小叶红叶藤药物溶液,向其中加入2.5 mL PBS、2.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液,50 $^{\circ}C$ 水浴加热20 min,而后加入2.5 mL 10%三氯乙酸溶液,若出现浑或沉淀,过滤处理;取以上混合液或其滤液2.5 mL加入2.5 mL蒸馏水、0.5 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液, $\lambda_{\text{max}} = 700$ nm下测量A,A越大,则样品的还原力越大,以不加药液的做为空白对照。

2.5 总黄酮含量测定^[6] 吸取0.0,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL芦丁对照品溶液(1.2 g·L⁻¹)于10 mL量瓶中,先加5%亚硝酸钠0.4 mL,静置5 min,再加入5%硝酸铝0.4 mL,静置5 min,最后加5%氢氧化钠试液4.0 mL,用95%乙醇稀释至刻度,摇匀;静置15 min后,在510 nm波长处测定各浓度A,做回归方程。

用以上步骤测定提取物吸光度,根据对照品的回归方程计算总黄酮的芦丁当量。

3 结果与讨论

3.1 $ABTS^+$ ·清除能力 由图1可知,在3种溶剂提取物中,EE表现出最强的 $ABTS^+$ ·清除能力,在药物质量浓度为2 g·L⁻¹时,清除率可达99.1%。

计算EAE,AE和EE半清除浓度(IC₅₀)分别为0.87,1.15,0.66 g·L⁻¹,IC₅₀越低,抗氧化剂清除自由基的能力越强,故其清除 $ABTS^+$ ·的能力强弱顺序为EE > EAE > AE。

3.2 DPPH·清除能力 DPPH在517 nm处有强吸收,有自由基清除剂存在时,其最大吸收波长处的吸光度变小,而吸光度变小的程度与自由基被清除的程度呈定量关系,因此可用于检测自由基的清除情况,从而评价实验样品的抗氧化能力。

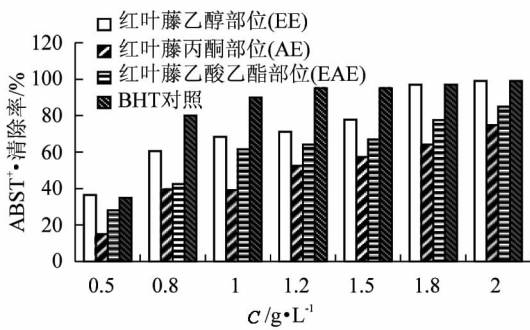


图 1 小叶红叶藤不同极性溶剂提取部位清除 ABST⁺·自由基能力

从图 2 可看出, EE 和 EAE 部位提取物的抗氧化活性和 BHT 对照品相近, AE 提取物的 SC% 远远小于 EE 和 EAE。计算 EE, AE, EAE 的 IC₅₀ 分别为: 0.6, 1.8, 0.7 g·L⁻¹, 因此, 在 3 种溶剂提取物中, 清除 DPPH· 的能力强弱顺序为: EE > EAE > AE。

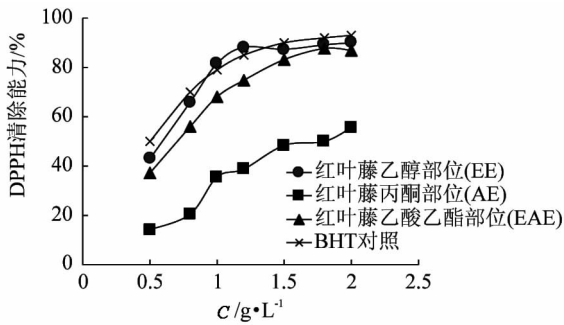


图 2 小叶红叶藤提取物对 DPPH 自由基的清除能力

3.3 还原能力 在波长 700 nm 条件下测定 A, A 越大, 则样品的还原力越大。从图 3 中可以看出, 随着浓度增大, 小叶红叶藤提取物的 A 逐渐增大, 表明浓度较高的提取物具有较强的还原能力。在 3 种提取物中, 还原能力强弱顺序为 EE > EAE > AE。

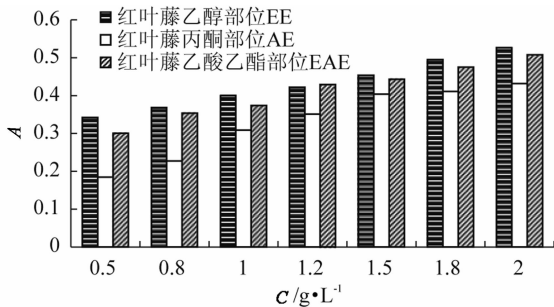


图 3 小叶红叶藤不同极性溶剂提取物的还原能力

3.4 总黄酮含量测定 植物中的类黄酮具有很强的抗氧化和消除自由基作用, 因此总黄酮含量的测

定对探讨不同部位小叶红叶藤提取物对自由基清除的机制具有一定的意义。根据线性方程为: $Y = 9.6778X + 0.0167 (r = 0.9992)$ 。得出小叶红叶藤乙醇提取物 (EE), 丙酮提取物 (AE) 和乙酸乙酯提取物 (EAE) 的总黄酮含量测定结果分别为 11.5, 7.724, 10.58 g·L⁻¹。

总黄酮含量排列顺序 EE > EAE > AE, 与清除 ABTS⁺·, DPPH 自由基能力及还原能力顺序一致。因此, 小叶红叶藤提取物的抗氧化能力可能与植物中的黄酮物质有关。

4 结论

综合实验结果可知, 小叶红叶藤各部位提取物均具有一定的抗氧化能力, 其中, EE 的各项指标测试均表明其抗氧化活性最强, 且抗氧化能力随药液浓度增大而增强, 故 95% 乙醇可作为小叶红叶藤抗氧化成分的最佳提取溶剂; 其提取物总黄酮含量与 ABTS⁺· 自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力及还原能力的顺序一致, 均为 EE > EAE > AE。研究表明, 小叶红叶藤各部位提取物, 特别是乙醇部位提取物, 具有很好的开发天然抗氧化性物质的潜力, 为进一步开发利用小叶红叶藤资源、深入挖掘其在食品、医学领域的应用提供了一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊, 等. 氧自由基与临床 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 21.
- [2] Kumar K S, Rao P V S. Antioxidant potential of solvent of Kappaphycus alvarezii (Doty)-an edible seaweed [J]. Food Chem, 2008, 107(1): 289.
- [3] Marina Contini, Simone Baccelloni, Riccardo Massantini, et al. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (Corylus avellana L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature [J]. Food Chem, 2008, 110: 659.
- [4] 霍丽妮, 李培源, 陈睿, 等. 广西小叶红叶藤挥发油化学成分及抗氧化性研究 [J]. 广西植物, 2011, 31(5): 706.
- [5] 霍丽妮, 廖艳芳, 陈睿, 等. 狐狸尾不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 155.
- [6] 吕鹏, 贾秀梅, 张振凌, 等. 怀山药及非药用部位总黄酮含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 65.

[责任编辑 聂淑琴]