

降香叶不同提取部位体外抗氧化活性的比较

李金玉¹, 陈地灵^{2*}

(1. 广东轻工职业技术学院, 广东广州 510300; 2. 华南师范大学药物研究院, 广东广州 510631)

摘要 [目的]考察降香叶不同提取部位的体外抗氧化活性,及其与黄酮类物质含量的相关性。[方法]采用不同极性的溶剂对降香叶水提物进行萃取,得到石油醚、氯仿、乙酸乙酯和水等4个提取部位。以体外清除1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基、过氧化氢、羟自由基和超氧阴离子的能力评价降香叶提取物的抗氧化活性;并采用铝盐络合法测定各个提取部位黄酮含量,比较分析其含量与氧化能力的相关性;采用HPLC法分析其指纹。[结果]降香叶各个提取部位均有不同程度的体外抗氧化能力,其效果顺序为:乙酸乙酯部位>氯仿部位>水提部位>石油醚部位,与各部位黄酮含量呈正相关。[结论]降香叶不同提取部位均具有抗氧化能力,其与黄酮类物质含量呈正相关,其乙酸乙酯部位可作为抗氧化活性部位。

关键词 降香叶;抗氧化;总黄酮含量;自由基;有效部位

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)09-03853-04

In vitro Antioxidant Activity of the Extracts from *Dalbergia* Leaves

LI Jin-yu et al (Guangdong Industry Technical College, Guangzhou, Guangdong 510300)

Abstract [Objective] To evaluate the antioxidant activity of total flavones in different extracts from *Dalbergia Odorifera* leaves. [Method] The four extracts were prepared by aqueous extract of *Dalbergia Odorifera* leaves by 3 different organic solvents petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and water. The antioxidant activities were assessed by DPPH radical scavenging activity, superoxide radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, peroxide scavenging activity, and nitric oxide scavenging activity, with the positive control of the antioxidant activity of ascorbic acid. The contents of total flavones were measured by Aluminum salt complex method. [Result] The pecking order of antioxidant capacity was Ethyl acetate parts > Chloroform parts > water extraction > Petroleum ether parts, and consistent with the content of the flavonoids. [Conclusion] Antioxidant components could mainly exist in the ethyl acetate parts, the antioxidant capacity was associated with its flavonoids content.

Key words *Dalbergia Odorifera*; Antioxidant activity; Total contents of flavonoids; Free radical; Active fraction

降香(LIGNUM DALBERGIAE ODORIFERAE)是豆科(Leguminosae sp.)植物降香檀(*Dalbergia Odorifera* T. Chen)树干和根的干燥心材,是我国的一种传统名贵中药材,具有行气活血、止痛和止血等功能,临床多用于脘腹疼痛、肝郁胁痛、跌扑损伤和外伤出血等症。其主要成分为黄酮类和萜类化合物^[1-4];亦是一种名贵香料,具有较高的经济价值。但降香成材周期较长。一直以来,降香的入药部位只限于其根部心材,为充分提高其价值,试验对降香叶进行抗氧化活性评价研究,筛选其可能抗氧化有效部位,以期对降香资源的综合开发利用提供研究基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 研究对象。降香叶,采自广州中医药大学大学城校区药王山,经广州中医药大学中药学院实验中心林勍教授鉴定为豆科植物降香黄檀(*Dalbergia Odorifera* T. Chen)的叶。

1.1.2 主要仪器。BP211D电子分析天平($d=0.000\ 01\ g$),购自德国Sartorius公司;XS 225A型分析天平($d=0.000\ 1\ g$),购自瑞士Mettler Toledo公司;DFY-200型粉碎机,购自浙江温岭市大德中药机械有限公司;HH-4型数显恒温水浴锅,购自上海浦东物理光学仪器厂;KQ-500型超声波清洗器(工作频率:40 KHz;超声电功率:500 W),购自江苏省昆山市超声仪器有限公司;TDL-2B离心机,购自Anke公司;ELX808多功能酶标仪,购自美国Bio-tek公司;Agilent8453E型紫外

可见光分光光度计,购自美国Agilent公司。

1.1.3 主要试剂。芦丁对照品,批号MUST-12040302,购自成都曼思特生物科技有限公司;三氯乙酸,批号20100201,购自天津市福晨化学试剂厂;三羟甲基氨基甲烷,批号PB11071-1;邻苯三酚,批号C1207030;抗坏血酸,批号20100226;硫代巴比妥酸,批号49837;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitro phenyl)hydrazyl, DPPH·),批号20110304,均购自美国Sigma公司;鹰嘴豆芽素A和6-羟基-鹰嘴豆芽素A,实验室自制;其余试剂均为分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 各部位储备液的制备。取粉碎过3号筛的干燥降香叶50.000 g,加入125 ml的水,煎煮提取3次,每次提取1 h,合并3次提取液,减压抽滤,滤液浓缩至150 ml,分别采用石油醚、氯仿和乙酸乙酯对滤液进行萃取,所得萃取液减压浓缩至干用无水甲醇定容与100 ml容量瓶中,作为各部位测定储备液备用。

1.2.2 色谱条件。采用HPLC-UV法对其水提液进行指纹分析。检测器为Dionex Ultimate 3000, DAD;色谱柱为Acclaim C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Dionex);流动相为浓度0.1%磷酸水溶液(A)-无水甲醇(B),梯度洗脱(0~15 min, B 95~85%; 15~50 min, B 80%~65%; 50~65 min, B 55%~0);190~400 nm全波长扫描,根据UV光谱图及对照品分析其可能组分。

1.2.3 降香叶不同提取部位黄酮含量的测定及HPLC指纹分析。(1)线性关系的考察。精密称取芦丁对照品5.00 mg,置于50 ml容量瓶中,用浓度60%乙醇稀释至刻度,摇匀,即

作者简介 李金玉(1971-),女,江西吉安人,讲师,从事生物及化工研究, E-mail: lijinyu101@163.com。*通讯作者,博士后,从事中药现代化研究, E-mail: diling0828@sina.com。

收稿日期 2013-03-21

得标准溶液。精密量取上述标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 ml, 分别置于 10 ml 容量瓶中, 加入蒸馏水使成 5 ml, 精密加入浓度 5% 亚硝酸溶液 0.3 ml, 摇匀, 放置 5 min, 再加入浓度 10% 硝酸铝溶液 0.3 ml, 摇匀, 放置 6 min, 然后加入浓度 4% 氢氧化钠溶液 2 ml, 最后用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 放置 10 min, 以第 1 管为空白, 在 510 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。(2) 按照标准曲线测定方法, 取各储备液 2 ml 稀释至 10 ml, 测定其吸光度 ($n=3$), 取平均值计算各储备液中黄酮含量, 并进行方法学考察。

1.2.4 清除 1,1-二苯基苦基苯腙 (DPPH·) 自由基能力的测定。采用 Cardador-Martinez 的方法评价清除 DPPH· 自由基的能力^[5]。取各提取部位储备液分别配置浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0 和 2.0 mg/ml, 每个待测样品溶液均取 0.1 与 2.4 ml 浓度 0.12 mmol/L 的 DPPH· 溶液混匀, 室温下反应 30 min 后, 在 517 nm 波长下测定其吸光度, 用同样体积的无水甲醇代替样品溶液作为空白对照, 采用抗坏血酸作为阳性对照。按如下公式计算其清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{自由基能力清除能力}(\%) = (1 - A_1) / A_0 \times 100$$

式中: A_1 为待测样品溶液吸光值; A_0 为空白对照溶液吸光值。每个试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.5 超氧阴离子 ($O_2^- \cdot$) 清除能力测定^[6]。每个提取部位储备液各取 6 支比色管分别移取 50 mmol/L (pH 8.2) 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.5 ml, 在 2~6 号比色管中分别加入 0.5 ml 浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0 和 2.0 mg/ml 的样品溶液, 置于 25 °C 水浴中预热 20 min, 再向每个提取部位 2~6 号试管中加入 25 °C 预热的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.3 ml 立即混匀, 然后在 30 s 内用蒸馏水补至 25.0 ml, 最后在 25 °C 水浴中准确反应 4 min, 立即滴加 0.5 ml 浓度为 8 mol/L 的 HCl 终止反应, 在 325 nm 处测定吸光度。以等体积的 Tris-HCl 缓冲溶液作为空白。吸光度越低, 清除超氧阴离子自由基效果越好, 采用抗坏血酸作为阳性对照。按如下公式计算其清除率:

$$\text{超氧阴离子的清除率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 为空白对照组吸光值; A_1 为样品溶液的吸光值。每个试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.6 清除羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的能力测定。按照脱氧核糖法来评价样品清除羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的能力^[7]。取各提取部位储备液分别配置成浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0 和 2.0 mg/ml, 每个待测样品溶液均取 75 μl 、10 mmol/L 脱氧核糖 150 μl 、10 mmol/L 的 FeSO_4 -EDTA 150 μl 、10 mmol/L 的 H_2O_2 150 μl 和 525 μl H_2O 充分混匀, 在 37 °C 水浴 4 h, 加入 750 μl 浓度 2.8% 的三氯乙酸和 750 μl 浓度 1% 的 TBA 溶液停止反应, 沸水浴 10 min, 在水中冷却后, 在 520 nm 波长下测定吸光值, 抗坏血酸作为阳性对照, 以同样体积的无水甲醇溶液代替样品溶液作为空白对照。按如下公式计算其清除率:

$$\text{羟基自由基清除能力}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 为空白对照组吸光值; A_1 为样品溶液的吸光值。每个试验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.7 清除 H_2O_2 能力测定。按照李贵荣等的方法来评价清除 H_2O_2 的能力^[8-9]。取 4.5 ml 浓度 0.1 mol/L (pH = 7.4) 磷酸盐缓冲溶液, 加入 2 ml 浓度 0.05% 的 H_2O_2 后, 加入 1 ml 一定浓度的试样, 立即混匀, 在 340 nm 处测定吸光度值 A_1 。试验中以不加试样的 H_2O_2 吸光度为 A_0 , 以不加 H_2O_2 的试样溶液的吸光度为 A_2 , 每个试验重复 3 次, 结果取平均值。按如下公式计算其清除率:

$$\text{过氧化氢清除率}(\%) = [A_0 - (A_1/A_2)] A_0 \times 100$$

1.2.8 亚硝酸盐 NO_2^- 清除能力测定^[10]。取各提取部位储备液分别配置成浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0 和 2.0 mg/ml, 每个待测样品溶液均取 0.1 ml 与 2.5 ml 的 NaNO_3 标准使用液, 于 37 °C 水浴锅中放置 10 min, 分别加 2 ml 的 $\text{Fe}(\text{CN})_2$ 溶液, 摇匀, 再加 2 ml 的乙酸锌溶液, 放置 30 min 后过滤。取滤液 5 ml, 加浓度 0.4% 对氨基苯磺酸溶液 2 ml, 3 min 后加浓度 0.2% 的盐酸萘乙二胺溶液 1.0 ml, 混匀, 放置 15 min, 在 538 nm 波长处测吸光度, 记为样管吸光度。同时作对照试验, 测定的吸光度记为对照管吸光度, 计算亚硝酸钠的清除率:

$$\text{亚硝酸盐清除率}(\%) = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100$$

式中: A_1 为对照管吸光度; A_2 为待测样品吸光度。每个试验重复 3 次, 结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 降香叶不同提取部位黄酮含量的测定 (1) 线性关系的考察。试验选择 510 nm 波长为降香叶不同提取部位黄酮测定波长。计算得线性回归方程为 $Y = 0.1092X - 0.0114$ ($R = 0.9999$), 表明在 0~0.05 mg/ml 范围内, 芦丁浓度与吸光度的线性关系良好, 各部位黄酮含量见表 1。(2) 精密密度试验。计算得吸光度的 RSD 为 0.11%, 表明精密密度良好。(3) 重复性试验。计算得吸光度的 RSD 为 2.54%, 表明该方法的重复性好。(4) 稳定性试验。计算得吸光度均值为 0.6824, RSD 为 2.13%, 说明供试品溶液在 90 min 内是稳定的。(5) 加样回收率试验。计算得平均回收率为 105.81%, RSD 为 3.32%, 表明该方法准确可靠, 可用于降香叶不同提取部位总黄酮的含量测定。

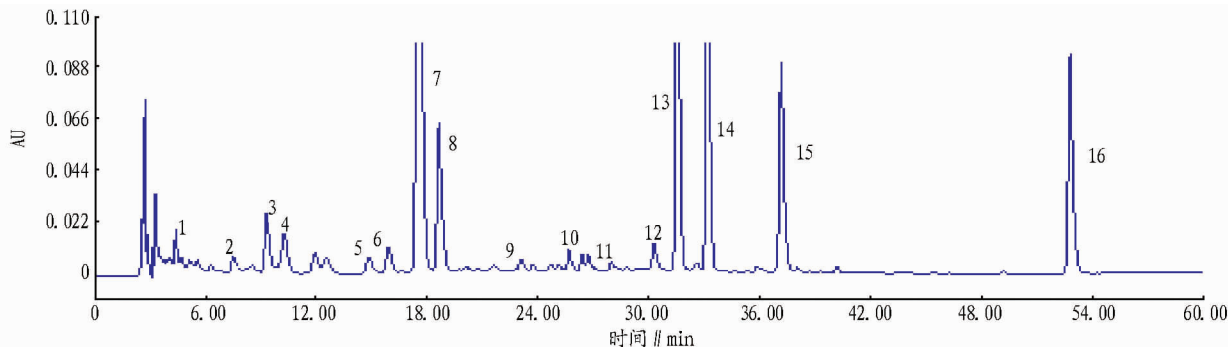
表 1 降香叶不同提取部位总黄酮含量测定结果 ($\bar{X} \pm S, n=3$)

编号	降香叶提取部位	黄酮含量//mg/g
1	乙酸乙酯	25.4 ± 0.42
2	氯仿	9.5 ± 0.25
3	水	5.5 ± 0.14
4	石油醚	3.4 ± 0.13

2.2 各提取部位清除 DPPH· 自由基的能力 图 2 和表 2 表明, 降香叶不同提取部位清除 DPPH· 自由基能力强弱为: 乙酸乙酯部位 > 氯仿部位 > 水提部位 > 石油醚部位。

2.3 各提取部位清除 $O_2^- \cdot$ 的能力 图 3 和表 2 表明, 降香叶不同提取部位清除 $O_2^- \cdot$ 能力强弱为: 乙酸乙酯部位 > 氯仿部位 > 水提部位 > 石油醚部位。

2.4 各提取部位清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力 图 4 和表 2 表明, 降香叶不同提取部位清除 $\cdot\text{OH}$ 能力强弱为: 乙酸乙酯部位 > 氯仿部位 > 水提部位 > 石油醚部位。



注:图中15为鹰嘴豆芽素A;16为6-羟基-鹰嘴豆芽素A。

图1 降香叶水提液 HPLC 指纹分析

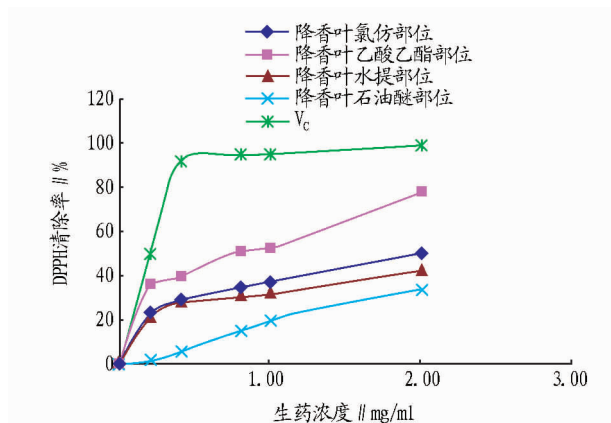


图2 降香叶各提取部位清除 DPPH· 自由基能力

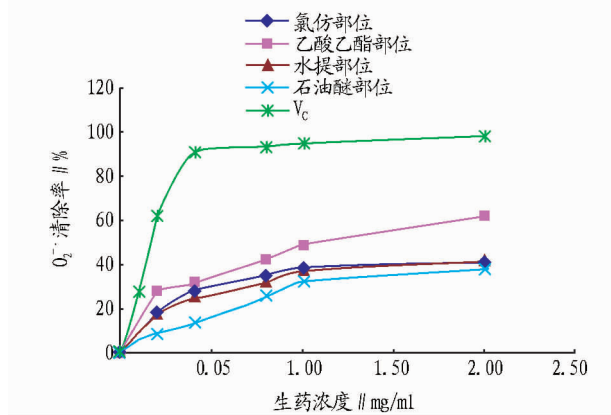


图3 降香叶各提取部位清除 O₂⁻· 能力

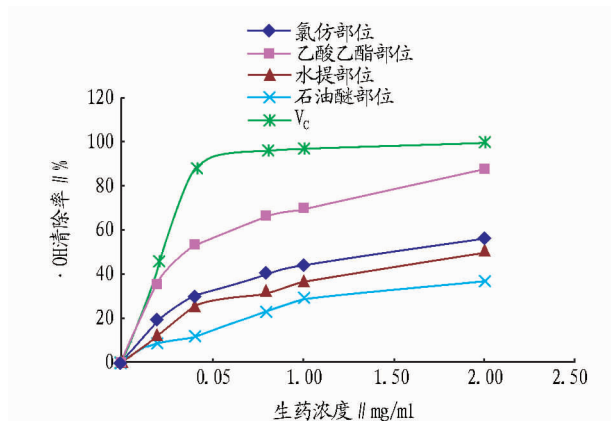


图4 降香叶各提取部位清除 ·OH 能力

2.5 各提取部位清除 H₂O₂ 的能力 图5和表2表明,降香叶不同提取部位清除 H₂O₂ 能力强弱为:乙酸乙酯部位 > 氯仿部位 > 水提部位 > 石油醚部位。

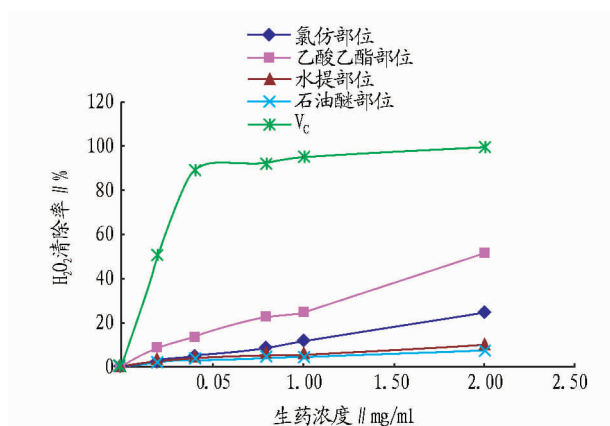


图5 降香叶各提取部位清除 H₂O₂ 能力

2.6 各提取部位清除 NO₂⁻ 的能力 图6和表2表明,降香叶不同提取部位清除 NO₂⁻ 能力强弱为:乙酸乙酯部位 > 氯仿部位 > 水提部位 > 石油醚部位。

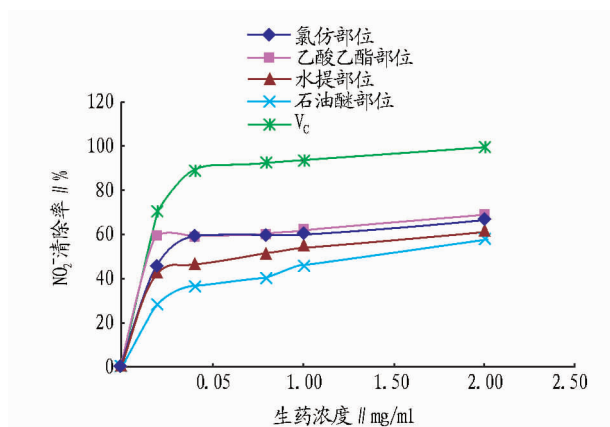


图6 降香叶各提取部位清除 NO₂⁻ 能力

3 结论与讨论

自由基是机体在生化反应中产生的性质活泼的具有极强的氧化功能、可导致机体衰老的物。自由基的形成有生化、化学、物理等多种因素,但主要是来自人体内的生化反应,各种酶的催化反应或疾病都可以产生大量自由基,当自由基浓度超过生理限度时,多余的自由基成为有害物质,攻

表2 降香叶不同提取部位5种抗氧化评价方法清除率 IC_{50} ($\bar{X} \pm S, n=3$)

部位	DPPH ·	O ₂ ⁻ ·	·OH	H ₂ O ₂	NO ₂ ⁻
乙酸乙酯部位	0.61 ± 0.09	1.04 ± 0.11	0.37 ± 0.03	1.95 ± 0.15	0.16 ± 0.02
氯仿部位	1.88 ± 0.06	-	1.44 ± 0.21	-	0.22 ± 0.04
水层部位	-	-	-	-	0.57 ± 0.13
石油醚部位	-	-	-	-	1.27 ± 0.31
VC(阳性参照)	0.34 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.06 ± 0.01

注：“-”表示在测试样品浓度中清除率达不到50%，无法计算 IC_{50} 。

击脂质、蛋白质等大分子物质，引起各种氧化损伤，进而导致细胞结构和功能的变化，使机体抵抗力下降，从而导致各种疾病发生，如癌症、心脑血管疾病^[11]，因此清除体内多余自由基十分必要。

研究表明，在检测剂量范围内，降香叶乙酸乙酯部位抗氧化能力最强，对超氧阴离子、羟基自由基、过氧化氢、亚硝酸盐均具有较强的清除能力，氯仿部位、水提部位其次，石油醚部位最弱，这与本文中用芦丁法所测的各提取部位黄酮含量大小相一致，可推断黄酮类成分含量的大小，对抗氧化能力的强弱影响较大，乙酸乙酯部位为降香叶药材中抗氧化最主要的活性部位，其具体化学组分和药效作用有待进一步的研究开发。

参考文献

[1] 周吴萍,柳娟,元平,等. 中药降香研究概况[J]. 安徽农业科学,2010,38(26):14354-14356.

- [2] 郭丽冰,孙丽丽,邓琪. 降香中黄酮类化学成分研究(II)[J]. 中药材,2010,33(6):915-917.
- [3] 刘海燕,范玫玫,何明珍,等. 降香挥发油的研究进展[J]. 中草药,2009,40(11):3-5.
- [4] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [5] CARDADOR-MARTINEZ A, LOARCA-PINA G, OOMAL B D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. J Agri&Food Chem, 2002,50(24):6975-6980.
- [6] 孟繁磊,张敏,陈瑞平,等. 刺五加多糖的提取及其抗氧化性[J]. 吉林大学学报,2005,45(3):683-686.
- [7] NAGAI T, MYODA T, NAGASHIMA T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*) *Equisetum arvense* L [J]. Food Chem, 2005,91(3):389-394.
- [8] 李贵荣. 枸杞多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 中国现代应用医学杂志,2002,19(2):94-96.
- [9] 张泽庆,田应娟,张静. 防风多糖的抗氧化活性研究[J]. 中药材,2008,3(2):268-271.
- [10] 赵艳霞,王艳. 紫外可见分光光度法测定蔬菜中亚硝酸盐含量[J]. 济宁医学院学报,2008,31(3):21-24.
- [11] 王俊. 生物多糖复合物抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗,2005,12(3):232-234.

(上接第3840页)

表2 各处理韭菜产量 kg

处理	第2茬	第3茬	第4茬	总产量
①	233.7	228.0	243.2	703.9
②	252.0	256.1	268.8	776.9
③	249.9	263.4	282.0	798.3
CK	227.1	220.0	219.7	666.8

均有不同程度的增加，而处理②可溶性蛋白和维生素C含量达到最高值。

表3 各处理韭菜品质和叶绿素指标

处理	可溶性糖含量 %	可溶性蛋白含量 mg/g	维生素C含量 mg/g	叶绿素含量 mg/g
①	1.59	1.05	3.61	0.98
②	2.39	1.30	9.25	1.13
③	2.67	0.87	7.30	1.74
CK	1.56	0.90	4.24	0.84

3 小结与讨论

研究表明，使用海藻冲施肥对韭菜营养器官的生长发育有明显的促进作用，对叶片的生长发育尤为明显。因此，在生育期内使用海藻冲施肥对单株营养体根茎叶器官有促进作用。通过促进营养器官的生长，根系发达，叶片的张开幅

度大。这有利于促进韭菜的光合作用，提高光合产物的形成和积累^[6]。使用海藻冲施肥还可以有效地提高韭菜产量，但使用冲施肥的浓度不同，效果不同。针对试验品种“独根红”而言，用75 g/m²海藻冲施肥的增产幅度最大，为16.5%，而过多的使用并不能使产量明显增加。海藻冲施肥能显著提高可溶性糖、叶绿素的含量。处理②可溶性蛋白和维生素C的含量达到最大值。这可能是由于过多使用海藻冲施肥促进了韭菜其他方面的改善，抑制了这2项品质指标的提高。因此，最佳的使用浓度为75 g/m²。海藻冲施肥对韭菜的其他品质指标有无影响，仍有待于在日后的生产和试验中进一步研究。

参考文献

- [1] 陆景陵. 植物营养学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000:45-72.
- [2] 潘孝玉,戴文超,王晓萍. 无公害韭菜栽培技术要点[J]. 吉林科学,2011(6):166.
- [3] 李顺蓬,马进伟. 韭菜韭蛆防治方法[J]. 青海农技推广,2009(4):22-23.
- [4] 刘理,石启田,沙荣艳,等. 银杏酮下脚料防治韭菜根蛆[J]. 江西植保,2004(3):124-125.
- [5] 吕晓惠,王克安,杨宁,等. 福施壮对韭菜产量、生长性状及品质的影响[J]. 山东农业科学,2012(12):71-74.
- [6] 芦润儒. 硫酸钾复合肥对温室韭菜的产量影响初探[J]. 长江蔬菜,2008(10):52-53.