

紫花苜蓿叶挥发油的体外抗氧化活性研究

毕飞翔, 张维维, 孙强伟, 杨梦雅, 陆莲莲, 毕淑峰* (黄山学院生命与环境科学学院, 安徽黄山 245041)

摘要 [目的] 研究紫花苜蓿叶挥发油的体外抗氧化活性。[方法] 以金属离子螯合作用、ABTS 自由基和 DPPH 自由基清除作用为指标评价紫花苜蓿叶挥发油的体外抗氧化活性。[结果] 紫花苜蓿叶挥发油对金属离子螯合作用和 ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 分别为 73.97、47.60 μL 。[结论] 紫花苜蓿叶挥发油具有一定的体外抗氧化活性, 具有开发利用潜力。

关键词 紫花苜蓿叶; 挥发油; 抗氧化活性

中图分类号 S541+.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-04084-02

Study on Antioxidant Activity of Volatile Oil from Leaves of *Medicago Sativa* in vitro

BI Fei-xiang et al (College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041)

Abstract [Objective] The aim was to study the antioxidant activity of volatile oil from leaves of *Medicago sativa* in vitro. [Method] The antioxidant activity of volatile oil from leaves of *Medicago sativa* in vitro was evaluated by metal chelating ability, scavenging capacity against ABTS· and DPPH·. [Result] The volatile oil had metal chelating ability and scavenging capacity against ABTS· with IC_{50} values of 73.97, 47.60 μL . [Conclusion] The volatile oil from leaves of *Medicago sativa* exhibited some antioxidant activity in vitro and had a development potential.

Key words Leaves of *Medicago sativa*; Volatile oil; Antioxidant activity

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为豆科苜蓿属多年生牧草, 其抗逆性强, 分布范围广, 资源丰富。紫花苜蓿含有黄酮、多糖、挥发油、香豆素等活性成分, 具有抗血脂、抗动脉粥样硬化、调节免疫力等作用^[1-3]。文献报道了新疆、河北产紫花苜蓿挥发油化学成分^[4-5], 但紫花苜蓿叶挥发油抗氧化活性未见报道。笔者采用水蒸气蒸馏法提取紫花苜蓿叶挥发油, 并以金属离子螯合作用、ABTS 自由基和 DPPH 自由基清除作用为指标研究紫花苜蓿叶挥发油的抗氧化活性, 为紫花苜蓿资源的综合开发、药理研究等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 紫花苜蓿叶于 2012 年 4 月采自黄山市, 真空烘干后粉碎、过筛后备用。主要试剂: 1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH), 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 2, 2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二氢盐 (ABTS), Regal Biotechnology Company; 菲洛嗪 (Ferrozine), 东京化成工业株式会社; 过硫酸钾、丙酮等均为国产分析纯。仪器设备: UV754N 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 挥发油提取器、PL203 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取。 精确称取粉碎后的样品 40.00 g 置于烧瓶中, 加水 350 ml, 用挥发油提取器按水蒸气蒸馏法提取 6 h, 得到无色透明油状物, 无水硫酸钠干燥, 共提取 6 次。用丙酮将挥发油稀释成体积分数 10.00%, 备用。

1.2.2 金属离子螯合率的测定^[6]。取不同体积 (20 ~ 100 μL) 样品, 用丙酮将样品体积补至 100 μL , 形成不同浓度梯度样品。加入 2.8 ml 蒸馏水、2 mmol/L 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 μL 和 5 mmol/L 的菲洛嗪 150 μL , 10 min 后在波长 562 nm 处测

吸光度 (A_t), 以相同体积丙酮代替挥发油作为空白对照, 测其吸光度 (A_0)。

$$\text{螯合率} = (1 - A_t/A_0) \times 100\%$$

1.2.3 ABTS 自由基清除率的测定^[6]。将等量 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾混合, 置于暗处 16 h。用甲醇将 ABTS 溶液稀释至其在波长 734 nm 处吸光度 (0.70 ± 0.02)。取不同体积 (20 ~ 100 μL) 样品, 样品体积少于 100 μL 的试验管用丙酮补至 100 μL , 加入 2 ml ABTS 溶液, 6 min 后测量其在波长 734 nm 处的吸光度 (A_t)。测定 2 ml ABTS 溶液与 100 μL 甲醇混合后的吸光度 (A_0); 以 2 ml 甲醇代替 ABTS 溶液, 测其吸光度 (A_t)。

$$\text{清除率} (\%) = [(A_0 - A_t + A_j)/A_0] \times 100.$$

1.2.4 DPPH 自由基清除率的测定^[7-8]。取不同体积 (20 ~ 100 μL) 样品, 样品体积少于 100 μL 的试验管用丙酮补至 100 μL , 加入 4 ml 24 mg/L 的 DPPH 乙醇 (95%) 溶液, 避光 2 h, 在波长 517 nm 处测吸光度 (A_t), 以不加样品的 DPPH 乙醇液为对照, 测定对照组吸光度 (A_0)。

$$\text{清除率} (\%) = (1 - A_t/A_0) \times 100.$$

2 结果与分析

2.1 挥发油对金属离子的螯合作用 由图 1 可知, 10.00% 紫花苜蓿叶挥发油对金属离子具有一定螯合作用, 体积为 100 μL 时, 螯合率为 69.54%, 但其螯合能力低于 0.50 mg/ml 的 EDTA。挥发油对金属离子的螯合率随着样品体积增加而增大, 两者存在明显的量效依赖关系。挥发油样品体积 (X) 与螯合率 (Y) 的回归方程为 $Y = 0.7367X - 4.4921$ ($R^2 = 0.9345$), IC_{50} 值 (螯合率为 50.00% 时的样品体积) 为 73.97 μL ; 0.50 mg/ml 的 EDTA 样品体积 (X) 与螯合率 (Y) 的回归方程为 $Y = 0.7795X - 9.6700$ ($R^2 = 0.9593$), IC_{50} 值为 51.74 μL 。

2.2 挥发油对 ABTS 自由基的清除作用 由图 2 可知, 10.00% 紫花苜蓿叶挥发油对 ABTS 自由基具有较好的清除能力, 其清除效果优于 0.10 mg/ml 维生素 C, 样品体积为 100

作者简介 毕飞翔 (1989 -), 男, 安徽黄山人, 本科生, 专业: 林学。
* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事天然药物化学研究, E-mail: bsfhs@yahoo.cn。

收稿日期 2013-03-18

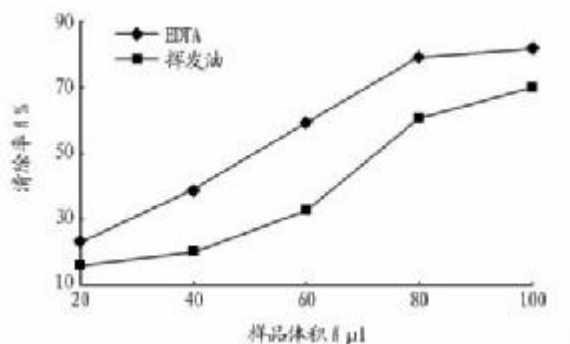


图1 挥发油对金属离子的螯合作用

μl 时,清除率达 70.43%,而相同体积 0.10 mg/ml 维生素 C 的清除率为 53.10%。挥发油对 ABTS 自由基的清除作用与样品体积存在剂量依赖关系,随着样品体积增加,清除率逐渐增加,但增幅逐渐减少。挥发油体积(X)与清除率(Y)的回归方程为 $Y = 0.4309X + 29.4872$ ($R^2 = 0.9807$), IC_{50} 值(清除率为 50.00% 时的样品体积)为 47.60 μl;0.10 mg/ml 维生素 C 样品体积(X)与清除率(Y)的回归方程为 $Y = 0.3023X + 22.0001$ ($R^2 = 0.9820$), IC_{50} 值为 92.63 μl,其值是紫花苜蓿叶挥发油 IC_{50} 值的 1.95 倍。

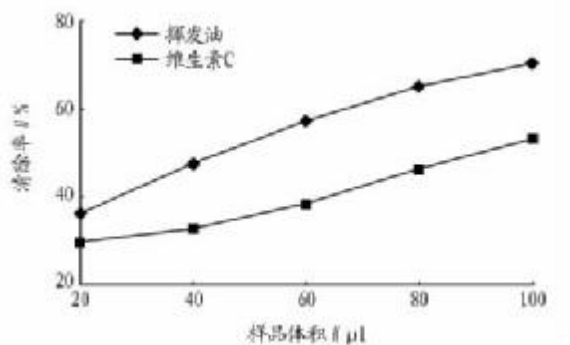


图2 挥发油对 ABTS 自由基的清除作用

2.3 挥发油对 DPPH 自由基的清除作用 由图 3 可知,10.00% 紫花苜蓿叶挥发油对 DPPH 自由基清除作用较差,其清除效果明显弱于 0.10 mg/ml 维生素 C,样品体积为 100 μl 时,清除率仅为 32.90%。清除率随着样品体积增加略有增大,样品体

积与清除率的相关性不明显,两者回归方程的 R^2 值仅为 0.7196。

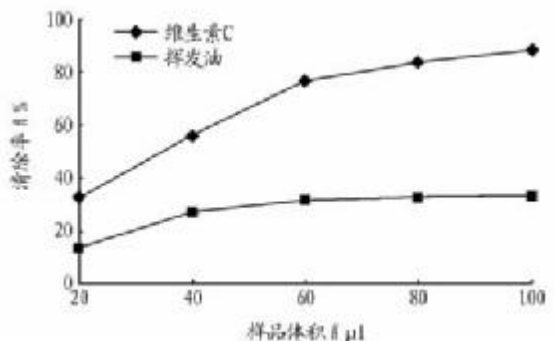


图3 挥发油对 DPPH 自由基的清除作用

3 结论与讨论

清除自由基是抗氧化剂抗氧化活性的主要机理。金属离子在自由基氧化过程中起催化剂作用,将金属离子螯合可以大大降低金属离子的催化作用,减弱或消除自由基对人体的危害。试验结果表明,10.00% 紫花苜蓿叶挥发油对金属离子和 ABTS 自由基具有较好螯合作用和清除作用, IC_{50} 值分别为 73.97、47.60 μl,且作用效果与样品量呈明显的正相关;但 10.00% 紫花苜蓿叶挥发油对 DPPH 自由基清除效果较弱。紫花苜蓿叶挥发油具有一定的抗氧化活性,在医药、食品等行业具有应用前景,其体内抗氧化活性有待进一步研究。

参考文献

- [1] 卢成,曾昭海,张涛,等. 紫花苜蓿生物活性成分研究进展[J]. 草业科学,2005,22(9):28-31.
- [2] 张春梅,王成章,胡喜峰,等. 紫花苜蓿的营养价值及应用研究进展[J]. 中国饲料,2005(1):15-17.
- [3] 陈元元,朱宇旋,张勇. 苜蓿多糖在畜禽饲料中的应用[J]. 动物营养学报,2013,25(1):36-43.
- [4] 张纵圆,彭映,符继红,等. 新疆紫花苜蓿挥发油化学成分的分析[J]. 质谱学报,2008,29(1):42-45.
- [5] 李存满,李兰芳,张勤增,等. 河北紫花苜蓿挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 河北工业科技,2010,27(3):146-148.
- [6] 杨少辉,宋英今,王洁华,等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力[J]. 食品科学,2010,31(17):166-169.
- [7] 贾红丽,张丕鸿,计巧灵,等. 新疆阿勒泰百里香挥发油化学成分 GC-MS 分析及抗氧化活性测定[J]. 食品科学,2009,30(4):224-229.
- [8] 赵金伟,李范洙,张先. 苹果酚类物质抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2010,31(17):170-172.

(上接第 4070 页)

模糊综合评价法和全息生育适度系数法均能有效地应对加工番茄品种品质进行定量和全面地综合评判。2 种方法比较得出,全息生育适度系数法分析结果更为准确,与品种的实际表现更相符,而且结果更为直观明了(尤其是全息图),充分反映了品种品质性状及表现,更具实用性。选取哪些性状综合分析评价加工番茄的品质,才能更加准确、全面的评判加工番茄品质的优劣,以及如何根据不同性状确定一个更为标准的权重系数乃是确定和使用评价方法的关键。

参考文献

- [1] 张俊儒,周宽基,王世红,等. 作物品种评价新方法——全息生育适度

- 系数法[J]. 安徽农业科学,2007,35(21):6345-6347.
- [2] 郁明谏,李淑珍. 多维时空全息协调理论专著[M]. 北京:北京农业大学出版社,1995.
- [3] 汪培庄,韩立岩. 应用模糊数学[M]. 北京:北京经济学院技术出版社,1989:209.
- [4] 杨崇瑞. 模糊数学及其应用[M]. 北京:中国农业出版社,1994:68-74.
- [5] 楼世博,孙章,陈化成. 模糊数学[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [6] 王建国,杨林章,单艳红. 模糊数学在土壤质量评价中的应用研究[J]. 土壤学报,2001,38(2):176-183.
- [7] 乐素菊,王晓明. 模糊数学在超甜玉米食用品质综合评价上的应用[J]. 玉米科学,2003,11(2):96-98.
- [8] 石书兵,徐文修,克尤木,等. 模糊综合评判在旱作春小麦品种评判中的应用[J]. 新疆农业大学学报,2001,24(2):22-25.
- [9] 郭瑞林. 农业模糊学[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1991:91-125.