

红毛七乙醇提取物 和不同极性部位抗氧化活性的研究

但飞君 鄢文芳 褚立军 鲁文艳 蔡正军

(三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室 湖北宜昌 443002)

摘要: 主要从清除 DPPH 自由基 ($\text{DPPH} \cdot$)、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot -}$)、羟基自由基 ($\cdot \text{OH}$) 和亚硝酸盐 (NO_2^-) 四个方面, 研究红毛七乙醇提取物和不同极性萃取部位的体外抗氧化活性。结果表明 红毛七乙醇提取物和不同极性部位对 $\text{DPPH} \cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot \text{OH}$ 、 NO_2^- 均具有清除能力, 其中乙醇提取物、正丁醇与乙酸乙酯中等极性部位抗氧化活性较强, 而极性较小的石油醚部位和极性较大的水部位抗氧化作用较弱。

关键词: 红毛七, 乙醇提取物, 极性部位, 抗氧化活性

Study on antioxidant activities of ethanol extract and different polar fractions of *Caulophyllum robustum* Maxmi.

DAN Fei-jun, YAN Wen-fang, CHU Li-jun, LU Wen-yan, CAI Zheng-jun

(Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development,
China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: The antioxidant activities of ethanol extract and different polar fractions of *Caulophyllum robustum* Maxmi. were evaluated by DPPH radical scavenging activity ($\text{DPPH} \cdot$), superoxide radical scavenging activity ($\text{O}_2^{\cdot -}$), hydroxyl radical scavenging activity ($\cdot \text{OH}$) and NO_2^- scavenging assays. The results showed that ethanol extract and different polar fractions displayed high antioxidant activities. In totally, the antioxidant activities of middle polar fractions were stronger than those of lower and higher polar fractions.

Key words: *Caulophyllum robustum* Maxmi. ; ethanol extract ; polar fraction ; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)01-0068-04

活性氧组分如 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot \text{OH}$ 等为人体正常代谢产物, 其含量过多会导致 DNA 和蛋白质受损、脂质过氧化、癌症、动脉粥样硬化、衰老和各种炎症疾病^[1]。抗氧化剂是一类重要的物质, 能够保护机体免受因自由基产生的氧化力造成的损伤。近年来, 从天然产物中寻找抗氧化剂成为研究热点^[2]。红毛七为小檗科红毛七属植物类叶牡丹 (*Caulophyllum robustum* Maxmi.) 的根及根茎, 我国主要分布于东北及陕西、浙江、湖北、四川、西藏等地, 其性温、味苦辛, 具有理气止痛、祛风活血、抗菌、散瘀等功效, 用于治疗跌打损伤、风湿疼痛、胃腹疼痛、月经不调等病症^[3], 文献报道红毛七具有抗炎镇痛、抗动脉粥样硬化、增加细胞膜的通透性、促进受损组织修复、抗肿瘤、抗病毒、抗心肌缺血和美容等多种生物活

性^[4,6]。红毛七的能效和生物活性是否与其抗氧化活性有关有待研究, 故本实验将红毛七乙醇提取物及不同的极性萃取部位进行了体外抗氧化实验, 包括其对 $\text{DPPH} \cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot \text{OH}$ 和亚硝酸盐的清除作用, 旨在揭示红毛七的抗氧化能力及其活性部位, 为红毛七作为功能性食品及天然抗氧化剂的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红毛七 采自湖北省宜昌市长阳土家族自治县 经三峡大学生物技术研究中心王玉兵老师鉴定为小檗科红毛七属植物红毛七 (*Caulophyllum robustum* Maxim.) 的根; DPPH Sigma 公司; 盐酸萘乙二胺 日本东京化工业株式会社; 其余试剂 均为国产分析纯。

AL204 电子天平 梅特勒-托利多(上海)有限公司; N-1001 旋转蒸发器 爱朗仪器(上海)有限公司; S-3100 紫外可见分光光度计 SCINCO 公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精密实验设备有限公司。

收稿日期 2009-12-18

作者简介: 但飞君(1972-)女, 博士, 副教授, 主要从事天然产物的活性成分研究。

基金项目: 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金项目(2007005)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 干燥红毛七粉碎过 60 目筛,得原药材粉末。以 95% 乙醇为溶剂,加热回流反复提取,减压浓缩得乙醇总提物(CR)3.6kg。总提物以 1:1 悬浮于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取液经减压浓缩,即得石油醚部位浸膏(CRP)50.3g、乙酸乙酯部位浸膏(CRE)33.2g、正丁醇部位浸膏(CRB)489.4g、水溶液部位浸膏(CRW)350.2g。

1.2.2 DPPH·清除能力的测定^[7-8] 精确称取 15.8mg DPPH,溶于 100mL 无水乙醇,配制成 $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 母液。依次精确量取 0.05、0.25、0.50、0.75、1.00mL 的 DPPH 母液,稀释至 2.00mL,在 517nm 下测其吸光度,得标准曲线: $Y = 1.233X - 0.05228$, $R = 0.99918$ 。

将 1.0mL 红毛七乙醇提取物、萃取部位不同浓度的样品溶液与 1.0mL $0.15\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液加入同一试管中,摇匀,放置 30min 后用溶剂作参比,测定其吸光度 A_1 ,同时测定 1.0mL $0.15\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液与 1.0mL 溶剂混合后的吸光度 A_0 ,以及 1.0mL 红毛七乙醇提取物、萃取部位不同浓度的样品溶液与 1.0mL 溶剂混合后的吸光度 A_j 。按照下式计算清除率,清除率越大,抗氧化能力越强。

$$\text{清除率}(S_0) = [1 - (A_1 - A_j) / A_0] \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

式中: A_0 : 未加抗氧剂时溶液的吸光度; A_1 : 加抗氧剂后溶液的吸光度; A_j : 样品在测定波长的吸光度。

1.2.3 超氧阴离子自由基清除能力的测定^[9-10] 取 4.5mL Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L, pH 为 8.2),于 20℃ 水浴中保温 20min,分别加入 1.0mL 不同浓度的乙醇提取物和不同极性萃取部位溶液以及 0.4mL 的邻苯三酚溶液($25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),混匀后,于 25℃ 水浴中反应 5min,加入 1.0mL HCl 溶液($8\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)终止反应,在 420nm 处测定吸光度 A_1 ,空白以蒸馏水代替样品液,测定吸光度 A_0 ;以蒸馏水代替显色剂测定样品本身吸光度 A_j 。按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - (A_1 - A_j)) / A_0] \times 100\% \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 : 空白对照液的吸光度; A_1 : 样品组的吸光度; A_j : 样品溶液吸光度。

1.2.4 羟基自由基清除能力的测定^[11] 在试管中加入 2.0mL pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液和 1.0mL $1.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻二氮菲溶液,混匀,加入 1.0mL $1.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液,立即混匀。加入 1.0mL 一定浓度的样品溶液,混匀,加入 0.02% 的 H_2O_2 1.0mL,补充体积至 8.0mL,37℃ 保温 1h。在 510nm 处测定吸光度(此为损伤管吸光度)。同时做样品空白实验,另做损伤管和未损伤管,其中损伤管中加入 0.02% H_2O_2 1.0mL,未损伤管不加 H_2O_2 ,最后补充各管体积至 8.0mL。于 37℃ 下保温 1h,测在 510nm 下的吸光度,重复两次,计算其平均值。按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_2 - A_1) / (A_0 - A_1)] \times 100\% \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 : 未损伤管的吸光度; A_1 : 损伤管的吸光度; A_2 : 加样品液并扣除样品空白后的吸光度。

1.2.5 亚硝酸盐清除能力的测定^[12-13] 精确量取亚硝酸钠标准液($5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)0.00、0.20、0.40、0.60、

0.80、1.00mL,分别置于 10mL 具塞刻度试管中。各加入 1.0mL 0.4% 的对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置 5min,加入 0.5mL 0.2% 的盐酸萘乙二胺溶液,加水至刻度,混匀,静置 15min,在 538nm 下测定吸光值,得标准曲线: $Y = 0.72478X + 0.01348$, $R = 0.99986$ 。

准确称取 $5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NaNO_2 标准溶液两份各 1.0mL,分别置于 25mL 比色管中,其中一份加入一定量的待测样品溶液,在 37℃ 恒温水浴中反应 30min,另一份作空白。取出后两份均立即加入 1.0mL 0.4% 的对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置 5min 后加入 0.5mL 0.2% 的盐酸萘乙二胺溶液,加水至 10mL,混匀,静置 15min,以不加 NaNO_2 的样品溶液的试剂为空白,于 538nm 处测定吸光值,分别为 A_1 、 A_2 。亚硝酸盐的清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_2 - A_1) / A_2] \times 100\% \quad \text{式(4)}$$

式中: A_1 : 加待测样品测定的吸光度; A_2 : 未加待测样品测定的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 红毛七乙醇提取物和不同极性部位对 DPPH· 的清除作用

DPPH· 是一种稳定的自由基,其在可见光区有特征吸收,比色测定简便、快捷。自由基清除剂存在时, DPPH· 的单电子被配对而使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小,且颜色变浅的程度与配对电子数是成剂量关系的,因此可用于天然抗氧化剂的筛选。本实验通过检测自由基 DPPH· 的清除率,观察红毛七乙醇提取物和不同极性萃取部位在体外对 DPPH· 有无清除作用,结果如图 1 所示。

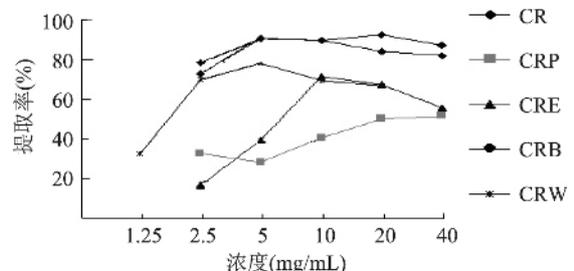


图1 红毛七乙醇提取物及不同极性部位对 DPPH· 的清除作用

由图 1 可知,在测定浓度范围内,样品对 DPPH 自由基都具有一定的清除能力,对 DPPH 自由基的清除率总体趋势是随着浓度的增加而提高,但当浓度增加到一定值后, DPPH· 清除率随浓度增大不再明显提高,甚至有所下降。其中石油醚部位、乙酸乙酯部位和水部位对 DPPH· 的最大清除率分别为 52.3%、72.4%、79.0%。乙醇提取物 $5.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 DPPH· 的清除率达 91.4%,正丁醇部位 $20.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 DPPH· 的清除率达 93.4%。正丁醇部位的清除 DPPH 自由基的作用最强,说明在正丁醇部位中清除 DPPH 自由基的物质的活性可能最高或含量最高。从实验过程和实验结果分析,当样品浓度增加到一定值时清除率反而有所下降,主要是样品颜色加深和溶解性问题,使得空白吸光度值较大,导致所得结果的偏差。

2.2 红毛七乙醇提取物和不同极性部位对超氧阴离子自由基的清除作用

超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)是活性氧的一种,是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的自由基。本实验通过邻苯三酚自氧化产生 $O_2^- \cdot$,来观察红毛七乙醇提取物和不同极性部位在体外对 $O_2^- \cdot$ 有无清除作用,结果如图2所示。

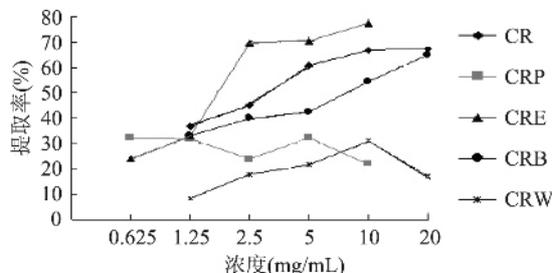


图2 红毛七乙醇提取物及不同极性部位对 $O_2^- \cdot$ 的清除作用

由图2可知,在测定浓度范围内,样品对 $O_2^- \cdot$ 都具有一定的清除能力,其中乙醇提取物、乙酸乙酯部位、正丁醇部位对 $O_2^- \cdot$ 的清除率总体趋势是随着浓度的增加而提高,且具有一定剂量依赖关系。而水部位当浓度增加到一定值后, $O_2^- \cdot$ 清除率随浓度增大不再提高甚至有所下降。乙醇提取物、正丁醇部位 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 对 $O_2^- \cdot$ 的清除率分别为67.2%和64.7%。乙酸乙酯部位 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 对 $O_2^- \cdot$ 的清除率达77.2%。乙酸乙酯部位、正丁醇部位的清除 $O_2^- \cdot$ 的作用强,说明在乙酸乙酯部位、正丁醇部位中清除 $O_2^- \cdot$ 的物质的活性可能较高或含量高。从实验过程和实验结果分析,样品的溶解性问题是影响测定和评价的主要因素。

2.3 红毛七乙醇提取物和不同极性部位对羟基自由基的清除作用

羟基自由基($\cdot \text{OH}$)是化学性质活泼的一种活性氧,也是目前已知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基,几乎能与所有的生物大分子发生反应。本实验以邻二氮菲- Fe^{2+} 为指示剂,采用比色法测定Fenton反应体系产生的 $\cdot \text{OH}$,评价样品对 $\cdot \text{OH}$ 的清除作用,结果如图3所示。

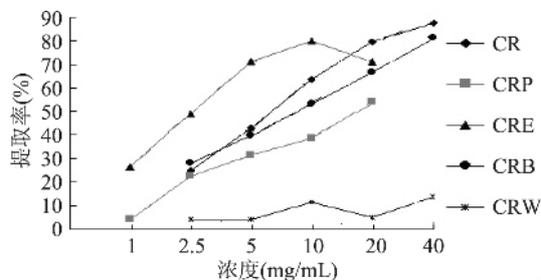


图3 红毛七乙醇提取物及不同极性部位对 $\cdot \text{OH}$ 的清除作用

由图3可知,在测定浓度范围内,样品对 $\cdot \text{OH}$ 都具有一定的清除能力。乙醇提取物、石油醚部位、正丁醇部位对 $\cdot \text{OH}$ 的清除率总体趋势是随着浓度的增加而提高,并呈一定的剂量依赖关系,而乙酸乙

酯部位浓度增加到一定值后, $\cdot \text{OH}$ 清除率随浓度增大不再明显提高甚至有所下降。石油醚部位对 $\cdot \text{OH}$ 具有一定清除能力,最大清除率达52.4%,而水部位对 $\cdot \text{OH}$ 的清除能力较弱。乙醇提取物、乙酸乙酯部位、正丁醇部位作用最明显。乙醇提取物、正丁醇部位 $40.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 对 $\cdot \text{OH}$ 的清除率分别达85.5%和79.3%。乙酸乙酯部位 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 对 $\cdot \text{OH}$ 的清除率达78.2%。乙酸乙酯、正丁醇部位的清除 $\cdot \text{OH}$ 的作用强,说明在乙酸乙酯部位、正丁醇部位中清除 $\cdot \text{OH}$ 的物质的活性可能较高或含量高。实验过程中当样品因浓度较高或极性较小出现溶解性问题时,虽然颜色变化明显但通过吸光度测定后计算结果却显示活性不好。

2.4 红毛七乙醇提取物和不同极性部位对 NO_2^- 的清除作用

亚硝酸盐与仲胺在人体中易合成强致癌物质亚硝胺,亚硝胺能引起人体和动物的肝脏等多种器官的恶性肿瘤,因此在体内清除亚硝酸盐以阻断亚硝胺的合成是防治癌症的有效途径之一。本实验通过检测对 NO_2^- 的清除率,观察红毛七乙醇提取物的不同极性部位在体外对 NO_2^- 有无清除作用,结果如图4所示。

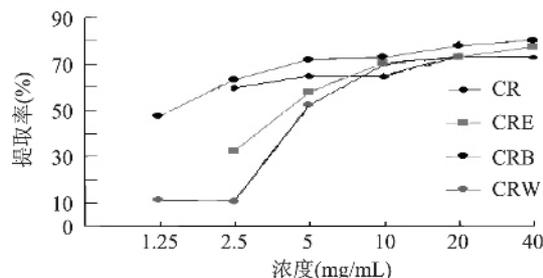


图4 红毛七乙醇提取物及不同极性部位对 NO_2^- 的清除作用

由图4可知,在测定浓度范围内,样品对 NO_2^- 都具有一定的清除能力,对 NO_2^- 的清除率总体趋势是随着浓度的增加而提高,但当浓度增加到一定值后, NO_2^- 清除率随浓度增大不再明显提高。乙醇提取物、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位作用很明显。对 NO_2^- 的清除率,乙醇提取物、水部位 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 为73.6%和73.8%,乙酸乙酯部位、正丁醇部位 $40.0 \text{ mg} \cdot \text{ mL}^{-1}$ 达77.7%和80.6%。

3 结论

实验对红毛七95%乙醇提取物和不同极性萃取部位的体外抗氧化研究结果表明:乙醇提取物和不同极性部位均具有抗氧化作用,其中以正丁醇与乙酸乙酯中等极性部位活性较强,而极性较小的石油醚部位和极性较大的水部位抗氧化作用较弱,这提示乙酸乙酯相和正丁醇相是其活性部位。另外在不同的自由基产生体系中,提取物和不同极性部位抗氧化活性强弱不尽相同。从DPPH \cdot 清除能力的测定中可知,最大清除率的顺序为:正丁醇部位>乙醇提取物>水部位>乙酸乙酯部位>石油醚部位;对 $O_2^- \cdot$ 的最大清除率的顺序为:乙酸乙酯部位

(下转第74页)

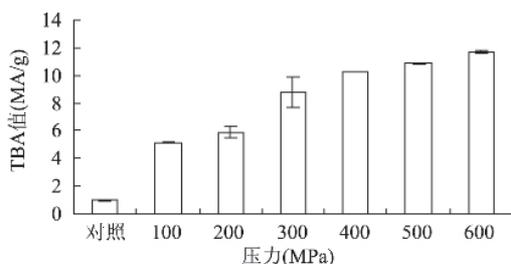


图8 超高压处理对TBA值的影响

3 结论

超高压对牡蛎的杀菌效果显著。当超高压值超过500MPa后,牡蛎样品达到商业无菌。600MPa处理的牡蛎在4℃冷藏21d后,总菌落数对数值不到6,仍然符合日本农林水产省对于生鲜牡蛎细菌总数的要求。pH7.5的中性蛋白酶受到压力的影响最大,而pH4.5和6的酸性蛋白酶受到压力的影响较小。超高压处理使牡蛎的硬度、弹性、咀嚼度、粘结性和恢复力表现出不同程度的下降,而且超高压处理对牡蛎的色泽会产生一定影响。超高压处理可引起TBA值显著升高,表明超高压引起了牡蛎中脂肪的氧化。本研究表明,较强超高压处理(>500MP)对牡蛎具有显著的杀菌效果,但也引起了牡蛎品质一定程度的下降,因此,有必要研究应用超高压与其他保鲜栅栏因子(如温和热处理、天然抗菌剂)协同提高杀菌效果、降低超高压强度和最大限度保留牡蛎的品质。

参考文献

- [1] 张立云,曹霞敏,李静,等.超高压对草莓浆杀菌效果及微生物菌落形态的影响[J].食品工业科技,2009,30:109-112.
- [2] 魏静,解新安.食品超高压杀菌研究进展[J].食品工业科技,2009,30:363-367.

(上接第70页)

>乙醇提取物>正丁醇部位>石油醚部位>水部位,对·OH的最大清除率的顺序为:乙醇提取物>正丁醇部位>乙酸乙酯部位>石油醚部位>水部位,对NO₂⁻的最大清除率的顺序为:正丁醇部位>乙酸乙酯部位>水部位>乙醇提取物。相同极性部位的提取物在不同的自由基体系中,其清除能力也不同。就正丁醇部位而言,对DPPH·的最大清除率为93.4%,对O₂⁻·的最大清除率达64.7%,对·OH的清除率达79.3%,对NO₂⁻的最大清除率为80.6%。这可能与红毛七提取物的不同极性部位中所含抗氧化成分的种类和结构有关,故在不同的抗氧化体系中,不同极性部位的抗氧化作用不同。

参考文献

- [1] Moskovitz J, Yim MB, Choke PB. Free radicals and disease[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 397(2): 354-359.
- [2] Schaffer S, Schmitt SS, Muller WE, et al. Antioxidant properties of Mediterranean food plant extract: geographical differences[J]. Journal of Physi and Pharma, 2005, 56: 115-124.
- [3] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1977: 998-999.
- [4] Perdue G P, Blomster R N, Blake D A, et al. South American

- [3] 潘见, 曾庆梅, 谢慧明, 等. 草莓汁的超高压杀菌研究[J]. 食品科学, 2004, 25: 31-34.
- [4] 张秋勤, 徐幸莲, 胡萍, 等. 超高压处理对肉及肉制品的影响[J]. 食品工业科技, 2008, 29: 267-270.
- [5] Angsupanich K, Ledward DA. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle[J]. Food Chemistry, 1998, 63(1): 39-50.
- [6] Chevalier D, Bail AL, Ghoul M. Effects of high pressure treatment (100 - 200MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle[J]. Food Research International, 2001, 34: 425-429.
- [7] Cano MP, Hernandez A, Ancos BD. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange produces[J]. J Food Sci, 1997, 62(1): 85-88.
- [8] Peñasa E, Préstamo G, Poloc F. Enzymatic proteolysis under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly in the hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 569-573.
- [9] Ramirez-Suarez JC, Morrissey MT. Effect of high pressure processing (HPP) on shelf life of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) minced muscle[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2006(12): 156-165.
- [10] Rodriguez-Amaya. Stability of carotenoids during the storage of foods[J]. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects, 1993: 591-628.
- [11] Cheah PB, Ledward DA. Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat[J]. Journal of Food Science, 1997, 62: 1135-1138.
- [12] Tanaka M, Xueyi Z, Nagashima et al. Effect of high pressure on the lipid oxidation in sardine meat[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57: 957-963.

plants II. Taspine isolation and anti-inflammatory activity[J]. Pham Sci, 1979, 6(1): 124-126.

- [5] 林蓉, 刘俊田, 贺浪冲. 红毛七提取物对H₂O₂损伤内皮细胞核转录因子-κB的表达和NO生成的影响[J]. 中国药理学杂志, 2004, 11(39): 826-828.
- [6] 焦淑萍, 于铁力, 姜虹. 类叶牡丹根茎水煎剂抗炎作用的研究[J]. 吉林医学院学报, 1997, 17(1): 8-9.
- [7] 杨怀霞, 马庆一, 吴平格. DPPH法评价葡萄籽提取物淬灭自由基的方法研究[J]. 河南科学, 2004, 22(6): 765-767.
- [8] Dziedzic S Z, Hudson B J. Hydroxy isoflavones as antioxidants for edible oil[J]. Food Chem, 1983, 11(3): 161-166.
- [9] 许中鸿, 杭湖, 李运平. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进[J]. 化学通报, 2001, 64(8): 516-519.
- [10] 吴春, 陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究开发, 2005, 17(5): 553-556.
- [11] 邓柯玉, 辛洪波. 云南甘草总皂苷清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(5): 350-354.
- [12] 薛长晖, 王佩维, 姚晨之. 苦荞粉提取液对NO₂⁻清除作用的体外实验研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2002(10): 48-50.
- [13] 袁毅桦, 陈忻, 陈纯馨, 等. 柚皮提取物对亚硝化反应抑制作用研究[J]. 化学世界, 2004(1): 27-30.