

瓶尔小草不同溶剂提取物的体外生物活性

曾永芳, 廖华珍, 许海棠, 王 聪, 韦贻春

Study on Biological Activity of Different Solvent Extracts from *Ophiolossium vulgatum* L. in Vitro

ZENG Yongfang, LIAO Huazhen, XU Haitang, WANG Cong, and WEI Yichun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020167>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

10种广东药食两用植物的抗氧化和抗增殖活性评价

Evaluation of Antioxidant and Antiproliferation Activities of 10 Kinds of Guangdong Medicinal and Edible Plant

食品工业科技. 2021, 42(8): 307-312

粗毛纤孔菌(*Inonotus hispidus*)的鉴定及其子实体不同溶剂提取物的抗氧化活性与抑菌活性研究

Identification of *Inonotus hispidus* and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Solvent Extracts from Its Fruiting Bodies

食品工业科技. 2018, 39(23): 99-104

海南4种茶水提物的抗氧化及抑菌活性比较

Antioxidant and Antibacterial Activity of Aqueous Extracts from Four Kinds of Tea in Hainan

食品工业科技. 2018, 39(23): 56-63

金花葵花黄酮提取物不同溶剂萃取物的抗氧化活性

Antioxidant Activity of Extracts from Different Polar Solvents of Flavonoid Extract of *Aurea helianthus* Flower

食品工业科技. 2019, 40(11): 120-125

木贼醇提物不同萃取部位总酚酸、黄酮含量测定及抗氧化活性研究

Determination of total phenolic acids, flavonoids of different solvent extracts from *Equisetum hiemale* L. and the antioxidant activity effects

食品工业科技. 2018, 39(8): 56-60,66

真空耦合超声波提取龙牙木皂苷及其抗氧化和抑菌活性研究

Optimization of Ultrasonic Coupled Vacuum Assisted Extraction and Antioxidant and Antibacterial Activity of Saponin from *Aralia elata*

食品工业科技. 2019, 40(22): 24-33,39



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

曾永芳, 廖华珍, 许海棠, 等. 瓶尔小草不同溶剂提取物的体外生物活性 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 363–368. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021020167

ZENG Yongfang, LIAO Huazhen, XU Haitang, et al. Study on Biological Activity of Different Solvent Extracts from *Ophiolossium vulgatum* L. in Vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 363–368. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021020167

瓶尔小草不同溶剂提取物的体外生物活性

曾永芳¹, 廖华珍², 许海棠^{2,*}, 王 聪², 韦贻春²

(1. 贵港市疾病预防控制中心, 广西贵港 537100;

2. 广西民族大学化学化工学院, 广西南宁 530006)

摘要: 比较瓶尔小草不同溶剂 (氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇) 提取物的抗氧化性、抑菌性和抗癌细胞增殖作用。以抗坏血酸为对照, 通过测定对 3 种自由基的清除作用来评价瓶尔小草提取物的抗氧化活性; 以微量稀释法研究了 4 种提取物对几种常见致病菌的抑菌活性; 同时还采用四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法研究了瓶尔小草提取物对 SKOV3 卵巢癌细胞的抗增殖作用。结果表明: 瓶尔小草各提取物都有一定的抗氧化、抑菌和抗增殖作用。其中正丁醇提取物的活性最强, 其对 DPPH 自由基的清除效果最佳, IC_{50} 为 0.114 mg/mL; 对乙型溶血性链球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠球菌有明显的抑制作用, MIC 均为 0.313 mg/mL; 对 SKOV3 卵巢癌细胞的抑制作用最强, IC_{50} 为 114.5 μ g/mL。瓶尔小草正丁醇提取物可望进一步开发用于药品和功能食品领域。

关键词: 瓶尔小草, 不同溶剂提取物, 抗氧化活性, 抑菌活性, 抗增殖活性

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)22-0363-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021020167



本文网刊:

Study on Biological Activity of Different Solvent Extracts from *Ophiolossium vulgatum* L. in Vitro

ZENG Yongfang¹, LIAO Huazhen², XU Haitang^{2,*}, WANG Cong², WEI Yichun²

(1. Guigang Centers for Disease Control and Prevention, Guigang 537100, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

Abstract: The antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of different solvents (chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, ethanol) extracts from *Ophiolossium vulgatum* L. were compared. The antioxidant activity of four extracts was evaluated by determining the removal effect of three free radicals, with ascorbic acid used as control. The antimicrobial activity of the four extracts against several common pathogenic bacteria was determined by microdilution assay. The antiproliferative activities on SKOV3 cells were detected by MTT assay. The results showed that all the extracts had certain antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities, especially *n*-butanol extract exhibited the strongest activity among them. The scavenging effect of *n*-butanol extract was the best for DPPH free radicals, with IC_{50} value of 0.114 mg/mL, and it had obvious inhibitory effect on beta hemolytic *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Monilia albican*, with MIC value of 0.313 mg/mL, and had the strongest inhibitory effect on SKOV3 ovarian cancer cells, with IC_{50} value of 114.5 μ g/mL. The *n*-butanol extract from *Ophiolossium vulgatum* L. showed the potential to be further studied and used in the fields of drugs and functional foods.

Key words: *Ophiolossiumvulgatum* L.; different solvent extracts; antioxidant activity; antibacterial activity; antiproliferative activity

瓶尔小草(*Ophioglossumvulgatum* L.), 又名一支箭、一枝枪、矛盾草等, 为蕨类植物, 广泛分布于云南、贵州、四川、广西等地。瓶尔小草是我国民间一

味重要的中药, 具有清热凉血、解毒镇痛之功效。常用于治疗肺热咳嗽、小儿高热惊风、目赤肿痛、胃痛、疔疮痈肿、蛇虫咬伤、跌打肿痛等症^[1]。目前, 从

收稿日期: 2021-02-23

基金项目: 广西自然科学基金青年项目 (2019GXNSFBA185002); 广西民族大学研究生教育创新计划项目 (gxun-chxzs2019010)。

作者简介: 曾永芳 (1984-), 女, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 食品科学, E-mail: xiaozeng031@163.com。

* 通信作者: 许海棠 (1975-), 女, 硕士, 正高级实验师, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: xhthellen@163.com。

瓶尔小草同属植物中鉴别分离得到的化合物有氨基酸、有机酸、黄酮类、甾体类及多糖等^[2-4]。文献已报道其不仅具有抗病毒、抗溃疡作用,还具有一定的抗肿瘤作用^[5-7]。但是,关于瓶尔小草的抗氧化、抑菌和抗增殖方面的研究较少见报道。

越来越多的证据表明许多疾病都与自由基有关,自由基进入细胞破坏 DNA,引起细胞损伤、死亡,并引发许多慢性疾病,例如心脑血管疾病、帕金森氏病和癌症等^[8]。因此,利用抗氧化剂有效抑制自由基的氧化反应至关重要^[9]。然而,研究表明,合成抗氧化剂具有一定的肝脏毒性和致癌作用^[10-11],因此,开发和利用安全有效的天然抗氧化剂成为研究热点。近年来,天然产物因具有良好的抗癌活性和低毒性受到人们的关注^[9,12]。多酚类化合物普遍存在于天然绿色植物中,研究发现植物多酚可以通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、免疫调节和增强体内抗氧化酶活性等方面发挥抗肿瘤作用^[13-14]。

为了研究瓶尔小草的抗氧化、抑菌和抗增殖活性,本实验对瓶尔小草进行脱脂,然后分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇加以提取,获得不同的提取物。通过测定瓶尔小草各提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的清除率进行抗氧化能力的评估;并测定其对 6 种常见致病菌和 1 种真菌的最低抑菌浓度,用以评价瓶尔小草不同溶剂提取物的抑菌性;还采用 MTT 法考察其对 3 种癌细胞的增殖抑制作用,以期为瓶尔小草的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

瓶尔小草 广西玉林中药材市场提供,经广西中医药大学药教研室鉴定为瓶尔小草(*Ophiopogon vulgatum* L.)的干燥茎叶;二苯代苦味酰、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 Sigma-aldrich 公司;金黄色葡萄球菌 CMCC26003、普通变形杆菌 CMCC49027、肺炎克雷伯氏菌 CMCC46117、大肠埃希菌 CMCC44102、铜绿假单胞菌 CMCC10104、乙型溶血性链球菌 ATCC21059、白色念珠菌 ATCC10231 广东环凯微生物科技有限公司提供;细胞:SKOV3 卵巢癌细胞 广西医科大学提供,U251 脑胶质瘤和 A375 黑色素瘤 南京科佰生物科技有限公司提供;细菌培养基、真菌培养基、1640 培养基、胰蛋白酶 EDTA 消化液等 为国产生物制剂;所有分离测试用的试剂 均为分析纯;水为自制超纯水。

全波长酶标仪 Thermo Labsystems 公司;CKX41 倒置显微镜 日本 Olympus 公司;5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱 美国 Thermo Fisher scientific 公司;RE52A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;SPX-500 生化培养箱 宁波江南仪器厂;CMP-TA-20L 型超纯水器 成都优越科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同溶剂提取物的制备 称取干燥的瓶尔小草 100 g,剪碎,用 800 mL 石油醚回流 2 h 后,取滤渣,挥干溶剂,加入 800 mL 的氯仿回流提取 2 次,每次 2 h,合并两次滤液,得氯仿提取液。同法,取挥干石油醚的滤渣,分别加入适量乙酸乙酯、正丁醇、乙醇回流提取 2 次,分别收集滤液。旋蒸提取液,真空干燥后得到瓶尔小草的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和乙醇的 4 种极性溶剂提取物,储存于 -20 ℃ 待用。

1.2.2 样品溶液的制备 精密称取各提取物,加入 1 mL 的二甲基亚砜(DMSO),超声波超声助溶,抗氧化实验需配成 20 mg/mL 的样品溶液,抑菌实验需配成 250 mg/mL 的样品溶液,抗增殖实验需配成 40 mg/mL 的样品溶液,测试之前用相应溶剂稀释至适宜浓度。

1.2.3 总黄酮含量的测定 芦丁标准曲线绘制:取 6 个 25 mL 容量瓶,分别加入芦丁对照品溶液(0.128 mg/mL)2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL,加入 5% 的亚硝酸钠溶液 1.0 mL,振摇,静置 6 min;再加入 10% 的硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,6 min 后加入 10.0 mL 氢氧化钠试液(1 mol/L),加 60% 乙醇溶液定容,摇匀,放置 15 min。以不含芦丁的上述混合溶液为空白溶液,在 510 nm 处测定吸光值^[15]。绘制标准曲线,得方程 $Y=12.036X+0.0012$, $r=0.9999$,其中, Y 为吸光度值, X 为浓度值,单位为 mg/mL。

样品总黄酮含量测定:精密量取样品溶液 1.0 mL,置于 50 mL 量瓶中,按上述方法操作测定吸光值,并计算总黄酮含量,结果以芦丁当量(每克提取物相当于芦丁的毫克数)表示。

1.2.4 总酚含量的测定 没食子酸标准曲线绘制 取一批试管,分别加入不同浓度没食子酸标准溶液(20、40、60、80、100 μg/mL)0.1 mL,加入 0.5 mL 福林酚试剂和 7.9 mL 水,避光放置 5 min,加入 1.5 mL 碳酸钠溶液(10%, w/v),避光放置 2 h 后在 765 nm 波长处测定吸光值^[15]。绘制标准曲线,得方程 $Y=0.0106X+0.174$, $r=0.9991$,其中, Y 为吸光度值, X 为浓度值,单位为 μg/mL。

样品总酚含量测定:精密量取样品溶液各 0.1 mL,置于试管中,按上述方法处理后测定吸光值,计算总酚含量,结果以没食子酸当量(每克提取物相当于没食子酸的毫克数)表示。

1.2.5 抗氧化活性的测定 本实验主要是通过测定瓶尔小草各溶剂提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的清除能力来评价其抗氧化活性。

参考文献 [16] 测定瓶尔小草各提取物的 DPPH 自由基清除能力。配制 DPPH 溶液(0.1 mmol/L)以及不同浓度的各提取物溶液,按文献方法分别取两种溶液等体积混匀,避光放置 30 min,以抗坏血酸溶液为对照,在 517 nm 处测定吸光度。计算清除率的公

式如下:

$$\text{清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

式 (1)

式中, A_1 为 DPPH 溶液+样品溶液的吸光值; A_2 为样品溶液+无水乙醇的吸光值; A_0 为 DPPH 溶液+无水乙醇的吸光值。

测定 ABTS 自由基清除率, 参照吴丰鹏等^[17] 的方法配制 ABTS⁺工作液, 精密吸取 ABTS⁺溶液 3.8 mL 和样品溶液 0.2 mL 混合摇匀, 6 min 后在 734 nm 波长处测定吸光值, 清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

式 (2)

式中, A_0 为空白溶液的吸光值, A_s 为样品溶液吸光值。

羟自由基清除能力的测定参考夏秀芳等^[18] 的方法, 实验前配制好不同浓度的样品溶液, 抗坏血酸溶液以及反应需要的各溶液: 磷酸盐缓冲液(pH=7.4), 邻菲罗啉溶液(5 mmol/L), 硫酸亚铁溶液(7.5 mmol/L) 和 1% 双氧水溶液。按表 1 依次加入各溶液分别配制损伤管, 未损伤管和样品管。将管中溶液充分混合均匀后, 置于 37 ℃ 水浴反应 1 h, 在 536 nm 处测吸光值。样品管、损伤管和未损伤管测得的吸光值分别记为 $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{损}}$ 、 $A_{\text{未损}}$, 清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{损}}}{A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}} \times 100$$

式 (3)

表 1 配制各试验管所需溶液 (mL)
Table 1 Preparation of solutions for test tubes(mL)

	磷酸盐 缓冲液	邻菲罗啉 溶液	硫酸亚铁 溶液	水	样品	1% 双氧水 溶液
未损伤管	5	1	1	3	0	0
损伤管	5	1	1	2	0	1
样品管	5	1	1	0	2	1

1.2.6 抑菌活性的测试 参照文献 [19], 采用微量二倍稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)。在聚乙烯 96 孔板上进行: 先往每个孔加入液体培养基 100 μL , 然后吸取灭菌的样品溶液(10 mg/mL)100 μL 加入第 1 孔中, 混匀后吸取 100 μL 加入到第 2 孔中, 依此类推, 得到一系列浓度的样品孔。每个样品做 3 个平行试验行。向样品孔中加入 100 μL 检验菌液(10^6 CFU/mL); 阳性对照孔只加液体培养基和菌液; 阴性对照孔不加菌液。实验结束后, 将各细菌试验板置于生化培养箱中, 设定 37 ℃ 培养 24 h; 白色念珠球菌试验板置于 28 ℃ 生化培养箱培养 48 h, 观察结果。

1.2.7 抗肿瘤活性测定 采用 MTT 法, 参照文献 [20] 进行测定。SKOV3 卵巢癌细胞经过活化培养后, 将细胞悬液的密度控制在 1×10^5 个/mL, 分别取 100 μL 接种于 96 孔板中, 并于 37 ℃、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 将孔内培养基吸出, 将含有不同终浓度(0、25、50、100、200、400

$\mu\text{g/mL}$)样品溶液的培养基 100 μL 加入到 96 孔板中, 并培养 48 h。每个梯度接种 5 个平行孔。培养完全后, 吸去上清液, 向各孔中加入 20 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h。吸去孔内的上清液, 每孔再加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在 490 nm 处测定各孔吸光度值。细胞增殖抑制率的计算公式为:

$$\text{增殖抑制率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_b} \times 100$$

式 (4)

式中, A_s 为加药孔的吸光值, A_c 为对照孔(含有细胞, 不加药物处理)的吸光值, A_b 为空白孔(只加培养基)的吸光值。

本实验中考察了正丁醇提取物对 U251 脑胶质瘤和 A375 黑色素瘤细胞的抗增殖作用, 按上述同法操作。

1.3 数据处理

所有实验分别取样重复测定 3 次, 结果用平均值 \pm 标准差表示。数据采用 Excel 2010 和 SPSS17.0 软件处理, 并采用 Origin8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 总黄酮和总酚含量

瓶尔小草 4 种溶剂提取物的总黄酮和总酚含量如表 2 所示。从表中可以看出, 正丁醇提取物中的总黄酮和总酚含量都是最高的, 达到了 3.35 和 18.40 mg/g; 其次是乙酸乙酯提取物, 含量分别是 1.63 和 5.98 mg/g。总黄酮含量最低的是乙醇提取物, 只有 0.94 mg/g; 总酚含量最低的是氯仿提取物, 含有 2.63 mg/g。植物多酚具有多元酚的结构, 极性较大, 易溶于正丁醇和乙酸乙酯中^[21], 因此, 正丁醇和乙酸乙酯提取物中的总黄酮和总酚含量较高。

表 2 总黄酮和总酚含量测定结果
Table 2 Content of total flavonoids and total phenols

成分	氯仿提取物 (mg/g)	乙酸乙酯提取物 (mg/g)	正丁醇提取物 (mg/g)	乙醇提取物 (mg/g)
总黄酮	1.13 \pm 0.04	1.63 \pm 0.05	3.35 \pm 0.09	0.94 \pm 0.03
总酚	2.63 \pm 0.08	5.98 \pm 0.14	18.40 \pm 0.46	4.53 \pm 0.12

2.2 DPPH 自由基清除能力

各提取物清除 DPPH 自由基的能力见图 1, 由图 1 可看出各提取物在试验范围内呈量效关系。当浓度从 0.2 增至 1.0 mg/mL 时, 氯仿、乙醇和乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基的清除率由 17.4%、38.2%、49.8% 分别上升至 48.4%、91.1%、92.6%。当浓度为 0.2 mg/mL 时, 正丁醇提取物的清除率已超过 90%, 远优于另外 3 个提取物, 且与抗坏血酸较为接近。通过对各样品溶液与清除率进行回归分析, 得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇提取物清除 DPPH 自由基活性的 IC_{50} (清除 50% 的自由基所需要的样品质量浓度)值依次是 0.965、0.243、0.114、0.326 mg/mL。显然, 对 DPPH 自由基清除能力最强的是正丁醇提

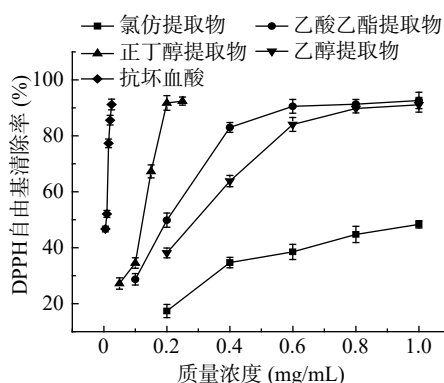


图1 瓶尔小草提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 DPPH radical scavenging ability of extracts from *Ophiolossum vulgatum* L.

取物,最弱的是氯仿提取物。

将不同提取物的总酚、总黄酮含量测定结果与不同方法测得的抗氧化能力结果作了相关性分析,结果见表3。从表3可以看出,瓶尔小草提取物清除 DPPH 自由基的能力与总酚、总黄酮的相关系数分别为 0.669 和 0.583,表明酚酸和黄酮类化合物为瓶尔小草中清除 DPPH 自由基的主要作用成分。

表3 抗氧化能力与总酚、总黄酮含量的相关性

Table 3 Correlation analyses between antioxidant capacity with content of total flavonoids and total phenols

相关系数	DPPH自由基清除能力	ABTS自由基清除能力	羟自由基清除能力
总酚含量	0.669	0.595	0.509
总黄酮含量	0.583	0.533	0.602

2.3 ABTS 自由基清除能力

各提取物清除 ABTS 自由基的结果如图2所示,正丁醇、乙酸乙酯和乙醇提取物在 0.2~2 mg/mL 的范围内量效关系明显,呈较好的线性关系。由线性方程计算出氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇提取物清除 ABTS 自由基活性的 IC_{50} 值分别为 4.34、1.02、1.07 和 1.90 mg/mL。显然,乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物清除能力较强,且很接近;氯仿提取物的清除能力明显低于其它3种提取物。从表3可看出,ABTS 自由基清除能力与样品中总酚和总黄酮的含量具有

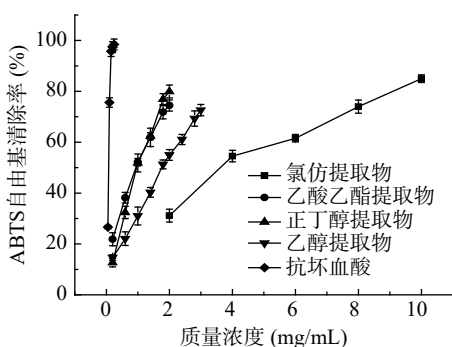


图2 瓶尔小草提取物对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.2 ABTS radical scavenging ability of extracts from *Ophiolossum vulgatum* L.

较高的相关性,相关系数分别为 0.595 和 0.533,表明酚类和黄酮类化合物对 ABTS 自由基清除能力都有贡献。

2.4 羟自由基清除能力

各提取物清除羟自由基的结果见图3。由图3可知,瓶尔小草各提取物对羟自由基的清除能力与浓度呈现很好的线性关系,增幅明显。由拟合的线性方程得到氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇提取物羟自由基清除活性的 IC_{50} 值分别为 1.38、2.44、1.23、2.65 mg/mL。由 IC_{50} 值可以推断对羟自由基清除能力最好的是正丁醇提取物,其次是氯仿提取物,清除作用最弱的是乙醇提取物,四者的清除能力都弱于抗坏血酸。强弱趋势与清除 DPPH 和 ABTS 自由基的趋势不一样,可能与样品对各自由基的清除原理不同有关。相关性分析结果显示,样品中总酚和总黄酮的含量与羟自由基清除能力具有较高的相关性,相关系数分别为 0.509 和 0.602,表明瓶尔小草中黄酮类化合物对羟自由基清除能力的贡献大于酚酸类化合物。

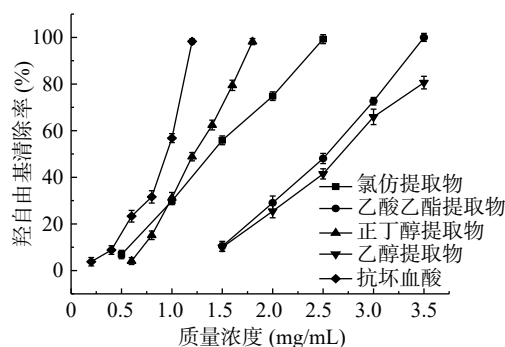


图3 瓶尔小草提取物对羟自由基的清除能力

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging ability of extracts from *Ophiolossum vulgatum* L.

有文献报导了提取物中较高的酚酸和黄酮含量与抗氧化活性呈正相关^[22],本实验结果与文献的研究结果一致。瓶尔小草各提取物对自由基的清除活性具有差异性,与总酚和总黄酮含量有关,总酚和总黄酮含量最高的正丁醇提取物表现为抗氧化能力最强。

2.5 MIC 测定结果

瓶尔小草各提取物对各供试菌的最低抑菌浓度见表4。由表4可知,4种瓶尔小草提取物对不同试验菌的抑制性表现出明显差别。氯仿提取物对大肠埃希菌抑制效果最好(MIC为1.25 mg/mL),但是对铜绿假单胞菌抑制效果最差。乙酸乙酯提取物对乙型溶血性链球菌的抑制效果很好(MIC为0.313 mg/mL),但是对大肠埃希菌和肺炎克雷伯氏菌的抑制效果最差。正丁醇提取物表现出较好的抑菌效果,除了大肠埃希菌,对于其它6种试验菌的MIC均为4个提取物中最低。乙醇提取物对7种试验菌的抑制效果一般,为4个提取物中最差。总的来说,瓶尔小草各提取物都具有一定的抑菌作用,正丁醇提取物对其中6种试验菌的抑制效果最强,说明其具有较强的广谱

抑菌性,提示其在呼吸科、皮肤科、外科及妇科等疾病治疗方面有良好的应用前景。正丁醇提取物对病原微生物具有较强的杀菌活性,这可能与其功能成分如多酚、黄酮类化合物的含量较高有关^[23]。前人研究结果表明,植物多酚具有较强的抗病毒和抗菌作用^[24]。

表 4 瓶尔小草提取物对不同细菌生长的 MIC
Table 4 MIC effect of extracts from *Ophiolossium vulgatum* L. on the growth of different bacteria

	各提取物质量浓度(mg/mL)			
	氯仿	乙酸乙酯	正丁醇	乙醇
金黄色葡萄球菌	1.25	0.625	0.625	1.25
普通变形杆菌	1.25	2.5	0.625	2.5
肺炎克雷伯氏菌	1.25	5	0.625	2.5
乙型溶血性链球菌	0.625	0.313	0.313	0.625
大肠埃希菌	1.25	5	2.5	2.5
铜绿假单胞菌	>5	0.625	0.313	1.25
白色念珠球菌	0.625	1.25	0.313	5

2.6 抗增殖测定结果

瓶尔小草各提取物对 SKOV3 卵巢癌细胞增殖的抑制活性结果见图 4。研究结果表明,提取物浓度在 25~400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下与癌细胞共培养 48 h, SKOV3 细胞的增殖受到抑制,并呈剂量依赖关系。正丁醇提取物对 SKOV3 细胞的抑制活性最强,当样品浓度为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时,正丁醇提取物的抑制率分别为 82.5% 和 95.9%;其次是乙酸乙酯提取物,当样品浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,其抑制率为 52.3%。

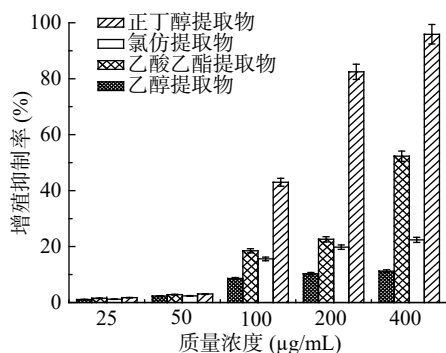


图 4 瓶尔小草提取物对 SKOV3 细胞增殖的抑制作用
Fig.4 Proliferation inhibition of SKOV3 cells of extracts from *Ophiolossium vulgatum* L.

进一步研究正丁醇提取物对 U251 脑胶质瘤和 A375 黑色素瘤细胞的抑制作用,并与它对 SKOV3 卵巢癌细胞的作用结果相比较,见图 5。从图中可看出,瓶尔小草正丁醇提取物对 3 种癌细胞都比较敏感,对 SKOV3 卵巢癌细胞的抑制作用最强,其次是对 U251 脑胶质瘤细胞,最后是 A375 黑色素瘤细胞。通过软件数据分析,得到 IC_{50} 依次是 114.5、160.5、196.9 $\mu\text{g/mL}$ 。本实验中,瓶尔小草正丁醇提取物的总酚和总黄酮含量都是 4 种提取物中最高的,其较强的细胞增殖抑制作用,可能是由于其酚类和黄酮类等活性化合物的存在所致。这与以前的研究吻合,植

物来源的酚类化合物已被证明能抑制或延缓癌细胞的增殖^[25-26]。

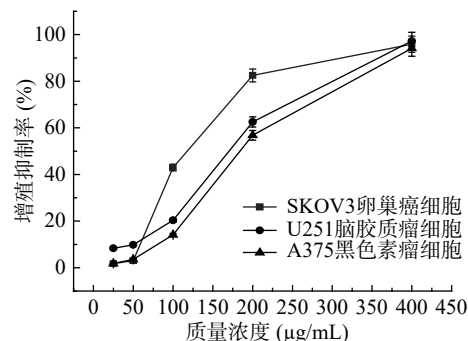


图 5 瓶尔小草正丁醇提取物对不同肿瘤细胞生长的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of the n-butanol extract from *Ophiolossium vulgatum* L. on the growth of different tumor cells

3 结论

本研究通过对 DPPH \cdot 、ABTS $^{+}$ 、羟自由基的清除能力的测定来评价瓶尔小草提取物的抗氧化活性,发现瓶尔小草的不同溶剂提取物都具有一定的抗氧化活性,其中正丁醇提取物的抗氧化活性较强。此外,在抑菌活性测试实验中,各提取物在一定程度上可以抑制 7 种试验菌的生长,其中正丁醇提取物表现出较强的广谱抑菌性。在癌细胞抗增殖试验中,正丁醇提取物对 SKOV3 卵巢癌细胞、U251 脑胶质瘤和 A375 黑色素瘤的细胞增殖均具有一定的抑制作用。相关性分析表明,瓶尔小草提取物的抗氧化能力与总酚、总黄酮含量正相关。正丁醇提取物的总酚、总黄酮含量在 4 种瓶尔小草提取物中最高,其对 DPPH 自由基的清除效果最佳, IC_{50} 为 0.114 mg/mL;对乙型溶血性链球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠球菌的 MIC 最低,为 0.313 mg/mL;对 SKOV3 卵巢癌细胞的抑制作用最强, IC_{50} 为 114.5 $\mu\text{g/mL}$ 。因此,可将瓶尔小草正丁醇提取物作为下一步研究重点,分离有效活性成分,确定其化学组成和结构,开发出安全有效的抗氧化剂、抑菌剂和抗癌药,以用于食品与医药领域。

参考文献

- [1] 秦仁昌. 中国植物志(第 2 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 10. [QIN R C. Chinese botany(Vol. 2)[M]. Beijing: Science Press, 2007: 10.]
- [2] 张帼威, 吴奶珠, 范强, 等. 狭叶瓶尔小草化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 2(6): 1006-1008. [ZHANG G W, WU N Z, FAN Q, et al. Chemical constituents of *Ophioglossum thermale* Kom[J]. Natural Product Research and Development, 2010, 2(6): 1006-1008.]
- [3] 胡文超, 周忠波, 万传星. 狭叶瓶尔小草黄酮类成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(5): 1035-1037. [HU W C, ZHOU Z B, WAN C X. Study on flavonoids of *Ophioglossum thermale*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(5): 1035-1037.]
- [4] 贺银菊, 杨再波, 彭芊媚, 等. 响应面优化瓶尔小草多糖超声提取工艺及体外抗氧化活性[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9):

- 19-27. [HE Y J, YANG Z B, PENG X M, et al. Response surface analysis of ultrasound extraction optimization and *in vitro* antioxidant ability of polysaccharides from *Ophioglossum vulgatum*[J]. China Food Additives, 2020, 31(9): 19-27.]
- [5] WAN C X, LUO J G, GU Y C, et al. Two new homoflavonoids from the fern *Ophioglossum pedunculatum*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2012, 14(6): 533-537.
- [6] 林婧, 蔡巧燕, 林久茂, 等. 瓶尔小草内生真菌代谢产物的体外抗神经炎症活性[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(3): 32-34. [LIN J, CAI Q Y, LIN J M, et al. Anti-neuroinflammatory activity of metabolites from endophytic fungi of *Ophioglossum vulgatum* L. *in vitro*[J]. Journal of Fujian University of TCM, 2013, 23(3): 32-34.]
- [7] 毛令飞. 苗药一支箭乙醇提取物对乙酸型胃溃疡大鼠 EGF 表达的影响[J]. 中国民族民间医药, 2010(23): 8-9. [MAO L F. Effects of EEO on the expression of EGF of acetic acid-induced gastric ulcer in rats[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2010(23): 8-9.]
- [8] 沈云辉, 陈长勋. 抗氧化应激研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2715-2719. [SHEN Y H, CHEN C X. Advances in antioxidant stress research[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(11): 2715-2719.]
- [9] 徐一鸣, 郭秀兰, 李秋霞, 等. 汉源花椒总黄酮提取物的抗氧化及抗 Hela 肿瘤细胞增殖活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 296-301, 314. [XU Y M, GUO X L, LI Q X, et al. The study of anti-oxidative and anti-proliferative activities of total flavonoids extract from Hanyuan *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 296-301, 314.]
- [10] 钱波, 廖衫, 刘斯悦, 等. 白茶乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 39-43. [QIAN B, LIAO S, LIU S Y, et al. *In vitro* antioxidant capability of white tea ethanol extracts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(8): 39-43.]
- [11] 孙建明, 李昭, 王小芳. 油脂无氧包装设计[J]. 中国油脂, 2018, 43(1): 151-154, 157. [SUN J M, LI Z, WANG X F. Design of oil no-oxygen packaging technology[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(1): 151-154, 157.]
- [12] 俞乐安, 肖遂, 黄亚辉, 等. 柑普提取物对 HepG2 和 SGC-7901 肿瘤细胞系的抗增殖作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 42-49. [YU L A, XIAO S, HUANG Y H, et al. The antiproliferative activities in ganpu tea on HepG2 and SGC-7901 tumor cell lines[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 42-49.]
- [13] 伊娟娟, 王振宇, 曲航, 等. 植物多酚抗肿瘤活性及其机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 391-395. [YI J J, WANG Z Y, QU H, et al. Research progress in the anti-tumor activities and related mechanisms of plant polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(18): 391-395.]
- [14] 杨楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381. [YANG N, JIA X B, ZHANG Z H, et al. Advance in studies on anti-cancer activity and mechanism of flavonoids[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(3): 373-381.]
- [15] 许海棠, 马少妹, 张金彦. 青天葵 4 种提取物抗氧化活性与其总黄酮和总酚含量的相关性[J]. 中成药, 2017, 39(1): 121-125. [XU H T, MA S M, ZHANG J Y. Correlations between antioxidant activities and contents of total flavonoids and total phenols of four extracts from *Nervilia fordii*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 39(1): 121-125.]
- [16] 孔方南, 李文砚, 韦优, 等. 刺果番荔枝叶多酚提取工艺优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 162-168. [KONG F N, LI W Y, WEI Y, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from *Annona squamosa* leaves and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 162-168.]
- [17] 吴丰鹏, 李芹英, 吴彦超, 等. 九蒸九制对黄精多糖单糖组成及其抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 42-46. [WU F P, LI Q Y, WU Y C, et al. Effects of Nine-steam-nine-bask on the monosaccharide composition and antioxidant activities of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 42-46.]
- [18] 夏秀芳, 王博, 郑幸子, 等. 大豆糖蛋白的抗氧化特性[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 91-97. [XIA X F, WANG B, ZHENG X Z, et al. Antioxidant property of soy glycoprotein[J]. Food Science, 2018, 39(7): 91-97.]
- [19] 田程飘, 朱伟伟, 宋雅玲, 等. 生姜与醋泡姜抗氧化、抑菌和抗肿瘤活性比较研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 18-23. [TIAN C P, ZHU W W, SONG Y L, et al. Comparative research on antioxidant, bacteriostatic and antitumor activities of ginger and vinegar soaked ginger[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 18-23.]
- [20] GUO Gai, YUE Li, FAN Shao-li, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of *Portulaca oleracea* L. seed oil[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 206-213. [GUO G, YUE L, FAN S L, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of *Portulaca oleracea* L. seed oil[J]. Food Science, 2017, 38(3): 206-213.]
- [21] 樊梓莺, 陈凯莉, 柳雅馨, 等. 红豆越橘不同溶剂萃取物组成及抗氧化相关性[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 138-144. [FAN Z L, CHEN K L, LIU Y X, et al. Correlation between antioxidant activity *in vitro* and active components of different solvent extracts from lingonberry[J]. Food Science, 2017, 38(17): 138-144.]
- [22] GALINANES C, FREIRE M S, GONZALEZ-ALVAREZ J. Antioxidant activity of phenolic extracts from chestnut fruit and forest industries residues[J]. European Journal of Wood and Wood Products, 2015, 73(5): 651-659.
- [23] DUDA-CHODAK A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota[J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2012, 63(5): 497-503.
- [24] MADDOX C E, LAUR L M, TIAN L. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*[J]. Current Microbiology, 2010, 60(1): 53-58.
- [25] JAGANATHAN S K, SUPRIYANTO E, MANDAL M. Events associated with apoptotic effect of p-coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(43): 7726-7734.
- [26] PANDEY K B, RIZVI S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2(5): 270-278.