

侧柏叶乙醇提取物抗氧化性的研究

李雪¹, 张建¹, 徐瑞红², 张鸣¹, 高天鹏¹

(1. 兰州城市学院 化学与环境科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 敦煌研究院 文物保护技术服务中心, 甘肃 敦煌 736200)

摘要: 采用分光光度法测定不同质量浓度的侧柏叶乙醇提取物对羟基自由基、超氧自由基的清除能力及其还原能力。结果表明: 随着侧柏叶乙醇提取物质量浓度的增加, 还原能力、清除羟基自由基和超氧自由基能力都随着增强, 所有提取物清除羟基自由基的活性均高于超氧自由基。此外在高实验质量浓度下, 50% 乙醇提取物清除羟基自由基的能力最强, 还原能力和清除超氧自由基的能力由强到弱依次为 50% 乙醇提取物、95% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物。

关键词: 侧柏叶; 乙醇提取物; 抗氧化性

中图分类号: S791.38 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2012)04 - 0805 - 04

A Study on the Antioxidant Activity of the Ethanol Extract from *Platycladus orientalis* Leaves

LI Xue¹, ZHANG Jian¹, XU Rui-hong², ZHANG Ming¹, GAO Tian-peng¹

(1. School of Chemistry and Environment Sciences, Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China; 2. Centre for Cultural Heritage Conservation Technology Services, Dunhuang Academy, Dunhuang 736200, China)

Abstract: Using the spectrophotometric method, the antioxidant activity of the extracts from *Platycladus orientalis* leaves under different concentrations of ethanol was studied by means of determining their reducing capacity, scavenging action to hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion free radical ($\cdot\text{O}_2^-$). The results showed the reducing capacity, scavenging effects on hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion free radical ($\cdot\text{O}_2^-$) were elevated with the concentration of ethanol extracts from *Platycladus orientalis*, and the effect of scavenging hydroxyl radicals was higher than that of superoxide anion radical. At high concentration, 50% ethanol extract demonstrated the strongest scavenging action to hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$), the reducing capacity and scavenging action to superoxide anion free radical ($\cdot\text{O}_2^-$) were in the order of 50% ethanol extract, 95% ethanol extract, 70% ethanol extract.

Key words: *Platycladus orientalis* leaves; ethanol extract; antioxidant activity

自由基是带有未成对电子的分子或离子, 其活性很高。过量的自由基氧化及其中间产物严重伤害生物膜、酶、蛋白质及活细胞功能, 导致肿瘤、心脑血管缺血、动脉粥样硬化等疾病的发生^[1]。为了减轻自由基的危害, 抗氧化剂的研究成为当今热点之一。目前人工合成的抗氧化剂虽然作用效果显著, 但其安全性却存在着一些问题。天然药用植物含有抗氧化活性成分, 用来减轻自由基的损害, 因此在预防和治疗疾病方面备受关注。

收稿日期: 2012 - 01 - 11 修回日期: 2012 - 04 - 14

基金项目: 甘肃省科技支撑计划(1011FKCA119)

作者简介: 李雪(1978—), 女, 讲师, 主要从事植物遗传与环境生物学研究, E-mail: lixue@lzcw.edu.cn。

侧柏(*Platycladus orientalis*)又名崖柏、扁柏、云片柏、香柏等,为柏科侧柏属常绿乔木,是我国应用最广泛的园林绿化树种之一,分布极广。现代医学表明侧柏叶具有凉血止血、祛风除湿、化痰止咳、消肿散毒的功效。据报道,侧柏叶的主要成分为挥发油、黄酮、鞣质、无机元素等^[2],目前关于侧柏叶的研究主要集中在化学成分的提取、检测^[3-5],但对侧柏叶提取物抗氧化性的研究鲜见报道。本试验对侧柏叶醇提取物抗氧化性进行了研究,以期对天然抗氧化剂的开发及侧柏叶资源的进一步利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂、仪器

材料:侧柏叶于2011年3月采自兰州城市学院院内,剪取侧柏小枝上的鳞叶,60℃恒温干燥,粉碎,过筛备用。

试剂:无水乙醇、95%乙醇、硫酸亚铁、30%过氧化氢、水杨酸、抗坏血酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、浓硫酸、浓盐酸、三羟甲基氨基甲烷、邻苯三酚等,均为国产分析纯。

仪器:722N型分光光度计,高速万能粉碎机,KH-500B型超声波清洗器,LT501E电子天平,101-1型干燥箱,800型离心机,SHB-ⅢS循环水式多用真空泵。

1.2 方法

1.2.1 样品液的制备 准确称取3份侧柏叶粉末10.0g于250mL锥形瓶中,以1:15(g/mL)料液比,分别加入50%、70%、95%的乙醇150mL,20℃浸泡4h后,超声波清洗器(功率500W,频率50kHz,温度70℃)中超声60min,经过减压过滤后,滤液置于蒸发皿中,70℃水浴浓缩至干,得浸膏,备用。分别将不同浓度乙醇提取物准确称取0.25g,用50%、70%、95%的乙醇溶解,定容于250mL容量瓶,作为1.0mg/mL的乙醇提取物样品,再稀释成不同浓度的样品试液备用。

1.2.2 羟基自由基清除率的测定 参照Fenton反应方法建立反应体系^[6],在10mL比色管中依次加入6mmol/L的FeSO₄溶液2mL,分别加入不同质量浓度的样品液2mL,6mmol/L的H₂O₂溶液2mL,摇匀,静置10min,再加入6mmol/L的水杨酸-乙醇溶液2mL,摇匀,在室温下静置45min后,于510nm处测其吸光度值A_i。以等体积的水代替水杨酸,测定其吸光度值A_j,以扣除样品本身颜色的干扰。以等体积的水代替侧柏叶提取物,测定其吸光度值A₀。其清除率计算公式为:

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

依照上述方法测定Vc溶液清除羟基自由基的能力。

1.2.3 超氧阴离子抑制作用的测定 通过邻苯三酚反应体系^[7],预先在各比色管中加入5.7mL 50mmol/L pH为8.20的Tris-HCl缓冲液,再加入0.2mL不同浓度的样品试液,于25℃保温10min,然后加入25℃预热的6mmol/L邻苯三酚0.1mL,迅速摇匀,在25℃水浴反应5min后,加1mL 10mmol/L的HCl溶液终止反应,于320nm处测定吸光度A_i。以等体积的10mmol/L的HCl溶液代替邻苯三酚,测定其吸光度值A_j,以扣除样品本身颜色的干扰。以等体积的水代替侧柏叶提取物,测定其吸光度值A₀。其清除率计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 还原能力的测定 参照文献[8],在比色管中加入2.5mL pH6.6磷酸缓冲溶液,1mL不同质量浓度的样品试液,1mL 1%铁氰化钾溶液,摇匀后,混合物在50℃恒温条件下,加热20min。急速冷却,再加入2.5mL 10%三氯乙酸,离心分离10min。取上层清液5mL,加5mL水,1mL 0.1%FeCl₃,混合均匀,在室温下静置10min后在波长700nm处测定其吸光度值。

用Vc代替提取物溶液,待测溶液为0.5mg/mL、0.1mg/mL的Vc在700nm处的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 侧柏叶乙醇提取物对羟基自由基的清除作用

侧柏叶乙醇提取物清除羟基自由基的能力,以Vc作为阳性对照,实验结果见图1。在实验所取的质量浓度范围内,侧柏叶不同质量浓度乙醇提取物对羟基自由基均有较强的清除能力,且清除作用随样品质量浓度的增大而增强,当小于0.4mg/mL时,侧柏叶乙醇提取物清除羟基自由基的能力差别不大,且

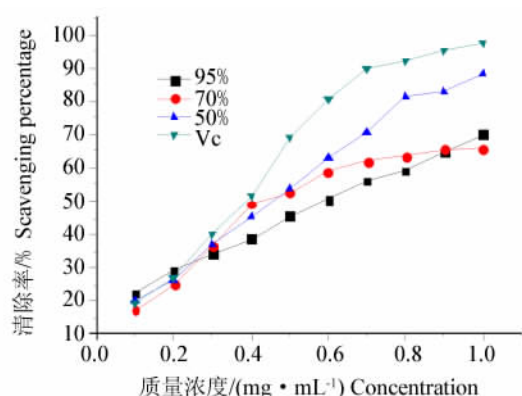


图1 侧柏叶乙醇提取物及Vc对羟基自由基的清除率

Fig. 1 Scavenging $\cdot\text{OH}$ ability of Vc and the ethanol extract from *Platycladus orientalis* leaves

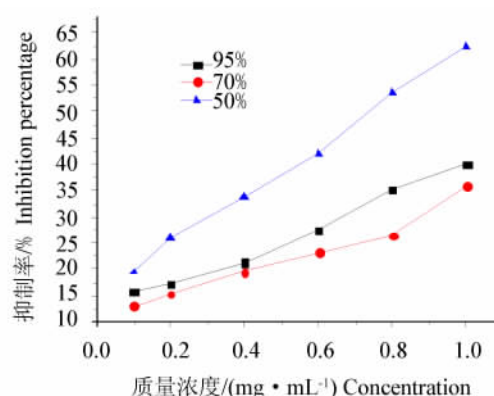


图2 侧柏叶乙醇提取物对超氧阴离子的抑制率

Fig. 2 Inhibiting $\cdot\text{O}_2^-$ ability of the ethanol extract from *Platycladus orientalis* leaves

与Vc较为接近。当质量浓度大于0.4 mg/mL时,侧柏叶乙醇提取物对超氧自由基的清除率弱于Vc,3种提取物相比较而言,当质量浓度大于0.5 mg/mL时,50%乙醇提取物抗氧化性最强,当质量浓度为1 mg/mL时,清除率为88.37%。

2.2 侧柏叶乙醇提取物对超氧阴离子的抑制作用

由图2中可知,在实验所取的浓度范围内,侧柏叶提取物对超氧自由基有一定的抑制作用,随着浓度的增加,对超氧自由基的抑制作用也在增强。在浓度相同的条件下,侧柏叶不同浓度乙醇提取物对超氧自由基抑制率能力依次为:50%乙醇提取物>95%乙醇提取物>70%乙醇提取物。50%乙醇提取物对超氧自由基的抑制率最大可达到62.32%,且劣于对羟基自由基清除能力。

2.3 侧柏叶不同质量浓度乙醇提取物的还原能力

样品反应后在700 nm的吸光度值大小反映了物质的还原能力强弱。由图3可知,在所测浓度范围内,侧柏叶不同质量浓度乙醇提取物均有一定的还原能力,将铁氰化钾还原成亚铁氰化钾,且还原能力均随质量浓度的增加而增强。当质量浓度小于0.6 mg/mL时,3种不同质量浓度乙醇提取物的还原能力相差不大;当质量浓度大于0.6 mg/mL时,50%乙醇提取物的还原能力最强,95%乙醇提取物次之,70%乙醇提取物最弱。

侧柏叶不同质量浓度乙醇提取物还原能力与Vc进行比较:95%乙醇提取物的质量浓度大于0.6 mg/mL时,其吸光度值大于质量浓度为0.5 mg/mL

的Vc,则说明其还原能力强于该浓度的Vc。70%乙醇提取物的质量浓度大于0.8 mg/mL时,其吸光度值大于质量浓度为0.5 mg/mL的Vc,则说明其还原能力强于该质量浓度的Vc。50%乙醇提取物的质量浓度大于0.7 mg/mL时,其吸光度值大于质量浓度为0.5 mg/mL的Vc,则说明其还原能力强于该质量浓度的Vc。

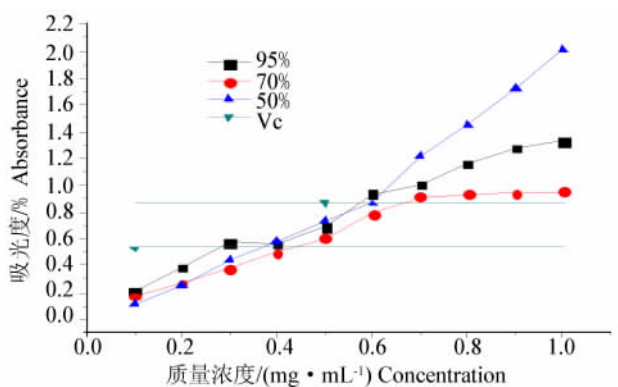


图3 侧柏叶不同浓度乙醇提取物及Vc还原能力

Fig. 3 Reducing capacity of Vc and the ethanol extract from *Platycladus orientalis* leaves

3 结论与讨论

侧柏叶提取物对清除羟基自由基、超氧阴离子自由基的能力呈现明显的量效关系,在测定的质量浓度范围内,当质量浓度大于0.5 mg/mL时,50%乙醇提取物清除羟基自由基的能力最强;在质量浓度相同的条件下,50%乙醇提取物对超氧自由基抑制能力最大;而且不同质量浓度乙醇提取物均有一定的还原

能力,表明侧柏叶乙醇提取物具有抗氧化活性。

侧柏叶的主要化学成分是挥发油、黄酮类、鞣质等^[2-3,5],其抗氧化性与这些活性成分有关。植物中的挥发油、黄酮类化合物与鞣质都具有抗氧化活性,挥发油含有不饱和键,具有抑制自由基的形成;黄酮类化合物的种类较多,羟基数目及位置与抗氧化活性有很大关系,羟基作为氢供体,对多种活性氧具有消除作用,从而打断自由基链反应^[9]。鞣质是一类结构复杂的多元酚类化合物,其抗氧化活性目前国内外研究较多^[10]。这些侧柏叶不同浓度的乙醇提取物抗氧化能力不同,与样品中含有抗氧化活性成分的种类和含量有关,具体有待于进一步进行深入的系统研究。

自由基最大的特点是进行链反应,反应一旦起始,生成稳定的非自由基产物的终止步骤很少发生。但是只要有少量的能捕捉和清除自由基的抗氧化剂就可以使链反应减慢或终止^[11]。自由基与多种疾病的发生都有关系,侧柏是一种中药材,具有抗炎、抗肿瘤、抗红细胞氧化等功能^[2],其抗氧化活性可能与其药理作用机制有关。

参考文献:

- [1]王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2002:96-103.
- [2]陈兴芬,单承莺,马世宏,等.侧柏叶化学成分、生理活性及防脱发功能研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(3):1-5.
- [3]赵永光,常立新,周永国,等.超声波法提取侧柏叶片中黄酮类化合物的研究[J].河北农业大学学报,2005,28(2):54-56.
- [4]孙立靖,任建成.中药侧柏叶饮片中无机元素的含量测定[J].山东师大学报:自然科学版,1999,14(4):400-402.
- [5]刘廷礼,邱琴,赵怡,等.侧柏叶挥发油成分的GC-MS分析[J].中药材,2000,23(8):460-461.
- [6]罗宗铭,方岩雄,张焜,等.黄酮及维生素C的抗羟基自由基的比较研究[J].中国油脂,2003,28(3):58-60.
- [7]吴亚楠,鲁晓翔,连喜军,等.玉米须黄酮清除自由基活性的研究[J].食品研究与开发,2009,30(1):5-8.
- [8]黄海兰,王国明,李增新,等.鸭跖草抗氧化成分提取及其活性研究[J].食品科学,2008,29(9):55-58.
- [9]郑瑞生,封辉,戴聪杰,等.植物中抗氧化活性成分研究[J].中国农学通报,2010,26(9):85-90.
- [10]邵芳芳,尹卫平,梁菊.重要的植物多酚及其抗氧化性能的研究概况[J].西北药学杂志,2010,25(1):66-68.

(上接第 780 页)

- [10]Song C, Gao B, Teng Y, et al. *MspI* polymorphisms in the 3rd intron of the swine *POU1F1* gene and their associations with growth performance[J]. Journal of Applied Genetics, 2005, 46(3): 285-289.
- [11]滕勇,宋成义,经荣斌.猪 *POU1F1* 基因第 3 内含子 *Msp I* 酶切片段多态特征及其与生长性能相关性的研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(2):205-208.
- [12]方华,郑友民,李宏滨,等.猪 *POU1F1* 第一内含子单核苷酸多态性和生长性状相关性研究[J].中国农业科学,2009,42(1):283-289.
- [13]方华.猪 *POU1F1* 基因多态性和 mRNA 表达相关性的研究[D].北京:中国农业科学院,2004.
- [14]庞瑾,李宏滨,郑友民,等.猪 *Pit-1* 基因的多态性研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(6):531-535.
- [15]Yu T P, Schmitz C B, Rothschild M F, et al. Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine *Pit-1* gene[J]. Animal Genetics, 1994, 25: 229-233.
- [16]Yu T P, Tuggle C K, Schmitz C B, et al. Association of *Pit-1* polymorphisms with growth and carcass traits in pigs[J]. J Anim Sci, 1995, 76(5): 1282-1288.
- [17]滕勇,经荣斌,宋成义.猪 *POU1F1* 基因第 3 内含子 *MspI* 酶切片段多态性特征的研究[J].华中农业大学学报,2004,24(2):8-11.
- [18]王秩,邓洁英,史轶蓁.促生长素释放激素及细胞因子对垂体促生长素基因表达的调控及其与 *Pit-1* 的关系[J].中华内分泌代谢杂志,2000,16:297-301.