

绞草萃取物体外抗氧化活性及其总酚含量比较

Comparisons of antioxidant activities and contents of total phenols of different extraction parts from *Spiranthes sinensis*

严鑫 王委 刘量

YAN Xin WANG Wei LIU Liang

(扬州大学医学院, 江苏 扬州 225009)

(School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

摘要:采用 DPPH 法、ABTS 法测定绞草不同有机溶剂萃取物的体外抗氧化活性,并用福林酚法测定其总酚含量。结果表明:绞草各溶剂萃取物均有明显的体外抗氧化活性,且呈剂量依赖性;各溶剂萃取物的抗氧化活性强弱及总酚含量大小顺序均为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物。说明绞草不同萃取物体外抗氧化活性与总酚含量呈正相关,其中乙酸乙酯萃取物的清除 DPPH· 及 ABTS⁺· 的 IC₅₀ 值分别为(45.270±0.005), (75.420±0.015) μg/mL,总酚含量为(13.861±0.002)%。

关键词:绞草;萃取物;抗氧化活性;总酚

Abstract: The *in vitro* antioxidant activities of different extractions of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames were evaluated through DPPH and ABTS assays, and the total phenols contents were determined by Folin-Ciocalteu method. It was shown that all the different extraction parts of *S. sinensis* had significant *in vitro* antioxidant activities in a dose-dependent manner; The antioxidant activities and total phenols contents were both ordered as follows: ethyl acetate extraction>*n*-butanol extraction> petroleum ether extraction. The results showed that the *in vitro* antioxidant activities were positively correlated with the total phenols contents of different extraction parts of *S. sinensis*, the IC₅₀ values of scavenging DPPH· and ABTS⁺· of ethyl acetate extraction part were (45.270±0.005) and (75.420±0.015) μg/mL, respectively, its total phenols content was (13.861±0.002)%.

Keywords: *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames; extraction; antioxidant activity; total phenols content

绞草(*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames)为兰科绞草属植

物,又名盘龙参、盘龙草、清明草等,生于草丛、湿草地或山坡中,中国各地均有分布^[1-2]。绞草为药食同源植物,常用来制作药膳,具有滋补强身的作用^[3]。绞草还是凉茶植物,用来制作夏季的消暑饮品,具有滋阴清热,化痰止咳的功效^[4]。已有报道^[5-7]显示绞草主要成分为包括二氢菲类、黄酮类、苯丙素类在内的酚类成分,具有开发抗氧化剂的前景。但绞草不同萃取物抗氧化活性和总酚含量是否有差异还未见报道。

本研究拟采用 DPPH 法、ABTS 法测定绞草各有机溶剂萃取物的抗氧化活性,采用福林酚法测定各萃取物的总酚含量,并比较两者的相关性,旨在为绞草后续化学成分的深入研究及抗氧化剂开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验原料

绞草:采购于安徽亳州,由扬州大学生命科学与技术学院金银根教授鉴定为兰科绞草属植物绞草 *S. sinensis*,药用部位为带根全草。

1.1.2 试剂

水溶性 V_E (Trolox): 纯度 97%, 美国 Sigma-Aldrich 公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH): 纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司;

2,2-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS): 纯度 98%, 美国 Sigma-Aldrich 公司;

福林酚试液 (Folin-Ciocalteu): 1 mol/L, 合肥博美生物公司;

没食子酸对照品: 纯度 98%, 上海金穗生物科技有限公司;

甲醇、无水乙醇、碳酸钠、二甲亚砜 (DMSO): 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

万分之一电子天平: BS124S 型, 北京赛多利斯仪器系统

基金项目:扬州市自然科学基金青年科技人才项目(编号: YZ2014022);扬州大学大学生学术科技创新基金项目(编号: x2016790)

作者简介:严鑫,男,扬州大学医学院在读硕士研究生。

通讯作者:刘量(1980-),女,扬州大学医学院讲师,博士。

E-mail: enjyoyz@163.com

收稿日期:2015-12-15

有限公司；
高速万能粉碎机:FW80 型,天津市泰斯特有限公司；
循环水式真空泵:SHZ-D(III)型,巩义市予华仪器有限
责任公司；
旋转蒸发器:RE-3000 型,上海亚荣生化仪器厂；
数显恒温水浴锅:HH-4 型,上海江星仪器有限公司；
数控超声波清洗器:KQ-500DE 型,昆山禾创超声仪器
有限公司；
多功能酶标仪:Synergy2 型,美国博腾仪器有限公司；
紫外可见红外分光光度计:U-3900 型,日本日立公司；
紫外可见分光光度计:UV-9600 型,北京瑞利分析仪器
公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料处理 缙草干燥带根全草 650 g,粉碎,用 95%乙醇于 85 ℃下回流提取 2 h,重复提取 5 次,减压浓缩得总浸膏。将总浸膏自然挥干至无醇味,加入 10 倍蒸馏水分散,再分别用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取物,减压浓缩并挥干试剂得相应的粉末,备用。

1.2.2 抗氧化活性试验溶液配制

(1) DPPH 溶液配制:精密称取 DPPH 试剂 40.0 mg,无水乙醇定容于 100 mL 容量瓶中,再从中吸取 20 mL 定容于 100 mL 的容量瓶中,备用。

(2) ABTS 溶液配制:精密称取 ABTS 试剂 200.0 mg,用蒸馏水定容于 50 mL 容量瓶中,再精密称取 35.0 mg 过硫酸钾,用蒸馏水定容于 50 mL 容量瓶中,摇匀后与 ABTS 水溶液混合,在室温黑暗处反应 12~16 h,产生 ABTS 阳离子自由基。从中吸取 20 mL 再定容于 100 mL 的容量瓶中,备用。

(3) 待测样品和阳性对照溶液配制:精密称取缙草 3 个萃取物粉末及水溶性 V_E 各 20.0 mg,用 1 mL DMSO 溶解,再加无水乙醇将样品稀释成终浓度为 1.000,0.500,0.400,0.200,0.100,0.050,0.025 mg/mL 的溶液,备用。

1.2.3 抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除:DPPH 是以氮原子为中心的一种稳定自由基,有强氧化性,易被抗氧化剂还原^[8]。往 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时,由于其自由基的清除作用,DPPH 溶液颜色消退,使得吸收光谱强度随加入的抗氧化剂的量的增加而减小,通过加入抗氧化剂前后吸光度的线性变化来计算自由基清除率^[9-10]。

在 96 孔板中加入准备好的样品溶液 100 μL,每个样品平行做 3 个,于 517 nm 紫外下测定吸光度 A_j,再向其中加入 DPPH 试剂 100 μL,37 ℃遮光放置反应 30 min 后,测量吸光度 A_i。空白对照(溶解样品的试剂)与阳性对照测定方法相同,且需同批次测定并每批次测定一次,分别记录。根据式(1)计算清除率:

$$SR = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

SR——DPPH 自由基清除率,%;

A_i——加入 DPPH 后样品或阳性对照的吸光度;
A_j——未加入 DPPH 时样品或阳性对照的吸光度;
A_c——加入 DPPH 后空白对照的吸光度。
由于中药样品在高浓度时本身具有颜色,DPPH 自由基清除后颜色也为黄色,会对试验结果产生一定影响,故计算中需要扣除样品背景影响即 A_j,以保证试验结果的准确性。

(2) ABTS 自由基清除:ABTS 法是以 ABTS 为显色剂,经活性氧化后生成阳离子自由基 ABTS⁺·,呈稳定的蓝绿色溶液;若向其中加入抗氧化物质,则会与 ABTS⁺·反应而使反应体系褪色,在 734 nm 处检测溶液吸光度,以此来衡量该物质的抗氧化能力^[11]。

在 96 孔板的各个孔中加入准备好的样品溶液 100 μL,每个样品平行做 3 个,再往里加入 ABTS 试剂 100 μL,常温反应 5 min 后,于 734 nm 紫外下测定吸光度 A_s。由于 ABTS⁺·清除后颜色为无色,对试验结果几乎无影响,故此此时不需要测样品本身吸光度。根据式(2)计算清除率:

$$SR = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

SR——ABTS 自由基清除,%;
A_c——加入 ABTS⁺·后空白对照的吸光度;
A_s——加入 ABTS⁺·后样品或阳性对照的吸光度。

1.2.4 多酚含量测定溶液配制 采用福林酚法。参考文献[12],修改如下:各称取一定量的缙草萃取物溶于甲醇中,超声辅助溶解,并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤溶解液,得供试品溶液。

(1) 对照品溶液的配制:精密称取没食子酸 10.0 mg,置 250 mL 量瓶中,以适量甲醇溶解,定容,精密量取 50 mL,采用倍半稀释法依次配制成质量浓度为 40,20,10,5,2.5,1.25,0.625,0.312 5 μg/mL 的没食子酸甲醇溶液备用。

(2) 样品溶液的配制:精密称取缙草 3 个萃取物各 10.0 mg,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 0.1 mg/mL 的样品溶液。

1.2.5 测定条件的优化及方法学考察

(1) 测定波长的选择:取适量没食子酸标准溶液于容量瓶中,加入 10%福林酚试剂 2.5 mL,再加入 20%碳酸钠溶液 150 μL,30 ℃下反应一段时间,在 500~900 nm 波长范围内测定吸光度。

(2) 稳定性试验:取适量没食子酸标准品,于上述条件下操作,在最佳检测波长处测定反应后不同时间点(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 h)的吸光度。

(3) 精密度试验:精确吸取 2.5 mL 的对照品溶液,在最佳检测波长处测定其吸光度,重复 6 次,计算变异系数(RSD),评价该方法的精密度。

(4) 重复性试验:称取缙草乙醇总提取物适量,按供试品溶液的配制方法,平行配制 6 份供试品溶液,于上述条件下操作,在最佳检测波长处测定吸光度。

(5) 加样回收率试验:分别称取缙草乙醇总提取物 6 份,每份精确加入一定量的没食子酸溶液,按上述条件操作,在最佳检测波长处测定吸光度,计算没食子酸回收率。

1.2.6 标准曲线的建立 精密量取各浓度没食子酸对照品溶液适量,按 1.2.5 优化的条件操作,在最佳检测波长处测定吸光度,以没食子酸溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度为纵坐标,按浓度与吸光度相关关系求回归方程。

1.2.7 样品总酚含量的测定 精密量取样品溶液 2.5 mL,按 1.2.5 优化的条件操作,在最佳检测波长处测定吸光度,重复 3 次,再根据标准曲线,计算出样品溶液中总酚含量。

1.2.8 数据分析 采用 SPSS 16.0、Microsoft Excel 2013 进行数据处理,并运用 GraphPad Prism 5 绘制图表,计算 IC_{50} 值。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化活性测定

本试验以水溶性 V_E (Trolox) 为阳性对照,分析缙草乙醇提取物各萃取物对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力,以 IC_{50} 值评价其抗氧化活性, IC_{50} 值越小,其抗氧化活性越强。由图 1、2 可知,缙草的石油醚、乙酸乙酯及正丁醇萃取物均具有清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力。各萃取物在浓度 0.025~1.000 mg/mL 时,清除 DPPH 及 ABTS 自由基的能力随浓度增加而增大;在相同浓度下,各萃取物清除 DPPH 自由基的能力较 ABTS 自由基强。

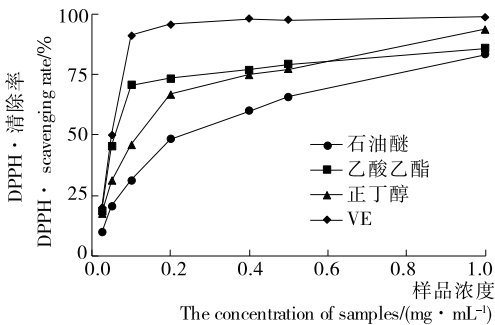


图 1 缙草不同萃取物对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 1 DPPH radical scavenging capacities of different extraction parts of *S. sinensis*

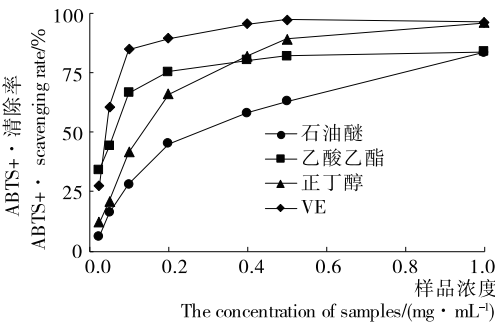


图 2 缙草不同萃取物对 ABTS 自由基的清除能力

Figure 2 ABTS radical scavenging capacities of different extraction parts of *S. sinensis*

由表 1 可知,乙酸乙酯萃取物清除两种自由基的 IC_{50} 值最低,其次为正丁醇萃取物,石油醚萃取物 IC_{50} 值最大,表明缙草不同萃取物体外氧化活性由强到弱依次为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物。乙酸乙酯萃取物抗氧化活性略弱于阳性对照 V_E 。

表 1 缙草不同萃取物抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of different parts of *S. sinensis* ($n=3$)

萃取物	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	DPPH ·	ABTS ⁺ ·
石油醚萃取物	218.770 ± 0.021	324.160 ± 0.046
乙酸乙酯萃取物	45.270 ± 0.005	75.420 ± 0.015
正丁醇萃取物	126.690 ± 0.012	134.140 ± 0.042
水溶性 V_E	38.920 ± 0.007	41.580 ± 0.016

2.2 多酚含量的测定

2.2.1 测定波长的选择 由图 3 可知,在 500~900 nm 波长范围内,没食子酸的最大吸收波长为 765 nm,因此选定 765 nm 作为检测波长。

2.2.2 稳定性试验 由图 4 可知,溶液在 2 h 后吸光度基本维持稳定,考虑到试验的效率,选择反应 2 h 后测定溶液的吸光度。

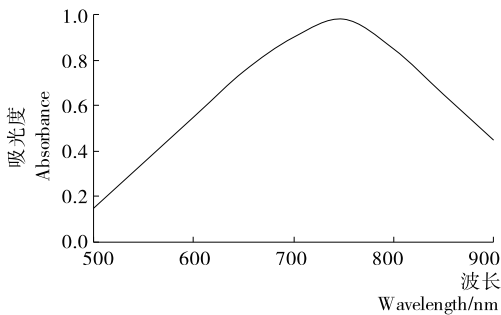


图 3 没食子酸紫外吸收光谱图

Figure 3 The ultraviolet spectrum of gallic acid

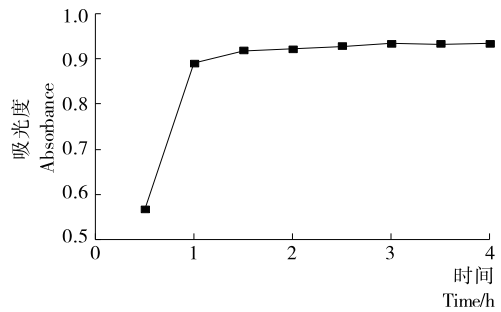


图 4 反应时间对吸光度的影响

Figure 4 Effect of reaction time on absorbance

2.2.3 精密度试验 按 1.2.5 的条件操作,在 765 nm 波长下,对福林酚法测定一定浓度的没食子酸对照品溶液进行精密度试验,重复 6 次,求得吸光度平均值为 0.125, RSD 为 0.53%,表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 重复 6 次测定一定量缙草乙醇提取物中多酚的含量,求得平均含量为 6.83%, RSD 为 0.79%,表明该方法重复性良好。

2.2.5 加样回收率试验 由表 2 可知,用福林酚法测得没食子酸的加样回收率为 95.05%~108.91%,平均回收率为 100.99%, RSD 为 6.23%,上述试验结果说明该方法具有较高的准确性,可用于缙草不同萃取物多酚含量的测定。

表 2 没食子酸加样回收率结果

Table 2 Recovery result of gallic acid (n=6)						
称样量/mg	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.30	0.61	1.01	1.61	100.00	100.99	6.23
10.20	0.62	1.01	1.59	96.03		
11.20	0.61	1.01	1.60	98.02		
10.10	0.58	1.01	1.68	108.91		
10.00	0.57	1.01	1.67	108.91		
10.30	0.62	1.01	1.58	95.05		

2.3 标准曲线的建立

根据不同浓度的没食子酸在 765 nm 波长下测定的吸光度,绘制标准曲线(见图 5),得到线性回归方程为 $Y=0.048\ 7x+0.010\ 3$,相关系数(r)为 0.999 8。表明没食子酸标准品溶液在 0.312 5~40.000 0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

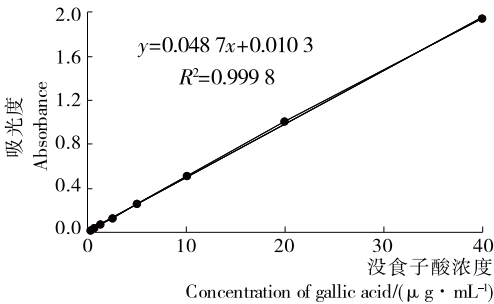


图 5 没食子酸浓度与吸光度的标准曲线
Figure 5 The standard curve of gallic acid concentration and absorbance

2.4 缙草不同萃取物总酚含量测定

用上述建立的方法,测定缙草 3 个不同萃取物的总酚含量。由图 6 可知,总酚含量分别为石油醚萃取物(5.67±0.005)%,乙酸乙酯萃取物(13.861±0.002)%;正丁醇萃取物(13.717±0.002)%。说明乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物总酚含量相当,都高于石油醚萃取物;三者总酚含量由高到低依次为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物。结合 2.1 抗氧化活性结果,表明缙草不同萃取物抗氧化

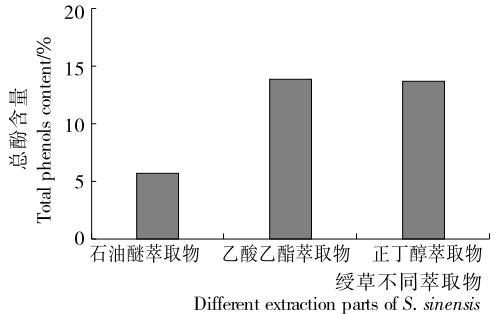


图 6 缙草不同萃取物总酚含量

Figure 6 Total phenol contents of the different extraction parts of *S. sinensis*

活性与总酚含量呈正相关。

3 结论

本研究通过 DPPH 法、ABTS 法评价了缙草不同萃取物体外抗氧化活性;建立了缙草不同萃取物总酚含量的测定方法,并经过了方法学考察。结果表明,缙草不同萃取物体外抗氧化活性与总酚含量呈正相关。基于前人^[5-7]关于缙草化学成分的研究结果,推测缙草乙酸乙酯萃取物总酚含量较高、抗氧化活性较强可能与其中含有较多的菲类、黄酮类等酚类成分有关。提示在后续进行化学成分研究时,可将重点锁定在乙酸乙酯萃取物;通过活性导向分离的方法,实现该萃取物中抗氧化成分的快速靶向分离,并通过对分离所得单体成分的抗氧化活性评价,进一步阐明缙草抗氧化物质基础,为从缙草中寻找天然来源的抗氧化剂的深入研究提供一定的理论依据。

参考文献

[1] 董必慧, 杨小兰. 沿海滩涂濒危物种缙草的生长利用特性和保护策略[J]. 江苏农业科学, 2006(3): 193.

[2] 陆静梅, 李桂兰, 杨凤清. 我国东北地区兰科药用植物简介[J]. 中国野生植物资源, 1994(2): 21.

[3] 倪素碧. 兰花药膳滋补强身[J]. 植物杂志, 1999(3): 15.

[4] 林仁慧. 福建地方凉茶植物资源和药用价值调查研究[D]. 福建: 福建农业大学, 2014: 44-45.

[5] DONG Mei-ling, CHEN Guang, ZHOU Zhi-ming. Flavonoid Constituents from *Spiranthes auatralis* Lindl[J]. Chem. Pharm Bull, 2008, 56(11): 1 600-1 603.

[6] LIU Jing, LI Cong-ying, ZHONG Yu-jiao, et al. Chemical constituents from *Spiranthes sinensis*[J]. Biochem Syst Ecol, 2013, 47(8): 108-110.

[7] LIN Yun-lian, HUANG Ray-ling, DON Ming-jaw, et al. Dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis*[J]. J. Nat. Prod., 2000, 63(12): 1 608-1 610.

[8] 曹清明, 邬靖宇, 钟海燕. 油茶叶中黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 162-166.

[9] ARTS M J T J, SEBASTIAAN D J, VOSS H P, et al. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures [J]. Food Chem., 2003, 80(3): 409-414.

[10] GIRI A, OSAKO K, OKAMOTO A, et al. Antioxidative properties of aqueous and aroma extracts of squid miso prepared with *Aspergillus oryzae*-inoculated koji[J]. Food Res Int, 2011, 44(1): 317-325.

[11] LI Xi-can, LIN Jing, GAO Yao-xiang, et al. Antioxidant activity and mechanism of Rhizoma *Cimicifugae*[J]. Chem. Cent J., 2012(6): 140.

[12] 王艳, 周波, 钟海雁. 制取工艺对杏仁油中总酚含量及其抗氧化能力的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 149-152.