

明日叶不同极性溶剂萃取物的活性研究

The studies on activities of extracts from *Angelica Keiskei* using different polar solvents

朱芳¹ 韦万丽¹ 杜莹¹ 陈婷¹ 周清娣² 廖莉玲¹

ZHU Fang¹ WEI Wan-li¹ DU Ying¹ CHEN Ting¹ ZHOU Qing-di² LIAO Li-ling¹

(1. 贵州师范大学化学与材料科学学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 悉尼大学化学学院, 澳大利亚 悉尼 2006)

(1. School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 55000, China

2. School of Chemistry, the University of Sydney, Sydney 2006, Australia)

摘要:为比较明日叶不同极性部位的活性,将明日叶粗提取物过 HPD-600 大孔树脂,收集 50% 乙醇洗脱物。采用不同极性有机溶剂对 50% 洗脱物进行液-液萃取,将 50% 洗脱物分为乙酸乙酯相、正丁醇相、水相三个不同极性溶剂萃取物,测定不同极性溶剂萃取物的总黄酮和总多酚含量,研究各萃取物清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基能力和总还原能力以及对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。结果表明:乙酸乙酯相的总黄酮含量以及总多酚含量高于其他溶剂相,且体外抗氧化能力和对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性最强。明日叶不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶的抑制率随着浓度的增加而增加。

关键词:明日叶;抗氧化; α -葡萄糖苷酶;抑制活性

Abstract: In order to compare the activities of different extracts using several polar fractions of extracts from *Angelica Keiskei*, the crude extracts were adsorbed by HPD-600 macroporous resin, and 50% ethanol eluents were collected as products. The products were separated into three different polar solvents for extracting, i.e., ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and aqueous fraction, and extracted by organic solvents of different polarities based on liquids-liquids extracting method. Moreover, the contents of total phenolic and flavonoid in different extracts were determined, and then the activities on scavenging DPPH, ABTS radical, ferric-reducing power and inhibiting to α -glucosidase were also studied. The results showed that the ethyl acetate-soluble fraction had high contents of total phenolic and flavonoid with the strongest antioxidant and α -glucosidase inhibi-

tory activities. The antioxidant activity and inhibitory rate of α -glucosidase of the extracts from *A. Keiskei* increased according with the their concentration increasing.

Keywords: *Angelica Keiskei*; antioxidant ability; α -glucosidase; inhibitory activity

明日叶是一种伞科多年生草本植物,药食兼用。原产于日本,因富含多种天然活性物质,被誉为“21 世纪的健康食品”^[1]。研究^[2-4]表明明日叶富含的黄酮类物质具有抗癌、降血糖、抗衰老等功效。目前,已经有不少文献^[5-6]对明日叶总黄酮的提取和纯化进行了报道,但鲜有文献对明日叶的活性部位进行追踪,而本研究拟采用简便快捷的方法,先将明日叶粗提取物过 HPD-600 树脂,再将大孔树脂纯化后的样品分为乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水相部位,采用清除 DPPH、ABTS 自由基,总还原能力和对 α -葡萄糖苷酶活性抑制的方法来评价明日叶不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性及对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,旨在追踪明日叶的活性部位,为明日叶活性物质的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

明日叶:上海交通大学农业与生物学院种植实验基地;
芦丁标准品:分析纯,贵州迪大科技有限责任公司;
二苯基苦味酰基苯肼:分析纯,东京化成株式会社;
 α -葡萄糖苷酶:100 U/mg, Sigma-Aldrich Company;
4-硝基苯酚- α -D-吡喃葡萄糖苷:分析纯, Sigma-Aldrich Company;

2,2'-联氨-双(3-(5-甲基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺):分析纯,上海源叶生物有限公司;

没食子酸标准品:分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心;

其余试剂均为分析纯;

基金项目:贵州省科学技术厅中药现代化攻关项目(编号:黔科合 ZY 字【2012】3012 号);贵阳市科技局现代药业计划项目(编号:筑科合同[2012204]号);教育部春晖计划(编号:Z2016012)

作者简介:朱芳,女,贵州师范大学在读硕士研究生。

通信作者:廖莉玲(1963—),女,贵州师范大学教授,硕士。

E-mail:lll6383@163.com

收稿日期:2016-12-11

HPD-600 树脂:沧州宝恩吸附材料科技有限公司;
分光光度计:L5s 型,上海仪电分析仪器有限公司;
旋转蒸发器:RE-52 型,上海亚荣生化仪器厂;
电子天平:A200S 型,德国 sartorius 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备 将晾干的明日叶粉碎过 40 目筛,称取 60 g 明日叶粉末与 53% 的乙醇按 1:17(g/mL) 的料液比混匀,在 82 °C 水浴提取两次,每次 2 h,合并两次提取液,抽滤,50 °C 真空减压浓缩至粉末状得到粗品。取一定量的蒸馏水溶解粗品,配成总黄酮含量为 2~3 mg/mL 的溶液,以 2 BV/h 的流速过 HPD-600 树脂至树脂吸附饱和后,用 50% 的乙醇溶液进行洗脱,直至洗脱液无色。收集洗脱液旋干得到大孔树脂纯化的样品,将大孔树脂未吸附的部分旋干得到过柱液样品。将大孔树脂纯化后的样品,加适量的蒸馏水溶解,充分混匀后转移到分液漏斗中。依次用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,旋干各相溶液分别得到乙酸乙酯相、正丁醇相、水相样品,并按式(1)计算得率:

$$C = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——得率, %;

m_1 ——旋干后各部分样品质量, g;

m_2 ——起始加入的明日叶粉末质量, g。

1.2.2 总黄酮含量的测定 采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[7]。以芦丁为标准品,在 200~700 nm 波长范围扫描,确定其最大吸收波长为 515 nm。在 515 nm 处测定标准系列的吸光度,并以吸光度(Y)对黄酮浓度(X)作图,得回归方程为: $Y = 11.466X - 0.0014$, $R^2 = 0.9999$ 。按同样方法测定不同溶剂萃取物样品的吸光度,代入标准曲线方程,计算各溶剂萃取物样品的总黄酮含量。

1.2.3 总多酚含量的测定 参考文献[8]。以没食子酸为标准品,在最大吸收波长 769 nm 下测定标准系列的吸光度。以吸光度(Y)对多酚浓度(X)作图,得回归方程 $Y = 132.3X - 0.0017$, $R^2 = 0.9999$ 。在同种方法下测定不同样品的吸光度,代入标准曲线方程,计算各溶剂萃取物样品的总多酚含量。

1.2.4 抗氧化能力测定

(1) 清除 DPPH 自由基能力的测定:根据文献[9],修改如下:取一定质量的样品,用 30% 的乙醇溶液溶解配成不同浓度的样液。分别向比色管中加入 1 mL 样液,再加入 0.1 mg/mL 的 DPPH 溶液 1.6 mL,最后用无水乙醇定容至 6 mL。摇匀避光保存 30 min 后,在 517 nm 波长处测定吸光度,每个样品平行测定 3 次。按式(2)计算清除率:

$$R_0 = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_0 ——自由基清除率, %;

A_1 ——待测体系的吸光度;

A_2 ——不加自由基体系的吸光度;

A_3 ——不加样液体系的吸光度。

(2) 清除 ABTS 自由基的测定:根据文献[10],修改如

下:取 7 mmol/L 的 ABTS 溶液 50 mL 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液 50 mL 混合均匀后,置于暗处反应 12~16 h,制备 ABTS^+ 溶液。使用前用蒸馏水按 1:40(体积比)进行稀释,使得 ABTS^+ 溶液吸光度在 734 nm 处为 0.698。取 0.2 mL 样液与 4 mL ABTS^+ 溶液混匀,室温下反应 10 min 后。测其吸光度,平行测定 3 次,清除率按式(2)计算。

(3) 总还原能力测定:根据文献[11]修改如下:取 0.5 mL 样液,加入 1 mL PBS(0.2 mol/L, pH=6.8) 溶液,1% 六氰合铁酸钾溶液 1 mL 混匀,于 50 °C 水浴 20 min 后,快速冷却至室温。加入 10% 三氯乙酸溶液 1 mL,混匀后离心 10 min,取 2.5 mL 上清液,加 2.5 mL 蒸馏水和 0.1% 氯化铁溶液 0.5 mL,静置 10 min 后,在 700 nm 处测其吸光度记为 A_1 ,用蒸馏水代替样液测得 A_0 。每个样品平行测定 3 次。

1.2.5 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制 根据文献[12]修改如下:分别向离心管中加入样液 0.2 mL,0.5 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶 0.2 mL,于 37 °C 的恒温水浴锅中反应 10 min 后,加入 5 mmol/L 的 PNPG 0.1 mL,在 37 °C 条件下继续反应 15 min 后,加入 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 1.4 mL 终止反应,用 0.1 mol/L pH=6.8 的缓冲溶液定容至 10 mL。在 402 nm 处测定其吸光度,平行 3 次,按式(3)计算抑制率。

$$R_1 = \frac{A_{\text{空}} - (A_{\text{样}} - A_{\text{背景}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R_1 ——对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, %;

$A_{\text{空}}$ ——不加样液体系的吸光度;

$A_{\text{样}}$ ——待测体系吸光度;

$A_{\text{背景}}$ ——不加酶体系的吸光度。

2 结果与分析

2.1 明日叶不同极性溶剂萃取物总黄酮和总多酚的含量

由表 1 可知,不同部分的样品得率相差较大,粗品得率为 23.42%,经大孔树脂纯化后的样品得率为 2.35%,而不被吸附的过柱液部分得率较高。纯化后的样品经不同极性的溶剂萃取后,各相萃取物得率相差不大,其中水相的得率最高。说明大孔树脂纯化部分样品中水溶性物质较多。

粗品经大孔树脂 HPD-600 纯化后,总黄酮含量提升近 6.3 倍,总多酚含量提升近 5.8 倍。而过柱液中总黄酮和总多酚含量较低,说明 HPD-600 树脂对明日叶中的黄酮可以

表 1 明日叶不同极性溶剂萃取物总黄酮、总多酚含量及得率
Table 1 Total flavonoids、phenolics contents and extract yield of different polar solvents of extracts from *Angelica Keiskei* %

萃取物	得率	黄酮含量	多酚含量
粗品	23.42±0.75	4.67±0.50	2.920±0.250
大孔树脂纯化品	2.35±0.15	29.24±1.15	16.820±0.280
过柱液	18.79±0.63	0.83±0.15	0.007±0.000
乙酸乙酯相	0.67±0.03	73.43±0.98	26.940±1.390
正丁醇相	0.69±0.07	26.83±1.15	15.920±0.340
水相	1.02±0.09	13.03±0.33	12.010±0.130

很好地富集。纯化后的样品经不同极性溶剂萃取分段后,各段的总黄酮和总多酚含量相差较大,乙酸乙酯部分总黄酮和总多酚含量最高,说明明日叶中的黄酮类物质属于中等极性。

2.2 明日叶不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性

不同极性溶剂萃取物清除 DPPH· 效果见图 1、表 2。由图 1 可知,不同极性溶剂萃取物对 DPPH· 的清除能力随着浓度的增加而增强,最终趋向平稳;但不同萃取物在相同浓度下,清除率相差较大。由表 2 可知,清除 DPPH· 的能力大小依次是 V_c>乙酸乙酯相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>水相>粗品>过柱液。

不同溶剂萃取物清除 ABTS⁺· 的效果见图 2、表 2。由图 2 可知,不同极性溶剂萃取物对 ABTS⁺· 的清除率随浓

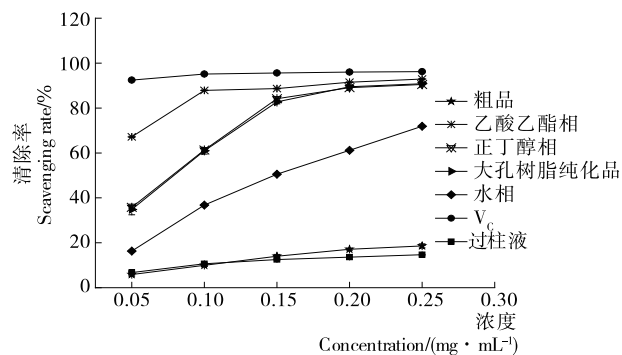


图 1 明日叶不同极性溶剂萃取物对 DPPH· 的清除作用
Figure 1 DPPH radical scavenging activity of different polar solvents of extracts from *Angelica Keiskei*

表 2 明日叶不同极性溶剂萃取物的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ of different polar solvents of extracts from *Angelica Keiskei* mg/mL

样品	DPPH·	ABTS ⁺ ·	α-葡萄糖苷酶
粗品	0.406±0.067	1.008±0.195	0.631±0.013
大孔树脂纯化品	0.080±0.003	0.270±0.001	0.284±0.007
过柱液	0.500±0.104	1.041±0.123	0.648±0.017
乙酸乙酯相	0.034±0.000	0.136±0.004	0.166±0.007
正丁醇相	0.081±0.001	0.316±0.009	0.416±0.010
水相	0.148±0.001	0.441±0.013	0.173±0.005
V _c	0.019±0.000	—	—
阿卡波糖	—	—	0.069±0.006

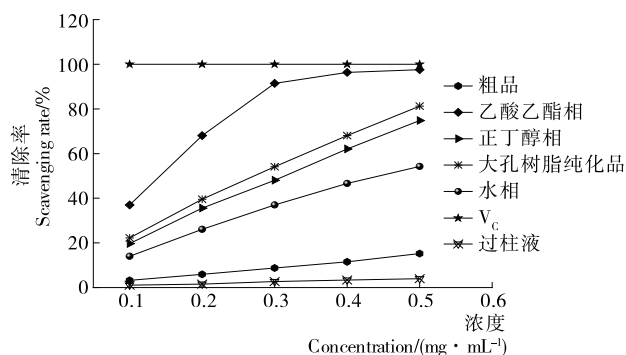


图 2 明日叶不同极性溶剂萃取物对 ABTS⁺· 的清除作用
Figure 2 ABTS radical scavenging activity of different polar solvents of extracts from *Angelica Keisk*

度的增大而增大,且对 ABTS⁺· 的清除能力相差较大。由表 2 可知,清除能力依次是 V_c>乙酸乙酯相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>水相>粗品>过柱液。

由图 3 可知,不同极性萃取物的还原能力随浓度的增大而增强,还原能力依次是 V_c>乙酸乙酯相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>水相>粗品>过柱液。

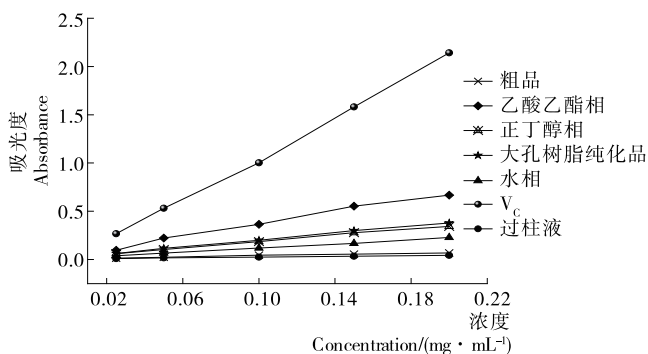


图 3 明日叶不同极性溶剂萃取物的总还原能力
Figure 3 Ferric-reducing antioxidant power of different polar solvents of extracts from *Angelica Keiskei*

综上所述,明日叶不同极性溶剂萃取物清除 DPPH·、ABTS⁺· 及总还原能力顺序均为 V_c>乙酸乙酯相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>水相>粗品>过柱液,表明不同极性部位样品的抗氧化能力大小顺序是 V_c>乙酸乙酯相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>水相>粗品>过柱液。而各样品的总黄酮、总多酚的含量顺序与其抗氧化能力顺序一致,即存在正相关性,说明黄酮、多酚是明日叶主要的抗氧化物质。而乙酸乙酯相的黄酮、多酚含量最高,因此乙酸乙酯抗氧化活性最强,活性物质也较多。

2.3 明日叶不同极性溶剂萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性

α-葡萄糖苷酶在人体糖类的代谢过程中发挥重要作用,α-葡萄糖苷酶抑制剂可以降低酶的活性,减缓碳水化合物的分解,使得血糖降低^[13]。体外降血糖活性多采用以 PNPG 为底物的酶抑制剂筛选模型来衡量物质对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性^[14]。各样品对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果见图 4、表 2。由图 4 可知,抑制率随着样品浓度的增加而增加。由

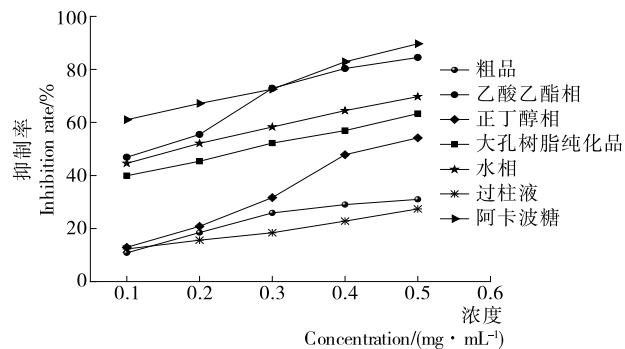


图 4 明日叶不同极性溶剂萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性
Figure 4 α-glucosidase inhibitory activity of different polar solvents of extracts from *Angelica Keisk*

表2可知,抑制率依次是阿卡波糖>乙酸乙酯相>水相>大孔树脂纯化品>正丁醇相>粗品>过柱液。可以看出明日叶乙酸乙酯对 α -葡萄糖苷酶有很好的抑制作用,在0.5 mg/mL时,其抑制率能达85%,与阿卡波糖的抑制作用相差不多。因此,对 α -葡萄糖苷酶抑制活性最强部位为乙酸乙酯部位,由于乙酸乙酯总黄酮含量高达73%,总多酚含量达27%,推测其活性物质可能为黄酮、多酚物质。可以从乙酸乙酯相进一步分离其活性物质,此外,水相部位黄酮、多酚含量低于大孔树脂后样品,但其 α -葡萄糖苷酶抑制活性却高于大孔树脂纯化后的样品,说明水相中存在非黄酮、多酚的活性物质,有待进一步深入研究。

3 结论

明日叶不同极性溶剂萃取物均有较强的还原能力并能有效地清除DPPH、ABTS自由基,具有良好的抗氧化活性,抗氧化活性最强的是黄酮、多酚含量最高的乙酸乙酯相,其他萃取物的抗氧化活性强弱顺序均与总黄酮、总多酚的含量大小顺序一致,即抗氧化活性与总黄酮、总多酚含量呈正相关关系,说明明日叶中总黄酮、总多酚是主要的抗氧化成分之一。在对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定中,发现,不同极性萃取物均有一定的抑制活性,其中总黄酮含量最高的乙酸乙酯相萃取物活性最高,与阿卡波糖的抑制效果相当,其次,水相萃取物的抑制活性也较强,但黄酮含量不高,说明在水相萃取物中可能含有其他的活性物质,有待进一步研究。通过对明日叶不同极性萃取物的抗氧化活性和对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定证实明日叶中的活性最强的部位在乙酸乙酯相,可通过进一步的分离纯化得到有效成分,为明日叶产品的开发利用提供理论依据。

参考文献

[1] 吴敬章,王磊,张菊平.明日叶的价值及其开发利用[J].中国野

生植物资源,2015,34(5):60-61.

- [2] YANG Meng, JING Yi-zhong, HE Sun. Effect of *Angelica keiskei* chalcone on the expression of apoptosis-regulating proteins of mice hepatocarcinoma cells [J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2011, 10(6): 325-327.
- [3] ENOKI T, OHNOGI H, NAGAMINE K, et al. Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei* [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(15): 6 013-6 017
- [4] 刘畅,王正武,吴金鸿.药食兼用植物明日叶的研究进展及应用[J].食品与药品,2015,15(3):205-209.
- [5] HU Yao-ming, CHU Dong-hai. Study on Ultrasonic extraction of total flavonoids from *Angelica keiskei* Koidzumi [J]. Agricultural Biotechnology, 2016, 5(3): 6-8.
- [6] 郭晓青,吴金鸿,周焱富,等.明日叶水溶性总黄酮提纯工艺[J].食品科学,2012,33(22):27-32.
- [7] 刘程程,韦万丽,廖莉玲.6种黔产清热类中草药主要抗氧化成分的含量[J].贵州农业科学,2012,40(2):41-43
- [8] 崔紫蛟,张彩云,刘彬彬,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定甜茶总多酚含量[J].贵州农业科学,2014,42(3):158-160.
- [9] 鄯佩娟,段旭昌,王敏,等.长裂苦苣菜甲醇提取物各极性成分的抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(16):146-150.
- [10] 曹清明,郭靖宇,钟海雁,等.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.
- [11] 欧阳凯,何先元,陈飞,等.四齿四棱草总皂苷提取工艺优化及抗氧化性研究[J].食品与机械,2016,32(7):141-145.
- [12] 李晨悦,李冬利,孙玉坤,等.筋菜提取物及其化学成分对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].食品工业,2016,37(4):164-166.
- [13] 李培.山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用动力学研究[J].食品与机械,2016,32(7):14-17.
- [14] 尹红力,赵鑫,佟丽丽,等.黑木耳多糖体外和体内降血糖功能[J].食品科学,2015,36(21):221-226.

(上接第83页)

4 结论

以上结果可以看出,对于相同的物料比例,双轴桨叶式混合机的混合时间一般约为150~180 s,而V型混合机的混合时间约为25 min,双轴桨叶式混合机比V型混合机的混合效率高很多;对于配方比例低至1:10 000的极少量物料,也可以在该设备上一次混合均匀。利用该设备对多组分粉料特别是混合比例相差较大的粉料进行混合,可以减少目前常用的等量递增或预混的方法,避免混合过程中的二次污染;在批量生产时可以节省生产时间,提高效率,降低成本。

在设备设计上,应考虑到搅拌桨掀起的物料飞扬到仓顶被吸附的问题,张麟等^[10]的设计充分考虑了物料飞扬的空间,避免了吸附的问题;Dinnissen 专为食品行业开发的易清洗混合机,将搅拌桨拉出来清洗解决了清洗死角和清洁效率的问题,值得中国公司借鉴。

参考文献

[1] 田耀华.制药工业粉体混合设备选用探讨[J].机电信息,2006

(17):14-19.

- [2] 查国才.混合设备在固体制剂中的发展与应用[J].医药工程设计,2007,28(5):41-44.
- [3] 崔福德.药剂学[M].2版.北京:中国医药科技出版社,2011:382.
- [4] 葛一健.我国双轴桨叶式饲料混合机生产现状及产品质量分析[J].渔业现代化,2012,39(5):53-56.
- [5] 任广跃,王红英,于庆龙,等.翻转卸料双轴桨叶饲料混合机工作性能试验研究[J].农业工程学报,2003,20(2):132-135.
- [6] 任广跃,王红英,于庆龙,等.双轴桨叶式混合机的混合性能及其发展前景分析[J].粮食与饲料工业,2003(7):23-31.
- [7] 飞马®混料机—首创推拉式驱动器用户操作手册[Z].[出版地不详]:迪尼森有限公司,2012:18.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 1886.220—2016 食品安全国家标准 食品添加剂 胭脂红[S].北京:中国标准出版社,2017:5.
- [9] 崔冬,王宇航,赵玉良.浅谈双轴卧式叶片混合机的设计[J].砖瓦世界,2013(12):28.
- [10] 张麟,谢宏.卧式双轴桨叶式混合机的结构特点及设计[J].饲料工业,1998,19(3):26-28.