

绞股蓝抗自由基成分的提取和性能测定

陈纯馨, 陈 忻, 刘爱文, 曹燕芬

(佛山科学技术学院理学院, 广东 佛山 528000)

摘 要: 研究了绞股蓝抗自由基有效成分的提取方法, 比较了不同产地的绞股蓝抗自由基的效果, 发现神农架出产的绞股蓝抗自由基的性能最好, 对羟自由基的清除率可达 100%, 对超氧阴离子自由基的清除率可达 67%, 对亚硝胺的抑制率最高可达 51%。

关键词: 绞股蓝; 提取; 超氧阴离子自由基; 羟自由基; 亚硝胺

Extraction of Antiradical Components from *Gynostemma pentaphyllum* and Thier Activities

CHEN Chun-xin, CHEN Xin, LIU Ai-wen, CAO Yan-fen

(College of Science, Foshan Academy of Science and Technology, Foshan 528000, China)

Abstract: The extraction method of antiradical components from *Gynostemma pentaphyllum* was studied, and the antiradical effect of *Gynostemma pentaphyllum* from different areas were compared. It was found that the *Gynostemma pentaphyllum* with the highest antiradical activity is from Shennongjia, higher than that from Liu Zhou. Its scavenging rates to hydroxyl radical and oxygen free radical are 100% and 67% respectively, and its highest inhibition rate to nitrosamine is 51%.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; extraction; super oxygen free radical; hydroxyl radical; nitrosamine

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0239-03

绞股蓝[*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak]又称“五叶参”、“七叶胆”, 是一种名贵天然的中草药资源^[1-2]。据国内外研究表明, 绞股蓝含有近 60 种人参总甙, 绞股蓝糖甙、氨基酸、生物碱以及 18 种人体需要的微量元素, 具有人参相似的免疫增强剂作用, 可调节人体生理机能, 降低转氨酶、延缓衰老^[3]、预防冠心病等作用, 尤其以抗衰老的效果最为明显, 所以绞股蓝被誉为“第二人参”、“长寿茶”。

绞股蓝的作用比较广泛, 人们对它进行了大量的研究, 但目前对绞股蓝的药理研究特别是对其有效成分的药理活性缺乏深层次阐明, 因此今后对绞股蓝的有效成分和有效单体的提取、分析、药理研究将会成为热点。基于以上原因, 本研究以不同产地的绞股蓝干为材料, 设置提取时间、提取温度、pH 等几个因素, 采用新技术超声波-乙醇法, 通过正交试验设计, 研究提取绞股蓝抗自由基有效成分的最佳提取条件, 为开发绞股蓝系列产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

不同产地绞股蓝干(湖北省神农架、广东省肇庆、广西省柳州) 佛山新一佳超市。

无水乙醇、邻二氮菲、六水硫酸亚铁铵、双氧水、磷酸二氢钾、磷酸钠等为 AR 级试剂; L 核黄素、氯化硝基四氮唑蓝(氮蓝四唑, NBT)为生化试剂; 亚硝酸钠、 α -萘胺、二甲胺、碳酸钠为 CP 级试剂。

1.2 仪器与设备

超声波清洗机 深圳特佳达机械有限公司; 722 型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; pHs-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 分析电子天平 上海天平仪器厂; 电热恒温水浴锅 上海沪南科学仪器联营厂。

1.3 原理及方法

1.3.1 清除羟自由基原理及方法

收稿日期: 2008-05-28

作者简介: 陈纯馨(1957-), 女, 副教授, 主要从事有机化学教学及应用研究。E-mail: chchx13@163.com

具体方法见文献[4],清除羟自由基的测定方法原理为: $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过Fenton反应产生羟自由基,邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液因被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} ,在510nm波长处的吸光度降低。加入双氧水前加入羟自由基清除剂,则Fenton反应产生的羟自由基被清除或部分清除,体系在510nm波长的吸光度降低相应减少。羟自由基清除率d计算方法如下:

$$d(\%) = \frac{A_{510}(\text{加入绞股蓝的样品}) - A_{510}(\text{损伤})}{A_{510}(\text{未损伤}) - A_{510}(\text{损伤})} \times 100 \quad (1)$$

式中, A_{510} (未损伤)指不加 H_2O_2 和绞股蓝样品的吸光度; A_{510} (损伤)指加 H_2O_2 不加绞股蓝样品的吸光度; A_{510} (加入绞股蓝的样品)指加绞股蓝后加 H_2O_2 样品的吸光度。

1.3.2 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)法检测清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的原理及方法

具体方法见文献[5],检测清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的原理为体系通过光照甲硫氨酸(Met)和核黄素(VB_2)产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$,可以将氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原为蓝紫色物质formazane,产物稳定且不溶于水。反应式如下 $\text{NBT} + \rightarrow \text{formazane} + \text{O}_2$ 因此,NBT与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用会有明显的颜色变化,若加入的物质可清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$,降低NBT的还原程度,颜色变化程度将减弱。用分光光度法测定其在560nm的吸光度,以吸光度的变化来间接判断受试物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用。清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{提取液}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3 阻断亚硝酸的原理及方法

具体方法见文献[6],模拟人体胃液的条件,二甲胺与亚硝酸钠在37℃,pH3的条件下可生成二甲基亚硝酸胺,在此条件下恒温1h可使亚硝酸胺加以纯化,反应充分。然后在紫外灯照射下生成的亚硝酸胺分解释放出亚硝酸根,与对氨基苯磺酸发生重氮化作用形成重氮盐,再与 α -萘胺偶合成紫红色物质;而清除亚硝酸钠的实验的前部分同上,但后部分不需要紫外灯照射,因为用紫外灯照射的目的是为了产生亚硝酸根,而它本身就是了,所以直接重氮化后与盐酸萘乙二胺显色即可。最后用比色法测其吸光度 A_x ,空白液吸光度 A_0 ,根据下式计算阻断率:

$$\text{阻断率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

1.4 实验步骤

将绞股蓝尽量粉碎,用分析天平称取10g装入碘量瓶,加乙醇溶液后,恒温水浴于温度t,超声波时间T。用漏斗过滤,把所得的滤液存于碘量瓶中,待测

($V_{\text{乙醇}} + V_{\text{蒸馏水}} = 100\text{ml}$, $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{蒸馏水}} = 3:2$, $t = 28^\circ\text{C}$)。

2 结果与分析

2.1 比较三种不同产地的绞股蓝抗羟自由基的效果

按照以上试验步骤和计算公式得到不同产地的绞股蓝提取液对羟自由基清除率实验结果,见表1。

表1 不同产地的绞股蓝提取液对羟自由基清除率

Table 1 Scavenging rates of *Gynostemma pentaphyllum* extracts from different areas to hydroxyl radical

	A	A空白	A实际	清除率(%)
未损伤	0.614	—	0.614	—
损伤	0.016	—	0.016	—
提取液1(湖北神农架)	0.666	0.098	0.568	92.31
提取液2(广西柳州)	0.532	0.014	0.518	83.95
提取液3(广东肇庆)	0.53	0.02	0.51	82.61

表1可见,湖北省神农架出产绞股蓝提取液清除羟自由基性能很好,可达92.31%,比其他两个地方要高出10%,这可能是由于湖北省神农架的环境无污染,绞股蓝质量优,有效成分积累较多。在以下的实验中,以神农架出产的绞股蓝干作为实验材料。

2.2 正交试验法获得最佳的提取条件

采用新技术超声波-乙醇法,设置提取时间t、提取温度T、溶剂的浓度、pH值等几个因素,并采用正交试验设计,研究提取绞股蓝抗羟自由基有效成分的最佳提取条件。根据表2(正交试验因素表),测得绞股蓝干清除羟自由基结果见表3。

表2 正交试验设计

Table 2 Design of orthogonal test

试验号	A时间(min)	B浓度(%)	C pH值	D温度(℃)
1	5	40	4~5	室温
2	5	60	6~7	55
3	5	80	8~9	80
4	15	40	6~7	80
5	15	60	8~9	室温
6	15	80	4~5	55
7	25	40	8~9	55
8	25	60	4~5	80
9	25	80	6~7	室温

注:室温28℃。

如表3所示,试验号5,即是 $A_2B_2C_3D_1$,时间15min,浓度60%,pH8~9,温度为室温为最佳的提取条件。以下进行绞股蓝性能测试均采用在最佳提取条件下得到的绞股蓝提取液。

2.3 绞股蓝提取液清除自由基性能

由表4可见,绞股蓝提取液具有优异的清除羟自由基性能,可达99.72%,比只具有单一成分绞股蓝皂甙

表3 清除羟自由基的结果
Table 3 Results of orthogonal test

试验号	A 溶液	A 试剂空白	A	转化率(%)
未损伤	0.373	0	0.373	—
损伤	0.012	0	0.012	—
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	0.12	0.105	0.015	0.83
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	0.197	0.175	0.022	2.77
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	0.602	0.232	0.37	99.17
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	0.075	0.026	0.049	10.25
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	0.572	0.2	0.372	99.72
A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	1.27	1.179	0.091	21.88
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	0.691	0.427	0.264	69.81
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	0.473	0.289	0.184	47.65
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	0.488	0.476	0.012	0

表4 绞股蓝提取液羟自由基的清除率实验结果
Table 4 Scavenging rate of *Gynostemma pentaphyllum* extract to hydroxyl radical

	A溶液	A试剂空白	A	清除率(%)
未损伤	0.373	0	0.373	—
损伤	0.012	0	0.012	—
提取液	0.572	0.2	0.372	99.72

表5 绞股蓝提取液清除超氧阴离子自由基实验结果
Table 5 Scavenging rate of *Gynostemma pentaphyllum* extract to superoxide radical

	A 提取液	A 空白样	清除率(%)
吸光度	0.08	0.248	67.74

对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力(64.4%)^[7]高很多;从表5中可见,绞股蓝提取液对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率可达67.74%。也比绞股蓝皂甙对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力(51.7%)^[7]高。

2.4 绞股蓝提取液阻断亚硝胺性能实验结果

表6 绞股蓝提取液阻断亚硝胺的性能
Table 6 *Gynostemma pentaphyllum* extract performance of blocking nitrosamines

	吸光度 A_x	A_0	阻断率(%)
空白液(A_0)	0	0.191	—
提取液	0.019	0.111	51.83

由表6可见,绞股蓝提取液对亚硝胺阻断作用可达51.83%,效果良好。

3 结 论

本研究分析了不同省份的绞股蓝清除羟自由基性能,发现神农架出产的绞股蓝清除羟自由基的性能最好。采用新技术超声波-乙醇法对绞股蓝进行正交试验,获得最佳的提取条件:时间为15min,乙醇浓度为60%,pH值为8~9,温度为28℃。实验结果表明绞股蓝提取液羟自由基清除率达99.72%,超氧阴离子自由基清除率可达67.74%,具有良好的阻断亚硝胺能力,阻断率达51.83%。

参考文献:

- [1] 张育松,陈洪德. 人间仙草——绞股蓝[J]. 中国茶叶加工, 1996(1): 13-14.
- [2] 郑小江,刘金龙.绞股蓝研究与开发[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 1999(12): 46-48.
- [3] 张谨瑞,陈谦,吴宪华. 多功能的抗衰老药——绞股蓝[J]. 国外科技, 1996(4): 47-48.
- [4] 雷学军. 清除氧自由基的功能性食品[J]. 食品工业, 2002 (3): 12-13.
- [5] 高斌,高洪. 氧自由基与细胞损伤[J]. 动物医学进展, 2002, 23(5): 34-36.
- [6] 郑荣梁. 自由基生物学[M]. 北京, 高等教育出版社, 1992: 55-56.
- [7] 张尔贤,俞丽君,肖湘. 绞股蓝皂甙清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 $\cdot\text{OH}$ 的作用[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 15(4): 244-246.