

牛蒡叶乙醇提取物的抗氧化性能

胡喜兰, 许瑞波, 姜 琴, 刘晓敏, 许 杰
(淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

摘 要: 用95%乙醇浸泡提取传统药食两用植物牛蒡叶, 并用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次对浸提液进行萃取。利用DPPH自由基清除法、 $O_2^{\cdot-}$ 清除法及 $\cdot OH$ 清除法测定各萃取部位的抗氧化活性, 以VC、VE和叔丁基对苯二酚(TBHQ)为对照物。结果表明: 牛蒡叶乙醇提取物具有较好的体外抗氧化活性, 其中乙酸乙酯萃取物(E_2)和正丁醇萃取物(E_3)具有较强的清除DPPH自由基的能力, 且活性强于TBHQ, 利用标准曲线法对乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物进行绿原酸含量的测定, 发现绿原酸含量分别达44.34mg/g和35.48mg/g。

关键词: 牛蒡叶; 提取物; 抗氧化活性; 绿原酸含量

Antioxidant Activities of Different Fractions of Ethanol Extract of *Arctium lappa* L. Leaves

HU Xi-lan, XU Rui-bo, JIANG Qin, LIU Xiao-min, XU Jie

(School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: This study was designed to investigate the DPPH, superoxide anion and hydroxyl free radical scavenging activities and reducing power of different fractions (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol) of the 95% ethanol extract of burdock (*Arctium lappa* L.) leaves using VC, VE and TBHQ as controls. The ethanol extract of burdock leaves revealed strong antioxidant activity *in vitro*. Ethyl acetate and *n*-butanol fractions had strong DPPH radical scavenging activity and were superior to TBHQ, and the content of chlorogenic acid in the two fractions was 44.34 mg/g and 35.48 mg/g, respectively.

Key words: burdock leaves; extract; antioxidant activity; chlorogenic acid content

中图分类号: TS218; TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0083-04

牛蒡(*Arctium lappa* L.)又名白肌人参, 属菊科。历代本草记载, 牛蒡的果、叶、根均可入药。牛蒡叶具有抗菌和抗真菌作用, 并含有抗肿瘤物质, 其鲜叶水煎, 可用于治疗急性乳腺炎等^[1-2]。目前中国已成为世界上最大的牛蒡生产和出口国。而江苏徐州占到中国牛蒡生产和出口量的1/2以上, 成为中国最大的牛蒡生产和商品牛蒡集散地, 徐州市沛县、丰县为最主要的种植地区^[3], 近年来, 有关牛蒡根的食用和药用方法的研究报道较多^[4-9], 牛蒡根已进入老百姓的餐桌, 但大量的牛蒡叶被废弃, 对牛蒡叶的研究^[10-13], 特别是有关其抗氧化活性成分与绿原酸含量的研究尚未见报道, 而其中的绿原酸是一种重要的生理活性物质, 研究表明^[14-15], 绿原酸具有利胆、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、止血、降血糖、降血脂等多种药用功能, 可以预防II型糖尿病、心血管疾病等^[16]。本研究以牛蒡叶为原料, 对乙醇提取物的不同萃取部位进行清除DPPH自由基、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 及还原能力的活性实验, 并与VC、VE、叔丁基对苯二酚(TBHQ)等进行比较, 通过标准曲线法对抗氧化活性强的部位进行绿原酸含量的测定, 其

结果将为牛蒡资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛蒡叶由江苏徐州市沛县河口镇提供, 采挖根部时, 取其茎叶, 洗净晾干, 用95%乙醇浸泡, 备用。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国Sigma公司; 芦丁标准品 中国食品药品检定研究院; 绿原酸(HPLC检测纯度98%, 批号: 201203) 上海顺勃生物工程有限公司; 乙醇、叔丁基对苯二酚(TBHQ)、VC、VE、水杨酸、双氧水、硫酸亚铁、邻菲罗啉、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TU-1901双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; LC-10ADVP型高压液相色谱仪、CLASS-VP工作站、SPD-M10AVP二极管阵列检测器 日本岛津公司; RE-52AA型旋转蒸发仪 上海亚荣生化

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 连云港市自然科学基金项目(CG1132); 淮海工学院引进人才启动基金项目(KK01060)

作者简介: 胡喜兰(1961—), 女, 教授, 学士, 研究方向为配位化学和天然药物化学的提取及应用。E-mail: huxilan@hhit.edu.cn

仪器厂; HH-2型恒温水浴锅、SK-1快速混匀器 常州国华电器有限公司; SHB-D(III)循环水式多用真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; DZF-6050型真空干燥箱 鄞城华鲁电热仪器有限公司; KS-150D超声波清洗器 宁波海曙科生超声设备有限公司; FA2104B型电子天平 上海越平科学仪器有限公司; HY旋转蒸发器 浙江舟山市定海区海源仪器厂; CHRIST冷冻干燥机 德国Martin公司。

1.3 方法

1.3.1 牛蒡叶乙醇提取物提取液的制备

将牛蒡叶用95%乙醇浸泡, 过滤后, 滤渣用回收溶剂重复浸泡提取两次, 合并滤液, 减压浓缩后, 冷冻干燥, 得粗提物(E_0), 称质量并计算产率。

称取粗提物5.0g分散于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 每种溶剂萃取3次。合并萃取液, 置于圆底烧瓶中, 旋转蒸发去除溶剂, 分别得石油醚萃取物(E_1)、乙酸乙酯萃取物(E_2)、正丁醇萃取物(E_3)及水残留物(E_4), 编号备用。

1.3.2 抗氧化活性测定^[17-22]

1.3.2.1 清除DPPH自由基能力的测定

利用DPPH自由基溶液的特征紫红色团的吸收, 用紫外-可见分光光度计在200~800nm波长处进行光谱扫描, 确定最大吸收波长。在最大波长处测定加抗氧剂提取液后的吸光度, 如果吸光度下降表示其对自由基具有消除能力。取2mL样品溶液, 加入到2mL 100 μ mol/L的DPPH溶液, 用快速混匀器混匀, 室温条件下静置30min后混合, 以无水乙醇为对照, 测定吸光度(A_i), 同时, 将2mL样品溶液与2mL无水乙醇混合后, 测吸光度(A_j); 再测定2mL的DPPH溶液与2mL无水乙醇混合后吸光度(A_c)。按式(1)计算抑制率。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100 \quad (1)$$

同时配制同浓度的VC、VE、TBHQ, 按照上述步骤测定吸光度并计算对DPPH自由基的清除率。

1.3.2.2 清除 $O_2^{\cdot -}$ 能力的测定

取50mmol/L的Tris-HCl缓冲溶液(pH8.22)4.5mL, 加入4.2mL的蒸馏水, 混匀后在25℃的水浴中保温20min, 取出后立即加入在25℃预热的0.3mL的邻苯三酚溶液(用10mmol/L HCl配制), 迅速摇匀后(1min内), 于325nm波长处每隔30s测定吸光度, 邻苯三酚自氧化5min后, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加值(ΔA_0)。在加入邻苯三酚之前分别加入样品, 按照上述步骤测定每分钟吸光度的增加值(ΔA)。用10mmol/L HCl校零。根据式(2)计算各待测物对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率。

$$O_2^{\cdot -} \text{清除率}/\% = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A} \times 100 \quad (2)$$

同时配制同浓度的VC、VE、TBHQ, 按照上述步骤

测定并计算 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率。

1.3.2.3 清除 $\cdot OH$ 能力的测定

取1mL 0.75mmol/L邻二氮菲无水乙醇溶液于试管中, 依次加入2mL 0.2mol/L的磷酸缓冲液(pH7.4)和2mL 50%无水乙醇, 充分混匀, 加入1mL新配制的0.75mmol/L硫酸亚铁溶液, 混匀后加入1mL新配制的0.01%的双氧水, 于37℃水浴加热60min后, 在536nm波长处测定吸光度($A_{\text{损伤}}$)。操作方法同损伤管, 但以1mL 50%乙醇代替损伤管中双氧水, 可测得($A_{\text{空白}}$)。样品管以0.2mL样品量代替损伤管中的50%无水乙醇, 操作方法同损伤管, 可测得 $A_{\text{样品}}$ 。根据式(3)计算对 $\cdot OH$ 的清除率。

$$\cdot OH \text{清除率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{空白}}}) \times 100 \quad (3)$$

同时配制同浓度的VC、VE、TBHQ, 按照上述步骤测定并计算清除 $\cdot OH$ 的清除率。

1.3.2.4 还原能力的测定

采用铁氰化钾还原法。在2.5mL pH6.86磷酸缓冲溶液中加入1mL样品, 1mL 1g/100mL铁氰化钾, 混合物在50℃恒温条件下加热20min。急速冷却, 加2.5mL 10g/100mL三氯乙酸, 取上层清液5mL, 加5mL蒸馏水再加1mL 0.1g/100mL $FeCl_3$, 混合均匀, 于2000r/min离心10min, 静置10min后在700nm波长处测吸光度, 吸光度越大, 则样品还原能力越强。

1.3.3 有关活性成分含量的测定

1.3.3.1 光谱曲线的测定

利用可见-紫外分光光度计对有关样品进行可见-紫外光谱扫描, 推测其可能含有的成分。

1.3.3.2 标准曲线法测定绿原酸^[23-24]

精密称取绿原酸标准品5.6mg, 用50%乙醇溶解并定容于50.0mL容量瓶中, 摇匀, 得到绿原酸标准溶液(112 μ g/mL)。精密吸取该标准溶液0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00mL分别置于10mL容量瓶中, 加50%乙醇定容至刻度, 摇匀。用28 μ g/mL的绿原酸标准溶液于紫外分光光度计200~600nm波长处进行扫描, 确定最大吸收波长。在最大吸收波长处测定吸光度, 制备标准曲线。取一定体积样品液按标准曲线相同方法操作, 在最大吸收波长处测得吸光度后, 由标准曲线计算出绿原酸含量。

1.3.3.3 高效液相色谱法测定绿原酸

设置条件为: 压力: 0~40MPa; 显示精度: $\pm 2\%$; 流速: 1mL/min; 进样: 10 μ L; 操作温度: 4~35℃; 流动相: H_2O -甲醇体积比1:1; 检测波长: 329nm; 取少量样品于小瓶内, 将其溶剂挥干后, 用适量甲醇溶解, 待用。

2 结果与分析

2.1 牛蒡叶乙醇浸提物的抗氧化活性

2.1.1 对DPPH自由基的清除作用

表1 牛蒡叶乙醇浸提物不同萃取部位的抗氧化活性结果
Table 1 Antioxidant activities of different fractions of the ethanol extract of burdock leaves

样品	DPPH自由基清除率/%	$O_2^{\cdot-}$ 清除率/%	$\cdot OH$ 清除率/%	还原能力(A_{700nm})
石油醚萃取物(E_1)	41.30	46.15	8.33	0.407
乙酸乙酯萃取物(E_2)	82.47	58.33	3.13	0.831
正丁醇萃取物(E_3)	87.39	—	—	0.792
水残留物(E_4)	32.65	58.33	2.08	0.402
VC	94.94	100.16	92.71	0.741*
TBHQ	39.91	99.53	48.96	0.322
VE	—	46.15	1.04	0.321

注：*。牛蒡叶乙醇提取物质量浓度为0.05mg/mL，其余均为1mg/mL；—。结果为负值。

从表1可以看出，牛蒡叶乙醇浸提物的乙酸乙酯和正丁醇萃取物对DPPH自由基的清除能力较强，高于合成抗氧化剂TBHQ，基于此，故对不同质量浓度的乙酸乙酯萃取物(E_2)、正丁醇萃取物(E_3)和VC溶液对DPPH自由基的清除能力进行了对比实验，结果见图1。

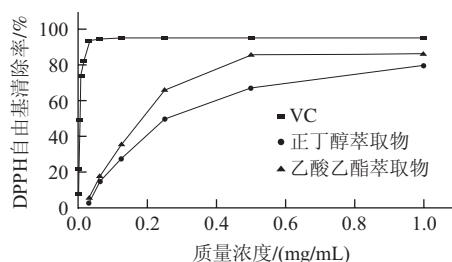


图1 不同萃取部位对DPPH自由基的清除作用

Fig.1 Scavenging activities of different solvent extracts of the ethanol extract of burdock leaves against DPPH free radicals

由图1可知，0.267mg/mL乙酸乙酯萃取物(E_2)或正丁醇萃取物(E_3)的清除能力随着质量浓度的增大而增大，在相同条件下，VC活性远远强于 E_2 、 E_3 ；且 E_2 活性稍强于 E_3 。

2.1.2 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力

从表1可以看出，除正丁醇萃取物外，牛蒡叶乙醇浸提物的其余各萃取物对 $O_2^{\cdot-}$ 具有一定的清除能力，虽低于合成抗氧化剂TBHQ以及VC的清除能力，但几乎与VE的清除力相当或更强。

2.1.3 对 $\cdot OH$ 的清除能力

从表1可以看出，牛蒡叶乙醇浸提物的各萃取物对 $\cdot OH$ 的清除能力并不明显。

2.1.4 还原能力

从表1可以看出，牛蒡叶乙醇浸提物的各萃取物均有一定的还原能力。相对而言，乙酸乙酯萃取物(E_2)还原能力较强，明显高于合成抗氧化剂TBHQ和其他萃取物。基于此，故对不同质量浓度的 E_2 (0.1mg/mL)及VC溶液(0.01mg/mL)的还原能力进行了对比实验，结果见图2。

VC溶液还原能力的相当，其萃取物中活性成分的分离、纯化工作正在进行。

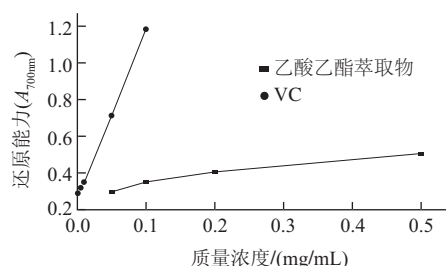


图2 乙酸乙酯萃取物与VC的还原能力对比

Fig.2 Comparison of the reducing power of ethyl acetate fraction and VC

2.2 牛蒡叶乙醇浸提物的紫外-可见吸收光谱

通过实验结果比较，牛蒡叶乙醇浸提物的乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物抗氧化能力较强，为了进一步研究其活性成分，对其进行了紫外-可见吸收光谱表征，结果见图3。

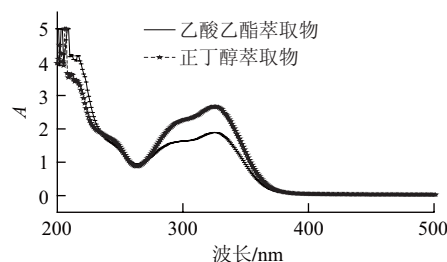


图3 乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的紫外-可见吸收光谱

Fig.3 UV-visible absorption spectra of ethyl acetate and n-butanol fractions

由图3可知，乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物在波长200~400nm范围有明显的吸收，通过TLC检验，用三氯化铁-铁氰化钾喷雾，斑点显蓝紫色，说明其中含有具有羟基的多酚类化合物，故进行绿原酸含量的测定。

2.3 牛蒡叶乙醇浸提物中绿原酸含量的测定结果

2.3.1 最大吸收峰波长确定

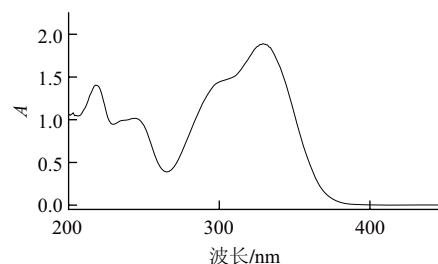


图4 绿原酸标准溶液紫外光谱图

Fig.4 UV absorption spectrum of standard chlorogenic acid solution

由图4可知，吸收曲线得到绿原酸最大吸收峰为波长329nm。在329nm波长处分别测定不同质量浓度标准溶液的吸光度。以绿原酸标准样品质量浓度为横坐标(x, $\mu g/mL$)，以其吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线，得标准曲线回归方程为 $y=0.0661x+0.0139$ ($R^2=0.999$)，表明芦丁标准曲线在测定质量浓度5.6~44.8 $\mu g/mL$ 范围内线性关系良好。

2.3.2 绿原酸的含量

将样品稀释5倍后,测定吸光度,代入回归方程,计算绿原酸含量并进行相应的换算,结果见表2。

表2 牛蒡叶乙醇浸提物的乙酸乙酯萃取物(E₂)与正丁醇萃取物(E₃)的绿原酸含量

Table 2 Chlorogenic acid content in ethyl acetate and *n*-butanol fractions

样品	吸光度(A)	绿原酸含量/(mg/g)
乙酸乙酯萃取物	0.604	44.34
正丁醇萃取物	0.483	35.48

由表2可知,乙酸乙酯萃取物(E₂)与正丁醇萃取物(E₃)均含有一定量的绿原酸,且E₂比E₃的含量高,这与2.1节的结果相对应,但从图3、4可以看出,其他化合物(如黄酮等)的存在对其测定有影响,故选取正丁醇萃取物(E₃),通过葡聚糖凝胶LH-20(纯甲醇洗脱)对其纯化,用薄层色谱检测,与绿原酸对照品比较,对得到的样品(E_{3.1})进行高效液相测定对比。

2.3.3 牛蒡叶乙醇浸提物高效液相测定结果

采用体积比1:1甲醇-水进行洗脱,正丁醇萃取物(E₃)、纯化后样品(E_{3.1})及绿原酸标准品的高效液相检测结果见图5。正丁醇萃取物(E₃)在5min左右有两个明显的其他峰,且相互交融,经过葡聚糖LH-20凝胶柱色谱分离纯化后,通过峰面积计算,虽然纯化后的产品相对含量从75.87%提高到了81.61%,但效果不是很好,还需用其他的方法进一步分离、纯化。

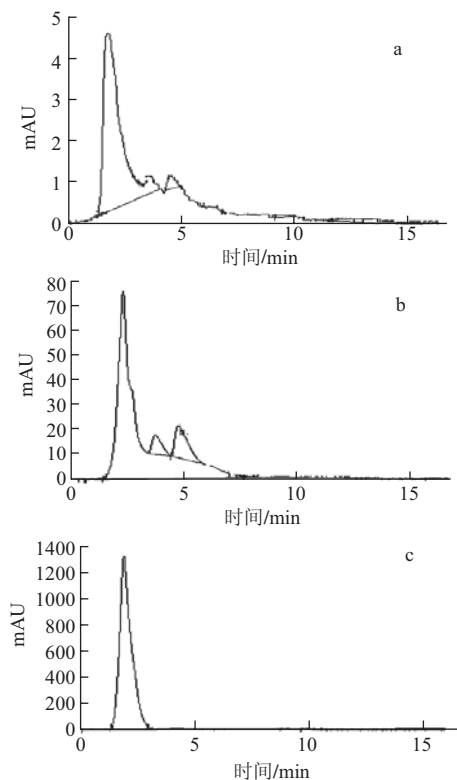


图5 牛蒡叶乙醇浸提物的正丁醇萃取物(a)、纯化后样品(b)及绿原酸标准品(c)高效液相色谱图

Fig.5 HPLC patterns of *n*-butanol fraction, its purified sample and chlorogenic acid standard

3 结论

牛蒡叶乙醇浸提物的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水残留物均有一定的抗氧化能力,且乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物抗氧化能力更强,其中绿原酸含量可分别达到44.34mg/g和35.48mg/g。现代科学对绿原酸生物活性的研究已深入到食品、保健、医药和日用化工等多个领域。在食品特别是功能性食品的研究开发上也成为热点,已经有人在开发保健饮料以及绿原酸用于果汁的护色、增香及果品的保鲜、防腐等方面^[25],展现出极大的应用前景。绿原酸和其他有效成分一起将成为牛蒡叶应用开发的基础,进一步的分离、纯化测定研究还在进行中。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 292.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志: 下册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 132-140.
- [3] 魏垂敬. 徐州牛蒡产业的发展前景及对策分析[J]. 产业论坛, 2006(12): 1-3.
- [4] 金春英, 张小勇, 崔胜云. DPPH及邻苯三酚法对牛蒡和小根蒜提取液及其他抗氧化剂的清除自由基能力的比较研究[J]. 延边大学学报: 自然科学版, 2008, 34(1): 43-46; 61.
- [5] 魏东. 牛蒡提取物抗疲劳作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(13): 3171-3172.
- [6] 马利华, 宋慧, 秦杰. 牛蒡提取物体外抗氧化性的研究[J]. 科研开发, 2007, 23(1): 69-72.
- [7] 于宏. 牛蒡的化学成分与生物活性[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(6): 244-247.
- [8] 陈世雄, 陈靠山. 牛蒡根化学成分及活性研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(7): 281-285.
- [9] 胡喜兰, 王国卫, 高英. 牛蒡根中活性成分的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 113-115.
- [10] 刘丹赤, 杨建华, 李鹏. 牛蒡叶中绿原酸提取工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2009(4): 305-306.
- [11] 林学政, 柳春燕, 陈靠山. 不同地域牛蒡叶绿原酸的含量比较及其抑菌实验[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 328-330.
- [12] 马利华. 大孔树脂纯化牛蒡叶中类胡萝卜素工艺的研究[J]. 农产品科技, 2008, 2(3): 10-13.
- [13] 刘世名, 董国霞, 陈靠山. 牛蒡叶中绿原酸的提取工艺优化[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(9): 659-661.
- [14] 吴卫华, 康杭, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 691-694.
- [15] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 479-481.
- [16] 王丽萍, 郭栋, 王果, 等. 中药绿原酸的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 961-963.
- [17] 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.
- [18] 柳建军, 许立松, 王菁菁, 等. 黄连木嫩叶抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 45-47.
- [19] 胡喜兰, 尹福军, 程青芳, 等. 不同花期芍药花中活性成分的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 511-514.
- [20] 石雪萍, 吴亮亮, 高鹏, 等. 20种食用辛香料抗氧化性及其与黄酮和多酚的相关性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 83-86.
- [21] 徐怀德, 闫宁环, 陈伟, 等. 黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 264-269.
- [22] 王威, 左双海, 程超. 贡水白柚柚皮乙醇提取物的体外抗氧化作用[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 143-148.
- [23] 李文芳, 晏丽, 田春莲, 等. 甘薯叶中绿原酸最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 245-248.
- [24] 向昌国, 李文芳, 聂琴, 等. 甘薯茎叶中绿原酸提取方法的研究及含量测定[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 126-130.
- [25] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 209-210.