

狗肝菜功能性成分的抗氧化活性

李南薇, 刘长海, 陆映机

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225)

摘要: 以狗肝菜为原料, 对其中的黄酮、多糖、多酚等功能性成分进行提取, 并对其抗氧化活性进行研究。结果表明: 狗肝菜中含有丰富的黄酮、多糖和多酚类物质, 其含量分别为 2.4、180.5 mg/g 和 61.2 mg/g (以干基计)。抗氧化实验表明: 狗肝菜黄酮、多糖和多酚具有较强的清除 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的能力, 对 DPPH 自由基的清除率分别为 76.7%、88.2% 和 35.8%, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 90.8%、95.7% 和 80.9%。

关键词: 狗肝菜; 黄酮; 多糖; 多酚; 抗氧化活性

Antioxidant Activities of Functional Components from *Dicliptera chinensis*

LI Nan-wei, LIU Chang-hai, LU Ying-ji

(College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Functional components including flavonoids, polysaccharides and polyphenols were isolated from *Dicliptera chinensis*, and their antioxidant activities were evaluated. The results indicated that *Dicliptera chinensis* was rich in flavonoids, polysaccharides and polyphenols, of which the contents were 2.4, 180.5 mg/g and 61.2 mg/g of dry *Dicliptera chinensis* (ma), respectively. Moreover, flavonoids, polysaccharides and polyphenols from *Dicliptera chinensis* had strong free radical scavenging capacity, with respective scavenging rates of 76.7%, 88.2% and 35.8% against DPPH free radicals and of 90.8%, 95.7% and 80.9% against hydroxyl free radicals.

Key words: *Dicliptera chinensis*; flavonoids; polysaccharides; polyphenols; antioxidant activity

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0071-04

狗肝菜, 为双子叶植物爵床科植物狗肝菜的全草, 分布在我国南方各省区, 是药食同源的植物。狗肝菜的食用部分为嫩茎, 味甘、微苦, 性寒, 有清热解毒、生津利尿之功效, 其作为传统的中药在我国已有上千年的使用历史, 临床上用于治疗发热咳嗽、咳血、感冒发热、暑热烦渴、目赤肿痛、斑疹发热、眼结膜炎、便血赤痢等^[1-3]。

迄今, 有关该植物的研究报道很少, 主要集中在栽培技术、化学成分分析、多糖提取及其保肝作用等方面^[1-8], 对狗肝菜黄酮、多酚的提取及其体外抗氧化活性的研究尚未见报道。本实验以狗肝菜为原料, 对其中的黄酮、多糖和多酚等功能性成分进行提取, 并对其抗氧化活性进行研究, 探讨其能否作为一种新的植物源食品或食品添加剂应用于生产中。

1 材料与方法

1.1 材料

狗肝菜采摘于广东肇庆农村, 清洗干净后自然晒干, 将晒干的狗肝菜切成小段, 然后放入 25000r/min 的高速粉碎机中打成粉末后, 备用。

没食子酸 天津市科密欧化学试剂开发中心; 葡萄糖 江苏强盛化工有限公司; 乙醇 天津市富宇精细化工有限公司; 水杨酸 天津市广成化学试剂有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、氯化铝、双氧水 广州化学试剂厂; DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)、邻二氮菲 美国 Sigma-Aldrich 公司; 芦丁 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

S54 紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 6202 小型高速粉碎机 台湾欣镇企业有限公司; ALC-210.4 电子分析天平 德国 Sartorius 公司; HWS12 型电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司。

收稿日期: 2010-10-08

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A024200003)

作者简介: 李南薇(1982—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: linanwei2006@yahoo.com.cn

1.3 狗肝菜功能性成分的提取和测定

1.3.1 狗肝菜黄酮的提取和测定^[9]

称取狗肝菜干粉 10g, 加入 70% 的乙醇 100mL, 在 75℃ 的水浴中回流提取 2h, 离心取上清液并进行减压浓缩, 然后定容至 100mL, 摇匀, 备用。

准确称取芦丁 10.0mg, 用 70% 的乙醇溶解后定容到 100mL, 配制成 0.1mg/mL 的芦丁标准溶液。吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL 的芦丁标准溶液分别置于 25mL 比色管中, 用 70% 乙醇溶液补至 10mL, 加入 1mL 5g/100mL 亚硝酸钠溶液, 振摇, 放置 5min, 加入 1mL 10g/100mL 硝酸铝溶液, 摇匀后放置 6min, 加入 5mL 1mol/L 氢氧化钠溶液, 用 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 15min, 以试剂为空白参比液, 于 510nm 波长处测定吸光度, 以芦丁标准溶液质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。取 10mL 狗肝菜黄酮提取液, 按上述操作测定其吸光度, 计算样品中的黄酮含量。

1.3.2 狗肝菜多糖的提取和测定

称取狗肝菜干粉 10g, 加入 100mL 蒸馏水, 在 75℃ 水浴中回流提取 2h, 将浸提液于 3000 × g 离心 15min, 取上清液浓缩至 50mL, 然后用 Sevag 法脱蛋白, 3000 × g 离心 15min, 取上清液, 并加入 95% 乙醇使乙醇终体积分数为 80%, 冰箱静置 48h 过滤, 再于 3000 × g 离心 15min, 取沉淀, 沉淀重新溶于蒸馏水中, 定容至 100mL, 摇匀, 备用^[10]。

采用硫酸-苯酚法^[11]。准确称取 10.0mg 葡萄糖, 用蒸馏水溶解后定容到 100mL, 配制成 0.1mg/mL 的葡萄糖标准溶液。吸取 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4mL 葡萄糖标准溶液分别置于 10mL 比色管中, 用蒸馏水补至 2mL, 加入 1mL 6% 苯酚试液, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0mL, 摇匀后放置 10min, 置沸水浴中加热 15min, 取出冷却至室温, 以试剂为空白参比液, 于 490nm 波长处测定吸光度, 以葡萄糖标准溶液质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。取 2mL 狗肝菜多糖提取液, 按上述操作测定其吸光度, 计算样品中的多糖含量。

1.3.3 狗肝菜多酚的提取和测定

称取狗肝菜干粉 10g, 加入 30% 的乙醇 100mL, 在 60℃ 的水浴中回流提取 1.5h, 离心取上清液并进行减压浓缩, 然后定容至 100mL, 摇匀, 备用。

采用 Folin-ciocalteu 法测定总多酚含量^[12]。准确称取 10.0mg 没食子酸, 用水溶解后定容到 100mL, 配制成 0.1mg/mL 的没食子酸标准溶液。吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0mL 没食子酸标准溶液分别置于 10mL 比色管中, 加水补至 6mL, 再加入 1mL 福林-酚试剂, 摇

匀, 在 1~8min 内再加入 2mL 20g/100mL Na₂CO₃ 溶液, 以蒸馏水定容至刻度, 40℃ 避光反应 2h。以试剂为空白参比液, 于 760nm 波长处测定吸光度, 以没食子酸标准溶液质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。取 2mL 狗肝菜多酚提取液, 按上述操作测定其吸光度, 计算样品中的多酚含量。

1.4 抗氧化活性的测定

1.4.1 清除 DPPH 自由基的测定^[13]

准确称取 DPPH 标准品 11mg, 用无水乙醇溶解并定容至 100mL, 配成 0.28mmol/L 的 DPPH 储备液, 置于冰箱中备用。用 0.1mL 无水乙醇与 3mL 0.28mmol/L 的 DPPH 溶液加入同一试管中, 摇匀, 在黑暗中放置 30min, 以无水乙醇为空白在 517nm 测定其吸光度($A_{\text{对照}}$)。把狗肝菜黄酮、多糖、多酚提取液分别稀释成不同质量浓度, 取 0.1mL 稀释的待测样品溶液与 3mL 0.28mmol/L 的 DPPH 溶液于同一试管中, 摇匀, 在黑暗中放置 30min, 以无水乙醇为空白在 517nm 波长处测定其吸光度($A_{\text{样品}}$)。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (1)$$

1.4.2 清除羟自由基的测定^[14]

在试管中依次加入 1.5mL 5mmol/L 邻二氮菲溶液, 2mL 0.05mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 1mL 7.5mmol/L FeSO₄ 溶液, 1mL 不同质量浓度的待测样品溶液, 混合均匀, 再加入 1mL 0.1% H₂O₂, 用蒸馏水补至 10mL, 在 37℃ 静置 1h 后于波长 510nm 处测定其吸光度($A_{\text{样品}}$), 用蒸馏水代替样品液按上述方法测定吸光度为 $A_{\text{损伤}}$, 用蒸馏水代替 H₂O₂ 及样品溶液按上述方法测定吸光度为 $A_{\text{未损伤}}$ 。按式(2)计算 ·OH 清除率。

$$\cdot \text{OH 清除率} / \% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 狗肝菜黄酮、多糖和多酚含量的测定结果

分别以芦丁、葡萄糖、没食子酸为标准品制作标准曲线来测定狗肝菜中黄酮、多糖和多酚的含量。根据标准曲线计算出回归方程和相关系数, 结果见表 1。

表 1 芦丁、葡萄糖及没食子酸含量测定的标准曲线回归方程
Table 1 Regression equations of rutin, glucose and gallic acid

标准品	回归方程	相关系数
芦丁	$A = 24.25C + 0.0061$	0.9999
葡萄糖	$A = 58.706C + 0.0031$	0.9993
没食子酸	$A = 38.429C - 0.0186$	0.9976

注: A 为吸光度; C 为物质含量。

表2 狗肝菜中黄酮、多糖和多酚含量

Table 2 Contents of flavonoids, polysaccharides and polyphenols in *Dicliptera chinensis*

成分	黄酮	多糖	多酚
含量/(mg/g)	2.4	180.5	61.2

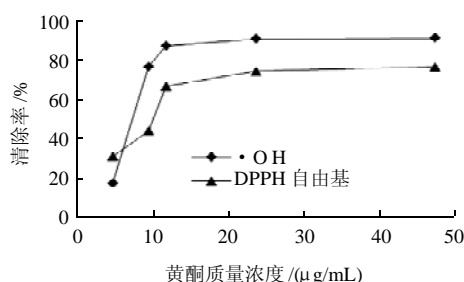
注：以干基计。

由表2可知，狗肝菜中含有丰富的黄酮、多糖和多酚。其中多糖含量最高，多酚其次，黄酮的含量相对较少。

2.2 狗肝菜的抗氧化活性

2.2.1 狗肝菜黄酮的抗氧化活性

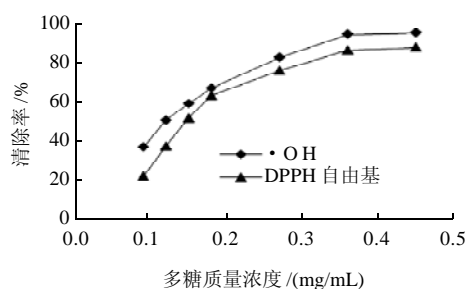
DPPH 自由基是一种很稳定的氮中心的自由基，常用于抗氧化成分的体外抗氧化评价。 $\cdot\text{OH}$ 被认为是毒性最强的活性氧自由基，辐射损伤等物理、化学因子都会促进其形成，是造成有机体过氧化损伤的主要因素^[15]。实验以 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 清除率为指标，对提取的狗肝菜黄酮、多糖和多酚的体外抗氧化活性进行初步研究。

图1 狗肝菜黄酮对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力Fig.1 Scavenging rates of flavonoids from *Dicliptera chinensis* against DPPH and hydroxyl free radicals

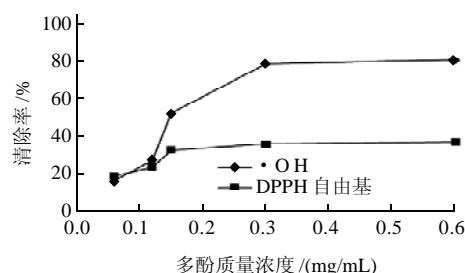
由图1可知，狗肝菜黄酮对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 具有较强的清除作用，并且呈显著地剂量依赖关系，随着狗肝菜黄酮质量浓度的增加，清除效果增强。当狗肝菜黄酮质量浓度大于 $11.7\mu\text{g/mL}$ 时，质量浓度的增加对 DPPH 自由基清除率的影响很小，最高清除率达到 76.7%。当样品质量浓度达到 $23.5\mu\text{g/mL}$ 时，样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达到 90.8%，之后质量浓度的增加对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率没有太大的影响。

2.2.2 狗肝菜多糖的抗氧化活性

由图2可知，狗肝菜多糖对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH 自由基具有极好的清除作用，并且自由基的清除率均随质量浓度的上升而增加。当狗肝菜多糖质量浓度达到 0.36mg/mL 时，继续增大质量浓度， $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH 自由基的清除率基本不再增加，其最大清除率分别为 95.7% 和 88.2%。

图2 狗肝菜多糖对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力Fig.2 Scavenging rates of polysaccharides from *Dicliptera chinensis* against DPPH and hydroxyl free radicals

2.2.3 狗肝菜多酚的抗氧化活性

图3 狗肝菜多酚对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力Fig.3 Scavenging rates of polyphenols from *Dicliptera chinensis* against DPPH and hydroxyl free radicals

由图3可知，狗肝菜多酚对 $\cdot\text{OH}$ 具有较好的清除作用。当狗肝菜多酚质量浓度小于 0.30mg/mL 时， $\cdot\text{OH}$ 的清除率随着质量浓度的加大而增强，继续增大质量浓度，对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果影响甚小，最高清除率达到 80.9%。

狗肝菜多酚对 DPPH 自由基也有一定的清除作用。狗肝菜多酚质量浓度小于 0.15mg/mL 时，随着质量浓度的增加，清除 DPPH 自由基的作用加强，当质量浓度大于 0.15mg/mL 时，DPPH 自由基的清除率增加缓慢，最高清除率达到 35.8%。

3 讨论

狗肝菜广泛分布于我国南方各省市，是药食同源的植物。目前有关该植物的研究报道不多，在市场上也没有对其进行进一步开发的产品，这种现状严重制约了狗肝菜的应用。根据本实验可知，狗肝菜中含有丰富的黄酮、多糖和多酚，尤其以多糖含量最高。抗氧化实验表明狗肝菜黄酮、多糖和多酚都具有良好的抗氧化活性，且对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率均高于其对 DPPH 自由基的清除率，这些都为开发利用该资源提供了参考依据。

参考文献：

- [1] 高毓涛, 杨秀伟, 艾铁民. 狗肝菜的化学成分研究[J]. 中草药, 2007,

- 38(1): 14-17.
- [2] 康笑枫, 徐淑元, 秦晓霜. 狗肝菜中挥发油的化学成分分析[J]. 热带农业科学, 2003, 25(4): 14-17.
- [3] 龚玉莲, 柯少娥, 李瑜丹, 等. 狗肝菜的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005(4): 81.
- [4] 陈显双. 狗肝菜及其栽培技术[J]. 广西热带农业, 2005(1): 41-42.
- [5] YUAN C I, CHAING M Y, CHEN Y M. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptere chinensis*[J]. Plant Science, 2002, 163(3): 543-554.
- [6] 付鹏, 朱华, 杨世联, 等. 不同产地狗肝菜中多糖的含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(4): 626-628.
- [7] 张可锋, 朱华, 高雅. 狗肝菜保肝作用有效部位筛选研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 497-498.
- [8] 张小玲, 肖胜军, 容明智, 等. 狗肝菜多糖减轻 D-氨基半乳糖与脂多糖诱导的大鼠急性肝损伤[J]. 中国药理学杂志, 2010, 26(5): 952-955.
- [9] 方敏, 占才贵, 宫智勇. 玉米须总黄酮的提取与抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 206-208.
- [10] 冯小映, 周诚, 黄恩, 等. 狗肝菜多糖含量的测定[J]. 中药材, 2003, 26(9): 643-644.
- [11] 陈平, 陈新, 王珏, 等. 硫酸-萘酚法测定鄂产竹节参多糖含量[J]. 中国医药学杂志, 2007, 27(12): 1654-1656.
- [12] 薛自萍, 曹建康, 姜微波. 枣果皮中酚类物质提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 农业工程学报, 2009, 25(增刊 1): 153-158.
- [13] AMAROWICZ R, NACZK M, SHAHIDI F. Antioxidant activity of various fractions of non-tanin phenolics of canola hulls[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2755-2759.
- [14] 文良娟, 毛慧君, 张元春, 等. 西番莲果皮成分分析及其抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 54-58.
- [15] 罗建平, 徐学玲, 潘利华, 等. 菠萝皮渣多糖的提取与体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 172-175.