

不同产地延龄草抗氧化活性测定

付洪冰

(西安文理学院 陕西 西安 710065)

摘要:采用清除 DPPH 自由基的测定方法评价延龄草的抗氧化活性, DPPH 自由基体系测定波长为 514 nm, 体系稳定时间为 30 min。结果表明, 在此反应中, 体系色彩变得越浅, 说明所检测物质的抗氧化能力越强, 用清除率来表示抗氧化能力, 清除率越大, 抗氧化性越强, IC_{50} 值越小, 清除能力越强, 由此三项指标可评价试验样品的抗氧化能力。其中测得西藏延龄草苷的 $IC_{50} = 0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 四川延龄草苷的 $IC_{50} = 0.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 湖北神农架延龄草苷的 $IC_{50} = 0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 清除能力由强到弱依次为四川延龄草苷 > 西藏延龄草苷 > 湖北神农架延龄草苷。综上所述, 延龄草具有较强的抗氧化活性。

关键词:延龄草; 抗氧化活性; DPPH

延龄草属百合科延龄草属植物, 主要分布在北美和东亚一带, 全世界约 50 个种, 我国有 3 个种, 即西藏延龄草 (*Trillium govonianum* wall. ex Royle)、吉林延龄草 (*Trillium kamtschicum* Pall.) 和延龄草 (*Trillium tschonoskii* Maxim), 主要分布于西藏、云南、四川、陕西、吉林、湖北等地海拔 1 000~3 200 m 林下。该类植物属国家 III 级重点保护野生植物, 是珍稀濒危物^[1]。目前, 对延龄草的药理活性研究主要集中在其抗炎、抗氧化和免疫调节等方面。黄丽亚等^[2]研究发现, 延龄草具有增强抗氧化酶表达作用; 肖本见等^[3]研究发现, 延龄草根茎醇提取物具有抗炎和增强免疫的作用; Ono 等^[4]研究了吉林延龄草中某些单体化合物消除氧自由基 DPPH 活性, 发现它们均有很强的消除 DPPH 的作用, 其中有些化合物可以与维生素 E 相媲美。

试验以三种不同产地的延龄草为研究对象, 采用 DPPH 测定法研究延龄草的抗氧化活性, 目的在于了解不同地区生态环境条件下延龄草中延龄草苷含量的分布情况及抗氧化能力, 从而为改善延龄草的生态环境条件, 促进延龄草苷含量的提高, 满足药物生产的需要打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

延龄草(四川产地、西藏产地、湖北神农架产地)。

1.2 试验方法

1.2.1 延龄草苷含量测定 采用醇溶剂提取法

提取延龄草总皂苷。

标准曲线绘制^[5]: 精密称取延龄草苷标准品 10 mg, 加 100 mL 无水乙醇配制 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液。配制标准品浓度梯度 ($0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 各 10 mL, 使用 UV-2450 紫外分光光度计以无水乙醇为空白对照, 在 286 nm 波长测定吸光度, 以浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与吸光度 (A) 绘制标准曲线, 求其线性回归方程。

精密称取样品适量, 加无水乙醇 100 mL 配制, 在 286nm 波长处测定吸光度。计算样品中延龄草苷含量。

1.2.2 抗氧化活性测定 (DPPH 法) 称取 19.7 mg DPPH 溶于无水乙醇中定容至 500 mL 制成工作液 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。配制浓度为 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0$ 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的不同浓度样品各 10 mL, 取 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 3 mL 于试管中, 再分别加入不同浓度样品 3 mL, 震荡混匀, 避光, 室温反应 30 min, 以 VC 作为阳性对照组。于紫外分光光度计测定吸光度, 每个浓度做 3 个平行实验。

DPPH 自由基的清除率 y ^[6,7] ($y = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\%$, A_0 为未加样的 DPPH 溶液的吸光度, A_1 为样品与 DPPH 反应液的吸光度)

以样品的浓度对自由基清除率作图并线性拟合, 计算半数抑制率 IC_{50} 值, 其中 IC_{50} 值定义为清除率为 50% 时延龄草苷的浓度。其中 IC_{50} 值越低则其抗氧化活性越高, 增加系数越大, 表示其增加速度越快, R^2 表示其相关性, 越接近 1, 表示其

收稿日期: 2017-02-10 修回日期: 2017-10-20

基金项目: 西安市科技计划项目 CXY1352WL15。

作者简介: 付洪冰 (1979-), 男, 黑龙江兰西人, 讲师, 博士, 蔬菜抗病育种。

相关性越好。

2 结果与分析

2.1 延龄草苷标准曲线绘制

由图 1 可以看出,延龄草在 0.01~0.05 mg·mL⁻¹范围内呈良好线性关系,其回归方程为: $y=0.0970x+0.0575$, $R^2=0.9988$,其中 y 为吸光度,x 为延龄草苷浓度。

图 1 延龄草苷标准曲线

2.2 样品含量测定

表 1 不同产地延龄草苷含量测定

产地	取样量/g	吸光度/A	含量/%
四川	0.1042	0.5949	5.54
西藏	0.1172	0.6189	5.79
湖北神农架	0.1030	0.4971	4.53

由表 1 结果表明,提取的三个延龄草总皂苷中延龄草苷含量在 5%左右,含量较低,西藏延龄草苷含量(5.79%)>四川延龄草苷含量(5.54%)>湖北神农架延龄草苷含量(4.53%)。

DPPH 的乙醇溶液呈深紫色^[8]。对 DPPH 溶液进行 UV-2450 光谱扫描,由图 2 可知,DPPH 溶液在 327 nm 和 514 nm 的吸光度都具有极大值,分别为 1.67 和 0.876。加入同一浓度产地湖北神农架的延龄草总皂苷后在 327 nm 和 514 nm 处的吸光度分别为 1.5789 和 0.0701,由此可见,在吸收波长 514 nm 处的吸光值下降幅度最大即其清除效果最明显,故选用 514 nm 表示 DPPH 含量的变化可提高测定灵敏度。

图 2 1 mmol·mL⁻¹ DPPH 溶液的紫外吸收光谱

表 2 样品不同浓度清除率(平均值±标准误差)

产地 浓度	西藏	神农架	四川	VC
0.5	72.267±1.662	68.033±0.153	73.567±1.332	96.833±0.208
1.0	81.667±0.513	79.3±0.173	84.3±3.041	97.1±0.1
1.5	88.033±0.666	86.167±0.569	87.633±0.737	97.2
2.0	91.467±0.153	89.833±1.415	91.233±0.058	97.4±0.2
2.5	91.6±0.1	92.033±0.058	92.033±0.153	97.667±0.058

龄草苷的增加速率最快,其次是西藏延龄草苷,最后是四川延龄草苷。就各地提取物的清除率与浓度的线性相关来说,湖北神农架延龄草苷的相关性最好。IC₅₀值越小,清除能力越强,根据评价抗氧化的清除能力的 IC₅₀值来判断,清除能力由强到弱依次为四川延龄草苷>西藏延龄草苷>湖北神农架延龄草苷。

3 讨论

试验研究了三个产地的延龄草所提取的总皂苷对 DPPH 自由基的清除能力,用紫外分光光度计测得延龄草总皂苷清除 DPPH 自由基的测定波长为 514 nm,体系稳定时间为 30 min。

从不同产地的延龄草中提取延龄草总皂苷,进而通过比对研究发现,不同产地的延龄草苷在抗氧化能力和清除自由基活性上有明显差异,其

(下转第 52 页)

图 3 不同浓度下不同产地延龄草苷和 VC 的清除作用

由表 2、图 3 可知,随着样品浓度增加,清除率越大,清除能力越强,在浓度 0.5~2.5 mg·mL⁻¹范围内,清除率就超出 50%。就清除能力而言,在同一浓度时,VC(抗坏血酸)的清除能力最高,其次为四川延龄草苷,之后为西藏延龄草苷,最后是湖北神农架延龄草苷。

由表 3 可知,就增加系数来看,湖北神农架延