

佛手花抗氧化活性研究

杨新周,郝志云,杨子仙,朱以常,董毅,林惠昆

(德宏师范高等专科学校 理工系,云南 德宏 678400)

摘要:为进一步综合利用佛手花,该研究测定了其对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力,并与对照槲皮素、山奈酚、咖啡酸、芦丁、没食子酸和对香豆酸进行比较。结果表明:各物质清除 DPPH 自由基的能力为:对香豆酸<佛手花提取物<香草酸<芦丁<咖啡酸<没食子酸。清除羟自由基的能力为:芦丁<咖啡酸<佛手花提取物<山奈酚<槲皮素。说明佛手花提取物具有很好的抗氧化活性,是一种良好的天然抗氧化剂。

关键词:佛手花;抗氧化活性;自由基;清除能力

中图分类号:S666.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)02-0072-03

佛手 [*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot) Swingle] 又名佛手柑,为芸香科柑橘属香橼的变种^[1]。在我国主要分布于福建、广东、浙江、四川和云南等地^[2]。佛手是传统的名贵中药,其花、叶和果实均可入药,且药食两用,具有和胃止痛、舒肝理气的功效^[3]。该文对佛手花乙醇提取物进行定量分析,以评价其抗氧化物质的抗氧化能力。通过对佛手花乙醇提取物进行清除 DPPH 自由基和羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力的测定,旨在为佛手花的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为佛手花,购自云南省腾冲县。供试仪器和设备为 V-1100 型可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、SK2200H 型超声波仪、AR224CN 型电子天平、HH-S24S 型数字显示恒温水浴锅(上海君竺仪器制造有限公司)、ZK 82J 型电热真空干燥箱和 EYELA N-1100 型旋转蒸发仪。供试试剂为 DPPH(国药集团化学试剂有限公司,纯度>99.0%)、槲皮素、山奈酚、咖啡酸、芦丁、没食子酸、香豆酸及香草酸标准品(国药集团浙江华东医药有限公司,纯度>98%)、番红花红、EDTA- Fe^{2+} (现配现用)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、双氧水(现配现用)和乙醇等试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 DPPH 储备液的制备 准确称取 10 mg DPPH,用无水乙醇溶解定容至 100 mL,制得 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 储备溶液。然后用无水乙醇稀释成浓度为 $0.024 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。

1.2.2 佛手花提取物的制备 将佛手花烘干,粉碎过筛,准确称取 2.000 0 g 样品于 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 乙醇溶液,封口,超声提取 3 次,每次 45 min,合并 3 次滤液于旋转蒸发器中浓缩,转移到 25 mL 容量瓶中,乙醇定容,备用。

1.2.3 清除 DPPH 自由基能力的测定 准确移取 4.5 mL DPPH 标准溶液,依次加入一定体积的提取物制备液于 10 mL 比色管中,定容至 5 mL,置于暗处 30 min,在波长 517 nm 下测定空白 DPPH 的吸光度值($A_{\text{空白}}$)及加入提取物后 DPPH 的吸光度值($A_{\text{样品}}$),按公式计算自由基清除率^[4]。

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = [A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}] / A_{\text{空白}} \times 100$$

1.2.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性测定 (1)准确移取 1.00 mL PBS 于 10 mL 比色管中,加入 3.5 mL 的蒸馏水,37℃ 水浴 30 min,室温下冷却,调零。(2)对照组:依次加入 1.00 mL PBS、1.50 mL $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 番红花红、1.00 mL EDTA- $\text{Fe}(\text{II})$ 、1.00 mL 蒸馏水于 10 mL 比色管中,37℃ 水浴 30 min,室温下冷却,测定吸光度 $A(\lambda = 520 \text{ nm})$, $V_{\text{总}} = 4.50 \text{ mL}$ 。(3)空白组:依次加入 1.00 mL PBS、1.50 mL $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 番红花红、1.00 mL EDTA- $\text{Fe}(\text{II})$ 和 1.00 mL 3% H_2O_2 于 10 mL 比色管中,37℃ 水浴 30 min,室温下冷却,

收稿日期:2013-09-25

基金项目:校级科学研究课题资助项目(DSK201303)

第一作者简介:杨新周(1986-),男,云南省腾冲县人,硕士,助教,从事分析化学研究。E-mail:yxz1149@126.com。

测定吸光度 A_0 ($\lambda = 520 \text{ nm}$), $V_{\text{总}} = 4.50 \text{ mL}$ 。
(4)样品组:依次加入 1.00 mL PBS 、 $1.50 \text{ mL } 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$ 番红花红、 $1.00 \text{ mL EDTA-Fe(II)}$ 、 $10.0 \mu\text{L}$ 不同浓度的样品溶液以及 $1.00 \text{ mL } 3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 于 10 mL 比色管中, 37°C 水浴 30 min , 室温下冷却, 测定吸光度 A_s ($\lambda = 520 \text{ nm}$), $V_{\text{总}} = 4.50 \text{ mL}$ [5]。

羟自由基清除率(%) = $[A_s - A_0] / [A - A_0] \times 100$

2 结果与分析

2.1 佛手花提取物对 DPPH 自由基清除率的影响

从图 1 可以看出,随着佛手花乙醇提取物浓度的增加,其对 DPPH 自由基清除率增大,当样品浓度达到 $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,清除率增加缓慢且呈平稳趋势。佛手花总固形物浓度为 $0.08 \sim 1.28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,通过测定佛手花乙醇提取物、

没食子酸、咖啡酸、香草酸、芦丁和对香豆酸清除 DPPH·自由基活性,得出对应的线性方程及各物质的 IC_{50} (见表 1)。从表 1 可以看出,各物质清除 DPPH 自由基活性的能力顺序为:对香豆酸<佛手花提取物<香草酸<芦丁<咖啡酸<没食子酸。

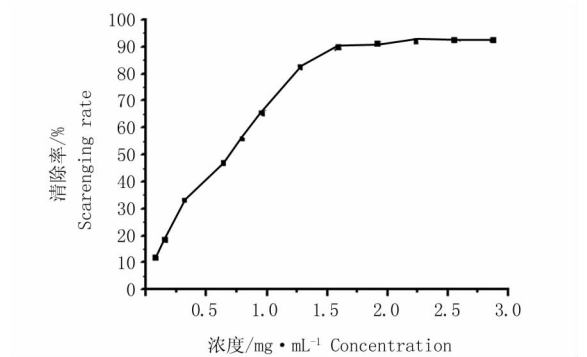


图 1 佛手花提取物对 DPPH 自由基清除力的影响
Fig. 1 The effect of extract from flower of *Citrus medica* on scavenging activities of DPPH free radical

表 1 佛手花乙醇提取物与各标准品清除 DPPH 自由基活性的比较

Table 1 The comparison of scavenging activities of DPPH free radical between extract from flower of <i>Citrus medica</i> and standard substance			
样品 Samples	回归方程 Regression equation	r^2	$\text{IC}_{50} / \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
佛手花 Flower of <i>Citrus medica</i>	$Y = 57.27X + 10.016$	0.9919	0.67
没食子酸 Gallic acid	$Y = 49340X + 4.5849$	0.9775	0.00092
咖啡酸 Caffeic acid	$Y = 15246X - 1.0143$	0.9933	0.0033
香草酸 Vanillic acid	$Y = 74.736X + 9.116$	0.9282	0.5471
芦丁 Rutin	$Y = 8238X + 14.592$	0.9457	0.0043
对香豆酸 P-coumaric acid	$Y = 17.437X + 10.388$	0.9565	2.27

2.2 佛手花提取物对羟自由基清除率的影响

由图 2 可知,羟自由基清除率随着样品浓度的增加而增大。根据所测定清除率与佛手花乙醇提取物总固形物浓度、槲皮素、芦丁、咖啡酸、山奈酚浓度的关系,得出清除率及佛手花乙醇提取物浓度、槲皮素、芦丁、咖啡酸、山奈酚浓度的线性方程(见表 2)。从表 2 中可知,佛手花提取物、槲皮素、芦丁、咖啡酸、山奈酚清除羟自由基活性能力顺序为:芦丁<咖啡酸<佛手花提取物<山奈酚<槲皮素。

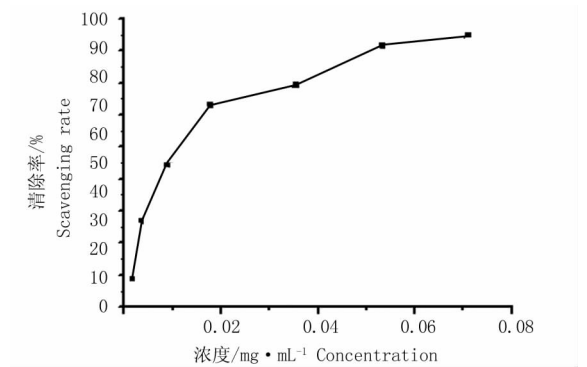


图 2 佛手花提取物对羟自由基清除率的影响
Fig. 2 The effect of extract from flower of *Citrus medica* on scavenging activities of hydroxyl radical

表 2 佛手花提取物与各标准品对清除羟自由基活性的比较
Table 2 The comparison of scavenging activities of hydroxyl radical between
extract from flower of *Citrus medica* and standard substance

样品 Samples	回归方程 Regression equation	r^2	$IC_{50}/mg \cdot mL^{-1}$
佛手花 Flower of <i>Citrus medica</i>	$Y=3106.9X+20.79$	0.9226	0.0094
槲皮素 Quercetin	$Y=6694.5X+31.077$	0.9947	0.003
咖啡酸 Caffeic acid	$Y=1252.3X+27.674$	0.9906	0.018
山奈酚 Kaempferol	$Y=7735.3X+7.982$	0.9998	0.005
芦丁 Rutin	$Y=1996.5X+3.0273$	0.995	0.023

3 结论

佛手花乙醇提取物对 DPPH 和 $\cdot OH$ 具有明显的清除作用,且随着佛手花乙醇提取物浓度的提高,其清除能力也相应地增强。且佛手花乙醇提取物清除 DPPH 能力优于对香豆酸。清除羟自由基活性能力优于芦丁和咖啡酸。这一结果为开发抗氧化剂提供了一个新的来源,从而得出佛手花是一种有开发价值的天然抗氧化剂。

参考文献:

[1] 《江苏新医学院》中药大辞典编写组. 中药大辞典(上册)[M].

上海:上海科技出版社,1995:1141.

[2] 宋立人. 现代中药学大辞典(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1071.

[3] 常雯,李学刚,张化金,等. 佛手提取物及活性部位抑制血管紧张素转化酶活性的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(8):126-129.

[4] 穆怀雪,杨新周,姚福泉,等. 不同提取方法对五味子清除 DPPH 自由基作用的影响研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1454-1455.

[5] 刘琼,李乔丽,放茂良,等. 傣族药竹叶兰不同极性部位提取物的抗氧化性研究[J]. 中国农学通报,2011,27(14):77-81.

Study on Antioxidative Activities of Flower of *Citrus medica*

YANG Xin-zhou, HAO Zhi-yun, YANG Zi-xian, ZHU Yi-chang, DONG Yi, LIN Hui-kun

(Science and Engineering Department of Dehong Teachers College, Dehong, Yunnan 678400)

Abstract: In order to further comprehensive utilization of flower of *Citrus medica*, the scavenging activities of DPPH free radical and hydroxyl radical were determined, and they were compared with quercetin, kaempferol, caffeic acid, rutin, gallic acid and p-coumaric acid. The results showed that the scavenging activities of DPPH free radical was p-coumaric acid < extract from flower of *Citrus medica* < vanillic acid < rutin < caffeic acid < gallic acid, the scavenging activities of hydroxyl radical was rutin < caffeic acid < extract from flower of *Citrus medica* < kaempferol < quercetin. It indicated that extract from flower of *Citrus medica* had good antioxidant activity and could be a good natural antioxidant.

Key words: flower of *Citrus medica*; antioxidant activities; scavenging activities

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部