

# 蛇莓总多酚体外抗氧化活性研究

苟体忠<sup>1,2</sup>, 唐文华<sup>1,2</sup>, 徐绍琴<sup>3</sup>, 孙大方<sup>1</sup>

(1. 凯里学院 化学与材料工程学院, 贵州 凯里 556011; 2. 凯里学院 应用化学研究所, 贵州 凯里 556011; 3. 凯里学院 继续教育学院, 贵州 凯里 556011)

**摘要:** 为了促进蛇莓的综合利用, 采用总抗氧化能力、 $\cdot\text{OH}$ 清除率和 DPPH $\cdot$ 清除率来考察蛇莓总多酚的体外抗氧化活性。结果表明: 蛇莓总多酚总抗氧化能力高于 VC, 且蛇莓总多酚的 $\cdot\text{OH}$ 清除率远高于 VC。此外, 蛇莓总多酚对 DPPH $\cdot$ 的  $\text{IC}_{50}$  ( $18.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与 VC ( $\text{IC}_{50} = 17.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 相近。蛇莓总多酚是天然的抗氧化活性剂和自由基清除剂。

**关键词:** 蛇莓; 总多酚; 抗氧化活性

**中图分类号:** R284

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-2767(2014)09-0094-03

蛇莓 (*Duchesnea indica* Focke) 为蔷薇科植物, 又名三叶莓、龙吐珠、蛇泡草和野杨梅等, 具有有清热解毒、凉血、消肿之功效<sup>[1]</sup>。蛇莓主要分布于贵州、云南、四川、广西、湖南和湖北等地。目前蛇莓主要用于治疗肝癌、舌管癌、胃癌等多种癌症。蛇莓中含有黄酮苷类<sup>[2]</sup>、三萜类<sup>[3]</sup>等活性成分, 其水提物对人体肝癌、胃癌、食管癌<sup>[4]</sup>、艾氏腹水癌<sup>[5]</sup>以及不同菌种<sup>[6]</sup>有明显的抑制作用。但蛇莓总多酚抗氧化活性的研究尚未见报道。因此, 该文分析了蛇莓总多酚的抗氧化活性, 从而为蛇莓的综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 蛇莓于 2013 年 11 月采自凯里市雷公山, 经凯里学院植物学博士鉴定为蔷薇科植物蛇莓 (*Duchesnea indica* Focke) 的全草。

1.1.2 药剂 三氯乙酸、没食子酸、1,1-二苯-2-苦基肼自由基 (DPPH 自由基)、Folin & Ciocalteu's 酚试剂为 Aladdin 试剂。其它试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备 紫外分光光度计 (UV-2550, 岛津)、植物粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司)、水浴振荡器 (SHA-C 型, 巩义予华仪器有限公司)、超声波 (WH-300, 济宁万和超声设备有限公司)、低速离心机 (TD5M, 长沙湘智离心

机仪器有限公司); 电子天平 (上海衡平仪器仪表厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 样品处理与总多酚的提取 将蛇莓样品于 80℃ 烘箱中干燥, 再用植物粉碎机粉碎并过 80 目筛, 待用。分别称取约 2 g 上述样品于 6 个 50 mL 离心管中, 分别用石油醚、正丁醇、乙醇、乙酸乙酯、甲醇和水提取, 经正交试验确定最佳萃取条件为: 料液比为 1:20, 超声间歇提取 2 次, 每次 30 min, 功率 100%, 离心, 取上层清液合并, 再置于 50 mL 容量瓶中并用相应试剂定容至刻度, 摇匀, 待测。

1.2.2 总多酚测定 总多酚含量的测定参照文献<sup>[7]</sup>并稍作修改。其简要流程为: 准确称取 0.125 g 没食子酸, 用超纯水定容至 1 000 mL。分别吸取该标准溶液 0、1、2、3、4 和 5 mL 于 6 个 25 mL 比色管中, (I) 先加超纯水至 10 mL, 摇匀, 再加入 Folin-Ciocalteu 酚试剂 1.0 mL, 混匀, 然后加入 6.0 mL 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 并用超纯水定溶至刻度, 摇匀。然后在暗室中放置 2 h, 并于 760 nm 波长下测定其吸光度。以没食子酸浓度 (C) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为:  $A = 0.0838C + 0.0067$  ( $r = 0.9999$ )。取蛇莓提取液 0.2 mL 于 25 mL 比色管中, 按步骤 (I) 测定其吸光度, 再根据回归方程计算蛇莓提取液总多酚的浓度, 并以此计算样品多酚含量, 以每克样品中没食子酸当量表示 ( $\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ )。

1.2.3 醇提物总抗氧化能力测定 总抗氧化能力的测定方法参照文献<sup>[8]</sup>, 其简要流程为: 取 1 mL 不同浓度提取液, 并依次加入 2.5 mL 的  $\text{pH} = 6.6$  的磷酸盐缓冲液和 1% 铁氰化钾 ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 溶液, 摇匀并置于 50℃ 水浴振荡器中 20 min。然后加入 2.5 mL 10% (m/v) 三氯乙酸溶液, 摇匀并取混液 2.5 mL, 再加入 2.5 mL 超纯水以及 0.1% (m/v) 氯化铁溶液, 摇匀并静置 10 min, 在 700 nm 处测定吸光度 ( $A_s$ ), 以超纯水

收稿日期: 2014-04-08

**基金项目:** 国家青年自然科学基金资助项目 (41303016); 贵州省科技厅自然科学基金资助项目 (黔科合 J 字 [2011] 2079 号); 凯里学院博士专项基金资助项目 (BS201003); 贵州省高校优秀科技创新人才计划资助项目 (黔教合 KY 字 [2012] 099 号); 贵州省教育厅“高层次人才引进项目”资助项目 (院科通 [2012] 7 号); 凯里学院重点资助项目 (Z1202); 贵州省特色重点学科资助项目 (黔教高发 [2011] 208 号); 凯里学院重点学科资助项目 (院通字 [2010] 86 号)

**第一作者简介:** 苟体忠 (1981-), 男, 贵州省遵义市人, 博士, 副教授, 从事天然药物化学研究。E-mail: gtz810110@126.com。

代替提取液作为空白并测定其吸光度  $A_c$ 。则总抗氧化能力用  $\Delta A$  来表示( $\Delta A = A_s - A_c$ ),其值越大,表示提取液抗氧化能力越强。

1.2.4  $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定  $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定方法参照文献[8],其简要流程为:在 25 mL 比色管中依次加入 4 mL pH=7.4 磷酸钠缓冲液以及 1.5 mL  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻二氮菲溶液、1 mL  $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$  溶液、1.5 mL 双蒸水,摇匀,再加入 1 mL 不同浓度的提取液,立即摇匀。最后加入 1.0 mL 1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,摇匀并置于  $37^\circ\text{C}$  恒温水浴中恒温 60 min,再于 536 nm 处测定其吸光度。根据下式计算样品对  $\text{OH}\cdot$ 清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_1 - A_2) / (A_0 - A_2)] \times 100$$

式中: $A_1$ 为加入提取液及  $\text{H}_2\text{O}_2$  时测得的吸光度; $A_2$ 为加  $\text{H}_2\text{O}_2$  而不加提取液时测得的吸光度; $A_0$ 为不加提取液及  $\text{H}_2\text{O}_2$  时测得的吸光度。

1.2.5 DPPH $\cdot$ 清除率测定 DPPH $\cdot$ 清除率的测定方法参照文献[9],其简要流程为:在 25 mL 比色管中依次加入 2 mL  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DPPH $\cdot$ 溶液和 2 mL 不同浓度提取液,摇匀,并在暗室中放置 30 min,以无水乙醇为参比液,在 517 nm 下测定其吸光值  $A_s$ ,同时测定 2 mL  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DPPH $\cdot$ 溶液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光值  $A_c$ 。计算样品溶液对 DPPH $\cdot$ 的清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{的清除率}(\%) = (1 - A_s / A_c) \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 蛇莓不同极性试剂提取液对 DPPH $\cdot$ 的清除能力

从图1可见,不同极性试剂提取液对 DPPH $\cdot$ 的清除能力大小顺序为:乙醇>甲醇>水>乙酸乙酯>正丁醇>石油醚。由此可知,乙醇提取液具有较高的清除 DPPH $\cdot$ 的能力。因此,以下试验均以乙醇提取液为考察对象。

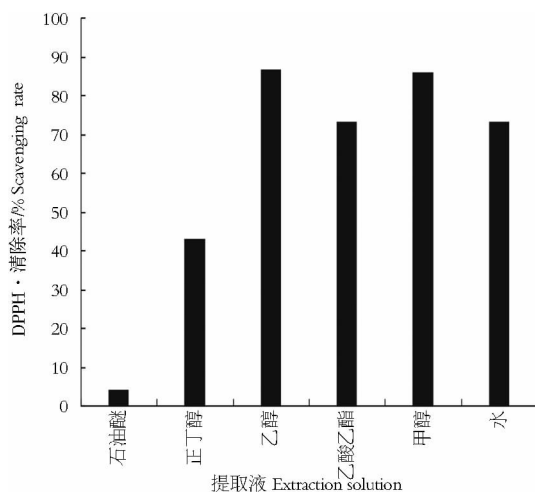


图1 不同提取液的 DPPH $\cdot$ 清除率比较  
Fig. 1 Comparison on DPPH $\cdot$  scavenging rate of different extraction solution

### 2.2 蛇莓总多酚含量

按 1.2.2 的方法得到蛇莓总多酚含量为  $3.7 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 2.3 蛇莓总多酚和 VC 的总抗氧化能力

从图 2 可见,随着浓度的增加蛇莓总多酚和 VC 总抗氧化能力也逐渐增加,且蛇莓总多酚总抗氧化能力高于 VC,其具有较强的抗氧化能力。经相关分析表明,蛇莓总多酚和 VC 之间均存在明显的正相关关系(其相关系数分别为 0.979 3 和 0.987 1),分析认为,蛇莓醇提物的抗氧化能力主要是由多酚成分决定的。

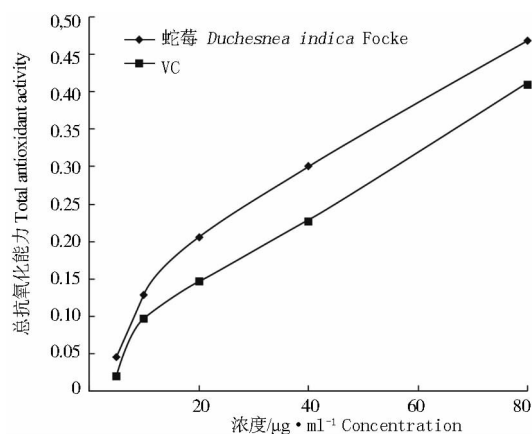


图2 蛇莓总多酚、VC 浓度对总抗氧能力比较  
Fig. 2 Comparison on total antioxidant activity of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke and VC

### 2.4 蛇莓总多酚和 VC 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率

由图3可见,随着浓度的增加,蛇莓总多酚清除  $\cdot\text{OH}$  效率明显增加。然而,VC 对  $\cdot\text{OH}$  的清除效率影响较小,且明显低于蛇莓多酚对  $\cdot\text{OH}$  的清除效率。经相关分析表明,蛇莓总多酚浓度与  $\cdot\text{OH}$  的清除率之间存在显著正相关关系( $r = 0.991 4$ ),而 VC 与  $\cdot\text{OH}$  的清除率之间存在一定的正相关关系( $r = 0.793 1$ )。分析认为,蛇莓总

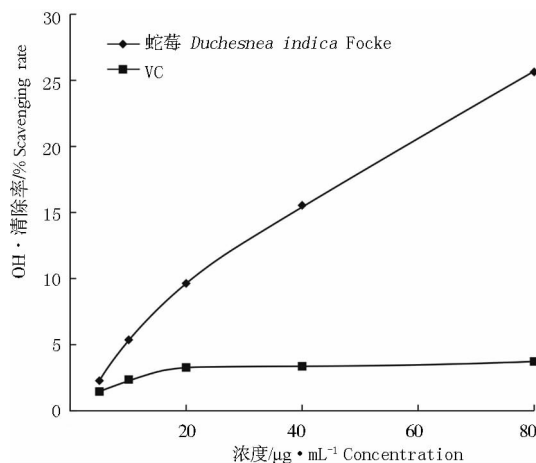


图3 蛇莓总多酚、VC 浓度对  $\cdot\text{OH}$  的清除率比较  
Fig. 3 Comparison on  $\cdot\text{OH}$  scavenging rate of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke and VC

多酚具有明显的清除 $\cdot\text{OH}$ 活性。

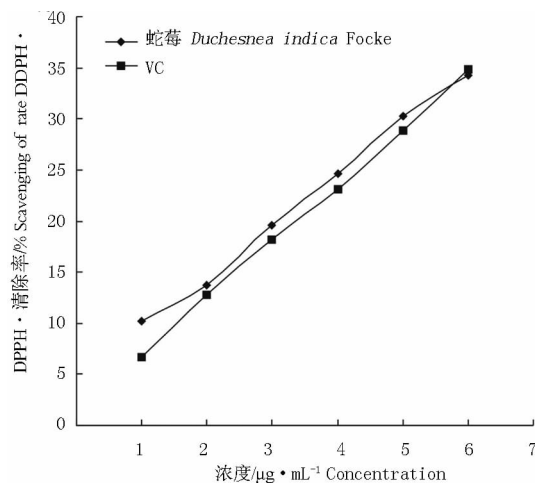


图4 蛇莓总多酚、VC浓度对DPPH·的清除率比较

Fig. 4 Comparison on DPPH·scavenging rate of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke and VC

## 2.5 蛇莓总多酚和VC对DPPH·的清除率

由图4可见,随着蛇莓总多酚和VC浓度的增加,其清除DPPH·的活性增加。经相关分析表明,蛇莓总多酚和VC与DPPH·的清除率之间均存在明显的正相关关系(相关系数分别为0.998 0和0.999 5)。分析认为,蛇莓醇提物清除DPPH·的活性主要是由多酚成分决定的。

以蛇莓总多酚和VC浓度对DPPH·的清除率作回归分析。蛇莓总多酚对DPPH·的清除率的回归方程为: $Y = 2.4993X + 4.6159$  ( $r = 0.9980$ )。VC对DPPH·的清除率的回归方程为 $Y = 2.7698X + 1.3694$  ( $r = 0.9989$ )。当DPPH·的清除率为50%时,对应蛇莓总多酚和VC的浓度即为 $\text{IC}_{50}$ 。经计算蛇莓总多酚和VC的 $\text{IC}_{50}$ 分别为18.2和17.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,结果表明,蛇莓总多酚具有一定的清除DPPH·的活性。

## 3 结论与讨论

国外学者研究也表明,含有高水平总多酚的植

物表现出很好的体外抗氧化活性<sup>[10]</sup>。该研究结果表明,蛇莓乙醇提取液具有一定的清除DPPH·的能力,且其总多酚含量达3.7 mg GAE·g<sup>-1</sup>。蛇莓总多酚总抗氧化能力高于VC,具有较强的还原能力。蛇莓总多酚对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效率明显高于VC,是清除 $\cdot\text{OH}$ 的良好活性剂。蛇莓总多酚对DPPH·的 $\text{IC}_{50}$ (18.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )与VC相近(17.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),表明蛇莓总多酚具有较好的抗氧化活性,是天然的抗氧化活性剂。

综上所述,蛇莓总多酚具有较强的抗氧化活性和清除自由基的能力。然而,在蛇莓总多酚中决定其抗氧化活性或清除自由基的主要活性成分尚未可知,仍需对其总多酚提取物进行进一步分离、提纯,再对分离后的成分进行抗氧化活性实验,并对其进行对比分析,以期筛选出抗氧化活性能力最强的活性成分,以便为蛇莓的综合开发利用提供重要参考。

## 参考文献:

- [1] 许文东,林厚文,邱峰,等.蛇莓的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2007,24(7):402-405.
- [2] 许文东,林厚文,邱峰,等.蛇莓黄酮苷类化学成分研究[J].中国药理学杂志,2007,42(13):981-982.
- [3] 吴培楠,段宏泉,姚智,等.蛇莓中具有抗癌活性的三萜类成分[J].中草药,2007,38(9):1311-1313.
- [4] 段泾云,刘小平,李秦.蛇莓抗肿瘤作用研究[J].中药药理与临床,1998,14(3):28.
- [5] 彭江南,陆蕴如,陈德昌.蛇莓化学成分的研究[J].中草药,1995,26(7):339-341.
- [6] 林居纯,黄玲,刘丹,等.蛇莓水提物的体外抗菌活性及抗菌机制[J].中国兽医科学,2013,43(6):645-649.
- [7] 焦士蓉,马力,黄承钰,等.枳实提取物的体外抗氧化作用研究[J].中药材,2008,31(1):113-116.
- [8] 赵艳红,李建科,赵维,等.常见药食植物提取物体外抗氧化活性的评价[J].食品科学,2009,30(3):104-108.
- [9] Gülcin I, Elmastas M, Aboul-Enein H Y. Antioxidant activity of clove oil—A powerful antioxidant source[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2012, 5:489-499.
- [10] Shukla S, Mehta A, Bajpai V K. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. [J]. Experimental and Toxicological Pathology, 2012, 64:807-811.

## Study on Antioxidant Activity *in vitro* of Total Polyphenol from *Duchesnea indica* Focke

GOU Ti-zhong<sup>1,2</sup>, TANG Wen-hua<sup>1,2</sup>, XU Shao-qin<sup>3</sup>, SUN Da-fang<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Materials Engineering, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011; 2. Institute of Applied Chemistry, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011; 3. College of Continuing Education, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011)

**Abstract:** In order to promote the comprehensive utilization of *Duchesnea indica* Focke, the antioxidant activity *in vitro* of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke was evaluated by total antioxidant activity, hydroxyl and DPPH free radical scavenging activity. The results showed that the total antioxidant activity of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke was slightly higher than VC, and the hydroxyl free radical scavenging activity of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke was much higher than VC. In addition, the half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) for DPPH free radicals of total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke and VC was similar, which was 18.2 and 17.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Total polyphenol from *Duchesnea indica* Focke is natural antioxidant and free radical scavenger.

**Key words:** *Duchesnea indica* Focke; total polyphenol; antioxidant activity