

· 基础研究 ·

牛大力根油脂抗氧化活性研究[△]弓宝¹, 陈德力¹, 刘洋洋¹, 方草², 王德立¹, 杨新全^{1*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 海南分所, 海南 万宁 571533;

2. 海南省农垦总医院, 海南 海口 570311)

[摘要] 目的: 研究牛大力根油脂抗氧化活性。方法: 将牛大力根干燥粉末用 70% 乙醇浸提, 结合硅胶柱层析分离, 获得牛大力根油脂提取物 F-1 和 F-2, 同时采用加热回流法提取获得牛大力根油脂提取物 F-3, 并以 DPPH 法和 FRAP 法对各油脂提取物的抗氧化活性进行评价。结果: 在 DPPH 法中, F-1、F-2 及 F-3 的半数最高抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 203.18、138.38、244.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 FRAP 值分别为 (7 712.2 $\pm$ 274.7)、(10 387.5 $\pm$ 280.5)、(4 584.1 $\pm$ 182.3) $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ 。抗坏血酸 (Vc) 和 BHT 的 IC₅₀ 值分别为 11.59、53.69 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, FRAP 值分别为 (17 356.1 $\pm$ 622.9)、(13 235.4 $\pm$ 469.5) $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 牛大力根油脂具有一定的抗氧化活性, 且以 F-2 最强。

[关键词] 牛大力; 油脂; 抗氧化Antioxidant Activity of Lipids from *Millettia speciosa* RootGONG Bao¹, CHEN Deli¹, LIU Yangyang¹, FANG Cao², WANG Deli¹, YANG Xinquan^{1*}

(1. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences &

Peking Union Medical College, Wanning 571533, China;

2. Hainan Provincial Nong Ken Hospital, Haikou, 570311, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to investigate the antioxidant activities of lipids from the *Millettia speciosa* root. **Methods:** The lipophilic extracts F-1 and F-2 were isolated from the dry root of *M. speciosa* by 70% ethanol extraction method and silica column chromatography. Meanwhile, lipophilic extract F-3 was extracted by heat reflux. Whereafter the antioxidant activity of F-1, F-2 and F-3 extracts were investigated by means of DPPH and FRAP assay. **Results:** The results showed that the half inhibitory concentration (IC₅₀) of extracts of F-1, F-2 and F-3 were 203.18, 138.38 and 244.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, with DPPH method, and their FRAP values were (7 712.2 $\pm$ 274.7), (10 387.5 $\pm$ 280.5) and (4 584.1 $\pm$ 182.3) $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, as well. The IC₅₀ of ascorbic acid (Vc) and BHT were respectively 11.59 and 53.69 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and their FRAP values were (17 356.1 $\pm$ 622.9), (13 235.4 $\pm$ 469.5) $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The oil fractions are moderate to good in scavenging effect on DPPH radical and reducing power.

[Keywords] *Millettia speciosa*; lipids; antioxidant activity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.10.009

牛大力为豆科崖豆藤属植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ. 的根, 别名猪脚笠、山莲藕、大力薯、大力牛等^[1], 以根入药, 载于《陆川本草》, 全年可采。牛大力具有补虚润肺、强筋活络的功效, 可用于治疗腰肌劳损、风湿性关节炎、肺热、肺虚咳嗽、肺结核、慢性支气管炎和慢性肝炎、病后体

虚等病症^[2]。在广东、广西、海南等地还广泛用作煲汤原料, 可补腰肾、强筋骨, 为岭南地区著名的药食两用植物。

目前, 国内外学者对牛大力根及叶化学成分的研究表明, 牛大力中含有三萜皂苷、异黄酮、查尔酮、多糖、香豆素、生物碱等类成分, 具有抗氧化、

[△] [基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013HNB02); 海南省自然科学基金(20152019)

* [通信作者] 杨新全, 副研究员, 研究方向: 南药研究与开发; E-mail: yangxinquan@sina.com

增强免疫力、抗炎、抗肿瘤、祛痰平喘等活性,是一味具有多种药理作用 and 良好保健功效的南药^[3-6]。目前,未见牛大力根油脂抗氧化活性的研究报道。据此,本文对牛大力油脂的抗氧化活性进行了研究,为牛大力资源的综合开发利用提供科学依据,本项目组对牛大力根的脂溶性成分进行了提取与分离富集,并采用 DPPH 法和 FRAP 法对其进行体外抗氧化活性评价,为进一步研究和开发利用牛大力奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验用牛大力根,于 2013 年 10 月采自海南省五指山参毛阳镇,经中国医学科学院药用植物研究所海南分所冯锦东研究员鉴定为 *Millettia speciosa* Champ. 的根。采后晒干粉碎,放置干燥暗处贮存备用。

2, 2-二苯基-1-苦基苯肼 (DPPH, A Johnson Matthey Company), 2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT, 广州化学试剂厂, 分析纯), 2, 4, 6-三吡啶基三嗪 (TPTZ, Sigma), 抗坏血酸 (Vc)、无水醋酸钠、无水醋酸、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、盐酸 (广州化学试剂厂, AR), 石油醚、乙酸乙酯、乙醇、正丁醇、二甲基亚砷 (DMSO)、95% 乙醇均为分析纯。

1.2 仪器

xMARK 微孔板分光光度计 (美国 BIO-RAD 公司)、BT224S 电子天平 (德国 Sartorius 公司), 移液器 (20 μL 、200 μL , DRAGON-MED)。

2 方法

2.1 试样的制备

牛大力根干燥粉末 2.5 kg, 用 70% 乙醇水溶液 (10 L $\times$ 3) 室温提取 7 d, 减压浓缩至无醇味, 得浸膏 250 g。将所得浸膏分散于水中成悬浊液, 以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取, 减压浓缩得石油醚萃取物 10 g。取石油醚萃取物, 硅胶柱色谱 (200 ~ 300 目, 40 g) 干法上柱, 以石油醚-乙酸乙酯 (99:1) 梯度洗脱, 采用 TLC 检测合并相同馏分, 得到 12 个部位, 其中 F-1 (550 mg) 和 F-2 (1.472 8 g) 为脂溶性成分, 溶解于 DMSO, 过滤, 备用。

取 200 g 牛大力根干燥粉末, 置于 2 L 烧瓶中, 加入 1000 mL 石油醚, 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流萃取 4 h, 取

萃取液过滤, 减压浓缩, 得到脂溶性成分 F-3 (2.565 4 g), 溶解于 DMSO, 过滤, 备用。

精确称取 F-1、F-2 及 F-3 各 10 mg, 溶解于 10 mL DMSO 溶液中, 制成 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液试样, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用, 实验时配制成 500、450、400、350、300、250、200、150、100、50、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。

2.2 阳性对照品溶液的制备

准确称取 100 mg 抗坏血酸 (Vc), 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 即得 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗坏血酸的母液, 再稀释配制质量浓度分别为 40、30、20、10、5、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。

准确称取 100 mg BHT, 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL 容量瓶中, 即得 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BHT 的母液, 再稀释配制质量浓度分别为 100、80、60、40、20、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。

2.3 DPPH 自由基清除试验

参考文献^[7-8]的方法, 进行改进优化。在 96 孔板中按表 1 加样, 分别在 517 nm 处测定 A_0 、 A_i 、 A_j 在 30 min 后的吸光度, 每一个试样做 3 个平行样, 取平均值。按公式计算样品对自由基的清除率。并采用药物代谢动力学模型拟合, 计算不同样品在对 DPPH 清除率为 50% 时的浓度 (即 IC_{50}), 对不同溶剂提取的样品抗氧化能力进行评价, 即 IC_{50} 越小, 抗氧化能力越强。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 DPPH 加样参数

吸光值	加样参数
A_0	100 μL 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 + 100 μL DMSO
A_i	100 μL 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 + 100 μL 试样
A_j	100 μL 95% 乙醇 + 100 μL 试样

注: A_0 , DPPH 溶液反应前的吸光值; A_i , 样品与 DPPH 溶液反应后的吸光值; A_j , 空白对照的吸光值。

2.4 FRAP 试验

2.4.1 绘制标准曲线 吸取 2.5 mL 系列浓度为 25、100、150、200、400、500、800、1000、1500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸亚铁 (FeSO_4) 溶液, 与 2.5 mL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPTZ 溶液、25 mL 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH3.6) 混合, 再分别吸取该混合液 200 μL 加入 96 孔酶标板中, 放入 x-Mark 酶标仪内, 升温至 37 $^{\circ}\text{C}$, 于 593 nm 下读取吸光值。以 FeSO_4

溶液的浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线, 所有试验重复 3 次。

2.4.2 试样抗氧化活性测定 参照文献^[7,9-10]的方法, 即吸取 2.5 mL 20 mmol·L⁻¹ FeCl₃ 溶液, 与 2.5 mL 10 mmol·L⁻¹ TPTZ 溶液、25 mL 300 mmol·L⁻¹ 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH3.6) 混合, 再吸取该混合液 150 μL 加入 96 孔酶标板中, 放入 xMark 酶标仪内, 升温至 37℃, 于 593 nm 下读取反应前吸光值 A₁ (TPTZ 本身有颜色), 之后在孔中加入 50 μL 1 mg·mL⁻¹ 的待测抗氧化物质。30 min 后于 593 nm 处读取反应后吸光值 A₂。由 (A₂-A₁) 的值在标准曲线上获得抗氧化物质相应的 FeSO₄ 的浓度 (μmol·L⁻¹), 再转换成量纲为 μmol·g⁻¹, 定义为 FRAP 值。FRAP 值越大, 表明由抗氧化物质还原的 Fe²⁺ 越多, 即抗氧化物质的抗氧化活性越强。所有的试验重复 3 次。

2.5 数据分析

计算结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 绘图采用 Origin 8.0 软件, 相关性分析用 SAS 8.0 软件分析。

3 结果

3.1 清除 DPPH 自由基能力

DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其乙醇溶液呈深紫色, 具有单一电子, 在波长为 517nm 下具有最大吸光值, 有自由基清除剂存在时, DPPH 的单电子被捕捉而使其颜色变浅, 是有效评价抗氧化活性的体外模型之一。

以抗坏血酸及 BHT 为阳性对照组, 其与自由基反应 30 min 后的最终清除率对样品质量浓度作图, 采用药物代谢动力学函数拟合, 结果见图 1, 计算得 Vc 的 IC₅₀ = 11.59 μg·mL⁻¹ ($r = 0.994\ 4$); BHT 的 IC₅₀ = 53.69 μg·mL⁻¹ ($r = 0.995\ 5$), 具有很好的相关性。

以提取、分离纯化所得牛大力根油脂样品对 DPPH 的最终清除率与质量浓度作图, 采用药物代谢动力学函数模型进行拟合, 并计算其 IC₅₀ 值, 结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出, 牛大力根油脂 F-1 的 IC₅₀ 值为 203.18 μg·mL⁻¹ ($r = 0.998\ 8$), F-2 的 IC₅₀ 值为 138.38 μg·mL⁻¹ ($r = 0.996\ 4$), F-3 的 IC₅₀ 值为 244.10 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 6$)。比较可知, F-2 对自由基 DPPH 的清除效果较好, 其次分别为 F-1、F-3。

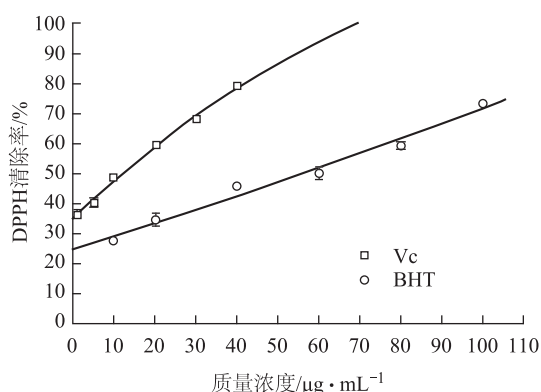


图 1 Vc 和 BHT 对 DPPH 自由基清除率曲线

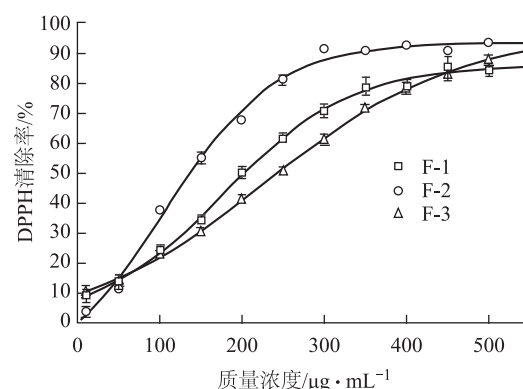
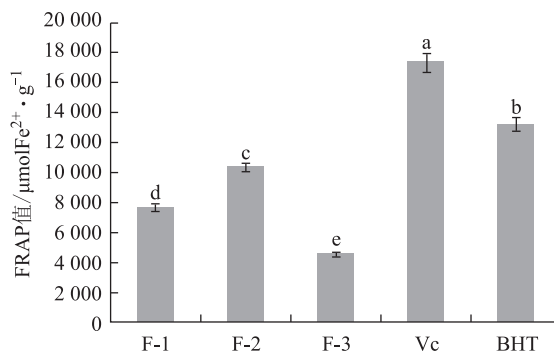


图 2 不同样品质量浓度与其最终清除率的关系图

3.2 FRAP 值测定结果

Fe³⁺ 吡啶三吡啶可被样品中还原物质还原为二价铁形式, 呈现出蓝色, 并于 593 nm 处具有最大吸光值, 根据吸光度大小计算样品抗氧化活性的强弱, FRAP 值越大, 抗氧化活性越强。由图 3 可以看出, 5 种不同样品均表现出一定的还原力, 以 Vc 最为显著, FRAP 值为 (17 356.1 ± 622.9) μmol Fe²⁺·g⁻¹, 其次为 BHT、F-2、F-1 及 F-3, FRAP 值分别为 (13 235.3 ± 469.5)、(10 387.5 ± 280.5)、(7 712.2 ± 274.7)、(4 584.1 ± 182.3) μmol Fe²⁺·g⁻¹。



注: 不同小写字母表示具有统计学差异。

图 3 不同样品铁离子还原能力图

由于不同抗氧化检测方法的反应机理不同,为获得可靠的结论,以样品的 IC_{50} 和 FRAP 值为指标进行统计分析,比较 DPPH 法与 FRAP 法的相关性,发现两种方法的结果具有很好的线性关系($r = 0.971$),说明此两种方法的结果具有很好的相关性和一致性。因此, IC_{50} 和 FRAP 值可视为样品观测的 2 个同量纲的抗氧化活性指标。综合 DPPH 法与 FRAP 法的结果表明,牛大力根部油脂具有较好的抗氧化活性,其中 F-2 部位的油脂抗氧化活性较 F-1 和 F-3 的活性强,这可能与 F-2 中富集含量较高的不饱和脂肪酸及其他抗氧化剂含量有关。

4 结论

牛大力为著名的药食两用植物,在广东、广西以及海南等地有大规模的种植栽培,具有重要的研究与开发价值。以上研究结果表明牛大力根油脂具有较好的抗氧化活性,其中可能存在大量的天然抗氧化活性物质,可开发成安全有效的抗氧化活性剂,在功能性食品、药品、保健产品、日化产品等行业具有广阔的研究与应用前景。

参考文献

- [1] 广东中药志编辑委员会. 广东中药志: 第一册[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1991: 168.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第四卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3296.
- [3] 韦玉燕, 巫繁菁, 曾海生, 等. 牛大力研究概况[J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 380-382.
- [4] 黎瑞汝, 陈占科, 高珊, 等. 中药牛大力的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(12): 165-167.
- [5] 杨增艳. 壮药牛大力的研究概况[J]. 中国民族民间医药杂志, 2010, 19(11): 12-13.
- [6] 刘丹丹, 魏志雄. 牛大力水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国现代中药, 2014, 16(7): 538-541.
- [7] 陈德力, 肖曼, 刘平怀. 海南核果木抗氧化活性[J]. 精细化工, 2011, 28(11): 1103-1106.
- [8] 吴双, 印敏, 单宇, 等. 海滨锦葵提取物体外抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2014, 39(5): 193-197.
- [9] Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay [J]. Anal biochem, 1996, 239(1): 70-76.
- [10] 李岗, 余德顺, 杨军, 等. 超临界 CO_2 萃取薄荷挥发油及其抗氧化能力的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(1): 276-279.

(收稿日期 2015-01-07)