

红背叶提取物的体外抗氧化活性

鲁俊华^{1,2}, 陈月圆², 黄荣韶¹, 陈换莹³, 李典鹏², 文永新^{2*}

(1. 广西大学农学院, 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区广西植物研究所, 中国科学院

广西桂林 541006; 3. 广西师范大学, 广西桂林 541001)

摘要: 采用 DPPH 法、FRAP 法、ABTS 法和清除羟基自由基法四种抗氧化活性方法, 测定了红背叶不同溶剂萃取 60% EtOH 提取物得到的部位清除自由基的能力。结果表明, 乙酸乙酯提取物的抗氧化能力最强, 强于阳性对照 VC 和 Trolox; 其次是 60% 乙醇提取物, 其抗氧化能力基本与阳性对照 BHA 相当。

关键词: DPPH; FRAP; ABTS; 羟基自由基; 抗氧化活性; 红背叶

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)01-0134-05

Study on the antioxidant activity of extracts from the leaves of *Alchornea trewioides*

LU Jun-Hua^{1,2}, CHEN Yue-Yuan², HUANG Rong-Shao¹,
CHEN Huan-Ying³, LI Dian-Peng², WEN Yong-Xin^{2*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Institute of Botany,

Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006,

China; 3. Guangxi Normal University, Guilin 541001, China)

Abstract: Antioxidant activity of different solvents extracts fractions fractionated from 60% EtOH extracts of the leaves of *Alchornea trewioides* were evaluated by DPPH assay, FRAP assay, ABTS assay and scavenging the corresponding hydroxyl radical method. When compared with the positive control samples BHA, VC and Trolox, the determination results showed that antioxidant activity of EtOAc extracts fractions of the leaves of *A. trewioides* was the highest, its antioxidant activity was higher than VC and Trolox. Antioxidant activity of 60% ethanol extracts fractions was as much as BHA, but lower than VC and Trolox.

Key words: DPPH; FRAP; ABTS; OH[·]; antioxidant activity; *Alchornea trewioides*

红背叶 (*Alchornea trewioides*) 别名红背山麻杆, 又名红背娘、红帽顶、红罗裙, 为大戟科山麻杆属植物, 味甘, 凉, 民间有治疗前列腺炎和清热利湿、散瘀止血之功效, 用于痢疾、小便不利、血尿、尿路结石或炎症、红崩、白带、腰腿痛、跌打肿痛, 外用治外伤出血、荨麻疹、湿疹。以根、叶入药。根四季可采, 夏秋采叶, 晒干(钱伯初等, 2007)。红背叶植物资料丰富, 主要分布于我国中部、东南和华南地区, 其中, 桂林地区分布较广, 生于海拔 15~400 (~1 000) m 沿

海平原或内陆山地矮灌丛中或疏林下或石灰岩山灌丛中(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1996; 广西壮族自治区中医药研究所, 1986)。

《中华本草》和《广西中草药》报道过红背叶的根含有生物碱和酚性物质, 叶含黄酮苷、酚类、氨基酸、有机酸和糖类等成分; 胡玉麟(1982)从红背叶种子中分离得到了五种生物碱类的美登素类肿瘤抑制剂。纪志武等(1992)研究红背叶的乙醚提取物对致癌物质 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene)诱发小

收稿日期: 2010-10-15 修回日期: 2010-11-17

作者简介: 鲁俊华(1985-), 女, 河南汝州人, 硕士研究生, 主要从事天然产物活性物质的开发和研究, (E-mail) lubing936@126.com。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: wyx@gxib.cn)

白鼠背部皮肤肿瘤有促进作用;吕小燕等(2007)研究了红背叶根抗四氯化碳致大鼠肝纤维化作用以及拮抗酒精性肝纤维化大鼠模型的作用机制;宋雨鸿等(2008)研究了红背叶根对小鼠免疫性肝损伤的保护作用;吕小燕等(2009)研究了红背叶根对免疫性肝纤维化大鼠血流变及微循环的影响;吕小燕等(2010)研究了红背叶根对肾间质纤维化大鼠血流变及微循环的影响。至今国内外尚未见红背叶叶子的抗氧化活性的研究报道。为了有效地开发利用该丰富的红背叶药用植物资源,本研究采用四种不同极性的溶剂对红背叶叶子的乙醇提取物进行萃取,再采用 DPPH 法、FRAP 法、ABTS 法和清除羟基自由基法研究不同极性部位的抗氧化活性,为红背叶的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红背叶鲜叶于 2009 年 8 月采自广西省桂林市雁山区,经广西植物研究所韦发南研究员鉴定为大戟科山麻杆属植物红背叶(*Alchornea trewioides*)。标本保存于广西植物研究所植物活性物研究开发中心。DPPH(Sigma-Fluka 公司);叔丁基羟茴香醚,简称 BHA(Sigma-Fluka 公司);FRAP、ABTS 总抗氧化能力测试试剂盒(碧云天生物技术研究所在)、羟自由基测试盒(南京建成生物工程研究所);VC(湖南省娄底市南化化学品有限公司);95%乙醇(分析纯)(广东汕头市西陇化工厂);其他溶剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

BS110S 赛多利斯电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Thermo Scientific Multiskan MK3 酶标仪(美国热电公司);数显电热培养箱 HPX-9082 MBE(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.3 红背叶提取物的制备

红背叶鲜叶切碎后阴干,称取 2.0 kg 用 60%乙醇加热提取 3 次,减压回收至无乙醇味,得乙醇提取物的浸膏约 500 g。乙醇提取物用水混悬后依次用石油醚、乙酸乙酯、60%乙醇和 20%乙醇等体积萃取 3 次,分别回收溶剂得石油醚提取物 0.55 g、乙酸乙酯提取物 59.8 g、60%乙醇提取物 306.7 g、20%

乙醇提取物 14.3 g。

1.4 红背叶提取物的抗氧化活性的测定

1.4.1 DPPH 法 按汪海波等(2008)的方法,精密称取适量各个提取物样品用体积分数 95%的乙醇倍比稀释配制成质量浓度分别为 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05 mg/mL 的样品溶液,取 2.8 mL 样品,加入 1.2 mL DPPH 甲醇溶液(2.5×10^{-4} mol/L),混合 30 min 后在 520 nm 处测定各样品吸光值(A_i),每份样品平行操作 3 次,最后取其平均值,以 BHA 和 VC 作为阳性对照。DPPH·自由基清除率 K 按公式计算: $K(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$

式中: A_c 为 2.8 mL 95%乙醇加入 1.2 mL DPPH 甲醇溶液(2.5×10^{-4} mol/L)混合后的吸光度, A_j 为 2.8 mL 样品加入 1.2 mL 95%乙醇混合后的吸光度。

1.4.2 FRAP 法 酸性条件下抗氧化物可以还原 Ferric-tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ,随后在波长 593 nm 测定蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 即可获得样品中的总抗氧化能力。按照碧云天生物技术研究所在的检测试剂盒检测方法测定,在波长 593 nm 测各个样品的吸光度值 A ,每份样品平行操作 3 次,取平均值。以 Trolox 浓度为 0.15~1.5 mmol/L 为横坐标,以反应 10 min 时波长为 593 nm 的吸光度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线。结果样品的抗氧化能力可以用 Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity(TEAC)来表示。

1.4.3 ABTS 法 ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成为绿色的 $ABTS^+$,在抗氧化物存在时 $ABTS^+$ 的产生会被抑制,在 734 nm 或 405 nm 测定 $ABTS^+$ 的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。按照碧云天生物技术研究所在的检测试剂盒检测步骤进行检测,在波长为 734 nm 测各个样品的吸光度值 A ,每份样品平行操作 3 次,取平均值。以 Trolox 浓度为 0.15~1.5 mmol/L 为横坐标,以反应 10 min 时波长为 734 nm 的吸光度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线,可计算出测试样品在 ABTS 法检测中的 ABTS 值。结果样品的抗氧化能力可以用 Trolox 当量来表示。

1.4.4 清除羟基自由基法 按照检测试剂盒检测方法测定,定义每毫克样品在 37 °C 下反应 1 min,使反应体系中 H_2O_2 浓度降低 1 mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位。预实验确定最佳浓度和最佳取

样量后,按各个样品的最佳浓度和取样量进行在波长 550 nm 测定,计算样品抑制羟自由基的活力,每份样品平行操作 2 次,取平均值。用 VC 作为参照来表示抑制羟自由基的活力。公式:

抑制羟自由基能力(U/mL)=(A_{对照} - A_{样品})/(A_{标准} - A_{空白})×标准管浓度(8.824 mmol/L)×(1 mL÷取样量)×样品测试前的稀释倍数(1 mg/mL ÷样品测试的浓度)

表 1 红背叶提取物对 DPPH· 自由基清除率 (%) (n=3)
Table 1 Scavenging rates of different solvent extracts from *Alchornea trewioides* to DPPH·

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging rates					
	石油醚提取物 Petroleum ether extracts	乙酸乙酯提取物 EtOAc extracts	60%乙醇提取物 60%-ethanol extracts	20%乙醇提取物 20%-ethanol extracts	BHA (对照 Contrast)	VC (对照 Contrast)
0.005	2.61±0.01 h	34.16±0.06 h	3.59±0.04 j	2.23±0.07 i	6.15±0.05 j	20.32±0.03 h
0.01	6.36±0.00 g	38.78±0.12 g	5.76±0.01 i	3.83±0.03 h	13.12±0.12 i	36.67±0.15 g
0.015	8.51±0.005 f	57.36±0.06 f	7.86±0.04 h	5.61±0.01 g	24.50±0.00 h	56.07±0.07 f
0.02	10.32±0.01 e	75.19±0.14 e	22.07±0.03 g	6.61±0.1 g	25.71±0.01 g	74.69±0.11 e
0.025	16.8±0.00 d	88.28±0.08 d	30.92±0.04 f	11.1±0.4 f	36.16±0.05 f	81.55±0.05 d
0.03	21.8±0.01 c	93.02±0.01 c	33.79±0.1 e	13.72±0.06 e	42.32±0.04 e	89.54±0.16 c
0.035	23.17±0.03 a	93.27±0.02 bc	45.64±0.09 d	16.71±0.06 d	50.7±0.3 d	93.89±0.59 b
0.04	22.66±0.06 b	93.4±0.03 bc	56.48±0.12 c	20.07±0.05 c	51.82±0.2 c	94.51±0.19 ab
0.045	22.78±0.08 ab	93.56±0.05 ab	58.21±0.00 b	22.7±0.1	54.69±0.11 b	95.72±0.08 a
0.05	22.89±0.11 ab	93.98±0.04 a	60.5±0.04 a	24.44±0.03	58.45±0.11 a	95.48±0.07 a

注:表中同列的不同字母表示 Tukey 法在 1%水平的差异极显著。下同。
Note: Different letters of the same sample indicate highly significant differences at 0.01 level according to Tukey. The same below.

2 结果与分析

2.1 红背叶不同溶剂提取物对 DPPH· 自由基的清除作用

根据表 1 数据得红背叶提取物清除 DPPH· 自由基的剂量一效应关系(图 1,表 2)。从表 2 中各样品的相关系数 R² 值,说明各种样品所建立的方程具有可靠性,能较好的解释红背叶提取物清除 DPPH· 自由基的剂量一效应关系。

从上述结果看出,红背叶提取物对 DPPH· 自由基的清除率随着提取物浓度的加大逐步呈增加的

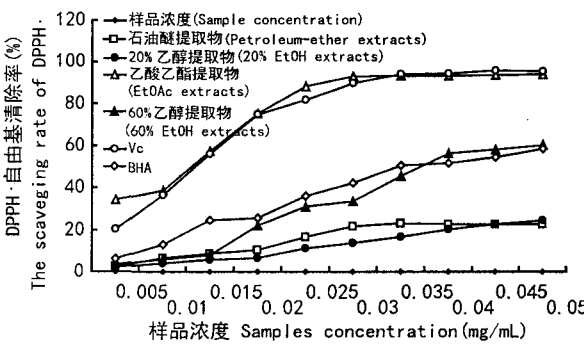


图 1 红背叶提取物清除 DPPH· 自由基的剂量一效应关系
Fig.1 Dose-effect relationship of eliminating DPPH· of different solvent extracts from *Alchornea trewioides*

表 2 各样品的趋势线方程和对 DPPH· 自由基清除活性的 IC₅₀ 值

Table 2 Trendline equation of every sample and IC₅₀ values of different solvent extracts from *Alchornea trewioides* to DPPH·

样品 Sample	趋势线方程 Trendline equations	相关系数 R ²	DPPH· IC ₅₀ (g/mL)
石油醚提取物 Petroleum-ether extracts	Y=-0.2379x ² +5.2301x-3.5905	0.951	99.4
乙酸乙酯提取物 EtOAc extracts	Y=-1.3175x ² +21.529x+8.4143	0.9698	9.6
60%乙醇提取物 60%-ethanol extracts	Y=-0.0524x ² +7.8249x-8.5378	0.9715	42.8
20%乙醇提取物 20%-ethanol extracts	Y=-0.0688x ² +1.893x-0.358	0.9902	103.1
BHA 对照 BHA contrast	Y=-0.3646x ² +9.9463x-4.3062	0.9887	37.5
VC 对照 VC contrast	Y=-1.4436x ² +24.046x-2.8337	0.9938	11.4

趋势,但在浓度为 0.04 mg/mL 时,自由基清除力渐趋于平缓。红背叶提取物对 DPPH· 清除活性 IC₅₀

值顺序为:乙酸乙酯提取物<VC<BHA<60%乙醇提取物<石油醚提取物<20%乙醇提取物。不同

提取物对 DPPH· 自由基清除作用以乙酸乙酯提取物最强,它的清除率比 VC 的效果强;60%乙醇提取物对 DPPH· 自由基具有一定的清除作用,但清除率较 BHA 略低;其石油醚提取物和 20%乙醇提取物对 DPPH· 自由基的清除作用较小。红背叶具有很好的自由基清除活性,且自由基清除作用功能因子主要存在中等极性的乙酸乙酯提取物中,乙酸乙酯提取物的浓度为 0.03 mg/mL 时,DPPH· 自由基清除率已高达 93.02%,是很多植物抗氧化活性的几倍甚

至几十倍;其次存在于大极性的 60%乙醇提取物中。

2.2 红背叶不同溶剂提取物对 FRAP· 自由基的清除作用

在 FRAP 方法中,以 Trolox 作为阳性对照,当 Trolox 浓度为 0.15~0.9 mmol/L 时,与自由基清除率有良好的线性关系, $Y=0.3156X+0.0639$, $R^2=0.9978$ 。红背叶提取物对 FRAP 自由基的清除效果用 Trolox 当量(抗氧化能力为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)来表示,大小排序为:乙酸乙酯提取物>60%

表 3 红背叶不同溶剂提取物对 FRAP· 自由基和 ABTS· 自由基的清除作用
Table 3 Scavenging activity of different solvent extracts from *Alchornea trewioides* to FRAP· and ABTS·

样品 Sample	浓度 Sample concentration (mg/mL)	FRAP·		ABTS·	
		吸光度 Absorption value	抗氧化能力 Antioxidant activity (mmol/L/mg)	吸光度 Absorption value	抗氧化能力 Antioxidant activity (mmol/L/mg)
石油醚提取物 Petroleum-ether extracts	0.2	0.105±0.0017	0.651±0.0277d	0.515±0.0179	0.605±0.0375b
乙酸乙酯提取物 EtOAc extracts	0.2	0.410±0.0098	5.483±0.1553a	0.079±0.0081	1.506±0.0167a
60%乙醇提取物 60%-ethanol extracts	0.2	0.255±0.0098	3.028±0.1559b	0.084±0.0115	1.496±0.0237a
20%乙醇提取物 20%-ethanol extracts	0.2	0.181±0.0012	1.855±0.183c	0.114±0.0277	1.433±0.0577a

表 4 红背叶不同溶剂提取物对羟基自由基的清除作用
Table 5 Scavenging activity of different solvent extracts from *Alchornea trewioides* to OH·

样品 Sample	浓度 Sample concentration (mg/mL)	A空白	A标准	A对照	A样品	抑制羟自由基的活力 OH· (U/mL)
石油醚提取物 Petroleum-ether extracts	0.2	0.02	0.827	0.92	0.424±0.014	135.59±3.83bc
乙酸乙酯提取物 EtOAc extracts	0.1	0.02	0.827	0.92	0.51±0.03	224.15±16.4a
60%乙醇提取物 60%-ethanol extracts	0.2	0.02	0.827	0.92	0.434±0.026	132.85±7.11bc
20%乙醇提取物 20%-ethanol extracts	0.4	0.02	0.827	0.92	0.431±0.018	66.85±2.46c
VC 对照 VC contrast	0.12	0.02	0.827	0.92	0.503±0.015	189.91±6.76ab

乙醇提取物>20%乙醇提取物>Trolox>石油醚提取物(表 3)。

2.3 红背叶不同溶剂提取物对 ABTS· 自由基的清除作用

在 ABTS 方法中,以 Trolox 作为参照来表示样品的抗氧化活性,当 Trolox 浓度为 0.1~0.3 mmol/L 时,与自由基清除率有良好的线性关系, $Y=-2.4189X+0.8073$, $R^2=0.9982$ 。红背叶提取物对 ABTS 自由基的清除效果用 Trolox 当量(抗氧化能力为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)来表示,大小排序为:乙酸乙酯提取物>60%乙醇提取物>20%乙醇提取物>Trolox>石油醚提取物(表 3)。

2.4 红背叶不同溶剂提取物对羟基自由基的清除作用

在清除羟自由基的试验中,按照试剂盒的方法,在波长 550 nm,先测标准空白管的吸光度 A 空白、

标准管吸光度 A 标准、对照管吸光度 A 对照、然后测每份样品的吸光度 A 样品,平行 2 次,取其平均值,按照公式计算出抑制羟自由基的活力。大小排序为乙酸乙酯提取物>VC>石油醚提取物>60%乙醇提取物>20%乙醇提取物(表 4)。

2.5 FRAP 法、ABTS 法和清除羟基自由基法三种抗氧化方法的比较

FRAP 法、ABTS 法和清除羟基自由基法三种抗氧化分析方法结果显示:乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最高,比 Trolox 和 VC 具有更强的抗氧化活性;其次是 60%乙醇提取物。用 SPSS 统计软件的相关性分析结果显示,红背叶鲜叶的不同溶剂提取物的 FRAP 值与 ABTS 值呈正相关($R^2=0.723$, $P=0.277<0.05$);ABTS 值与羟自由基清除值不呈现相关性($R^2=0.109$, $P=0.891>0.05$);FRAP 值与羟自由基清除值呈正相关($R^2=0.758$, $P=0.242$)。

<0.05)。

对这三种抗氧化分析方法结果进行了方差分析和相关性分析,虽然不同的样品在不同抗氧化分析方法中会有所差异,但 FRAP 值与其他两种方法存在显著的正相关,而且此方法各个样品的 FRAP 值差异极显著,说明 FRAP 法适合样品的抗氧化活性的测定,并且结果可靠;虽然羟自由基清除值与 ABTS 值不呈现相关性,但羟自由基清除值与 FRAP 值的相关性相对于 ABTS 值与 FRAP 值的相关性较高,且此方法各个样品的羟自由基清除值差异显著,说明清除羟自由基法也适合样品的抗氧化活性的测定,并且结果可靠。ABTS 值虽然与 FRAP 值存在显著的正相关,但此方法中各个样品之间的 ABTS 值差异不显著,所以,FRAP 法和清除羟自由基法比 ABTS 法更能准确、可靠的反映红背叶鲜叶不同溶剂提取物抗氧化活性。

3 结论

本文采用四种方法对红背叶鲜叶不同溶剂提取物抗氧化活性进行了研究,这四种方法在测样品的抗氧化活性确有不同,主要是反应机制和反应条件的不同所致。因此需要采用多种抗氧化分析方法来综合评价和分析样品的抗氧化活性。红背叶作为民间药用植物,DPPH 法、FRAP 法、ABTS 法和清除羟基自由基法研究都表明红背叶具有很好的抗氧化活性,尤其是其的乙酸乙酯提取物比 Trolox 和 VC 具有更强的抗氧化活性,这一研究为红背叶的开发和应用提供了科学依据,为红背叶成为一种新的抗氧化药物提供了一定的理论基础。

参考文献:

- 广西壮族自治区中医药研究所. 1986. 广西药用植物名录[M]. 广西人民出版社:185
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1996. 中国植物志第四十四卷(第2分册)[M]. 北京:科学出版社:66—74
- Hu YL(胡玉麟). 1982. New tumor inhibitors of maytansinoids

- from *Alchornea trewioides*; Trewiasine, Dehydrotrewiasine, Demethyltrewiasine(从红背叶得到的新的美登素类肿瘤抑制剂:红背叶素、脱氢红背叶素和脱甲基红背叶素)[J]. *Fore Med Sci Section On Pharm*(国外医学·药学分册),5:16
- Ji ZW(纪志武),Zhong JM(钟建明),Zeng Y(曾毅). 1992. Studies on enhanced effects of mice skin papilloma induced by extracts of *Euphorbia antiquorum*, *E. milii*, *Jasminum amplexicaule* and *Alchornea trewioides*(火殃箭、铁海棠、扭曲藤和红背叶对3-甲基胆蒽诱发小白鼠皮肤肿瘤的作用)[J]. *Chin J Cancer*(癌症),11(2):120—12
- Lü XY(吕小燕),Liu Q(刘强),Chen YX(陈育尧),et al. 2007. Resistive effects of Hongbeiyegen on rat hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride(红背叶根抗四氯化碳致大鼠肝纤维化作用研究)[J]. *Liaoning J Trad Chin Med*(辽宁中医杂志),34(5):668—669
- Lü XY(吕小燕),Liu Q(刘强),Chen YX(陈育尧),et al. 2007. Therapeutic effect effect of Hongbeiyegen on alcohol-induced rat hepatic fibrosis(红背叶根拮抗酒精性肝纤维化大鼠模型的作用机制)[J]. *J Southern Med Univ*(南方医科大学学报),27(2):153—155
- Lü XY(吕小燕),Sun XG(孙学刚),Liu Q(刘强),et al. 2009. Effects of Hongbeiyegen on Hemorheology and microcirculation in immunological hepatic fibrosis rats(红背叶根对免疫性肝纤维化大鼠血流变及微循环的影响)[J]. *Shanghai J Trad Chin Med*(上海中医药杂志),43(9):70—72
- Lü XY(吕小燕),Lü ZP(吕志平),Sun XG(孙学刚),et al. 2010. Influences of Hongbeiyegen (*Stipellaria trewioides*) on hemorheology and microcirculation in rats with renal interstitial fibrosis(红背叶根对肾间质纤维化大鼠血流变及微循环的影响)[J]. *J Beijing Univ Trad Chin Med*(北京中医药大学学报),33(6):398—401
- Qian BC(钱伯初),Shi H(史红). 2007. Progress in research on animal models of chronic nonbacterial prostatitis(慢性非细菌性前列腺炎动物模型研究进展)[J]. *Chin J Clinical Pharm Therapeutics*(中国临床药理学与治疗学),12(1):12—14
- Song YH(宋雨鸿),Liu Q(刘强),Chen YX(陈育尧),et al. 2008. Protective effects of Hongbeiyegen against immunological liver injury in mice(红背叶根对小鼠免疫性肝损伤的保护作用)[J]. *J Southern Med Univ*(南方医科大学学报),28(3):494—496
- Wang HB(汪海波),Xiao JQ(肖建青),Liu XK(刘锡葵). 2008. Study on antioxidant activity of *Juglans regia* L. flowers(核桃花抗氧化活性研究)[J]. *Food Sci*(食品科学),29(10):140—142