

文章编号: 1674 - 7054(2019) 03 - 0231 - 04

# 刺芫荽叶乙醇提取物的抗氧化活性

张建春, 吴接呈, 张筑宏, 王兰英, 骆焱平

(海南大学 植物保护学院, 海口 570228)

**摘要:** 以乙醇为提取溶剂采用浸提法对刺芫荽叶进行浸提, 进一步测定该提取物的总多酚、总黄酮含量以及对 DPPH 自由基、羟自由基的清除作用和高价铁离子的还原能力。结果表明: 刺芫荽叶乙醇提取物总多酚含量为 1mg 提取物干粉的抗氧化能力相当(  $23.2 \pm 0.01$  )  $\mu\text{g}$  的没食子酸标准品; 总黄酮含量为 1 mg 提取物干粉的抗氧化能力相当于(  $0.96 \pm 0.02$  )  $\mu\text{g}$  的芦丁纯品; 高价铁离子的还原能力为 1mg 提取物干粉的还原力相当于  $0.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的七水合硫酸亚铁; DPPH(2,2-二苯基-1-苦肟基) 自由基清除作用半抑制质量浓度(  $IC_{50}$  ) 为  $0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 羟自由基清除作用半抑制浓度(  $IC_{50}$  ) 为  $0.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 提取物对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率低于对照的药剂(芦丁、特丁基对苯二酚)。

**关键词:** 刺芫荽; 乙醇提取物; 总黄酮; 总多酚; 抗氧化活性

**中图分类号:** S 435

**文献标志码:** A

**DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.03.004

刺芫荽(*Eryngium foetidum* L.) 别名野香菜、刺芹、洋芫荽等, 为伞形科刺芹属多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 在我国主要分布于海南、广东、广西、云南等热带、亚热带地区<sup>[2]</sup>, 是一种药蔬两用植物, 具有显著的消炎、抑菌的功效, 极具开发价值<sup>[3]</sup>。目前关于刺芫荽提取物的研究取得了一定进展, 如文献[4]发现刺芫荽水煎剂具有局部抗炎作用和镇痛作用; 文献[5]发现刺芫荽的己烷提取物也具有抗炎活性, 并且确定了其主要成分为谷甾醇; 文献[6]发现刺芫荽新鲜及干燥叶水提物还能抑制蛇、蝎毒液对红细胞的溶血作用。文献[7]发现刺芫荽水提物对多种细菌有一定的抑制作用, 其中, 对白喉杆菌的作用较消炎散结片强。文献[8]发现刺芫荽叶提取物对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等致病菌有较好的抑制作用<sup>[8]</sup>。文献[9]发现刺芫荽对胸膜炎模型大鼠炎性细胞因子的影响, 说明其治疗感染性疾病的作用不单纯在于抗菌, 而可能对复杂的细胞因子网络进行协调。可见刺芫荽提取物具备多种功效, 备受科研者的广泛关注。本研究拟通过对刺芫荽叶乙醇提取物的总多酚、总黄酮的含量, 对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除作用以及对高价铁离子还原能力的测定来评价刺芫荽的抗氧化活性, 以期对刺芫荽开发应用奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 供试药剂** 刺芫荽提取物(刺芫荽采自海南省五指山地区); 芦丁、没食子酸和叔丁基对苯二酚(TBHQ)均购于国药集团化学试剂有限公司。

**1.2 提取物的制备** 将采集的刺芫荽叶洗净, 室内自然阴干, 碾碎, 称质量后加入 95% 无水乙醇中, 避光浸提 3 d。抽滤, 得到滤液。滤渣在相同条件下再浸提 1 次, 合并滤液, 减压浓缩, 得到浸膏, 置于室温阴凉处保存备用。

**1.3 提取物总多酚含量的测定** 参照文献[10]的方法测定, 略有改动。用 95% 无水乙醇配制  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙醇提取物样品, 移取 1 mL 样品液于试管中, 加入 0.5 mL 福林-薛卡多(Folin-Ciocalteu)试剂和 5 mL 蒸馏水, 充分混匀, 在室温下反应 5 min。再向试管中加入 1 mL 5% 碳酸钠溶液, 混匀, 室温下黑暗处理 60

收稿日期: 2019 - 06 - 15

基金项目: 2018 海南省自然科学基金项目(2018CXTD335)

作者简介: 张建春(1994 -), 男, 海南大学热带农林学院 2017 级硕士研究生 E-mail: zjc614585635@163.com

通信作者: 骆焱平(1973 -), 男, 博士, 教授. 研究方向: 生物农药. E-mail: yanpluo@126.com

min。在 760 nm 处测定样品的吸光值,实验重复 3 次。以没食子酸(60,40,20,10,5,2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为标准样品绘制标准曲线,根据标准曲线计算提取物的总多酚含量。

**1.4 提取物总黄酮含量的测定** 参照文献 [11] 的方法,略有改动进行测定。用 95% 的乙醇配制  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙醇提取物样品,移取 0.5 mL 样品液于试管中,加入 0.1 mL 10% 氯化铝溶液、0.1 mL 醋酸钾溶液、4.3 mL 蒸馏水,充分混匀,室温下孵育 30 min。在 415 nm 下测定样品液的吸光值,实验重复 3 次。以芦丁(0.32,0.16,0.08,0.04,0.02,0.01  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为标准样品绘制标准曲线,根据标准曲线计算提取物的总黄酮含量。

**1.5 提取物对 DPPH 自由基清除能力的测定** 参照文献 [12] 方法进行,略有改动进行测定。将样品溶液稀释为 1,0.8,0.6,0.4,0.2,0.1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 3.5 mL 2,2-二苯基-1-苦肼基(DPPH)溶液于试管中,向试管中加入 0.5 mL 不同浓度的样品溶液,充分摇匀,在室温下孵育 30 min,在 517 nm 下测定的吸光度为 A。用 0.5 mL 95% 无水乙醇代替样品溶液与 3.5 mL DPPH 溶液加入试管,测其吸光度为 A<sub>1</sub>;用 0.5 mL 双蒸水代替样品液与 3.5 mL 的无水乙醇混合,同时以其作为空白对照,测 95% 无水乙醇和双蒸水的吸光度为 A<sub>0</sub>。将芦丁稀释成与样品相同浓度的标准溶液作为阳性对照,代替样品进行上述实验,每组重复 3 次试验。并计算样品对 DPPH 自由基的清除率以及半数清除作用浓度 IC<sub>50</sub> 值。按以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100\%$$

式中:A 为样品溶液和 DPPH 溶液的平均吸光度;A<sub>0</sub> 为 95% 无水乙醇和双蒸水的平均吸光度;A<sub>1</sub> 为 95% 无水乙醇和 DPPH 溶液的平均吸光度。

**1.6 提取物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除能力的测定** 参照芬顿(Fenton)反应<sup>[13]</sup>的方法,略有改动。将样品溶液稀释为 0.8,0.6,0.4,0.2,0.1,0.05  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 300  $\mu\text{L}$  样品溶液于试管中,依次加入 1 mL 1.5 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  硫酸铁溶液、0.7 mL 6 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  过氧化氢溶液和 1.2 mL 6 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  水杨酸钠溶液,充分摇匀。37℃ 反应 5 min,在 510 nm 下测定样品的吸光度为 A<sub>1</sub>;用双蒸水代替样品液作空白对照,按同样步骤测吸光度为 A<sub>0</sub>。每个处理重复 3 次,分别求吸光度平均值。以特丁基对苯二酚(TBHQ)作阳性对照,重复上述实验步骤。按以下公式计算:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub> 为空白对照平均吸光度;A<sub>1</sub> 为加样品的平均吸光度;

**1.7 提取物对高价铁离子还原能力的测定** 参照文献 [14] 的方法,略有改动。取 100  $\mu\text{L}$  样品溶液于试管中,加入 3 mL FRAP 溶液 [25 mL 300 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  醋酸盐缓冲溶液、2.5 mL 0.01 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  三吡啶三嗪(TPTA)溶液、2.5 mL 0.02 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  六水合三氯化铁溶液],充分摇匀。37℃ 反应 30 min,在 593 nm 测定样品的吸光度。七水合硫酸亚铁代替样品液,设置质量浓度梯度:0.2,0.1,0.05,0.025,0.0125,0.0065  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,重复上述实验。每个质量浓度重复 3 次,求吸光度平均值,并绘制标准曲线。

**1.8 数据统计与分析** 实验数据表示为平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD),采用 spss22.0 软件对数据进行分析处理,采用 excel 2016 作图。

## 2 结果与分析

**2.1 提取物的总多酚含量测定** 以没食子酸标准溶液质量浓度为横坐标,反应液的吸光度为纵坐标,拟合回归方程为  $y = 0.0056x + 0.1251$ ,相关系数  $R^2$  为 0.981。表明没食子酸在质量浓度为 0 ~ 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内与其吸光度呈良好的线性关系,符合朗伯比尔定律,该方程可用于刺芫荽叶乙醇提取物总多酚的定量测定。测得刺芫荽叶乙醇提取物为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时总多酚相对超纯水吸光度平均值为 0.255,由上述方程计算该样品的总多酚含量为 1 mg 提取物干粉的抗氧化能力相当(23.2  $\pm$  0.01)  $\mu\text{g}$  的没食子酸标准品。

**2.2 提取物的总黄酮含量测定** 以芦丁为参比标准来衡量提取物中黄酮类化合物的含量,以芦丁的质量浓度为横坐标,505 nm 处的吸光值为纵坐标绘制标准曲线,拟合回归方程为  $y = 0.797x + 0.1623$ ,相关系数  $R^2$  为 0.9741,说明方程相关性好。测定 0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  提取物的吸光值为 0.541,由上述方程计算该提取物的总黄酮含量为 1 mg 提取物干粉的抗氧化能力相当于(0.96  $\pm$  0.02)  $\mu\text{g}$  的芦丁纯品。

**2.3 提取物对 DPPH 自由基的清除能力测定** 测定刺芫荽叶乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力见图 1, 由图 1 可见, 该提取物在  $0.1 \sim 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围内对 DPPH 自由基有较强的清除作用, 且清除率随浓度的增大而升高。计算其回归方程为  $y = 1.2886x + 5.4104$ , 相关系数  $R^2$  为 0.916, 对 DPPH 自由基清除作用半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时测得芦丁回归方程为  $y = 1.2449x + 5.741$ , 相关系数  $R^2$  为 0.887, 计算芦丁的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。刺芫荽叶乙醇提取物对 DPPH 自由基清除作用稍弱于芦丁标准品。

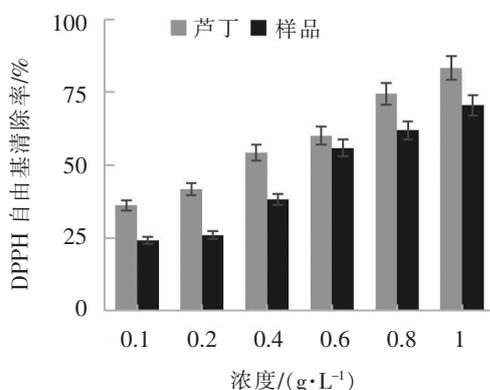


图 1 提取物及芦丁溶液 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 DPPH radical scavenging rate of extract and rutin

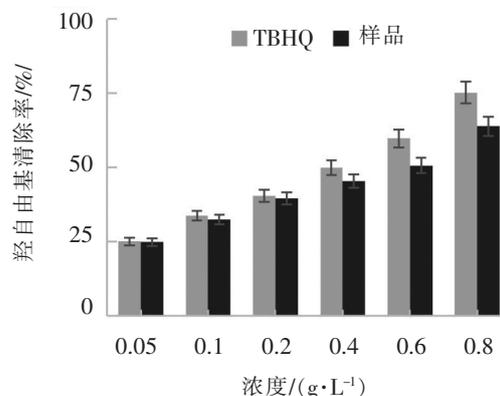


图 2 提取物及 TBHQ 溶液羟基自由基的清除作用

Fig.2 Hydroxyl radical scavenging rate of extract and TBHQ

**2.4 提取物对羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除能力的测定** 以 2-叔丁基对苯二酚 (TBHQ) 为阳性对照, 测定刺芫荽叶乙醇提取物对羟自由基的清除作用 (图 2)。由图 2 可见, 在  $0.05 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内, 随着浓度的增加该提取物对羟自由基的清除作用逐渐增强。计算回归方程为  $y = 0.7497x + 5.2767$ , 相关系数  $R^2$  为 0.936, 对羟自由基清除作用半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时计算 TBHQ 标准品回归方程为  $y = 0.9981x + 5.5534$ , 相关系数  $R^2$  为 0.917, 对羟自由基清除作用半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。相比之下, 刺芫荽叶乙醇提取物对羟自由基的清除活性低于 TBHQ 标准品。

**2.5 提取物对高价铁离子的还原能力测定** 以  $\text{FeSO}_4$  质量浓度为横坐标, 593 nm 处吸光值为纵坐标, 拟合回归方程为  $y = 1.7788x + 0.0026$ , 相关系数  $R^2$  为 0.973。测得刺芫荽叶乙醇提取物为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时还原铁的相对超纯水吸光度平均值为 0.358, 由上述方程计算该样品还原铁的含量为 1 mg 提取物干粉的还原力相当于  $0.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的七水合硫酸亚铁。由此可见该提取物具有很好的高价铁离子的还原能力。

### 3 讨论

本研究采用乙醇对刺芫荽叶进行浸提, 测定了该提取物的总多酚含量、总黄酮含量以及对 DPPH 自由基、羟自由基的清除作用和高价铁离子的还原能力。结果表明: 1 mg 提取物干粉的抗氧化能力相当 ( $23.2 \pm 0.01$ )  $\mu\text{g}$  的没食子酸标准品; 1 mg 提取物干粉的抗氧化能力相当于 ( $0.96 \pm 0.02$ )  $\mu\text{g}$  的芦丁纯品; 1 mg 提取物干粉的还原力相当于  $0.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的七水合硫酸亚铁; 提取物对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率低于对照的药剂。总体来看, 提取物抗氧化活性较好。这一结论验证了刘志东<sup>[15]</sup>等人提出刺芫荽是天然抗氧化剂的重要来源这一观点。

自由基的清除是抗氧化剂发挥抗氧化作用的主要机理<sup>[16]</sup>。大量研究结果证明, 刺芫荽全株含豆甾醇类物质, 嫩叶富含十二碳烯醛、十四碳烯醛、十二醛、月桂酸等多种芳香物质, 如高燕等研究发现 2-十二碳烯醛是刺芫荽特征香气的主要成分, 具有柑橘和脂肪气味<sup>[17]</sup>。JAN BANOUT 等的研究也证明了刺芫荽水提取物中 2-十二碳烯醛是主要成分, 其次是正十二烷醛, 2-十四碳烯醛和 1-十四烯<sup>[18]</sup>。本研究尚未对提取物成分进行分析, 在后续研究中寻找清除自由基的物质是追踪刺芫荽抗氧化作用机理的关键。

### 参考文献:

- [1] 林华铭, 杨梦成, 谢飞, 等. 正交试验法优选刺芫荽总黄酮提取工艺的研究 [J]. 河南化工, 2017, 34(7): 19-21.
- [2] 杨梦成, 谢飞, 黄晓孟, 等. 刺芫荽中总黄酮含量的测定 [J]. 广东化工, 2016, 43(16): 173-174.

- [3] 杨永丽, 陈学云, 杨绍斌. 微波辅助萃取刺芫荽中挥发油工艺研究[J]. 现代农业科技, 2017(12): 269–270.
- [4] SÁENZ MT, FERNÁNDEZ MA, GARCÍA MD. Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae) [J]. Phytotherapy Research, 1997, 11(5): 380–383.
- [5] GARCÍA MD, SÁENZ MT, GÓMEZ MA, et al. Topical anti-inflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation model [J]. Phytotherapy Research, 2001, 13(1): 78–80.
- [6] ALKFOFAHI A, SALLAL A J, DISI A M. Effect of *Eryngium cretissum* on the hemolytic activities of snake and scorpion venom [J]. Phytotherapy Research. 1997, 11: 540–542.
- [7] 叶碧波, 陈再智, 陈小娟, 等. 刺芫荽抗菌作用的试验研究[J]. 中国中医药科技, 2000, 7(4): 224–224.
- [8] BEGUM S, AHMARUZZAMAN M, ADHIKARI P P. Ecofriendly bio-synthetic route to synthesize ZnO nanoparticles using, *Eryngium foetidum* L. and their activity against pathogenic bacteria [J]. Materials Letters, 2018: S0167577X18308450.
- [9] 黄玲, 广枣园, 刘泽银. 洋芫荽对胸膜炎模型大鼠炎性细胞因子的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 156–192.
- [10] 喻谨, 岳永德, 趟锋, 等. Folin-Ciocalteu 法测定竹叶中总多酚含量[J]. 光谱试验室, 2013, 30(6): 27–28.
- [11] 屈晓宇, 高秋玉, 邓小宽, 等. 赶黄草总黄酮树脂精制工艺与检测方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 2230–2237.
- [12] 张文州, 林水森, 陈琳琳, 等. 辣木复合果蔬饮料工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与发, 2019, 40(11): 111–115.
- [13] 陈玉霞, 刘建华, 林峰, 等. DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性[J]. 实验室研究与探索, 2011(6): 11–14.
- [14] 段明慧, 阮培均, 方婷, 等. 毛叶蔷薇果营养成分及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 23–28.
- [15] 刘志东, 郭本恒, 工荫榆. 抗氧化活性检测方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 563–563.
- [16] 王青华, 杜娟, 张维民. 天然抗氧化剂原花色素的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007(4): 953–954.
- [17] 高燕, 马银海. 刺芫荽挥发性成分研究[J]. 昆明学院学报, 2013, 35(3): 69–70.
- [18] BANOUT J, HAVLIK J, KULIK M, et al. Effect of solar drying on the composition of essential oil of sacha culantro (*Eryngium foetidum* L.) grown in the peruvian amazon [J]. Journal of Food Process Engineering, 2010, 33(1): 83–103.

## Antioxidant Activity of Ethanol Extract from *Eryngium foetidum* Leaves

ZHANG Jianchun, WU Jiecheng, ZHANG Zhuhong, WANG Lanying, LUO Yanping  
(College of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Leaves of coriander (*Eryngium foetidum*) were extracted with ethanol as extraction solvent, and their contents of total polyphenols and flavonoids, the scavenging effect on DPPH radical and hydroxyl radical and the reduction ability of high-valence iron ion were determined. The results show that the total polyphenol content, the total flavonoids content, the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of DPPH radical scavenging effect, the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of hydroxyl radical scavenging effect, and the reduction ability of high-valence iron ion of the ethanol extract from coriander leaves was  $(23.20 \pm 0.01)$  mg GAE/(g · DW<sup>-1</sup>),  $(0.96 \pm 0.02)$  mg RE/(g · DW<sup>-1</sup>),  $0.48$  g · L<sup>-1</sup>,  $0.43$  g · L<sup>-1</sup>, and  $0.72$  M Fe<sup>2+</sup>/(g · DW<sup>-1</sup>). The extract had lower DPPH radical scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate than rutin and TBHQ.

**Keywords:** *Eryngium foetidum*; ethanol extract; total flavonoids; total polyphenols; antioxidant activity

(责任编辑: 叶 静)