

野牡丹提取液的抗氧化活性研究

赵鑫¹, 张冬青¹, 黄荣林¹, 肖玉平¹, 黄碧云^{2*}

1. 广东轻工职业技术学院食品与生物工程系, 广东 广州 510300

2. 广州医科大学药物研究中心, 广东 广州 510182

摘要: 目的 研究野牡丹提取液的抗氧化活性。方法 采用二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)和铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)测定法, 测定其抗氧化活性, 并将其与芦丁和维生素C(Vc)的抗氧化能力进行比较研究。结果 野牡丹提取液具有较强的抗氧化能力, 对DPPH·自由基有较好的清除率, 半数清除浓度(IC₅₀)为23 μg/mL; 对Fe³⁺也具有较好的还原能力, 0.5 mol/L FeSO₄当量对应野牡丹提取液质量浓度为55 μg/mL。结论 野牡丹的抗氧化能力与芦丁相近, 低于Vc。野牡丹的抗氧化活性在一定浓度范围内与黄酮的含量有较好的相关性。

关键词: 野牡丹; DPPH; FRAP; 总黄酮; 抗氧化活性

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)04-0317-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.006

Study on the antioxidant activity of extract from *Melastoma candidum*

ZHAO Xin¹, ZHANG Dong-qing¹, HUANG Rong-lin¹, XIAO Yu-ping¹, HUANG Bi-yun²

1. Department of Food and Bioengineering, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China

2. The Pharmaceutical Research Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China

Abstract: Objective To study the antioxidant activity of the extract from *Melastoma candidum*. **Methods** The antioxidant activity was observed and compared with the antioxidant capacities of Vc and rutin by two methods, namely, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. **Results** The extract from *M. candidum* had the high antioxidant activity, which was manifested in DPPH free radical scavenging activity and the ability to reduce ferric ions. The IC₅₀ (50% the initial DPPH-concentration) of the extract from *M. candidum* was 0.023 mg/mL. The concentration of 0.5 mol/L ferrous sulfate had the same reducing ability with the extract from *M. candidum* was 0.055 mg/mL. **Conclusion** *M. candidum* has the similar antioxidant activity with rutin, but less than Vc. The antioxidant capacity of *M. candidum* has closely correlated with the concentration of flavonoids in a certain range.

Key words: *Melastoma candidum* D.Don; DPPH; FRAP; flavonoids; antioxidant activity

人体产生的自由基及其诱导的氧化反应与多种疾病密切相关, 并可加速人体衰老。衰老始终对人类的健康构成重大威胁。研究发现^[1-2], 衰老程度与人体产生的自由基及其诱导的氧化反应密切相关。人体内的各种氧化反应可以导致机体产生氧化损伤, 诱发氧化应激, 继而导致各类疾病, 从而加速人的衰老。

近年来, 寻找和开发天然植物抗氧化剂, 消除氧自由基对机体的损害作用, 已逐渐成为研究热点, 我国中草药资源极其丰富, 是天然抗氧化剂的重要来源之一。野牡丹 *Melastoma candidum* D. Don 在华

南地区广泛存在, 其活性成分为多糖、黄酮类、氨基酸、脂肪族、甾体、酚类、常量和微量元素、色素等^[3], 临床多利用其清热解毒、利湿消肿等功效, 主治肠炎、痢疾等疾病^[4], 其中含量丰富的黄酮类化合物组分具有较高的抗氧化、抗衰老开发应用价值^[5], 但目前暂未有此方面的应用开发。

本文利用醇提结合超声浸提的方法提取野牡丹总黄酮, 以维生素C(Vc)和芦丁为对照, 采用自由基清除能力法(DPPH)和抗氧化剂还原能力法(FRAP)来评估野牡丹活性提取物的体外抗氧化活性, 为野牡丹的开发利用提供依据。

收稿日期: 2014-03-12

作者简介: 赵鑫(1982—), 男, 江苏高邮人, 博士, 讲师, 研究方向为中药现代化。Tel: (020)61230006 E-mail: zhaoxin.gy@gmail.com

*通信作者 黄碧云 Tel: (020)81340243 E-mail: guangyihby@126.com

1 仪器和试剂

VGT—103A 型超声波清洗器(深圳市威固特超声波科技开发有限公司);UV757C型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);PHS—3C 酸度计(上海佑科仪器公司);微量移液器(Eppendorf 公司)。

二苯代苦味酰基自由基(1, 1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, Tokyo Chemical Industry, 批号 U6GVH-HK); FRAP 工作液(300 mmol/L 醋酸盐缓冲液, 10 mmol/L TPTZ, 20 mmol/L FeCl₃, 临用时现配); TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-trizine, 萨恩化学技术有限公司, 批号 BI130025); Vc (中国医药集团上海化学试剂公司, 批号 20120628); 芦丁(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 11040302); 野牡丹提取液(自制)。

2 方法

2.1 野牡丹提取液总黄酮的测定

野牡丹提取液总黄酮的测定采用铝盐显色法^[6]。精密称取芦丁对照品 12.5 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用体积分数为 50% 甲醇溶液定容至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 0.125 mg/mL 的芦丁标准贮备液, 分别准确吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入 0.3 mL 质量分数为 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 静置 5 min 后, 加质量分数为 10% AlCl₃ 甲醇溶液 0.3 mL, 摇匀静置 5 min, 再加 1.0 mol/L NaOH 溶液 4.0 mL, 用 50% 甲醇定容至刻度, 此时芦丁的质量浓度依次为 12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 μg/mL, 摇匀静置 10 min, 采用试剂为空白参比, 在 200~800 nm 波长扫描, 选择最佳吸收峰波长, 并在此波长下绘制工作曲线。

称取 50 g 经烘干粉碎后过 50 目筛的野牡丹药材粗粉, 按液固体积比 5:1 加入 95% 乙醇, 水浴加热回流 1 h 后, 滤过, 收集滤液, 重复操作一次; 取滤渣按液固体积比 10:1 加入体积分数 50% 乙醇浸提过夜后超声波提取 1 h, 滤过, 收集滤液; 合并滤液, 减压真空浓缩到 200 mL, 得野牡丹提取液。吸取 0.1 mL 野牡丹提取液, 置于 10 mL 量瓶中, 按上述显色方法测定吸光度值, 代入芦丁标准曲线, 计算提取液总黄酮的量, 结果以芦丁当量/干材料表示, 单位为 mg/g。

2.2 DPPH 自由基法评估野牡丹的抗氧化活性

DPPH 自由基是一种稳定存在的有机自由基, 其乙醇溶液呈深紫色, 在特定波长处有强吸收, 当

加入抗氧化剂后吸收峰值下降, 下降程度直接反映样品清除自由基能力的大小^[7]。各物质对 DPPH• 的清除能力大小是其抗氧化能力强弱的评价指标之一, 可用清除率表示, 清除率高则抗氧化能力强。

2.2.1 最佳吸收波长的选择 分别将 Vc、芦丁、野牡丹提取液和 DPPH 自由基无水乙醇溶液混合, 待反应稳定后, 采用试剂空白作为参比, 在 200~800 nm 波长扫描, 选择最佳测定吸收波长。

2.2.2 DPPH 自由基与待测样品的紫外吸收 精密称取 5.0 mg DPPH, 采用无水乙醇定容至 100 mL, 配成质量浓度为 50 mg/L 的 DPPH 无水乙醇溶液作为标准贮备液, 本溶液需要临用时现配。

精密移取 50 mg/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 4.0 mL, 加入质量浓度分别为 5、10、20、40、60、80、100、200 μg/mL 野牡丹提取液(以总黄酮计)1.0 mL, 使得反应体系的终体积为 5 mL, 充分混匀, 记录加入野牡丹提取液后 1、3、5、10、15、20、25、30 min 时在波长 517 nm 处测定吸光度值, 同时平行测定空白对照管和试剂空白管的吸光度值, 按下式计算对野牡丹提取液对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_0$$

A₀ 为 4.0 mL 50 mg/L DPPH•乙醇溶液+1.0 mL 空白试剂的吸光度值; A_i 为 4.0 mL 50 mg/L DPPH•乙醇溶液+1.0 mL 样液的吸光度值; A_j 为 4.0 mL 无水乙醇溶液+1.0 mL 样液的吸光度值。

分别配制质量浓度为 5、10、20、40、60、80、100、200 μg/mL 芦丁溶液和 Vc 溶液作为对照检测液, 按上述方法分别测定 8 个浓度下的两种对照检测液在不同时间对 DPPH 自由基的清除率。

为了更好的比较三者的抗氧化能力, 以半数清除浓度(IC₅₀)来表征其清除能力大小, 将 8 个不同浓度的样品溶液测得的 DPPH 自由基的清除率采用非线性回归分析得出各自的 IC₅₀ 值, IC₅₀ 值越小, 表示其清除自由基的能力越强^[8]。

2.3 铁还原/抗氧化能力分析法评估野牡丹的抗氧化活性

采用铁还原/抗氧化能力(Ferric reducing/antioxidant power, FRAP)分析法评估所选野牡丹提取液的总抗氧化活性^[9]。该分析方法的原理是抗氧化物质将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺, Fe²⁺与三吡啶三吡嗪(TPTZ)结合生成蓝色络合物, 该化合物在 593 nm 处有最大吸收, 吸光度值的大小反应了该抗氧化剂的还原能力大小。

2.3.1 FRAP 工作液的配制 分别配制 300 mmol/L 的醋酸盐缓冲溶液 (pH 3.6)、10 mmol/L 的 TPTZ 溶液和 20 mmol/L 的 FeCl_3 溶液, 将上述 3 种溶液按体积比 10:1:1 混合, 并水浴加热至 37 °C, 备用。

2.3.2 铁标准溶液的配制 精密称取 0.027 81 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 粉末, 用超纯水溶解, 转移至 100 mL 量瓶中, 配成浓度为 1 mmol/L 的贮备液。分别精密移取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 配制成浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的铁标准溶液, 备用。

2.3.3 抗氧化活性的评估 精密移取上述系列溶液铁标准溶液各 0.1 mL, 加入 FRAP 工作液 3 mL, 混匀 37 °C 反应完全, 使用超纯水作空白, 于 400~800 nm 扫描得到最大吸收波长, 于此波长处测定各吸光度值, 绘制 FeSO_4 的标准曲线。

分别配制质量浓度为 5、10、20、40、60、80、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的野牡丹提取液、芦丁溶液和 Vc 溶液作为 FRAP 检测液。分别量取检测液 0.1 mL, 加入 3 mL FRAP 工作液, 混匀后使用超纯水作空白, 在最大吸收波长处测定其在 37 °C 下反应不同时间的吸光度值, 代入 FeSO_4 标准曲线求成当量 FeSO_4 值, 以对不同浓度的不同样品对 Fe^{3+} 的还原能力随时间的变化关系进行比较研究, 样品的当量 FeSO_4 值越大表示其还原能力越强。

3 结果

3.1 野牡丹提取液总黄酮的测定

野牡丹提取液总黄酮的测定采用硝酸铝显色法, 以试剂参比空白, 在 200~800 nm 扫描发现在 510 nm 处有最大吸收, 在该波长下测定吸光度无杂质干扰。测定芦丁对照品系列溶液的吸光度值, 得回归方程为 $A = 13.04C + 0.0122$, $R^2 = 0.9992$ 。测定野牡丹提取液的吸光度, 根据标准曲线及稀释倍数测得野牡丹药材总黄酮提取率为 9.72 mg/g。

3.2 最佳吸收波长的选择

Vc、芦丁、野牡丹提取液和 DPPH 自由基无水乙醇溶液混合后经紫外扫描发现, DPPH 自由基溶液的最大吸收波长在 327 nm 和 517 nm 附近。而野牡丹提取液、芦丁以及 Vc 溶液在 517 nm 处基本没有吸收, 不会干扰 DPPH 自由基溶液在 517 nm 处吸收度的检测。因此本实验选择 517 nm 处的吸光度值来表征 DPPH 自由基的变化。

3.3 野牡丹提取液的抗 DPPH 自由基能力

不同浓度的野牡丹提取液 (以总黄酮计) 对于 DPPH 自由基的清除率随时间变化见图 1。可以看出, 低质量浓度时 (总黄酮量为 5~60 $\mu\text{g/mL}$) 的野牡丹提取液, DPPH 自由基清除率在 20 min 左右基本达到稳定, 随着野牡丹提取液质量浓度的增加, DPPH 自由基的清除率也逐渐提高, 加入高质量浓度的野牡丹提取液时 (总黄酮量为 60 $\mu\text{g/mL}$ 以上), DPPH 清除率在 5 min 左右达到稳定, 极高质量浓度时 1 min 左右就能达到稳定, 达到稳定状态时 DPPH 自由基的清除率最高为 83.80%。

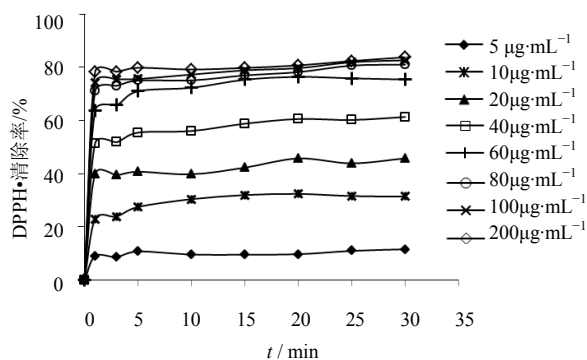


图1 野牡丹提取液对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1 Effect of extract from *M. candidum* on DPPH scavenging activity

芦丁溶液加入到 DPPH 自由基溶液中, 其对于 DPPH 自由基的清除率随时间变化见图 2, 低质量浓度 (5~60 $\mu\text{g/mL}$) 时, 同样需要约 20 min 左右 DPPH 清除率才不会出现大幅度变化, 高质量浓度 (80~200 $\mu\text{g/mL}$) 时, DPPH 自由基清除率在 5 min 左右也能达到稳定, 达到稳定状态时 DPPH 自由基的清除率最高为 81.67%。

Vc 属于一种快速抗氧化剂, 清除自由基的速度很快, 向 DPPH 自由基溶液中加入 Vc 后 DPPH 自由基的清除率随时间变化见图 3, 可以看出, Vc 加入到 DPPH 自由基溶液中后, DPPH 自由基清除率迅速上升, 并且很快就可以达到稳定, 即使是质量浓度低至 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 也能够 1 min 左右即达到稳定, 随着时间的延长 DPPH 自由基清除率变化很小。且 Vc 加入量从 5 $\mu\text{g/mL}$ 增大到 60 $\mu\text{g/mL}$ 时, DPPH 自由基清除率升高的幅度很大, 继续提高 Vc 的浓度, DPPH 自由基清除率升高的幅度无明显变化。

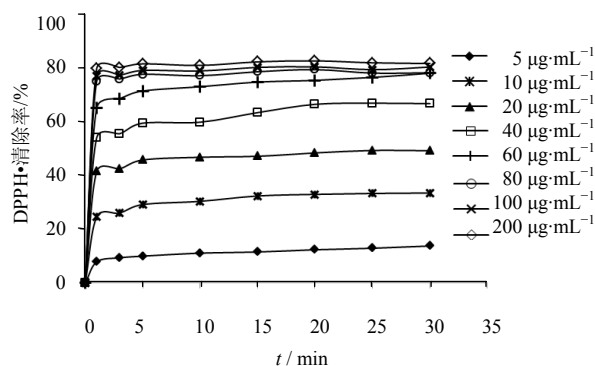


图2 芦丁对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 2 Effect of rutin on DPPH-scavenging activity

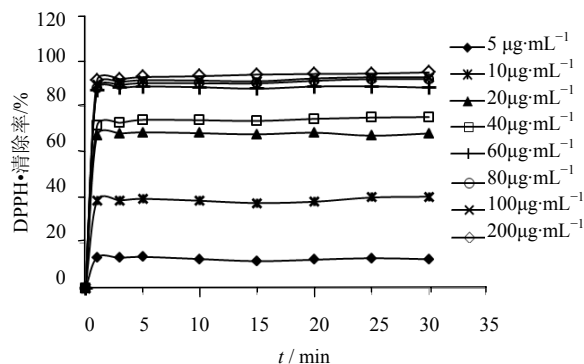


图3 Vc 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 3 Effect of Vc on DPPH-scavenging activity

达到稳态 (20 min) 时 Vc、芦丁、野牡丹提取液等 3 种抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除作用见图 4, 从图中可以看出, 3 种抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除作用都随着质量浓度升高而逐渐增强, 在质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 野牡丹提取液等 3 种抗氧化剂对 DPPH 自由基清除率均在 80% 以上, 具有较强的自由基清除能力, IC_{50} 值见表 1。

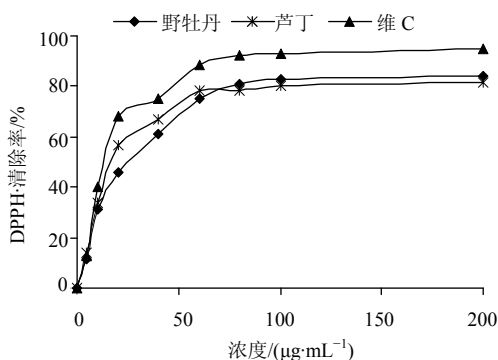


图4 3种抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除曲线

Fig. 4 Curves of scavenging effects of three antioxidants on DPPH·

表1 3种抗氧化剂对 DPPH 自由基清除能力比较

Table 1 Comparison of three antioxidants with DPPH-scavenging capacity

样品	清除率/%	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
Vc	92.96	14.06
芦丁	80.36	21.42
野牡丹提取液	82.65	23.71

表 1 中所示的 IC_{50} 值越小, 样品清除自由基的能力越强。各样品清除 DPPH 自由基的能力为: $\text{Vc} > \text{芦丁} > \text{野牡丹提取液}$; 质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 最终自由基清除率大小为 $\text{Vc} > \text{野牡丹提取液} > \text{芦丁}$, 说明野牡丹提取液的抗氧化能力和芦丁相当。

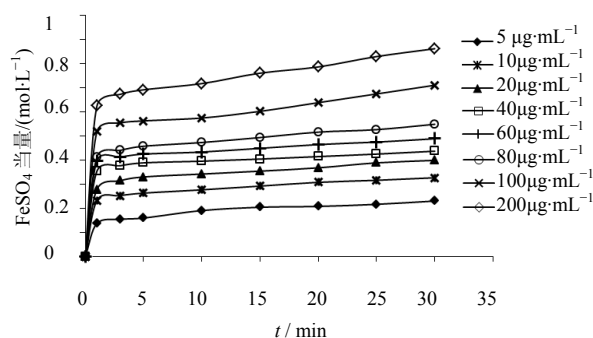
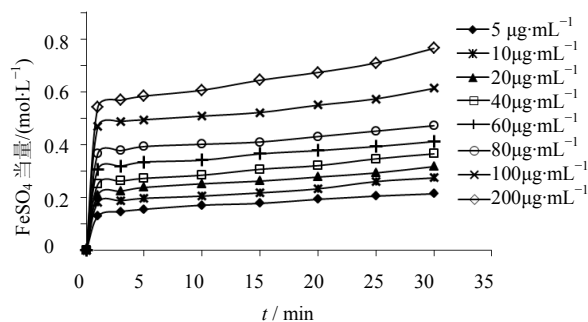
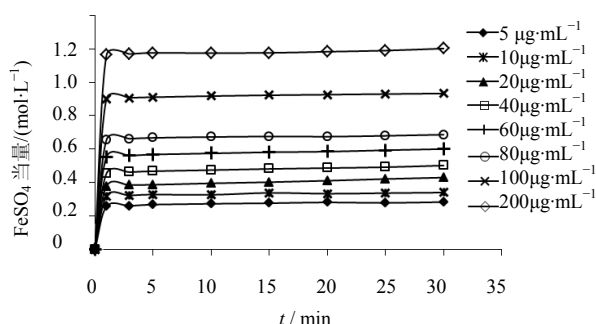
将低质量浓度的野牡丹提取液、芦丁溶液 (质量浓度为 10~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别与 DPPH 自由基的清除率在达到稳态后 (20 min 的数据) 进行线性回归, 回归方程分别为 $\text{SR} = 876.49C + 24.28$, $R^2 = 0.9914$ (野牡丹提取液), 和 $\text{SR} = 886.71C + 27.47$, $R^2 = 0.9733$ (芦丁), 说明两种样品对 DPPH 自由基的清除率分别与总黄酮和芦丁的质量浓度具有一定的相关性。

3.4 FRAP 法评估野牡丹的抗氧化活性

铁标准溶液加入 FRAP 工作液显色后, 最大吸收波长为 593 nm, 于此波长测定系列铁标准溶液的吸光度值, 得 FeSO_4 标准溶液的标准曲线为 $A = 0.5837C + 0.1216$, $R^2 = 0.9996$, 结果线性良好, 方法可靠。

不同浓度的野牡丹提取液 (浓度以总黄酮计)、芦丁溶液和 Vc 溶液对 Fe^{3+} 的还原能力随时间的变化见图 5~7。比较研究发现, 当野牡丹提取液和芦丁加入到 FRAP 工作液中后, FeSO_4 当量随样品浓度的增加而增加, 不同质量浓度的样品待测液在 30 min 后仍有升高的趋势, 并未达到稳定平衡状态, 单位时间内低浓度的野牡丹提取液对应的 FeSO_4 当量升高幅度与芦丁相近, 高浓度的野牡丹提取液对应的 FeSO_4 当量升高幅度明显高于芦丁, 说明野牡丹提取液的抗氧化能力可能优于芦丁。而 Vc 为快速抗氧化剂, 向 FRAP 工作液中加入不同浓度的 Vc 溶液后, FeSO_4 当量都迅速增大, 1 min 即迅速达到稳定, 随着时间的延长 FeSO_4 当量变化不大, 而增加 Vc 的加入量, 当量 FeSO_4 明显升高。

野牡丹提取液、芦丁溶液对铁离子的还原能力与质量浓度 (10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 也呈良好的量效关系,

图5 不同浓度的野牡丹提取液还原 Fe^{3+} 能力曲线图Fig. 5 Curves of Fe^{3+} reducing power of extract from *M. candidum* at different concentration图6 不同浓度的芦丁溶液还原 Fe^{3+} 能力曲线图Fig. 6 Curves of Fe^{3+} reducing power of rutin at different concentration图7 不同浓度的Vc溶液还原 Fe^{3+} 能力曲线图Fig. 7 Curves of Fe^{3+} reducing power of Vc at different concentration

回归得到的线性方程分别为: $Y=6.0361X+0.1679$, $R^2=0.9926$ (野牡丹提取液), $Y=5.3615X+0.1208$, $R^2=0.9939$ (芦丁)。

以对应 0.5 mol/L FeSO_4 当量对应的各样品质量浓度来比较各个样品的相对抗氧化能力, 结果分别为: 野牡丹提取液中总黄酮的质量浓度 $55 \text{ } \mu\text{g/mL}$;

芦丁质量浓度 $70 \text{ } \mu\text{g/mL}$; Vc 的质量浓度 $37 \text{ } \mu\text{g/mL}$; 各个样品的相对抗氧化能力为: $\text{Vc} > \text{野牡丹提取液} > \text{芦丁}$ 。

4 结论

本实验采用 DPPH 自由基清除率和 FRAP 模型, 以 Vc 和芦丁作为比较对照, 测定了野牡丹提取液的抗氧化活性。发现野牡丹提取液对 DPPH 自由基有较好的清除率, 对 Fe^{3+} 具有较好的还原能力, 其抗氧化活性在一定浓度范围内与黄酮的含量具有较好的相关性。野牡丹药材强的抗氧化能力可能与其含有较高的黄酮类成分有关, 野牡丹药材具有的强抗氧化能力, 有进一步研究和开发的价值。

参考文献

- [1] Perera R M, Bardeesy N. Cancer: when antioxidants are bad [J]. *Nature*, 2011, 475(7354): 43-44.
- [2] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 44-84.
- [3] Joffry S M, Yob N, Rofiee M S, *et al.* *Melastoma malabathricum* (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: a review [J]. *Evidence-based Compl Altmed*, 2012, 9(1): 1-48.
- [4] 国家医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 第5卷. 上海: 上海科技出版社, 20005.
- [5] Lee M H, Lin R D, Shen L Y, *et al.* Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in *Melastoma candidum* D. Don [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(11): 5551-5555.
- [6] Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. *Food Chem*, 1999, 64: 555-559.
- [7] Chen Y, Wang M F, Rosen R T, *et al.* 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical scavenging active components from *Polygo-num multiflorum* Thunb. [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 2226-2228.
- [8] Mishra K, Ojha H, Chaudhury N K, *et al.* Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results [J]. *Food Chem*, 2012, 130(4): 1036-1043.
- [9] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239: 70-76.