

滇西北地区车前草抗氧化活性研究

苏林军^{1,4}, 杨耀权^{1,4}, 杨晓燕^{1,2,3,4}, 余容^{1,4*}¹大理大学 天然抗氧化剂和抗氧化炎症研究院;²中国三江并流区域生物多样性协同创新中心;³大理大学 三江并流区域生物多样性保护与利用云南省创新团队;⁴大理大学 东喜马拉雅研究院,大理 671003

摘要:为探究滇西北地区所产车前草的抗氧化活性,本研究分别采用 DPPH 自由基清除率法、ABTS 自由基清除率法以及 FRAP 总还原能力法对其石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、95% 乙醇提取物、水提取物的抗氧化活性进行了评价。结果显示,四种提取物均具有一定的抗氧化活性。其中,95% 乙醇提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除效果最好(IC_{50} 分别为 116.00 mg/L 和 25.00 mg/L,为 Vc 的 1.2% 和 5%),水提取物的总抗氧化还原能力最强(浓度为 1.00 g/L 时,FRAP 值为 3.42 ± 0.02)。研究表明,滇西北地区所产车前草具有体外抗氧化活性,且高于其他产地,可进一步研究确认其抗氧化机制,为滇西北地区天然抗氧化产物开发提供理论依据。

关键词:车前草;滇西北;体外抗氧化;自由基清除率;氧化还原能力

中图分类号:Q819

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0057-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.009

Study on antioxidant activity of plantain grown in northwestern Yunnan

SU Lin-jun^{1,4}, YANG Yao-quan^{1,4}, YANG Xiao-yan^{1,2,3,4}, SHE Rong^{1,4*}¹Institute of Natural Antioxidants and Antioxidant Inflammation, Dali University;²Collaborative Innovation Center for Biodiversity in Three Parallel Rivers of China;³Yunnan Provincial Innovation Team for Biodiversity Conservation and Utilization in Three Parallel Rivers, Dali University;⁴Institute of Eastern-Himalaya Biodiversity Research, Dali University, Dali 671003, China

Abstract: In order to explore the antioxidant activity of plantain grown in northwestern Yunnan, this study used DPPH free radical scavenging rate method, ABTS free radical scavenging rate method and FRAP total reducing ability method to evaluate the antioxidant activity of its petroleum ether extract, ethyl acetate extract, 95% ethanol extract and water extract. The results show that the four extracts all have certain antioxidant activity. Among them, 95% ethanol extract has the best scavenging effect on DPPH and ABTS free radicals (IC_{50} is 116.00 mg/L and 25.00 mg/L which was 1.2% and 5% of Vc), and the total reduction ability of water extract is the strongest (when the concentration is 1.00 g/L, the FRAP value is 3.42 ± 0.02). Studies have shown that the plantain grown in northwestern Yunnan has *in vitro* antioxidant activity, and is higher than that grown in other areas. Further research is needed to confirm its antioxidant mechanism and provide a theoretical basis for the development of natural antioxidant grown in northwestern Yunnan.

Key words: plantain; northwest Yunnan; antioxidant *in vitro*; free radical scavenging rate; redox capacity

近年来,随着我国人口数量的急剧增加,人口老龄化越来越严重,老年性疾病也急剧增加,主要有高血压病、冠心病、糖尿病、高脂血症等。研究表明,体内自由基产生过量是引起这类疾病的重要因素。在病理状态下,氧自由基的慢性或急性过度产生可诱发或加重老年性疾病,并对蛋白质和核酸造成不良

影响。抗氧化物质是一类可以减少过量自由基,从而预防和辅助治疗老年性疾病的物质。因此,在老年性疾病的预防和辅助治疗中有广泛应用^[1]。但是,目前市面上安全、稳定的抗氧化药物非常有限,有必要进一步开发新型抗氧化药物,而对植物所含抗氧化活性物质的筛选是一个非常前景方向^[2,3]。

我国地幅辽阔,尤其是在滇西北这种亚热带地区,却表现出北温带气候的独特气候条件,加上高海拔的地理位置,使在这里的植物含有特异的活性产

收稿日期:2022-02-14 接受日期:2022-06-20

基金项目:云南省科技厅科技计划(202101BA070001-115);第二次青藏高原综合科学考察研究资助项目(2019QZKK0402)

* 通信作者 Tel:86-017302812076; E-mail:sher@eastern-himalaya.cn

物。从古至今,人们对该地区中草药的研究从未停歇,但在滇西北地区分布极其广泛的车前草,对其进行抗氧化活性的研究却很少。车前草有抗菌、利尿、抗氧化等作用^[4]。目前以车前草为原料加工各种保健品的方式越来越多,早在2008年就已经有人将车前草与白花蛇舌草混合制成保健药品^[5-7]。车前草在治疗糖尿病上也作为其药引辅助治疗^[8],种种迹象表明,车前草是具有一定的抗氧化活性的。另一方面,对植物抗氧化活性物质进行筛选的方法有很多,但目前的研究大多局限于用单一萃取剂提取有效成分,忽略了不同萃取剂萃取获得成分不同,因而其抗氧化活性也会不同的问题。

基于此,本研究以滇西北出产车前草为研究对象,采用不同萃取剂萃取其有效成分,分别进行DPPH自由基、ABTS自由基和FRAP法铁离子还原能力的测定,以探究滇西北地区车前草的抗氧化性以及不同的萃取物对车前草抗氧化活性测定的影响,为车前草在抗氧化炎症上的作用的研究提供理论基础。研究结果无论是对发展地方经济,还是支撑国家大健康大卫生战略均有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

车前草自采于云南省丽江市郊外的山区,经大理大学东喜玛拉雅研究院李继红高级实验师鉴定为车前科车前属植物车前 *Plantago asiatica* L. 全草。

1.1.2 试剂

石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、95%乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH,分析纯,梯希爱化成工业发展有限公司);2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);过二硫酸钾、无水乙酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)等。

1.1.3 仪器

超声清洗机;旋转蒸发仪;紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司722N型);超纯制水机;冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司SCI-ENTZ-10N型);恒温水浴锅;分析天平(奥豪斯仪器有限公司PX224ZH型)。

1.2 方法

1.2.1 前处理

称取干燥粉碎的车前草50 g,加入500 mL石油

醚,60%超声强度,20℃超声1 h,浸提一次。超声结束后取上清液一层滤纸抽滤后,将滤液倒入旋转蒸发瓶中,40℃,40 r/min旋蒸得石油醚提取物。将滤渣40℃烘干后,依照上述方法,依次加入乙酸乙酯、95%乙醇,以及蒸馏水进行提取。旋蒸后的石油醚、乙酸乙酯、95%乙醇提取产物用无水乙醇洗出后晾干,4℃保存;蒸馏水提取物加入少许蒸馏水溶出,冻干,4℃保存^[9]。最终分别获得石油醚提取物(EPEE)、乙酸乙酯提取物(EAE)、95%乙醇提取物(EAE)和蒸馏水提取物(EDWE)。

1.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定

准确称取DPPH 1.00 g,用无水乙醇配制1 g/L DPPH母液,后用无水乙醇稀释为50 mg/L的DPPH工作液。准确称取提取物干粉,并以乙醇(或水)为溶剂,配制成不同质量浓度(4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 g/L)的样品作为试验组,取样品溶液2 mL,加入同体积DPPH工作液,混匀,37℃恒温水浴30 min。同时,以样品溶液加无水乙醇作为对照组,DPPH加无水乙醇作为空白组。反应结束后于517 nm处测量吸光度,每个浓度梯度重复6次^[10-12]。

1.2.3 ABTS 自由基清除能力的测定

准确称取ABTS 0.3843 g,加入蒸馏水定容至100 mL,配成7 mmol/L的ABTS溶液;准确称取过二硫酸钾0.1324 g,加入蒸馏水定容至100 mL,配成4.9 mmol/L的过二硫酸钾溶液,以1:1比例混合,避光反应16 h,后用无水乙醇稀释至吸光度为 0.7 ± 0.002 的ABTS工作液。准确称取提取物干粉,并以乙醇(或水)为溶剂,配制成不同质量浓度(4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 g/L)的样品作为试验组,取样品溶液2 mL,加入同体积ABTS工作液,混匀,避光反应6 min,以样品溶液加无水乙醇作为对照组;ABTS加无水乙醇作为空白组,在734 nm处测量吸光值,每个浓度梯度重复6次^[13,14]。

1.2.4 FRAP 法测定总氧化还原能力测定

准确称取TPTZ 3.9100 g用40 mmol/L的盐酸配制10 mmol/L的TPTZ溶液;准确称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.8111 g用蒸馏水配制为20 mmol/L FeCl_3 的溶液;准确称取1.8200 g无水乙酸钠、量取16 mL冰乙酸,用蒸馏水定容至1000 mL,配置成0.3 mol/L, pH 3.6的醋酸缓冲液,TPTZ溶液: FeCl_3 溶液: 醋酸缓冲液以1:1:10比例混合配置成FRAP工作液。称取提取物干粉,并以乙醇(或水)为溶

剂,配制成不同质量浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 g/L)的样品作为试验组,取样品溶液0.15 mL,加入3.60 mL FRAP工作液,混匀,37℃恒温水浴10 min,以样品溶液加无水乙醇作为对照组,在593 nm处测量吸光值,每个浓度梯度重复6次。并用去离子水配制硫酸亚铁溶液(浓度为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 mmol/L),按上述方法测定标准溶液的吸光度,再以吸光度为纵坐标,硫酸亚铁浓度为横坐标绘制标准曲线^[15,16]。

1.2.5 结果计算

自由基清除率计算公式:清除率 = $[1 - (A_1 - A_i) \div A_0] \times 100\%$,式中, A_1 :样品和DPPH(ABTS)混合液的吸光值; A_i :对照组吸光值; A_0 :空白组吸光值。

FRAP值计算公式:FRAP值 = $(B_1 - B_i) / B_{\text{标}}$,式中, B_1 :样品和FRAP混合液的吸光值; B_i :对照组吸光值; $B_{\text{标}}$:0.1 mmol/L标准硫酸亚铁加FRAP混合液的吸光值。

比活性计算公式:比活性 = $IC_{50}(Vc) / IC_{50}(\text{样品}) \times 100\%$,式中, IC_{50} :根据车前草提取物DPPH/ABTS自由基清除率与浓度曲线所得回归方程,计算得到车前草提取物将自由基原始质量浓度减少至50%时的使用浓度。

1.2.6 数据分析

数据采用Excel 2016软件进行数据统计,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据运用GraphPad Prism 7.00统计软件进行 IC_{50} 评估分析。

2 结果

2.1 DPPH自由基清除能力

四种提取物对DPPH自由基都有一定的清除能力,其中,95%乙醇提取物对DPPH自由基的清除能力最高($IC_{50} = 116.00$ mg/L,比活性为1.267%),其次是水提取物($IC_{50} = 149.00$ mg/L,比活性为0.986%),再次是乙酸乙酯提取物($IC_{50} = 226.00$ mg/L,比活性为0.650%),效果最差的是石油醚提取物,其 IC_{50} 为756.00 mg/L,比活性为0.194%(见图1)。

2.2 ABTS自由基清除作用

四种提取物对ABTS自由基都有一定的清除能力,其中,95%乙醇提取物对ABTS自由基的清除能力最高($IC_{50} = 25.00$ mg/L,比活性为5.880%),其次是乙酸乙酯提取物($IC_{50} = 65.00$ mg/L,比活性为2.262%),再次是水提取物($IC_{50} = 81.00$ mg/L,比

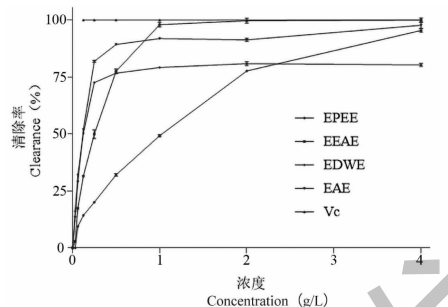


图1 DPPH自由基清除率

Fig. 1 The DPPH free radical clearance rate

活性为1.815%),效果最差的是石油醚提取物,其 IC_{50} 为401.00 mg/L,比活性为0.366%(见图2)。

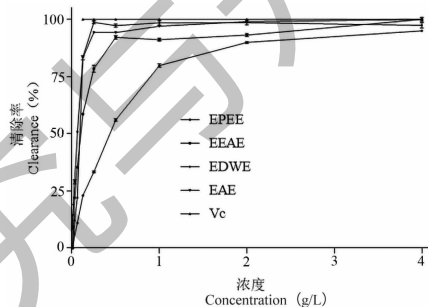


图2 ABTS自由基清除率

Fig. 2 The ABTS free radical clearance rate

2.3 FRAP法总还原能力的测定

四种提取物对铁离子都有一定的还原能力,在浓度为1.00 g/L时,水提取物对铁离子的还原能力最强(3.42 ± 0.02),其次是95%乙醇提取物(2.58 ± 0.01),再次是石油醚提取物(1.75 ± 0.01),效果最差的是乙酸乙酯提取物(1.51 ± 0.02)(见图3)。

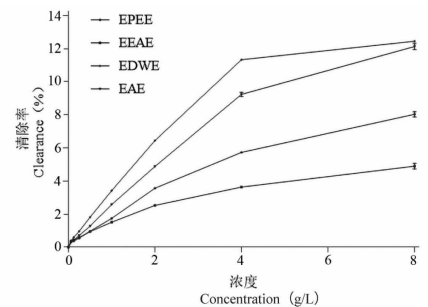


图3 FRAP总还原能力

Fig. 3 Total FRAP reduction capacity

3 讨论与结论

车前草富含各种天然抗氧化剂活性成分,其中萜类、甾体等大环、稠环化合物极性小,易溶于石油醚、乙酸乙酯等亲脂性溶剂,而糖、苷等极性较大物

质易溶于水、乙醇等溶剂中^[17]。因此,本实验分别采用石油醚、乙酸乙酯、95%乙醇、水四种试剂进行提取,同时以超声辅助萃取,以提高提取物浓度,达到富集化学分子的效果,利于后期抗氧化能力的测定。

不同生境造就了植物不同的生物特性,滇西北地区地处亚热带却表现出温带的气候条件和高海拔的地理位置,使得在这里生长的植物与其他地区相比拥有更多的生物特性,车前草作为滇西北地区广泛分布的植物,也受其生境的影响,从而导致车前草中含有更多特殊的萜类、甾体、糖、苷等化合物^[18-21]。对滇西北所产车前草抗氧化活性潜能进行评估,分析结果显示,4种不同极性有机溶剂提取所得产物均具有抗氧化能力。据研究表明,产自华东、华南地区的车前草对 DPPH 和 ABTS 自由基清除的 IC₅₀ 分别为 652.65 mg/L 和 107.93 mg/L^[22,23],而本研究对象滇西北地区所产车前草对自由基清除的 IC₅₀ 分别为 116.00 mg/L 和 25.00 mg/L,其抗氧化效果明显高于其他生境的车前草,说明滇西北地区车前草拥有更好的研究价值与药用价值。因此,在未来研究中将进一步采用高效液相色谱分离纯化抗氧化活性较好的提取物中的有效成分,并通过细胞学试验进一步验证其抗氧化活性及安全性,能有效地探究滇西北地区所产车前草的天然抗氧化剂开发潜能。

参考文献

- Tan PX, Ye T, Liu XX, et al. Research advances in antioxidant composition of botanical extracts and their action mechanisms[J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(15): 288-292.
- Zhao NN, Zhu XR, Li DH. Study on the correlation of polyphenols, flavonoids and polysaccharides contents and antioxidant activities in korean pine shell[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2017, 33(12): 44-49.
- Zhao NW, Ding YF, Yang YT. Overview of ethnic medicine research and chinese herbal medicine resources in Xinjiang, Yunnan and Guizhou[J]. J. Guizhou Univ Tradit Chin Med(贵阳中医学院学报), 2019, 41(2): 101-103.
- Wang Q, Tao HQ. Progress in the pharmacological effects of plantain[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2017, 17(A2): 72.
- Zhou SX, Lin YR, Wang DL, et al. Preparation of a compound healthy beverage from asiatic plantain and *Agkistrodon acutus* tongue grass[J]. Jiangxi Chem Ind(江西化工), 2008(3): 57-59.
- Xia DZ, Chen J, Zou ZD. Study on development and antioxidant effects of compound health beverage made from *Portulaca oleracea* L. and *Plantago depressa* Willd[J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(4): 118-122.
- Pasanda IM, Suryanto E, Djarkasi G. Formulation of composite flour with antioxidant from goroho plantain flour (*Musa Acuminata*, sp) and yellow pumpkin flour (*Cucurbita moschata*) and its application on biscuit kaking[J]. Ind Food and Nut Pro, 2019, 16(1): 15-21.
- Zhang XQ, Qu W, Liang JY. Research progresses on chemical constituents and pharmacological activities of *Plantago* spp[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2013, 25(11): 1-8.
- Xu RR. Study on the antibacterial activity and stability of *Plantago asiatica* extract of north China[J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2020, 31(3): 37-42.
- Sun T, Fu XY, Zhang B, et al. Measurement of the antiradical efficiency of proanthocyanidin in seabuckthorn seed by the DPPH assay[J]. J Ningxia Med Univ(宁夏医科大学学报), 2009, 31(1): 26-28.
- Yan QP, Zheng J, Zheng Y, et al. Antioxidant activity of polyphenol from asiatic plantain[J]. Chin J Spectrosc Lab(光谱实验室), 2012, 29: 2739-2742.
- Zhang Y, Tang QY, Dai J, et al. Study on the preparation of flavonoids extracted from mulberry leaves and its anti-oxidative activity *in vitro* [J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2020, 31(9): 47-52.
- Jiang BL, Wang ZH, Zhang DJ, et al. Determination of main bioactive compounds and comparison of antioxidant capacity of four cultivars of citrus peels[J]. J Fuyang Nor Univ: Nat Sci(阜阳师范大学学报: 自然科学版), 2021, 38(1): 51-56.
- Wang XY. Study on the antioxidant activity and methods of detection in wine[D]. Yangling: Northwest A&F University(西北农林科技大学), 2008.
- Benzie I FF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP Assay[J]. Anal biochem., 1996, 239(1): 70-76.
- Han Y. Study on the antioxidant activity and polyphenols ingredient about five species of fruit drugs of Rosaceae[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine(安徽中医药大学), 2016.
- Cheng YT, Fan JZ, Zhang CZ, et al. Study on the natural antioxidant activity of bamboo fungus[J]. Edible Fungi(食用菌), 2021, 43(5): 8-11.
- Zhu JF, Xia JB, Lu ZH, et al. Growth, physiological and biochemical characteristics of *Tamarix chinensis* seedlings under salt-drought intercross stress[J]. Acta Bot Bor-Occid Sin(西

- 北植物学报),2012,32:124-130.
- 19 Tang SH, Yang HJ, Huang LJ. Discuss on effect of physical environmental factors on nature of Chinese materia medica [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2010,35:126-128.
- 20 Xia Y. Discussion on distribution law of medicinal plant *Plantago depressa* Willd[J]. Forest Invest Design(林业勘察设计),2020,49(2):100-102.
- 21 Liu LF. Study on chemical constituents and biological activities of *Juniperus przewalskii* at different altitudes[D]. Yan-gling:Northwest A&F University(西北农林科技大学),2019.
- 22 Wu Q, Huang J, Luo LX, et al. Studies on the antioxidant activity of extracts of 15 Chinese medicinal herbs[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2006,6(1):284-289.
- 23 Xia DZ, Liu JE, Chen PP. The scavenging activities of total flavonoids from *Plantago asiatica* Linn. on free radicals and its protective effects on oxidative damage in mice[J]. Bull Sci Technol(科技通报),2009,25:792-797.

(上接第98页)

- 6 Sun C, Sun WH, Bao X, et al. Determination and absolute bioavailability of astragaloside in rat plasma[J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志),2021,31:1300-1302.
- 7 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部). Beijing:China Medical Science Press,2015:302.
- 8 Guo ZR. Strategy of molecular drug design: activity and drug-gability[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2010,45:539-547.
- 9 Song L, Ping QN. Study on the stability of 5-aminosalicylyl-glycine in the gastrointestinal tract [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志),2003,24(6):294-296.