

罗汉果不同溶剂提取物抗氧化及清除活性氧自由基作用

李海云¹, 王秀丽¹, 潘英明², 李文兰¹

(1. 桂林工学院 材料与化学工程系, 广西 桂林 541004; 2. 广西师范大学 化学化工学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 以水、甲醇、乙醇和乙酸乙酯为溶剂, 对罗汉果干果进行提取, 分别采用磷钼酸铵体系、邻苯三酚自氧化体系、Fenton 反应体系和卵黄脂质过氧化体系测定各种提取物的总抗氧化性能、超氧阴离子自由基和羟基自由基清除性能及其抗脂质过氧化作用。结果表明, 四种溶剂提取物均具有较强的抗氧化性和活性氧自由基清除性能, 其能力的大小顺序为: 乙酸乙酯提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物 > 乙醇提取物。

关键词: 罗汉果; 总抗氧化性; 超氧阴离子自由基; 羟基自由基; 脂质过氧化

中图分类号: Q946.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0698-05

Antioxidant and activated oxygen free radical scavenging activities of different extract from *Siraitia grosvenorii*

LI Hai-Yun¹, WANG Xiu-Li¹, PAN Ying-Ming², LI Wen-Lan¹

(1. Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The antioxidant and radical scavenging activities of water extract, methanol extract, ethanol extract and ethyl acetate extract from dried fruit of *Siraitia grosvenorii* were investigated in present study, employing various methods established *in vitro* systems, such as the total antioxidant capacity measured by phosphomolybdenum method, scavenging activities towards superoxide anion radical with auto-oxidation of pyrogallol method, scavenging activities towards hydroxyl radical with fenton reaction, and antilipoperoxidation activities measured by method of peroxidation of egg lipid. The results showed that all the extracts exhibited antioxidant and radical scavenging activities at different magnitudes of potency. The decreasing order of antioxidant and radical scavenging activities among the extracts assayed through all the four methods were found to be ethyl acetate extract > water extract > methanol extract > ethanol extract. Results of this study show that extracts of *S. grosvenorii* might be valuable antioxidant natural sources and seem to be applicable in both healthy medicine and foods.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; total antioxidant capacity; superoxide anion radical; hydroxyl radical; lipid peroxidation

随着自由基学说的创立和自由基医学研究的深入, 人们越来越关注各种自由基对机体造成的种种损伤, 其中与人体关系最密切的是活性氧自由基。

活性氧自由基是组织内氧代谢的产物, 包括超氧阴离子自由基、羟基自由基、单线态氧和过氧化氢等 (Grisham 等, 1986)。研究已经证实, 衰老、恶性肿

收稿日期: 2006-07-10 修回日期: 2006-09-05

基金项目: 桂林工学院青年教师扶持基金 [Supported by Young Teachers Foundation of Guilin University of Technology]

作者简介: 李海云 (1975-), 男, 江西信丰人, 硕士, 副教授, 研究方向为天然产物研究开发, (E-mail) haiyunli@glite.edu.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence)

瘤、动脉粥样硬化、糖尿病、某些自身免疫性疾病、肺气肿、白内障等许多疾病都与活性氧自由基有关(Halliwell, 1994; Pincemail, 1995; Dreher & Junod, 1996; Oberley TD & Oberley LW, 1997; Maxwell, 1997)。当自由基代谢失调时,对机体适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物,可以改善以上状况。化学合成的抗氧化剂由于其潜在的毒副作用,随着人们健康意识的增强而逐渐受到排斥和抵制。因此,从自然界中寻找和挖掘对活性氧自由基具有较强清除作用的天然植物具有重要意义。近十几年来,关于天然植物提取物抗氧化和清除活性氧自由基的作用开始得到众多研究者的重视(熊皓平等, 2001; 沈齐英等, 2001; Racková 等, 2004; 耿慧君等, 2005; 张海容, 2005; 莫晓燕等, 2005; ílhami 等, 2005; 栾萍等, 2006)。广西著名特产罗汉果在广西民间的药用历史已有 300 多年,其性凉味甘、无毒,有润肺止咳、凉血、润肠通便的功效,是家用良药。目前对罗汉果的研究主要集中在其化学成分的提取、分离和鉴定等(林岩香等, 1997),对其药理研究主要有罗汉果甜苷的祛痰、镇咳、平喘、抗炎镇痛、抑菌作用及其对免疫系统、胃肠的影响等(王霆等, 1999)。本文采用水、乙醇、甲醇和乙酸乙酯为溶剂,对罗汉果进行提取,对提取物的抗氧化和清除活性氧自由基作用进行研究,为进一步开发罗汉果的保健效用提供参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器、材料和试剂

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限责任公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); ZK-82B 型真空干燥器(上海实验仪器厂有限公司)。

罗汉果干果(广西永福产); 0.05 mol/L pH=8.2 Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl 缓冲液; 2.5 mmol/L 邻苯三酚(用 10 mmol/L 盐酸配制); 0.01 mol/L 邻菲罗啉溶液; 0.02 mol/L pH7.4 的 PBS(磷酸)缓冲液; 0.01 mol/L Fe(II)溶液; 0.05% 的 H₂O₂ 溶液; 0.02 mol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 溶液; 3.00 mol/L H₂SO₄ 溶液; 0.14 mol/L Na₃PO₄ 溶液; 10% 卵黄悬液(1.15% 的 KCl 溶液为溶剂); 0.8%

硫代巴比妥酸(TBA)溶液(内含 1.1% 十二烷基硫酸钠); 20% 醋酸溶液。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 罗汉果提取物的制备

称取 10.0 g 磨碎干燥的罗汉果粉末,按固液比 1:10 的比例加入 100 mL 蒸馏水,60 °C 恒温水浴回流浸提 3 h 后,过滤。滤渣加等量溶剂同法再提取一次,过滤,合并两次滤液。滤液置旋转蒸发器中减压蒸馏,回收溶剂,残留物低温真空干燥至干,得罗汉果蒸馏水提取物。同法制备乙醇、甲醇、乙酸乙酯提取物。提取物置 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 总抗氧化能力测定

按文献方法(Prieto 等, 1999)略作修改:在 6 支 10 mL 具塞刻度比色管中,分别加入 1.00 mL 浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg/mL 的抗坏血酸溶液,然后依次加入 1.0 mL 3.00 mol/L H₂SO₄ 溶液、1.0 mL 0.14 mol/L Na₃PO₄ 溶液和 1.0 mL 0.02 mol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 溶液,用蒸馏水定容至 5.0 mL,摇匀,加塞于 95 °C 水浴中加热 90 min,取出流水冷却后,以不加抗坏血酸的溶液为空白,在紫外分光光度计上测定 695 nm 波长处的吸光度,绘制抗坏血酸总抗氧化能力标准曲线。

分别取 1.00 mL 浓度为 1.0 mg/mL 的罗汉果水、乙醇、甲醇和乙酸乙酯提取物溶液,同上法测定,在标准曲线上查得每克提取物相当于抗坏血酸的量(mg)。

表 1 邻苯三酚自氧化测定加样表

Table 1 Experiment of pyrogallol autoxidation

试剂 Reagents	加样量 Sample volume(mL)	
	样品管 Sample tube	参比管 Control tube
0.1 mol/L Tris-HCl(pH=8.20, including 2 mmol/L EDTA)	4.5	4.5
二次蒸馏水 Double distilled water	4.2	4.2
10 mmol/L HCl	—	0.3
6 mmol/L 邻苯三酚 Pyrogallol	0.3	—
总体积 Total volume	9.0	9.0

1.4 清除超氧阴离子自由基实验

参照许申鸿等(2001)的方法,按表 1 所示量依次加入各试剂,从加入邻苯三酚开始准确计时,混匀后立即置于紫外可见分光光度计上,以相应的参比管为参比,于 320 nm 波长处测定准确反应 2 min 时的吸光度 A₀。

在加入邻苯三酚前先加入一定量的罗汉果提取

物溶液,并相应调整加入蒸馏水的量,保持总体积不变,同上法操作,测定加入罗汉果提取物溶液后的吸光度 A_1 ,按下式计算罗汉果提取物对邻苯三酚自氧化反应产生的超氧阴离子自由基的清除率: $I\% = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。

1.5 清除羟基自由基实验

羟基自由基清除实验根据文献方法(朱启忠等, 1998)略作修改:在 25 mL 比色管中依次加入 0.5 mL 0.01 mol/L 邻菲罗啉溶液、6 mL 0.02 mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液、适量罗汉果提取物溶液、0.5 mL 0.01 mol/L Fe(II) 溶液,最后加入 1 mL 0.05% 的 H_2O_2 溶液,加水稀至刻度,混匀后于 37 °C 水浴恒温反应 1 h,取出流水冷却,用 1 cm 比色皿在紫外可见分光光度计上测定 510 nm 波长处的吸光度。

按照上述试验方法,通过加或不加 H_2O_2 来控制体系羟基自由基的产生。不加提取物和 H_2O_2 体系吸光度为 A_1 ,加 H_2O_2 但不加提取物体系吸光度为 A_2 ,加提取物和 H_2O_2 体系吸光度为 A_3 ,加提取物但不加 H_2O_2 体系的吸光度为 A_4 。按下式计算清除率: $I\% = [(A_3 - A_4) - A_2]/(A_1 - A_2) \times 100\%$ 。此处 $A_3 - A_4$ 是为了扣除罗汉果提取物溶液本身的吸收对测定结果的影响。

1.6 抗脂质过氧化实验

抗脂质过氧化实验采用卵黄过氧化体系(Miguel 等, 2004):在具塞试管中加入 0.5 mL 10% 的卵黄悬浮液和适量不同浓度的提取物,用蒸馏水补至 1.0 mL,再加入 1.5 mL 20% 的醋酸溶液,1.5 mL 0.8% TBA 溶液,用微型混合振荡器振荡混合,加塞于 95 °C 恒温水浴中加热 60 min,流水冷却至室温,加入 5.0 mL 正丁醇,振荡后,3 000 r/min 离心 10 min,取上层清液,以正丁醇为空白管调零,用紫外分光光度计测定 532 nm 处的吸光度 A_1 。不加提取物的对照体系吸光度为 A_0 。

按下式计算提取物对卵黄脂蛋白过氧化的抑制率: $I\% = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 罗汉果提取物的总抗氧化能力

按 1.3 方法测定抗坏血酸总抗氧化性标准曲线见图 1。可得标准曲线方程为: $A = 27.25C - 0.02$, $r = 0.9990$ 。罗汉果水、乙醇、甲醇和乙酸乙酯提取

物的总抗氧化能力测定结果见表 2。

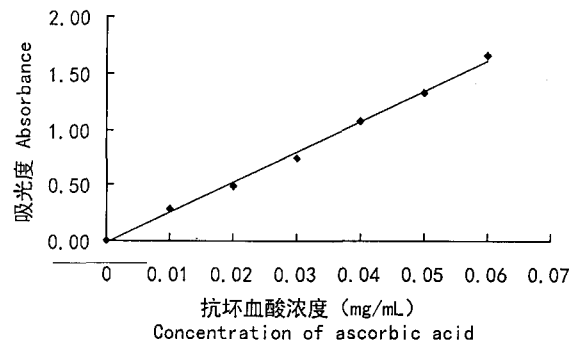


图 1 抗坏血酸总抗氧化性标准曲线

Fig. 1 Standard curve of the total antioxidant capacity of ascorbic acid

表 2 罗汉果不同提取物总抗氧化性

Table 2 Total antioxidant capacities from different extracts from *Siraitia grosvenorii*

提取物 Extract	总抗氧化性 Antioxidant capacity as equivalent to ascorbic acid(mg/g of extract)
水提取物 Water extract	128.81 ± 1.52*
乙醇提取物 EtOH extract	50.64 ± 0.98
甲醇提取物 MeOH extract	102.57 ± 1.03
乙酸乙酯提取物 EtOAc extract	160.73 ± 1.68

Values are means ± SD of three determination.

上表结果表明,四种溶剂的罗汉果提取物总抗氧化能力的大小顺序为:乙酸乙酯提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物 > 乙醇提取物。

2.2 罗汉果提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

四种提取物对超氧阴离子自由基均有一定作用且呈量效关系。在所试验的浓度范围内,甲醇和乙醇提取物对超氧阴离子自由基的清除作用未达 50%;乙酸乙酯提取物和水提取物对超氧阴离子自由基的清除率达 50% 时,其浓度 (IC_{50}) 分别为 0.58 mg/mL、0.92 mg/mL。四种提取物清除超氧阴离子自由基的能力强弱顺序为:乙酸乙酯提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物 > 乙醇提取物(图 2)。

2.3 罗汉果提取物对羟基自由基的清除作用

实验结果表明,罗汉果四种溶剂提取物均具有清除羟基自由基的作用,其作用强度顺序与总抗氧化、超氧阴离子自由基清除作用相似。乙酸乙酯提取物作用最强,其浓度为 0.4 mg/mL 时,对羟基自由基的清除率即可达 82.44%。乙酸乙酯、水、甲醇和乙醇提取物对羟基自由基的清除率均可达 50%,相应的 IC_{50} 分别为 0.25、0.57、0.78 mg/mL 和 0.99 mg/mL(图 3)。

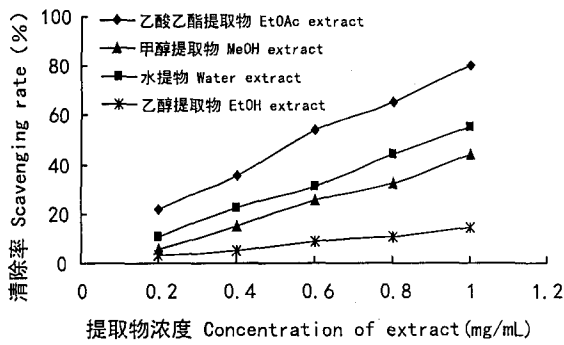


图 2 罗汉果不同溶剂提取物清除超氧阴离子自由基作用
Fig. 2 Superoxide anion radical scavenging activities of different extracts from *S. grosvenorii*

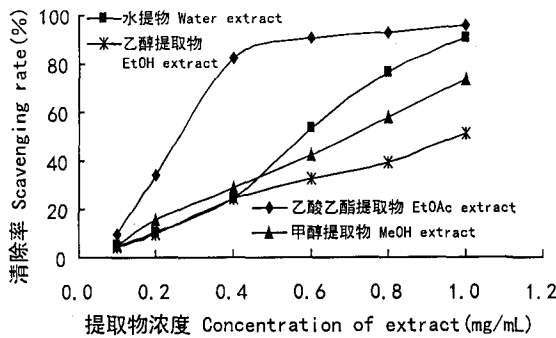


图 3 罗汉果不同溶剂提取物清除羟基自由基作用
Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging activities of different extracts from *S. grosvenorii*

2.4 罗汉果提取物的抗脂质过氧化作用

实验结果表明,四种提取物均表现出较强的抗脂质过氧化作用,其作用强度顺序为:乙酸乙酯提取物>水提取物>甲醇提取物>乙醇提取物(图 4)。在实验的浓度范围内,乙酸乙酯、水和甲醇提取物对脂质过氧化作用均可达 50%,相应的 IC₅₀ 分别为 0.59、0.68 mg/mL 和 1.18 mg/mL。

3 结论

以水、乙醇、甲醇和乙酸乙酯等为溶剂分别对罗汉果干果进行提取,得各种溶剂提取物,对其体外抗氧化和清除活性氧自由基性能进行了研究。综合抗氧化和清除自由基实验结果可知,罗汉果四种溶剂提取物抗氧化和清除活性氧自由基性能的强弱顺序均为:乙酸乙酯提取物>水提取物>甲醇提取物>乙醇提取物。其中乙酸乙酯提取物作用最强,成分预试表明其主要含黄酮类物质。本研究表明,罗汉果

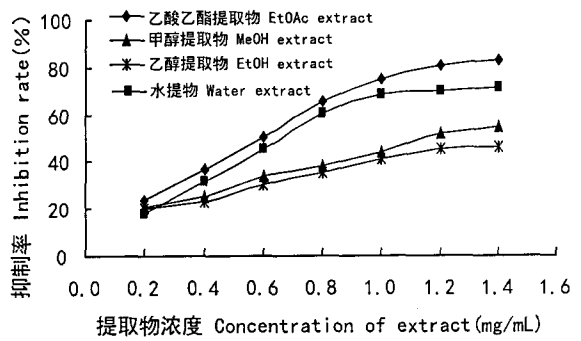


图 4 罗汉果不同溶剂提取物抗脂质过氧化作用
Fig. 4 Antilipoperoxidation effects of different extracts from *S. grosvenorii*

乙酸乙酯提取物是一种较好的天然抗氧化剂,为进一步开发利用罗汉果资源、深入挖掘罗汉果在食品、医学领域的应用提供了一定的参考价值。

参考文献:

林岩香,梁敬钰,陈黄实. 1997. 罗汉果化学研究[J]. 海峡药学,9(2):1-3

Dreher D,Junod AF. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development[J]. *Eur J Cancer*,32A:30-38

Geng HJ(耿慧君),Wang WK(王文科),Bi RC(毕润成). 2005. The anti-outside oxidizes effect from *Forsythia suspensa* leaves(连翘叶的体外抗氧化活性研究)[J]. *J Shanxi Teach Univ(Nat Sci Edi)*(山西师范大学学报(自然科学版),19(4):71-73

Grisham MB,McCord JM. 1986. Chemistry and cytotoxicities of reactive oxygen metabolites[M]//Taylor AE,Matalon S,Ward P(Eds). *Biology of Oxygen Radicals*, American Physiological Society,Bethesda:1-18

Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? [J]. *Lancet*,344:721-724

ilhami G,Dali B,Akcahan G, et al. 2005. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* Decne[J]. *J Ethnopharmacol*,101(1):287-293

Luan P(栾萍),Liu Q(刘强). 2006. Anti-oxidative activity of *Chaenomeles sinensis*(番木瓜的抗氧化作用研究)[J]. *Chin J Modern Appl Pharm*(中国现代应用药理学),23(1):19-20,27

Maxwell S. 1997. Anti-oxidant therapy; does it have a role in the treatment of human disease? [J]. *Exp Opin Invest Drugs*,6: 211-236

Miguel G,Simode M,Figueiredo AC, et al. 2004. Composition and antioxidant activeties of the essential oils of *Thymus enespirititus*, *T. camphorates* and *T. mastichina*[J]. *Food Chem*,86:83-188

Mo XY(莫晓燕),Xu J(徐静),Zhang AN(张安宁). 2005. Studies on antioxidant activities of extracts from mesosperms of *Ginkgo biloba*(银杏中种皮提取物抗氧化活性的研究)[J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Fore(Nat Sci Edi)*(西北农林科技大学学报·自然科学版),33(11):83-88

Pincemail JJ. 1995. Free radicals and antioxidants in human disea-

- ses[M]//Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre J-(Eds.) Analysis of Free Radicals in Biological Systems, Birkhauser Verlag, Berlin; 83—98
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of anti-oxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex[J]. *Analytical Biochemistry*, **269**: 337—341
- Racková L, Májeková M, Košťálová D, et al. 2004. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **12**(17): 4 709—4 715
- Shen QY(沈齐英), Shen QY(沈秋英). 2001. Study on the resisting oxygen free radical and hydroxyl free radical effect of *Cordyceps militaris* (北虫草抗氧自由基和羟自由基作用的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(3): 252—254
- Oberley T D, Oberley L W. 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer[J]. *Histol Histopathol*, **12**: 525—535
- Wang T(王霆), Huang ZH(黄志红), Jiang YM(蒋毅珉), et al. 1999. Studies on the pharmacological profile of Mogrosides(罗汉果甜苷的生物活性研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug*(中草药), **30**(13): 914—916
- Xu SH(许申鸿), Hang H(杭瑚), Li YP(李运平). 2001. Study and improvement on the pyrogallol autoxidation assay method for SOD activity assay(超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进)[J]. *Chemistry*(化学通报), (8): 16—519
- Xiong GP(熊皓平), Yang WL(杨伟丽), Zhang YS(张友胜), et al. 2001. Recent advances in natural plant antioxidants(天然植物抗氧化剂的研究进展)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物研究与开发), **13**(5): 75—79
- Zhang HR(张海容). 2005. Study of the scavenging radical activities of polysaccharide of *Hippophae rhamnoides* fruit peel(沙棘果皮多糖清除氧自由基的活性研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **22**(6): 703—707
- Zhu QZ(朱启忠), Deng ZX(邓振旭), Xiao YH(肖延海). 1998. Study on phenanthroline hydrate colorimetric determination of hydroxyl radicals(邻菲罗啉比色法检测羟自由基的研究)[J]. *J Xinjiang Agric Univ*(新疆农业大学学报), **21**(3): 207—210

(上接第 614 页 Continue from page 614)

- 宋永昌. 2001. 植被生态学[M]. 上海: 华东师范大学出版社: 549—573
- 吴兆洪, 王铸豪. 1999. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, **6**(1): 116—123
- 吴征镒. 1987. 云南植被[M]. 北京: 科学出版社: 197—231
- 张宪春, 张丽兵. 2004. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, **6**(3): 70—138
- 陈晓, 武素功, 陆树刚. 2005. 云南植物志[M]. 北京: 科学出版社: 1—414
- 姜汉桥, 段昌群, 杨树华, 等. 2005. 植物生态学[M]. 北京: 高等教育出版社: 99—60
- 侯学煜. 1957. 贵州省及邻近地区的蕨类植物生态环境的初步观察[M]. 北京: 科学出版社: 62
- 赵志模, 郭依泉. 1990. 群落生态学原理与方法[M]. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社
- 董鸣. 1997. 陆地生物群落调查观测与分析[M]. 北京: 中国标准出版社: 3—10
- 徐永椿, 姜汉桥, 全复. 1987. 西双版纳自然保护区综合考察报告集[M]. 昆明: 云南科技出版社
- 曹寿善. 2003. 菜阳河自然保护区[M]. 昆明: 云南科技出版社: 12
- 陶玲, 任珺. 2004. 进化生态学的数量研究方法[M]. 北京: 中国林业出版社: 1—50
- 谢演堂, 武素功, 陆树刚. 2000. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, **5**(1): 26—195
- Dong M(董鸣). 1996a. Clonal growth in plants in relation to resource heterogeneity; foraging behavior[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **38**(10): 828—835
- Dong M(董鸣). 1996b. Plant clonal growth in heterogeneous habitats; Risk-spreading(异质性生境中的植物克隆生长: 风险分摊)[J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), **20**(6): 543—548
- Li BG(李保贵), Zhu H(朱华). 2005. A study on ferns in monsoon evergreen broad-leaved forest on Mangong Mountain in Mengla, Xishuangbanna, China(西双版纳勐腊南贡山季风常绿阔叶林蕨类植物初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(6): 497—503
- Shi JP(施济普), Zhu H(朱华). 2003. A community ecology study on the monsoonal evergreen broad-leaved forest in tropical montane of Xishuangbanna(西双版纳热带山地季风常绿阔叶林的群落学研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **25**(5): 513—519
- Shimizu Y. 1991. Forest types and vegetation zones of Yunnan, China[J]. *J Faculty of Sciences, Univ Tokyo, sect III*, **15**: 1—71
- Smitinand T, Larsen K. 1989. Flora of Thailand[M]. **3**(4): 53—522
- Walker B, Kinzig A, Langridge J. 1999. Plant attribute diversity, resilience, and ecosystem function; the nature and significance of dominant and minor species[J]. *Ecosystems*, **2**: 95—113
- Yan YH(严岳鸿), Qin XS(秦新生), Xing FW(邢福武). 2003. The characteristics of fern community in Gudoushan Nature Reserve, Guangdong(广东古兜山自然保护区蕨类植物群落的特征)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), **11**(2): 109—116
- Zhu H, Shi JP, Zhao CJ. 2005. Species composition, physiognomy and plant diversity of the tropical montane evergreen broad-leaved forest in southern Yunnan[J]. *Biodiversity and Conservation*, **14**: 2 855—2 870