

DPPH 法测定青皮加速溶剂萃取提取物的抗氧化活性

刘平怀,汪春牛*,陈德力,葛思思,许琼情

(海南大学材料与化工学院,海南优势资源化工材料应用技术教育部重点实验室,海口 570228)

[摘要] 目的:研究海南特有药用植物青皮 *Vatica mangachapoi* Blanco 的抗氧化活性。方法:利用加速溶剂萃取技术 (ASE) 快速制备青皮石油醚 (MSO)、乙酸乙酯 (EtOAc)、乙醇 (EtOH)、甲醇 (MeOH) 提取物;结合酶标仪,快速筛选具有清除二苯代苦味肼基自由基 (DPPH·) 能力的 ASE 提取物。结果:青皮不同溶剂 ASE 提取物清除 DPPH· 的能力大小为:乙酸乙酯 ASE 提取物 > 乙醇 ASE 提取物 > 石油醚 ASE 提取物 > 甲醇 ASE 提取物;其 IC₅₀ 值分别为 0.143 4, 0.501 8, 0.567 7, 0.693 7 g·L⁻¹。乙酸乙酯 ASE 提取物的抗氧化活性强于抗坏血酸 (IC₅₀ = 0.203 4 g·L⁻¹)。结论:乙酸乙酯 ASE 提取物具有较强清除 DPPH· 的能力,有望开发成天然的抗氧化剂。

[关键词] 青皮;加速溶剂萃取;DPPH·;抗氧化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0069-05

Determination of Antioxidant Capacity of *Vatica mangachapoi* accelerated solvent extraction (ASE) with DPPH Assay

LIU Ping-huai, WANG Chun-niu*, CHEN De-li, GE Si-si, XU Qiong-qing

(Ministry of Education Key Laboratory of Application Technology of Hainan Superior Resources Chemical Materials, College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant effect of medicinal plants *Vatica mangachapoi* in Hainan province. **Method:** The sample extractions were prepared by accelerated solvent extraction (ASE) using solvent petroleum ether (MSO), ethyl acetate (EtOAc), ethanol (EtOH), methanol (MeOH); Combining with microplate assay model, the ASEs that had high antioxidant activity were screened quickly. **Result:** The antioxidant activity of different solvent ASEs from *Vatica mangachapoi* was evaluated by DPPH assay. The antioxidant activity was listed as follows: ethyl acetate > ethanol > petroleum ether > methanol; its IC₅₀ values were 0.143 4, 0.501 8, 0.567 7, 0.693 7 g·L⁻¹ respectively. The antioxidant of ethyl acetate ASE was better than ascorbic acid (IC₅₀ = 0.203 4 g·L⁻¹). **Conclusion:** The ethyl acetate ASE showed great DPPH scavenging activity, it's hopeful to develop a new natural antioxidant.

[Key words] *Vatica mangachapoi*; accelerated solvent extraction; DPPH; antioxidant

青皮 *Vatica mangachapoi* Blanco 又称青梅、海

梅、苦香(海南)等,为龙脑香科青梅属植物,分布于越南、泰国、菲律宾、印度尼西亚,我国仅产于海南^[1-2],有别于广西青梅 *V. guangxiensis* X. L. Mo、版纳青梅 *V. xishuangbannaensis* G. D. Tao et J. H. Zhang。青皮具有抗菌消炎等功效,海南民间用其提取中药龙脑香。青梅属植物因其含有白藜芦醇类^[3-5]、三萜类、异香豆素类等成分和具有抗人免疫缺陷病毒(HIV)^[6]、抗肿瘤、抗菌^[7]等药理活性而受到极大关注,陈光英等研究了青皮的化学成分^[8-10],

[收稿日期] 20110505(010)

[基金项目] 国家高新技术研究发展计划(863)项目(2007AA021500)

[第一作者] 刘平怀,硕士,教授,从事生物制药、生物产业等研究, Tel: 0898-66291892, E-mail: twlph@163.com

[通讯作者] *汪春牛,在读硕士,从事生物制药工程研究, Tel: 15248920349, E-mail: wchn1985@gmail.com

并对其做了活性筛选^[11-13],而有关青皮的抗氧化活性报道则很少^[14]。DPPH·(二苯代苦味肼基自由基)法为经典的抗氧化剂筛选模型,DPPH·是一种性质很稳定的自由基,溶于乙醇溶剂时为紫色,在 517 nm 处有最大稳定吸收,若结合抗氧化剂则得到电子,在紫外下表现为吸收变弱,可以利用这一性质来判断提取物的抗氧化活性能力。加速溶剂萃取(accelerate solvent extraction, ASE)又称快速溶剂萃取,是一种新型的样品萃取方法。该方法是在较高温(50~200℃)和高压(10.3~20.6 MPa)条件下进行有机溶剂的自动萃取,具有有机溶剂用量少,萃取时间短,样品回收率高等优点^[15-16]。本研究采用不同极性大小的溶剂石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇依次对青皮进行加速溶剂萃取(ASE)制备青皮的不同溶剂的 ASE 提取物,通过 DPPH·法计算半数抑制率(IC₅₀)最终筛选出具有明显抗氧化活性的提取部位。且本实验联合微孔板法建立一种微量、快速的筛选途径,可用于天然产物抗氧化活性的批量快速筛选^[17]。

1 材料

青皮由课题组于 2009 年 8 月采自海南万宁市神州半岛,经海南大学生物工程系刘平怀教授鉴定为青梅属植物青皮 *V. mangachapoi*,其标本保存于海南大学生物工程综合实验室。

DPPH 试剂(2,2-二苯基苦味酰基苯肼基, A Johnson Matthey Company),抗坏血酸(广州化学试剂厂,AR),石油醚、甲醇(广东光华化学厂有限公司,AR),乙酸乙酯、二甲基亚砷(天津富宇精细化工有限公司,AR),无水乙醇(广州化学试剂厂,AR)。

ASE150 型加速溶剂萃取仪(美国 Dionex 公司),xMark 微孔板分光光度计(美国 BioRad 公司),Dragon-med 移液器(20,200 μL),96 孔板(国产),BT224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 加速溶剂法快速制备提取物样品 青皮经自然放置后粉碎,过 20 目筛,再置 50℃烘箱内烘干。将青皮粉末和硅藻土以 2:1 混合后加入加速溶剂萃取仪的 100 mL 样品池内,样品池底部预装一纤维素滤片,设置提取参数为温度 120℃,静态萃取时间 5 min,静态循环次数 2 次,提取压力 10 MPa,以占池体积 60% 的溶剂冲洗,N₂ 吹扫时间 120 s。使青皮

样品依次经过石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇溶剂快速萃取,得各部分萃取液。萃取液经过浓缩挥干,分别称取 100 mg 用二甲基亚砷(DMSO)溶剂配成 100 g·L⁻¹样品母液,将其稀释制成 20,10,8,6,4,2,1,0.5,0.1 g·L⁻¹样品溶液,再进行清除 DPPH 自由基的抗氧化能力的测定。抗坏血酸溶液亦经过稀释配制得质量浓度分别为 0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.35,0.4,0.45,0.5,0.55,0.6 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2 ASE 提取物清除 DPPH·能力的测定 参照刘平怀^[18]、郭志琴等^[19]的方法,进行改进优化。准确称取 25.8 mg DPPH·用少量 95% 乙醇溶解后定容于 100 mL 量瓶,作为储备液(6.5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹)储藏于 -4℃ 的冰箱中,用时取出。利用 DPPH·溶液特征紫红色团的在波长 517 nm 下有最大吸收并在加入抗氧化剂提取物后吸收下降表示其对有机自由基的清除能力。在 96 孔板中按表 1 加样,置酶标仪中测定在 20 min 内每 30 s 的 A₀,A_i,A_j,每个平行测 3 次,取其平均值。按式(1)计算样品对自由基的清除率(scavenging activity, SA):

$$\text{清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

表 1 DPPH 试验加样方法

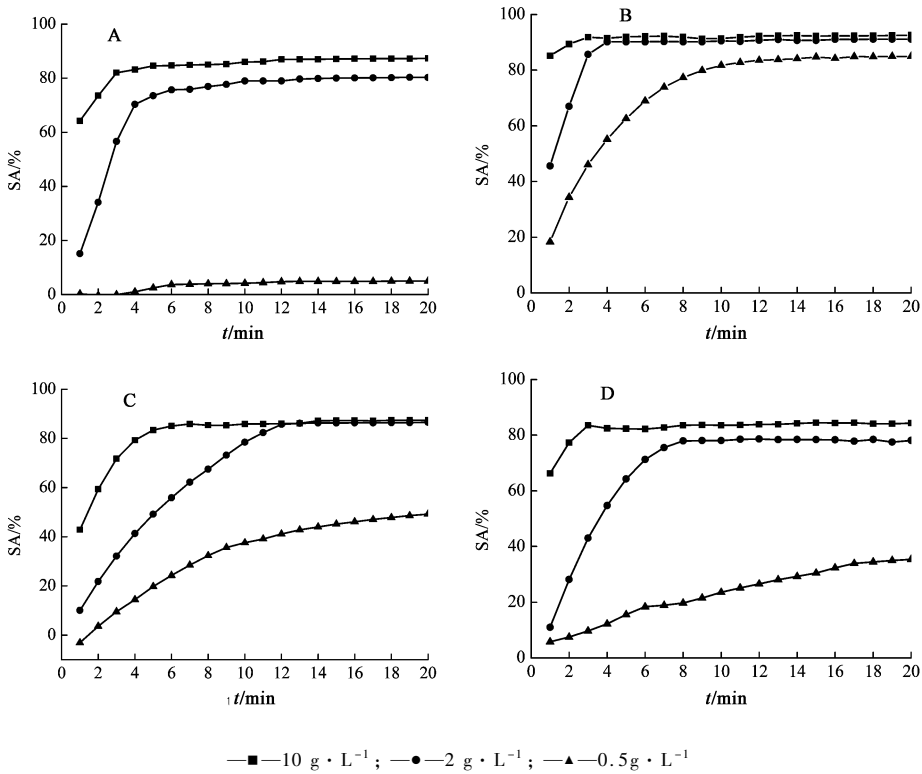
吸光度	加样值
A ₀	100 μL 6.5 × 10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹ DPPH·溶液 + 20 μL 样品的溶剂(DMSO)
A _i	100 μL 6.5 × 10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹ DPPH·溶液 + 20 μL 样品溶液
A _j	100 μL 95% 乙醇 + 20 μL 样品溶液

阳性对照品抗坏血酸同时做清除 DPPH·试验。采用药物代谢动力学模型拟合不同样品浓度下 DPPH·清除率曲线,并计算不同样品清除 DPPH·的半数抑制率(IC₅₀),对不同质量浓度 ASE 提取物和不同溶剂 ASE 提取物分别进行抗氧化能力评价,即 IC₅₀ 越小,抗氧化能力越强。

3 结果与讨论

3.1 不同质量浓度下 ASE 提取物的抗氧化活性比较 对青皮同一溶剂快速制备的 ASE 提取物,选取高、中、低 3 种不同质量浓度(10,2,0.5 g·L⁻¹)的样品,考察在不同质量浓度时同一溶剂 ASE 提取物对 DPPH·清除率的影响。

结果表明,质量浓度越大,其清除率越大,清除 DPPH·能力越强。10,2 g·L⁻¹质量浓度的样品溶液在接近 20 min 后,其清除 DPPH·的能力越接近。此时,2 种质量浓度下清除 DPPH·能力相当。4 种不同



—■— $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; —●— $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; —▲— $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 A. 石油醚 ASE 提取物; B. 乙酸乙酯 ASE 提取物; C. 乙醇 ASE 提取物; D. 甲醇 ASE 提取物
 图 1 不同质量浓度的同一溶剂青皮 ASE 提取物对 DPPH·清除率的比较

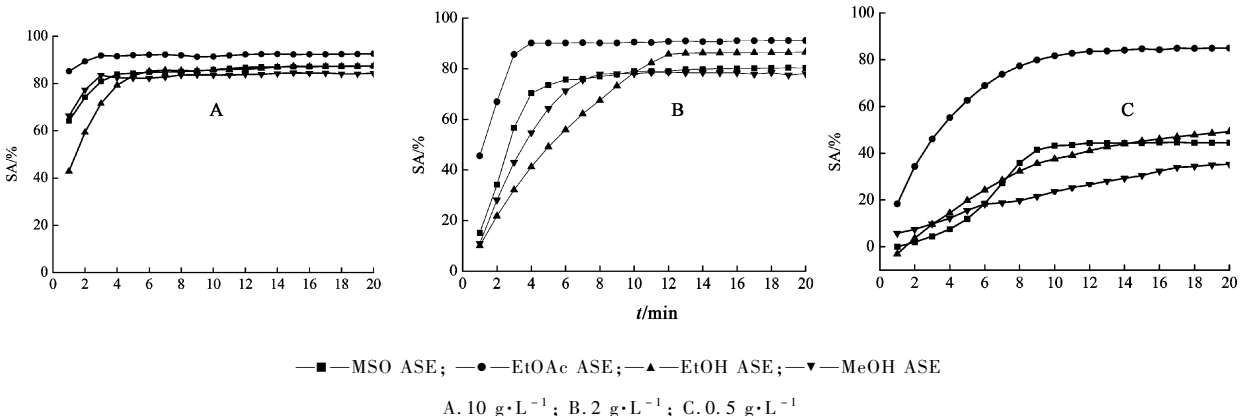
溶剂的 ASE 提取物,除乙酸乙酯 ASE 提取物外,10, $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度时对 DPPH·的清除率都远大于 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度时的清除率。

由图 1 得出,在 20 min 内抗氧化反应基本达到平衡,故平衡时的清除率可以作为样品对 DPPH·最终的清除率,即 20 min 可以作为最终反应时间。

3.2 不同极性溶剂 ASE 提取物清除 DPPH·抗氧化活性比较 在同一质量浓度 ($10, 2, 0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 下,比较石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇 4 种 ASE 提取物清除 DPPH·能力。结果见图 2。

结果表明,在同一质量浓度下,不同极性大小溶剂提取的青皮 ASE 提取物清除 DPPH·能力大小:乙酸乙酯 ASE 提取物 > 乙醇 ASE 提取物 > 石油醚 ASE 提取物 > 甲醇 ASE 提取物。说明抗氧化能力强弱与不同极性大小的溶剂所加速萃取的成分不同有关。

3.3 抗坏血酸与 ASE 提取物对 DPPH·清除率的评价 抗坏血酸是公认的具有较强抗氧化能力的对照品。以其反应 20 min 后最终的清除率对质量浓度作图,采用药物代谢动力学函数拟合。结果见图 3,计



—■—MSO ASE; —●—EtOAc ASE; —▲—EtOH ASE; —▼—MeOH ASE
 A. $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; B. $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; C. $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 图 2 不同溶剂的青皮 ASE 提取物对 DPPH·清除率的比较

算得抗坏血酸的 $IC_{50} = 0.2034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9979$), 具有良好的相关性, 说明抗坏血酸对 DPPH·清除反应符合药物代谢动力学函数。

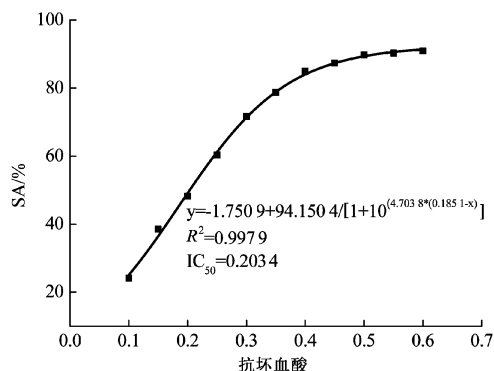
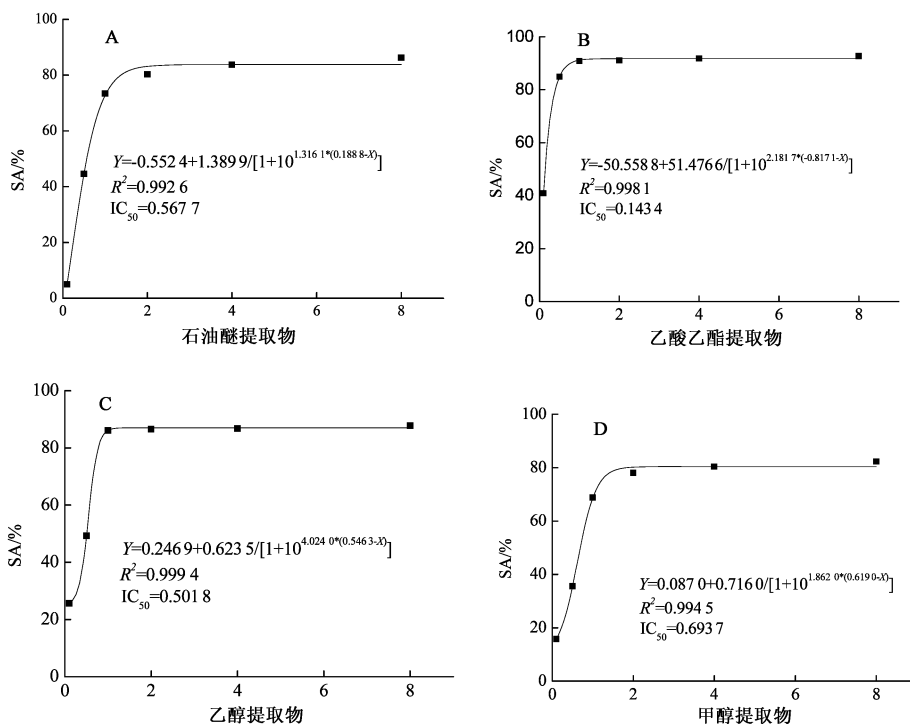


图 3 不同质量浓度抗坏血酸清除 DPPH· 曲线

由于抗坏血酸符合药物代谢动力学, 具有良好的相关性, 故以青皮 ASE 提取物样品质量浓度对 DPPH·的最终清除率作图 4, 采用药物代谢动力学函数模型进行拟合, 并计算 IC_{50} 值。由图 4 可得出: 石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇 ASE 提取物的 IC_{50} 值分别为 0.5677, 0.1434, 0.5018, 0.6937 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由 IC_{50} 可知, 4 种溶剂 ASE 提取物中乙酸乙酯 ASE 提取物效果最好, 且效果好于阳性对照品抗坏血酸, 与图 2 所得的结论一致。清除率与样品质量浓度呈现良好的相关性, 并且符合药物代谢动力学函数。说明青皮乙酸乙酯 ASE 提取物具有明显的抗氧化活性, 完全可作为新型天然抗氧化剂的来源。



A. 石油醚 ASE 提取物; B. 乙酸乙酯 ASE 提取物; C. 乙醇 ASE 提取物; D. 甲醇 ASE 提取物

图 4 不同溶剂 ASE 提取物样品质量浓度与其最终清除率的关系

4 结论

加速溶剂萃取技术是一种在高温高压条件下, 用有机溶剂自动化萃取的方法^[20]。与传统的提取方法相比, 具有快速、简便、溶剂消耗量少、萃取效率高、自动化程度高等优点, 近年来, 逐渐被用于天然产物活性部位、活性成分提取研究中^[16, 21]。本文采用加速溶剂萃取技术 (ASE) 依次制备青皮石油醚、乙酸乙酯、乙醇、甲醇提取物, 从而最大限度地缩短提取时间、减少样品量、降低萃取溶剂消耗量, 实现

高通量快速制备样品提取物。联合微孔板分光光度计进行数据处理分析, 具有快速、准确、稳定可靠、用样量小等优点^[22]。适合于天然产物抗氧化活性的快速批量筛选。

采用 DPPH·法, 以半数抑制率 IC_{50} 为指标, 评价青皮不同极性溶剂大小的 ASE 提取物的抗氧化活性, 实验表明青皮不同 ASE 提取物抗氧化活性能力依次为乙酸乙酯 ASE 提取物 > 乙醇 ASE 提取物 > 石油醚 ASE 提取物 > 甲醇 ASE 提取物, 其 IC_{50} 值分

别为 0.143 4, 0.501 8, 0.567 7, 0.693 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且乙酸乙酯 ASE 提取物抗氧化能力强于抗坏血酸 ($\text{IC}_{50} = 0.203 4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。推测其抗氧化活性可能与青皮中含有的白藜芦醇类^[11]、多酚类^[14]等成分有关。因此,有望从青皮中筛选出具有抗氧化活性的有效部位或有效成分,进而开发成天然的抗氧化剂。

[参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志. 第 50 (2)卷. [M]. 北京:科学出版社,1990:128.
- [2] 吴德邻. 海南及广东沿海岛屿植物名录[M]. 北京:科学出版社,1994:58.
- [3] Seo Eun-Kyoung, Chai Heebyung, Howard L Constant, et al. Resveratrol tetramers from *Vatica diospyroides*[J]. J Org Chem, 1999,64(19):6976.
- [4] Tetsuro Ito, Toshiyuki Tanaka, Munekazu Hinuma, et al. Three new resveratrol oligomers from the stem bark of *vatica pauciflora*[J]. J Nat Prod, 2004,67(6):932.
- [5] Naohito Abe, Tetsuro Ito, Kenji Ohguchi, et al. Resveratrol oligomers from [J]. J Nat Prod, 2010,73(9):1499.
- [6] Zhang Hong-Jie, Tan Ghee-Teng, Hoang Vu-Dinh, et al. Natural anti-HIV agents. Part IV. Anti-HIV constituents from *Vatica cineraea*[J]. J Nat Prod, 2003,66(2):263.
- [7] Joanna R, Zgoda-Pols, Alan J Freyer, et al. Antimicrobial resveratrol tetramers from the stem bark of *vatica oblongifolia* ssp. *Oblongifolia*[J]. J Nat Prod, 2002,65(11):1554.
- [8] 莫峥嵘,陈光英,韩长日,等. 青梅茎的化学成分研究(I)[J]. 中山大学学报:自然科学版,2007,46(2):126.
- [9] 莫峥嵘,王安伟,莫燕琴,等. 青梅茎中总三萜酸的含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2580.
- [10] 李玖慧,陈光英,韩长日,等. 青梅茎化学成分研究[C]. 海口:海南省药学会 2010 年学术年会会议论文集,2010.
- [11] 陈光英,莫峥嵘,宋鑫明,等. 青梅属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 海南师范大学学报:自然科学版,2008,21(2):180.
- [12] 陈忠,杨燕,王天山,等. 青梅和大叶鱼骨木提取浸膏的抑菌活性[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):445.
- [13] 袁媛,王琳,田丽美,等. MTT 法筛选青梅对 SPCA-1 体外增殖抑制作用有效部位的研究[J]. 海南师范大学学报:自然科学版,2009,22(3):291.
- [14] 尹文清,宋鑫明,陈光英,等. 青梅叶中多酚含量测定及抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2009,34(5):283.
- [15] 赵恒强,陈军辉,郭秀春,等. 加速溶剂萃取法快速提取黄连中的生物碱[J]. 分析实验室,2008,27(11):5.
- [16] 刘平怀,刘洋洋,时杰,等. 加速溶剂萃取(ASE)技术提取海南萝芙木活性成分[J]. 精细化工,2009,26(11):1120.
- [17] 张丽,王丽,李彩芳,等. 槲皮素微孔板抗氧化微量模型探析[J]. 河南大学学报:医学版,2009,28(1):26.
- [18] 刘平怀,陈德力,汪春牛,等. 海滩植物厚藤(*Ipomoea pescaprae*)抗氧化活性研究[J]. 精细化工,2010,27(9):866.
- [19] 郭志琴,吕海宁,陈巧莲,等. 野坝子体外清除自由基活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):180.
- [20] Lancaster S, Senseman S, Carson K. Accelerated solvent extraction of fluometuron from selected soils[J]. J AOAC Int, 2007,90(4):1142.
- [21] 周桂芬,吕圭源,陈素红. 响应面分析法优化加速溶剂萃取当归中阿魏酸的工艺参数[J]. 中成药,2010,32(5):775.
- [22] 刘平怀,刘洋洋,陈德力,等. ASE 联合微孔板刃天青显色法快速筛选海洋抗菌活性物质[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):176.

[责任编辑 邹晓翠]