

# 白毛乌莓醇提物不同萃取部位抗氧化活性研究

周芳<sup>1,2\*</sup>, 段湘兰<sup>3\*</sup>, 彭伊玲<sup>1</sup>, 姚旺<sup>1</sup>, 张卓<sup>1</sup>, 易刚强<sup>1</sup>, 李斌<sup>1</sup>, 彭彩云<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学药学院中药民族药物创新发展国际实验室, 湖南 长沙

<sup>2</sup>湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙

<sup>3</sup>湖南省农科院职工医院, 湖南 长沙

Email: 405597276@qq.com, 112355015@qq.com, #pengcaiyun-hucm@qq.com

收稿日期: 2020年10月21日; 录用日期: 2020年11月17日; 发布日期: 2020年11月24日

## 摘要

目的: 研究白毛乌莓(*Cayratia albifolia* C. L. Li)乙醇提取物不同萃取部位抗氧化活性。方法: 以VC为阳性对照, 选取清除1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)自由基清除能力为抗氧化指标, 探究白毛乌莓乙醇提取物不同萃取部位抗氧化活性。结果: 正丁醇层、乙酸乙酯层、二氯甲烷层、石油醚层DPPH清除能力分别为2.76、0.48、16.99、3.03 (mg/g) VC当量。结论: 白毛乌莓乙醇提取物二氯甲烷层的抗氧化能力最强, 其次是石油醚层, 正丁醇层, 乙酸乙酯层活性最弱。

## 关键词

白毛乌莓, 不同萃取部位, 抗氧化活性, DPPH法

## Study on Antioxidant Activity of Different Solvent Extract of *Cayratia albifolia* C. L. Li

Fang Zhou<sup>1,2\*</sup>, Xianglan Duan<sup>3\*</sup>, Yiling Peng<sup>1</sup>, Wang Yao<sup>1</sup>, Zhuo Zhang<sup>1</sup>, Gangqiang Yi<sup>1</sup>, Bin Li<sup>1</sup>, Caiyun Peng<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Innovation and Development International Laboratory of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan

<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan

<sup>3</sup>Staff Hospital of Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha Hunan

Email: 405597276@qq.com, 112355015@qq.com, #pengcaiyun-hucm@qq.com

\*并列第一作者。

#通讯作者。

Received: Oct. 21<sup>st</sup>, 2020; accepted: Nov. 17<sup>th</sup>, 2020; published: Nov. 24<sup>th</sup>, 2020

## Abstract

**Objects:** To study the antioxidant activity of different solvent extract of ethanol extract of *Cayratia albifolia* C. L. Li. **Methods:** VC was used as positive control; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging ability was used as an antioxidant index; the antioxidant activity of different solvent extract of ethanol extract of *Cayratia albifolia* C. L. Li was studied. **Results:** The DPPH scavenging abilities of n-butanol layer, ethyl acetate layer, dichloromethane layer and petroleum ether layer were 2.76, 0.48, 16.99, 3.03 (mg/g) VC equivalent. **Conclusion:** The antioxidant activity of dichloromethane layer was the strongest, followed by petroleum ether layer, n-butanol layer and ethyl acetate layer.

## Keywords

*Cayratia albifolia* C. L. Li, Different Solvent Extract, Antioxidant Activity, DPPH Method

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

白毛乌莓(*Cayratia albifolia* C. L. Li)隶属于葡萄科(*Vitaceae*)乌莓属(*Cayratia*Juss),该属约45种,广泛分布于亚洲、非洲及大洋洲等世界各地,在中国约有13种,主要分布在江西、浙江、福建、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州、云南等地区,生于海拔300~2000米的山谷林中或山坡岩石上[1]。在《唐本草》、《本草纲目》和《草木便方》等古代医籍中都有记载,其主要作用是清热解毒,活血散瘀,利尿的功效[2]。

乌莓属植物在民间多被用于咽喉肿痛、痢疾、痈肿、跌打肿痛、毒蛇咬伤等证的治疗,也常被用于治疗风湿性疾病、泌尿系统感染、口腔疱疹等疾病[2]。现代药理研究显示,乌莓属植物具有镇痛[3][4]、抗菌、抗炎、抗病毒和抗肿瘤活性,其醇提物还表现出较好抗氧化活性[5]。侗族是我国人口数第11位的少数民族,聚集在湘黔桂毗邻地区,白毛乌莓(侗语发音“教美姑”,“教眉库”)在湖南湘西北侗族聚居区被用于治疗类风湿性关节炎,疗效确切[6]。相对于其他种乌莓,目前尚未有白毛乌莓化学成分与活性研究的相关报道[7][8][9]。自由基是机体多种疾病的发生和发展重要参与者,是心血管疾病、癌变、糖尿病、神经病变等多种疾病诱发因素之一,因此研究药物清除自由基能力和抗氧化能力是新药研究最基础的活性筛选途径[10][11][12]。而且近年来因天然来源的抗氧化剂因毒副作用比合成氧化剂小而受到更多关注[13][14][15]。为较好的保护和开发白毛乌莓,充分挖掘其药用价值,本研究以白毛乌莓乙醇浸膏为研究对象,分别采用石油醚,二氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇进行极性分段,并针对四种不同极性萃取物进行了DPPH自由基清除能力的抗氧化活性研究,为白毛乌莓进一步的开发和利用提供实验和理论基础。

## 2. 仪器与材料

白毛乌莓(采购于湖南怀化通道县,湖南中医药大学药学院王智鉴定为白毛乌莓,收藏于湖南省

侗药重点实验室); VC 标准品、DPPH 标准品(上海如吉生物科技发展有限公司); 甲醇、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、二氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 水为蒸馏水; 紫外分光光度计(岛津 UV1800)。

### 3. 实验方法

#### 3.1. 白毛乌莓不同萃取部位和供试样品的制备

白毛乌莓干燥地上部分(1500 g), 粉碎成粗粉, 75%的乙醇渗漉提取。滤液减压浓缩(60℃), 得干燥浸膏 460 g。取 235 g 干燥浸膏分散于 700 mL 水中, 依次用石油醚, 二氯甲烷, 乙酸乙酯, 正丁醇萃取。各萃取液减压浓缩, 干燥分别得: 石油醚层浸膏(12.86 g), 二氯甲烷层浸膏(12.04 g), 乙酸乙酯层浸膏(4.57 g), 正丁醇层浸膏(25.85 g)。分别精密称量各提取部位样品于容量瓶中, 用甲醇溶解定容, 制备成如下被试样品溶液: 0.90 mg/mL 正丁醇层样品溶液, 0.45 mg/mL 乙酸乙酯层样品溶液, 0.20 mg/mL 二氯甲烷层样品溶液, 1.6 mg/mL 石油醚层样品溶液。

#### 3.2. DPPH 自由基清除力的测定

##### 3.2.1. 标准溶液的配制

VC 溶液的配制: 精密称量 0.0025 g VC 标准品于 50 mL 容量瓶中, 加水定容, 得浓度为 5.0 μg/mL VC 样品溶液。

DPPH 自由基溶液的制备: 称取 DPPH 0.0202 g, 用少量甲醇溶解后定容至 50 mL, 作为储备液。精密移取上述储备液 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中, 定容得浓度为 40.4 μg/mL DPPH 自由基溶液, 备用。

##### 3.2.2. 标准曲线的绘制

用移液管分别移取 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mL VC 样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 加水补齐至 1 mL 后, 用 40.4 μg/mL DPPH 溶液定容, 摇匀, 放置 10 min 后, 用紫外分光光度计, 于 515 nm 波长处测吸光度, 得  $A_1$ 。

用移液管分别移取 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mL VC 样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 加水补齐至 1 mL 后, 用甲醇定容, 摇匀, 放置 10 min 后, 用紫外分光光度计, 于 515 nm 波长处测吸光度, 得  $A_2$ 。

精密移取 1 mL 水于 5 mL 容量瓶中, 用 40.4 μg/mL DPPH 溶液定容, 摇匀, 放置 10 min 后, 用紫外分光光度计, 于 515 nm 波长处测其吸光度, 得  $A_0$ 。DPPH 自由基清除率(%) =  $\left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right] \times 100\%$ , 以 VC 摩尔浓度为自变量、DPPH 自由基清除率为因变量绘制标准曲线并计算回归方程。

##### 3.2.3. 被试样品 DPPH 自由基清除率测定

1) 各萃取层反应时间的优化分别取 0.20 mL 上述各萃取层被试样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 加入 4.0 mL DPPH 溶液, 甲醇定容。定容后开始测各层样品反应液的吸光度值, 以 10 min 为间隔, 测至反应溶液吸光度值不再剧烈变化(且其后一个小时内吸光度 RSD 值小于 3.00%)。

2) 各溶剂层 DPPH 自由基清除率测定计算白毛乌莓乙醇提取物各萃取层提取物 DPPH 自由基清除力的 VC 当量。由于各层样品清除自由基能力不同, 故不同层的样品测浓度清除率曲线时, 所用的浓度梯度各不相同, 即样品取样量不同。

正丁醇层: 取样量为 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL。用 1 mL 移液管, 分别移取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 用甲醇补齐至 1 mL 后, 用 40.4 μg/mL DPPH 溶液定容, 摇匀, 放置 80 min 后, 用紫外分光光度计, 于 515 nm 波长处测其吸光度, 得  $A_1$ 。用 1 mL 移液管, 分别移取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 用用甲醇(AR)定容, 摇匀, 放置 10 min

后,用紫外分光光度计,于 515 nm 波长处测其吸光度,得  $A_2$ 。用 1 mL 移液管,精密移取 1 mL 甲醇于 5 mL 容量瓶中,用 40.4  $\mu\text{g/mL}$  DPPH 溶液定容,摇匀,放置 10 min 后,用紫外分光光度计,于 515 nm 波长处测其吸光度,得  $A_0$ 。计算 DPPH 自由基清除率。

乙酸乙酯层(取样量为 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、1.00 mL),二氯甲烷层(取样量为 0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 mL),石油醚层(0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL)抗氧化活性测定方法同正丁醇层。

3) 各萃取层标准曲线的绘制。以白毛乌荛莓乙醇提取物各溶剂层提取物摩尔浓度为自变量, DPPH 自由基清除率为因变量绘制标准曲线并计算回归方程。

## 4. 实验结果

### 4.1. VC 抗氧化清除曲线的测定

结果见表 1。以浓度为横坐标,清除率为纵坐标,VC 清除率浓度曲线见图 1。由上述所测数据可得 VC 的  $\text{IC}_{50}$  (即 50%清除率时的浓度)为: 0.32  $\mu\text{g/mL}$ 。

Table 1. VC clearance rate

表 1. VC 清除率

序号	VC 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_1$	$A_2$	$A_0$	清除率(%)
1	0.20	0.5044	0.0238		33.31
2	0.30	0.3975	0.0229		48.02
3	0.40	0.3013	0.0230	0.7206	61.38
4	0.50	0.1905	0.0231		76.77
5	0.60	0.0864	0.023		91.20

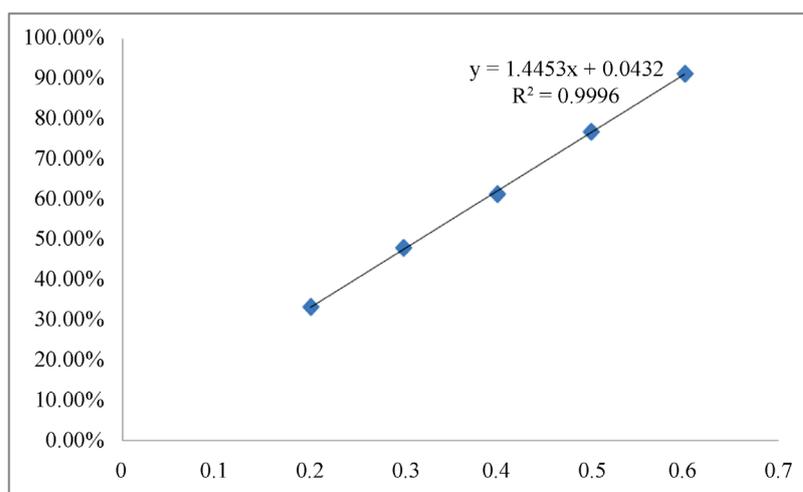


Figure 1. VC standard clearance/concentration curve

图 1. VC 清除率/浓度标准曲线图

### 4.2. DPPH 法对不同萃取层样品抗氧化活性的测定

#### 4.2.1. 各萃取层样品反应时间测定

结果表明,不同极性萃取部位的反应时间均不相同,正丁醇层样品反应进行到 80 min 后,样品溶液的吸光度值基本不变化,其后一个小时吸光度 RSD 值为 2.70%,故确定正丁醇层反应时间为 80 min。乙

酸乙酯层样品反应进行到 150 min 后, 样品溶液的吸光度值基本不变化, 其后一个小时吸光度 RSD 值为 2.97%, 故确定乙酸乙酯层反应时间为 150 min。二氯甲烷层样品和石油醚层样品分别反应到 90 min 和 110 min 后, 样品溶液的吸光度值基本不变化, 其后一个小时吸光度 RSD 值分别为 1.72% 与 1.72%, 故确定二氯甲烷层和石油醚层样品反应时间分别为 90 min 和 110 min。

#### 4.2.2. 各萃取层清除率曲线测定

各萃取层不同浓度下对 DPPH 自由基清除率结果见表 2, 根据表中结果分别计算正丁醇层、乙酸乙酯层、二氯甲烷层和石油醚层的回归方程及  $IC_{50}$  值。

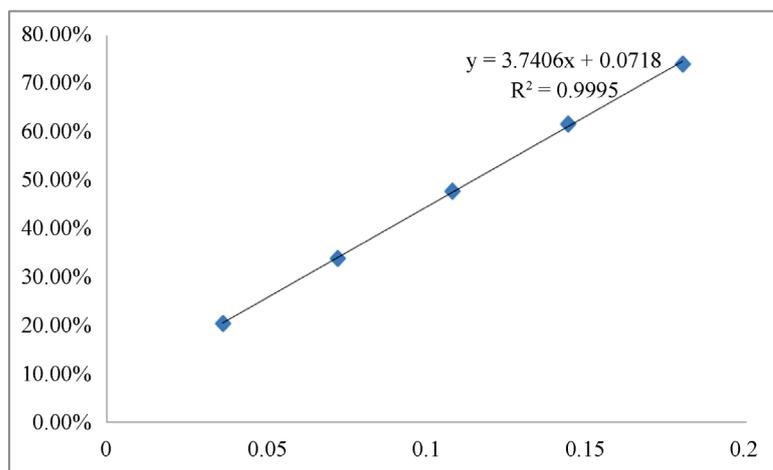
Table 2. Solvent layers clearance rate

表 2. 各萃取层清除率

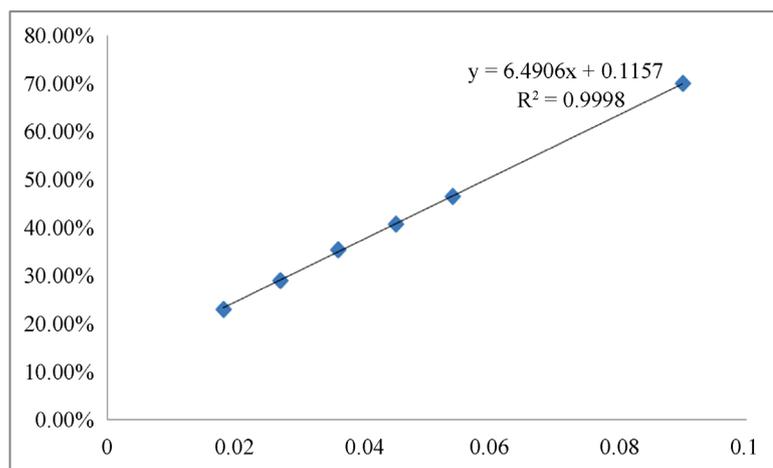
样品	序号	浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_1$	$A_2$	$A_0$	清除率(%)
正丁醇层	1	0.036	0.5440	0.0244	0.6539	20.54
	2	0.072	0.4579	0.0257		33.90
	3	0.108	0.3672	0.0257		47.77
	4	0.144	0.2761	0.0258		61.72
	5	0.180	0.1966	0.0263		73.96
乙酸乙酯层	1	0.018	0.5855	0.0216	0.7324	23.01
	2	0.027	0.5422	0.0225		29.04
	3	0.036	0.4963	0.0230		35.38
	4	0.045	0.4572	0.0237		40.81
	5	0.054	0.4204	0.0286		46.50
	6	0.090	0.2520	0.0318		69.93
二氯甲烷层	1	0.012	0.4472	0.0247	0.6874	38.54
	2	0.016	0.3994	0.0251		45.55
	3	0.020	0.3486	0.0250		52.92
	4	0.024	0.3050	0.0249		59.25
	5	0.028	0.2585	0.0256		66.12
石油醚层	1	0.032	0.5776	0.0252	0.7037	21.50
	2	0.064	0.4845	0.0265		34.92
	3	0.096	0.3978	0.0270		47.31
	4	0.128	0.3161	0.0282		59.09
	5	0.160	0.2330	0.0292		71.04

#### 4.2.3. 各萃取层 $IC_{50}$

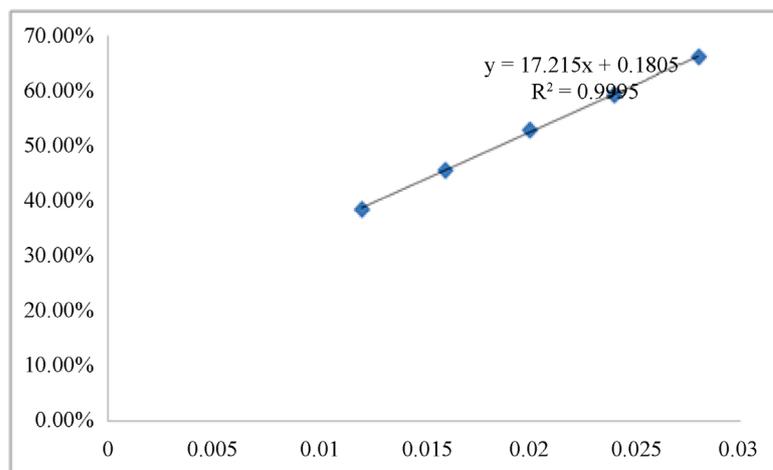
$IC_{50}$  是指清除率达到 50% 时样品的质量浓度, 通过不同浓度样品的清除率可以绘制出清除率的标准曲线, 求出回归方程, 并计算得到  $IC_{50}$ 。正丁醇层回归方程为(见图 2):  $Y = 3.7406x + 0.0718$  ( $R^2 = 0.9995$ ),  $IC_{50}$  值为 0.11 mg/mL; 乙酸乙酯层回归方程为(见图 3):  $Y = 6.4906x + 0.1157$  ( $R^2 = 0.9998$ ),  $IC_{50}$  值为 0.66 mg/mL; 二氯甲烷层回归方程为(见图 4):  $Y = 17.215x + 0.1805$  ( $R^2 = 0.9995$ ),  $IC_{50}$  值为 0.02 mg/mL。石油醚层样品回归方程为(见图 5)  $Y = 3.8516x + 0.098$  ( $R^2 = 0.9993$ ),  $IC_{50}$  值为 0.10 mg/mL。



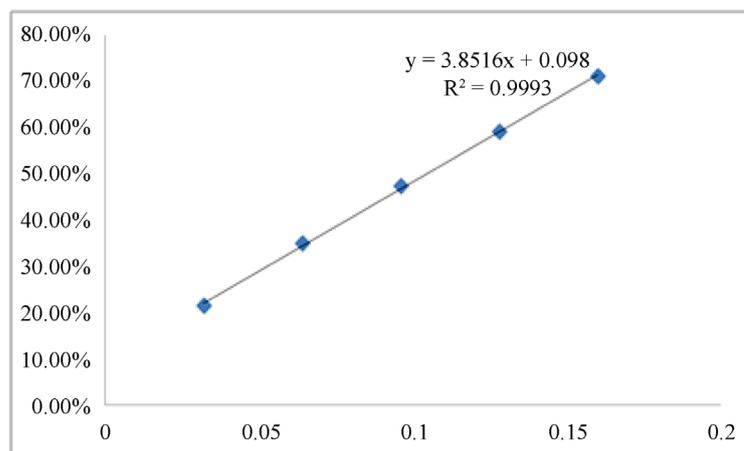
**Figure 2.** N-butanol solvent layer standard clearance/concentration curve  
**图 2.** 正丁醇层清除率/浓度曲线图



**Figure 3.** Ethyl acetate solvent layer standard clearance/concentration curve  
**图 3.** 乙酸乙酯层清除率/浓度曲线图



**Figure 4.** Dichloromethane solvent layer standard clearance/concentration curve  
**图 4.** 二氯甲烷层清除率/浓度曲线图



**Figure 5.** Petroleum ether solvent layer standard clearance/concentration curve  
**图 5.** 石油醚层清除率/浓度曲线图

#### 4.2.4. 不同萃取部位的 VC 当量

过不同萃取部位的 DPPH 清除率( $IC_{50}$ )与 VC 的相对比, 得到不同萃取部位的 DPPH 清除率的 VC 当量, 可以比较直接的分析其抗氧化活性强弱。具体结果见表 3。

**Table 3.** VC equivalent of DPPH clearance rates in different solvent layers  
**表 3.** 不同萃取层 DPPH 清除率的 VC 当量

样品	$IC_{50}$	VC 当量(mg/g)
VC 标准品	0.32 $\mu$ g/mL	1000
正丁醇层	0.11 mg/mL	2.76
乙酸乙酯层	0.66 mg/mL	0.48
二氯甲烷层	0.02 mg/mL	16.99
石油醚层	0.10 mg/mL	3.03

实验结果表明, 二氯甲烷层、石油醚层、正丁醇、乙酸乙酯层的 VC 当量分别是 16.99、3.03、2.76、0.48。二氯甲烷萃取部位浸膏的抗氧化性最强, 其次是石油醚层, 正丁醇层, 乙酸乙酯层。

## 5. 小结与讨论

体内过量的自由基是慢性病和健康衰老的根本原因, 如动脉硬化、心脑血管疾病、糖尿病、风湿骨病、关节炎等, 都被证实与自由基有关。侗族使用白毛苣蓐治疗关节炎具有确切的疗效。目前很多侗药的研究还处于起步阶段, 其药效物质基础和作用机制尚不明确。本文针对白毛苣蓐的乙醇提取物, 分离得到正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚四个萃取层, 基于抗氧化活性导向, 以 DPPH 自由基清除率为指标, 测定了四个不同极性萃取部位的抗氧化活性。研究表明, 二氯甲烷萃取部位浸膏的抗氧化性最强, 其次是石油醚层, 正丁醇层, 乙酸乙酯层。其中二氯甲烷层、石油醚层和正丁醇层的 VC 当量分别是 16.99、3.03、2.76, 表明白毛苣蓐的二氯甲烷层、石油醚层和正丁醇层提取物具有较好的抗氧化活性, 值得后期进一步深入研究, 明确其抗氧化功效物质基础。在基础研究上结合治疗关节炎活性实验, 为深入研究白毛苣蓐抗关节炎物质基础明和作用机制提供实验和理论基础。

## 基金项目

侗医药研究湖南省重点实验室(2015TP1020-02), 侗医药研究湖南省重点实验室平台建设(2017CT5025)。大学生创新项目 S202010541039, 湖南省药学一流学科开放基金(2020YX04)。

## 参考文献

- [1] 巩江, 张晶, 倪士峰. 国产乌莓属植物药理学研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3031-3032.
- [2] 崔传文, 孙翠玲, 陈全成, 等. 乌莓化学成分初步探究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2906-2909.
- [3] 梁生林, 黄芳辉, 钟兴华, 等. 乌莓抗炎镇痛有效部位的筛选[J]. 中草药, 2016, 47(4): 634-639.
- [4] 颜峰光, 钟兴华, 宓嘉琪, 等. 乌莓水煎剂对小鼠镇痛作用初探[J]. 中国医药指南, 2013, 11(9): 457-458.
- [5] 黄思涵. 乌莓不同溶剂提取物抗氧化活性研究[J]. 广东化工, 2018, 45(9): 31-32.
- [6] 王治, 田兰, 田华咏, 主编. 中国侗医药史[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014: 105.
- [7] Kumar, D., Kumar, S., Gupta, J., *et al.* (2011) A Review on Chemical and Biological Properties of *Cayratia trifolia* Linn. (Vitaceae). *Pharmacognosy Reviews*, **5**, 184-189. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.91117>
- [8] Ragasa, C., Buluran, A.I., Mandia, E., *et al.* (2014) Chemical Constituents of *Cayratia trifolia*. *Der Pharma Chemica*, **6**, 418-422.
- [9] Mohammed, S.I., Salunkhe, N.S., Vishwakarma, K.S., *et al.* (2017) Experimental Validation of Antidiabetic Potential of *Cayratia trifolia* (L.) Domin: An Indigenous Medicinal Plant. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **32**, 153-162. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0598-1>
- [10] Bahorun, T., Soobrattee, M.M., Luximon-Ramma, M.V., *et al.* (2006) Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update*, **1**, 24-40. <https://doi.org/10.4314/ijmu.v1i2.39839>
- [11] Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science and Engineering*, **4**, 89-96.
- [12] Jahanban-Esfahlan, A. (2019) A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules*, **24**, 2133. <https://doi.org/10.3390/molecules24112133>
- [13] 王峰, 麻旭州, 王道才, 等. 和厚朴酚体外抗氧化活性的研究[J]. 湖北民族大学(自然科学版), 2020, 38(2): 130-133, 170.
- [14] 罗廷顺, 石桂兰, 杨静, 等. 紫地榆多酚提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2853-2856.
- [15] 杨嬭娟, 张希, 马雅鸽, 等. 发酵对黄精主要活性成分及其抗氧化活性和刺激性的影响[J]. 食品工艺科技, 2020, 41(2): 52-58.