

青钱柳叶提取物的抗氧化活性及其与黄酮含量的关系研究

毛传亮¹, 黄宏亮², 董国庭³, 王丽玲⁴, 骆先有⁵, 柏明娥⁴

(1. 庆元县自然资源和规划局, 浙江 庆元 323800; 2. 安吉县林业技术推广中心, 浙江 安吉 313300; 3. 安吉县章村镇人民政府, 浙江 安吉 313301; 4. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023; 5. 龙泉市林业科学研究院, 浙江 龙泉 323700)

摘要: 根据溶剂萃取分离法, 采用水、乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 5 种溶剂从青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 叶中提取分离得到 7 种提取物样品, 通过不同样品对 DPPH 自由基 (1,1-二苯基-2-三硝基胍基自由基)、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用研究青钱柳叶不同活性组分的抗氧化活性, 并对各提取物中的总黄酮含量进行测定, 分析总黄酮含量与抗氧化活性的相关性。结果表明, 青钱柳叶各提取物均对 DPPH 自由基具有较强的清除作用, 在 0.04 mg·mL⁻¹ 浓度以下其清除率与浓度呈现良好的线性关系, 清除能力最强的为醇提后的水提物, 当浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时其清除率达到 91.29%; 对羟自由基的清除能力最强的为乙醇提取物, 当浓度为 1 mg·mL⁻¹ 时其清除率为 53.55%, 在试验浓度范围内除石油醚提取物外, 其余样品的浓度与清除率均呈现一定的线性关系; 而各样品对超氧阴离子自由基的清除率都明显小于 Vc, 且随浓度的增大其变化幅度较小; 醇提后的水提物的总黄酮含量最高, 为 11.32%, 其次为水提物, 为 10.94%; 黄酮含量与 DPPH 自由基清除率呈极显著正相关, $r=0.602$, 与羟自由基清除率呈显著正相关, $r=0.427$, 与超氧阴离子自由基清除率呈正相关, 但相关性不显著, $r=0.210$, 说明黄酮类化合物可能是青钱柳叶中主要的抗氧化活性成分之一。

关键词: 青钱柳; 叶; 提取物; 抗氧化活性; 总黄酮含量

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776 (2021) 03-0032-07

Study on Relation between Antioxidant Activity of Extracts from *Cyclocarya paliurus* Leaves and Total Flavonoid Content

MAO Chuan-liang¹, HUANG Hong-liang², DONG Guo-ting³, WANG Li-ling⁴, LUO Xian-you⁵, BAI Ming-e⁴

(1. Qingyuan Natural Resources and Planning Bureau of Zhejiang, Qingyuan 323800, China; 2. Anji Forestry Extension Center of Zhejiang, Anji 313300, China; 3. Anji Zhangcun Township People's Government of Zhejiang, Anji 313301, China; 4. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China; 5. Longquan Forestry Institute of Zhejiang, Longquan 323700, China)

Abstract: In September 2019, fresh *Cyclocarya paliurus* leaves were collected from 5-year trees in Suichang, Zhejiang province. Seven different extracts were isolated from them by different reagents. Experiments were conducted on scavenging DPPH, hydroxyl free radical and superoxide anion free radical of different extracts and total flavonoid content of different extracts were determined. The results showed that the extracts had scavenging effect on DPPH, the water extract after ethanol extraction had the strongest scavenging ability, the rate reached 91.29% with the concentration of 0.1 mg/mL. The ethanol extract had the strongest scavenging ability on hydroxyl free radical, the rate topped to 53.55% with concentration of 1 mg/mL. The scavenging rate of superoxide anion free radical of each extract was significantly lower than that of Vc. The total flavonoid content of water

收稿日期: 2021-01-17; 修回日期: 2021-04-16

基金项目: 浙江省省属科研院所扶持专项 (2017F30019)

作者简介: 毛传亮, 工程师, 从事林业技术推广和森林资源管理; E-mail:326426150@qq.com。通信作者: 柏明娥, 研究员, 从事资源植物开发研究; E-mail:baiminge66@163.com。

extract after ethanol extraction was the highest, 11.32%, followed by water extract, 10.94%. The content of flavonoid had extremely evident positive correlation with DPPH scavenging rate ($r=0.602$), evident positive with hydroxyl free radical scavenging rate ($r=0.427$) and positive with superoxide anion free radical scavenging rate ($r=0.210$).

Key words: *Cyclocarya paliurus*; leaf; extract; antioxidant activity; total flavonoid content

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 系胡桃科 Juglandaceae 青钱柳属 *Cyclocarya* 植物,为我国特有^[1]。青钱柳的树皮和叶具有清热解毒、止痛功能,也可用于治疗顽癣^[2]。青钱柳中含有丰富的天然药用成分,如多糖、黄酮、酚类、萜类、皂苷、香豆精、生物碱、有机酸、维生素 E、咖啡因和人体必需的微量元素等^[3-4]。目前,已从青钱柳中分离得到的化合物有 70 多种,大部分成分都来自青钱柳叶^[5]。大量现代医学研究表明,青钱柳具有明显的降血糖^[6-7]、降血压^[8]、降血脂^[9-10]、抗氧化^[11-12]、抗肿瘤^[13-14]和增强机体免疫功能^[15-16]等作用,是很好的天然保健食品资源。我国自 1970 年起就对它的化学成分及其药理作用进行了大量研究,虽然有一定的发现,但其化学成分与药理活性之间的相关性及其发挥功效的主要活性物质等方面的研究还有待深入。本文采用溶剂萃取分离法,根据相似相溶原理,将青钱柳叶中性质相近的组分集中用同一种溶剂进行分离提取得到不同的提取物,再对各提取物进行抗氧化活性的测定和活性成分的含量测定,以期为青钱柳的应用和产品开发提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与实验仪器

供试青钱柳叶采集自浙江省遂昌县王村口镇山井村,地理坐标为 119°04'53" E, 28°20'49" N,海拔为 1 059 m,系人工种植 5 年生苗。于 2019 年 9 月底采集植株上的全部鲜叶,摊晾后放置于阴凉的室内使其自然萎凋,然后置烘箱内于 100℃ 高温烘 3 ~ 5 min 后取出,冷却后于塑料袋内密封保存,使用前采用粉碎机粉碎至 80 目备用。

主要化学试剂:石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水杨酸、双氧水、苯酚、香草醛、冰醋酸、邻苯三酚、L-抗坏血酸 Vc、三羟甲基氨基甲烷、浓硫酸、盐酸、三氯化铝、高氯酸均为国产分析纯(杭州汇普化工仪器有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(艾览(上海)化工科技有限公司);芦丁标准品(纯度≥98%)(上海晶纯生物科技股份有限公司)。

实验仪器:超声仪(浙江省林业科学研究院自制)、UV-759S 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、HH-ZK1 型数显式电热恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)、GZX-9240MBZ 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、CPA124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)、RE-2000A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、DLSB-1005 型低温冷却液循环泵(杭州大卫科教仪器有限公司)、PHS-25 型数显 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)、真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司, FreeZone 2.5 L)。

1.2 试验方法

1.2.1 青钱柳叶不同提取物的制备

1.2.1.1 青钱柳叶水提取物的制备 称取 200 g 青钱柳叶样品,加 8 ~ 10 倍蒸馏水于 90℃ 水浴回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液后减压浓缩、冷冻干燥后得青钱柳叶水提取物样品。

1.2.1.2 青钱柳叶乙醇提取物的制备 称取青钱柳叶样品 10 kg,加 100 kg 95%乙醇进行超声提取 2 h,超声功率为 1 000 w,频率为 20 000 Hz。回收溶剂后得青钱柳醇提物浸膏,称取部分浸膏挥干溶剂后进行冷冻干燥得青钱柳叶 95%乙醇提取物。

1.2.1.3 乙醇提取物不同溶剂萃取物的制备 称取上述青钱柳叶醇提物浸膏 600 g,加适量水悬混,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,每种溶剂萃取多次,合并萃取液并减压浓缩各萃取液,挥干溶剂后进行冷冻干燥,分别得到青钱柳叶石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和萃取后的水层物样品。

1.2.1.4 醇提后水提取物的制备 将上述青钱柳叶经醇提后的药渣晾干后,取 1 000 g 加 8 ~ 10 倍蒸馏水 90℃ 浸提 2 次,合并浸提液,过滤浓缩后冷冻干燥,得青钱柳叶醇提后的水提取物。

青钱柳叶不同提取物的制备工艺流程见图 1。

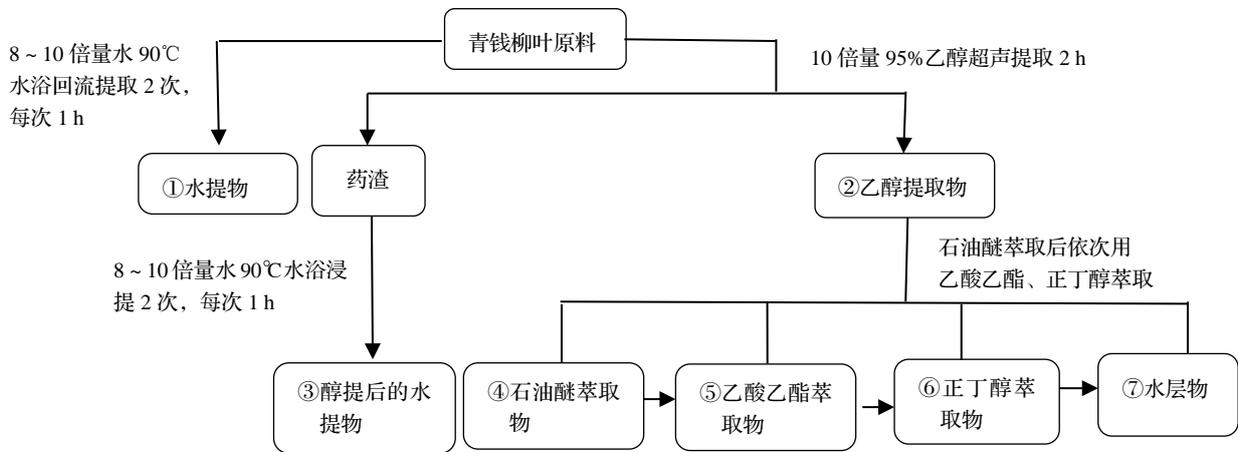


图 1 青钱柳叶不同提取物的制备工艺流程

Figure 1 Preparation of different extracts from *C. paliurus* leaves

1.2.2 青钱柳叶不同提取物的抗氧化活性测定

1.2.2.1 对 DPPH 自由基的清除试验 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 是一种有机合成的自由基, DPPH 自由基有单电子, 其乙醇溶液呈紫色, 在 517 nm 附近有强吸收。在试验中, 当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时, 其孤对电子被配对, 颜色会由紫色变浅, 根据吸光度的变化可以计算其自由基的清除率。

称取上述制得的 7 个青钱柳叶提取物样品各 10 mg, 分别置于小烧杯中用甲醇溶解, 并于 100 mL 容量瓶中定容至刻度, 得 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同样品的储备液。将浓度为 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液用无水乙醇分别稀释成质量浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 和 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。分别取 3 mL 上述溶液于试管中, 并加入 2 mL $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 溶液, 混匀后避光静置 1 h, 在 517 nm 处测定吸光度 (用原溶剂作参比)。同时测定 3 mL 无水乙醇与 2 mL $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液的混合溶液在 517 nm 处的吸光度, 以蒸馏水作空白对照, 3 次重复。按照公式 (1) 计算不同浓度待测液的 DPPH 自由基清除率。以 L-抗坏血酸 Vc 作阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_c - (A_i - A_j)] / A_c \times 100 \quad (1)$$

式中, A_i 为 3 mL 样品溶液+2 mL DPPH 溶液的吸光度; A_j 为 3 mL 样品溶液+ 2mL 无水乙醇的吸光度; A_c 为 3 mL 无水乙醇+2 mL DPPH 溶液的吸光度。

1.2.2.2 对羟自由基的清除试验 利用 Fenton 反应产生羟自由基: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} = \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+}$ 在反应体系中加入水杨酸, Fenton 反应生成的羟自由基与水杨酸反应, 生成于 510 nm 处有特殊吸收的 2,3-二羟基苯甲酸。如果向反应体系中加入具有清除羟自由基功能的被测物, 就会减少生成的羟自由基, 从而使有色化合物的生成量相应减少。采用固定反应时间法, 在 510 nm 处测量含被测物反应液的吸光度, 并与空白液比较, 以测定被测物对羟自由基的清除作用。称取上述制得的 7 个青钱柳叶提取物样品各 100 mg, 分别置于小烧杯中用甲醇溶解, 并于 100 mL 容量瓶中定容至刻度, 得 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同样品的储备液。

将浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液用无水乙醇分别稀释成质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的待测物溶液。根据表 1 设计的试剂和剂量往比色管中添加药品, 依次加入 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液 1 mL、 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸乙醇溶液 1 mL、样品溶液 1 mL、去离子水 1 mL 和 $8.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液 1 mL。摇匀, 在 37°C 水浴中加热 15 min 后取出, 于 510 nm 处测定吸光度。测定 A_c 时, 参比溶液为不加双氧水体系。 A_i 、 A_j 测定时参比溶液

表 1 各试剂添加量

Table 1 Dosage of each reagent

试剂	组成/mL		
	A_c	A_i	A_j
FeSO_4 溶液	1	1	1
水杨酸乙醇溶液	1	1	1
样品溶液		1	1
去离子水	1		1
H_2O_2 溶液	1	1	

注: 反应总体积为 4 mL。

为去离子水。以 L-抗坏血酸 Vc 为阳性对照。

按照公式 (2) 计算不同浓度待测液对羟自由基的清除率:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [A_c - (A_i - A_j)] / A_c \times 100 \quad (2)$$

式中, A_i 为添加样品溶液的吸光度; A_j 为添加去离子水代替双氧水溶液的吸光度; A_c 为不添加样品溶液的吸光度。

1.2.2.3 对超氧阴离子自由基的清除试验 在弱碱性条件下, 邻苯三酚不稳定, 会迅速自氧化释放出超氧离子, 并生成有色的中间产物, 该中间产物在 $\lambda=320 \text{ nm}$ 处有一特征吸收峰。当有抑制剂存在时, 抑制剂清除超氧离子而阻止了中间有色物质的积累, 所以可以通过检测中间产物的含量来测定清除自由基的能力。

称取上述制得的 7 个青钱柳叶提取物样品各 100 mg, 分别置于小烧杯中用甲醇溶解, 并于 100 mL 容量瓶中定容至刻度, 得 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同样品的储备液。将 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液用 70% 乙醇分别稀释成质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的待测物溶液。

取 4.5 mL Tris-HCL 缓冲液 ($0.05 \text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ pH 8.2) 于试管中, 在 25°C 水浴中保温 10 min, 加入不同浓度的青钱柳样品溶液 1.0 mL, 混匀后加入 0.4 mL $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯三酚, 反应 4 min, 加入 $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCL 溶液 1.0 mL 终止反应, 于 320 nm 下测量其吸光度。每个浓度重复 3 次, 取平均值。按照公式 (3) 计算不同浓度待测液的超氧阴离子自由基清除率。以 L-抗坏血酸 Vc 为阳性对照。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = [A_c - (A_i - A_j)] / A_c \times 100 \quad (3)$$

式中, A_c 为去离子水代替青钱柳样品溶液时的吸光度; A_i 为青钱柳样品不同浓度下的吸光度; A_j 为去离子水代替邻苯三酚时青钱柳样品不同浓度下的吸光度。

1.2.2.4 提取物中总黄酮含量的测定 标准曲线的绘制: 称取芦丁对照品 18 mg, 溶于 70% 乙醇并置于 100 mL 容量瓶定容至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 (每 1 mL 含芦丁标准品 0.1764 mg)。分别精确吸取 $0.1764 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于 6 只 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 1% 三氯化铝 (甲醇溶液), 并加入甲醇至 10 mL, 摇匀, 放置 15 min, 以蒸馏水为对照, 于 410 nm 处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标, 芦丁浓度为横坐标绘制标准曲线。

样品测定: 称取上述制得的各提取物样品各 50 mg, 用 70% 乙醇溶解后定容至 25 mL, 摇匀。吸取 0.5 mL 样品液于 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 1% 三氯化铝 (甲醇溶液), 用甲醇定容, 摇匀, 放置 15 min, 以蒸馏水为对照, 于 410 nm 处测定其吸光度。根据标准曲线, 计算样液中总黄酮的含量。总黄酮含量 (M) 计算公式如下:

$$M(\%) = (\rho \times V) / m \times 100\%$$

式中, ρ 表示样液中黄酮浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 由标准曲线计算得出; V 表示样液体积的放大倍数; m 表示称取样品的质量 (mg)。

1.3 数据处理

所有数据采用 Excel 表进行绘图; 采用 SPSS17.0 分析软件进行 Pearson's 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 青钱柳叶不同提取物对 DPPH 自由基的清除作用

由图 2 可知, 7 个样品中除石油醚萃取物对 DPPH 自由基的清除作用较弱外, 其他 6 个样品均表现出对 DPPH 自由基有较强的清除能力, 且清除率随浓度的升高而增大; 在 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度以下

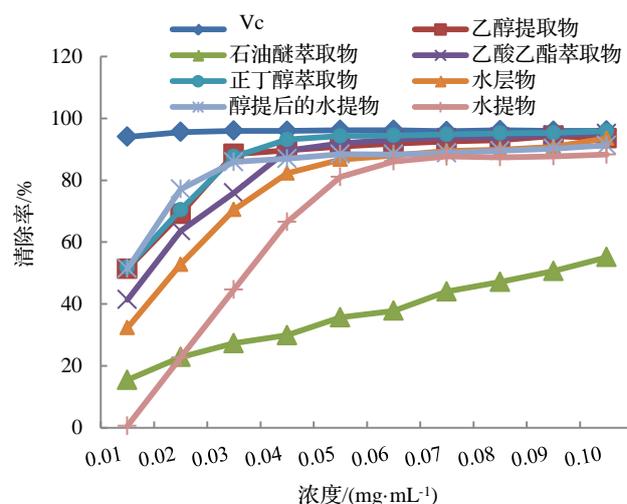


图 2 青钱柳叶不同提取物对 DPPH 自由基的清除作用
Figure 2 Scavenging effect on DPPH by different extracts from *C. paliurus* leaves

时,其清除率与浓度呈现良好的线性关系(见表2),而当浓度超过 $0.04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后,其清除率基本保持在一个稳定状态;清除率最大的为醇提后的水提取物,当浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其清除率达到 91.29% 。Vc对DPPH自由基的清除率在 $0.01\sim 0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围时均达到 90% 以上,各提取物在低浓度下对DPPH自由基的清除能力都弱于Vc;而当浓度超过 $0.04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后,除石油醚萃取物外其余样品对DPPH自由基的清除率基本与Vc接近。

表2 不同样品的浓度与DPPH自由基清除率的线性关系及其 IC_{50} 值
Table 2 Linear relationship between concentration of extracts and DPPH scavenging rate and IC_{50}

样品	线性关系式	R^2	线性浓度范围/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IC_{50} 值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
乙醇提取物	$y = 1\ 852.80x + 32.58$	0.999 4	0.01 ~ 0.03	9.40
石油醚萃取物	$y = 421.05x + 13.44$	0.992 2	0.01 ~ 0.10	86.80
乙酸乙酯萃取物	$y = 1\ 567.00x + 28.43$	0.980 7	0.01 ~ 0.04	13.76
正丁醇萃取物	$y = 1\ 787.70x + 34.22$	0.999 4	0.01 ~ 0.03	8.80
水层物	$y = 1\ 908.70x + 13.71$	0.998 3	0.01 ~ 0.03	19.01
醇提后的水提取物	$y = 1\ 725.00x + 36.97$	0.926 9	0.01 ~ 0.03	7.55
水提取物	$y = 2\ 194.70x - 21.26$	1.000 0	0.01 ~ 0.04	32.47

根据不同提取物对DPPH自由基的清除率与浓度的关系($0\sim 0.04\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围),得到各自的线性方程,由线性方程计算出各样品的 IC_{50} 值(清除率为 50% 时所需样品的浓度),且达到半数清除率时所需样品浓度越低,说明样品的抗氧化性越强。由表2可知,各提取物对DPPH自由基的清除能力的强弱依次为:醇提后的水提取物>正丁醇萃取物>乙醇提取物>乙酸乙酯萃取物>水层物>水提取物>石油醚萃取物。

2.2 青钱柳叶不同提取物对羟自由基的清除作用

由图3可知,在试验所选的浓度范围内Vc对羟自由基的清除率与浓度大小成正比,当浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其清除率达到 93.88% ,且浓度与清除率呈现一定的线性关系, $y = 102.30x - 9.053 (R^2 = 0.992\ 0)$,根据此线性关系计算得出Vc的 IC_{50} 值为 $0.58\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。而所有样品对羟自由基的清除率随浓度的增大变化并不明显,呈现出一个极度缓慢的变化趋势。从各样品对羟自由基的清除能力来看,除乙醇提取物、正丁醇萃取物和水提取物在低浓度下清除率大于Vc外,其他样品的清除率都远小于Vc,特别是水层物,在浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下对羟自由基的清除率均为负值,当试验浓度提高到 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时才表现为正值。对羟自由基清除率最大的为乙醇提取物,当浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时清除率为 53.55% 。

根据表3各样品对羟自由基的清除率与浓度的关系可以看出,在试验浓度范围内除石油醚提取物外,其余样品的线性关系良好,由线性方程计算出各样品的 IC_{50} 值,根据 IC_{50} 值比较各样品对羟自由基的清除能力从大到小依次为:乙醇提取物>正丁醇萃取物>水提取物>石油醚提取物>乙酸乙酯提取物>醇提后的水提取物>水层物。

2.3 青钱柳叶不同提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

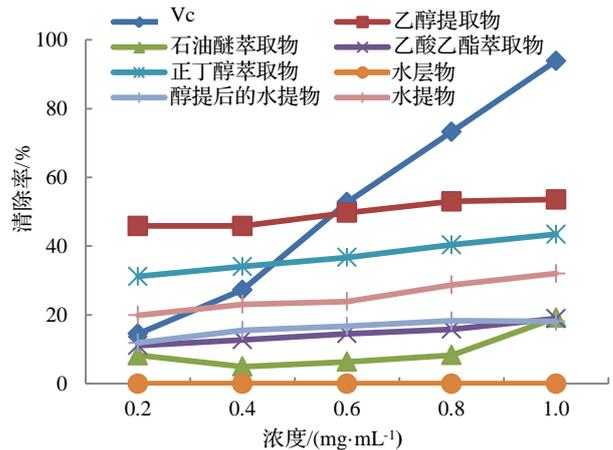


图3 青钱柳叶不同提取物对羟自由基的清除作用
Figure 3 Scavenging effect on hydroxyl radical by different extracts from *C. paliurus* leaves

表3 样品浓度与羟自由基清除率的线性关系及 IC_{50} 值
Table 3 Linear relationship between concentration of extracts and hydroxyl radical scavenging rate and IC_{50} value

样品	线性关系式	R^2	IC_{50} 值/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
乙醇提取物	$y = 11.28x + 42.832$	0.920 4	0.64
石油醚萃取物	$y = 12.561x + 1.868\ 4$	0.497 6	3.83
乙酸乙酯萃取物	$y = 9.412\ 8x + 8.975$	0.977 6	4.36
正丁醇萃取物	$y = 15.44x + 27.889$	0.997 3	1.43
水层物	$y = 3.363\ 6x - 7.985\ 1$	0.973 0	17.24
醇提后的水提取物	$y = 7.638\ 7x + 11.514$	0.851 9	5.04
水提取物	$y = 14.952x + 16.559$	0.963 4	2.24

不同样品对超氧阴离子自由基的清除作用见图 4。由图 4 可知, Vc 对超氧阴离子自由基的清除率随着浓度的增大而增大, 且当浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其清除率达到 96.21%, 在 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度以下可拟合线性关系为 $y = 231.7x - 16.12$ ($R^2=1$), 根据此线性关系计算得出 Vc 的 IC_{50} 值为 $0.29 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 各样品对超氧阴离子自由基的清除率都明显小于 Vc, 且随着浓度的增大其变化幅度较小, 各样品在该浓度范围内对超氧阴离子自由基的清除能力比较接近。当浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 其清除率从大到小依次是: 正丁醇萃取物为 20.1%、乙酸乙酯萃取物为 19.77%、乙醇提取物为 18.72%、石油醚萃取物为 17.8%、水层物为 12.69%、醇提后的水提物为 12.23%、水提物为 10.7%。

2.4 青钱柳叶不同提取物中的总黄酮含量及其与抗氧化活性的相关性

通过对青钱柳叶各提取物中总黄酮含量的测定结果表明(表 4), 总黄酮含量最高的为醇提后的水提物, 含量达 11.32%, 其次为水提物, 为 10.94%, 二者的总黄酮含量均显著高于其他几种样品的 ($P < 0.01$), 乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和乙醇提取物中的黄酮含量虽较前两者低, 但含量均在 6% 以上, 而石油醚萃取物和水提物中的总黄酮含量很低, 几乎为零。通过对样品中的总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率之间的相关性分析表明(见表 5), 总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率呈极显著正相关, 相关系数 $r=0.602$, $P=0.000$ ($P < 0.01$); 总黄酮含量与羟自由基清除率呈显著正相关, 相关系数 $r=0.427$, $P=0.011$ ($P < 0.05$); 总黄酮含量与超氧阴离子自由基清除率呈正相关, 但相关性不显著, $r=0.210$, $P=0.225$ 。

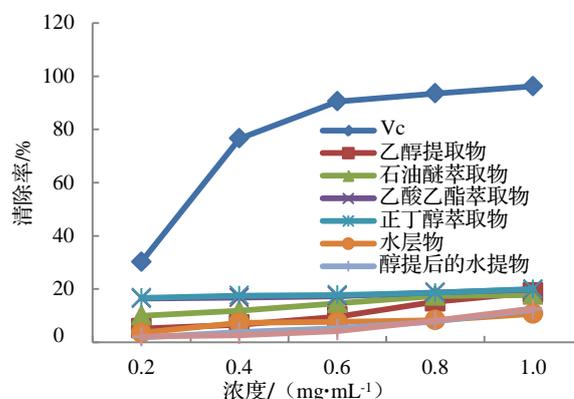


图 4 青钱柳叶不同提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

Figure 4 Scavenging effect on superoxide anion free radical by different extracts from *C. paliurus* leaves

表 4 青钱柳叶不同提取物中的总黄酮含量

Table 4 Content of total flavonoids in different extracts of *C. paliurus* leaves

样品	总黄酮含量/%	样品	总黄酮含量/%
醇提后的水提物	11.32±0.55a	乙醇提取物	6.37±0.23d
水提物	10.94±0.69a	水层物	0.18±0.03e
乙酸乙酯萃取物	9.47±0.56b	石油醚萃取物	0.08±0.04e
正丁醇萃取物	8.18±0.65c		

注: 不同字母代表差异性显著 ($P < 0.05$)。

表 5 青钱柳叶提取物总黄酮含量与抗氧化活性的相关性

Table 5 Correlation between total flavonoids of extracts from *C. paliurus* leaves and antioxidant activity

指标	DPPH 自由基清除率	羟自由基清除率	超氧阴离子自由基清除率
总黄酮含量	0.602**	0.427*	0.210

注: *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, $n = 70$ (DPPH 自由基清除率), $n = 35$ (羟自由基和超氧阴离子自由基清除率)。

3 讨论与结论

3.1 讨论

由于天然产物的组成成分及结构相当复杂, 为了筛选有效的活性组分, 需采用现代分离和分析技术对各组分和单体进行深入研究^[17], 其中利用不同溶剂将性质相近的组分集中在一起将其提取出来, 并分别与临床、动物实验相配合, 确定该部分是否有效, 再对有效部分进行分离、找出关键成分的系统分离法是应用较为普遍的一种技术手段。本试验利用溶剂的极性大小对青钱柳叶中的有机成分进行粗分, 得到成分相似的不同组分, 并考察各组分的抗氧化活性及抗氧化活性与活性组分间的量效关系。水作为强极性溶剂常用于提取极性很大的武

类、糖类、氨基酸、蛋白质、小分子有机酸等；乙醇作为亲水性有机溶剂，除了蛋白质、黏液、果胶、淀粉和部分多糖外，其他极性成分大部分能溶解，为了能够提取出一些极性较大的甙类物质，通常采用 95%乙醇；石油醚作用亲脂性的有机溶剂，常用于提取挥发油、脂肪油、脂溶性色素等非极性有机成分；乙酸乙酯和正丁醇作为中等和中等偏大极性的有机溶剂常用于提取中等极性的黄酮甙类和中等偏大极性的某些甙类（如皂甙、蒽甙等）。黄酮类化合物的多酚结构，可提供活泼的质子，与自由基结合形成稳定的化合物，从而起到清除自由基的作用，黄酮类化合物的提取分离常用丙酮、乙酸乙酯、乙醇、水或某些极性较大的混合溶剂如甲醇-水等进行萃取^[18]。

3.2 结论

本试验结果表明，青钱柳叶各提取物对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基都有不同程度的清除作用，但各提取物对不同自由基的清除能力存在一定的差异。青钱柳叶各提取物对 DPPH 自由基具有较强的清除作用，在 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度以下，其清除率与浓度呈现良好的线性关系，清除率最大的为醇提后的水提物；当浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，其清除率达到 91.29%；各提取物对 DPPH 自由基的清除能力依次为：醇提后的水提物>正丁醇萃取物>乙醇提取物>乙酸乙酯萃取物>水层物>水提物>石油醚萃取物。对羟自由基的清除能力最强的为乙醇提取物，当浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其清除率为 53.55%；在试验浓度范围内除石油醚提取物外，其余样品的浓度与清除率均呈现一定的线性关系。各样品对超氧阴离子自由基的清除率都明显小于 Vc，且随浓度的增大其变化幅度较小。

试验结果表明，采用乙醇、水和正丁醇等极性溶剂提取得到的活性组分的抗氧化作用强于其他提取物的活性组分，说明青钱柳叶中发挥抗氧化作用的是极性偏大的物质。同时，分析表明，总黄酮含量最高的为醇提后的水提物，其次为水提物，二者均显著高于其他几种样品，且各提取物中的总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率均呈极显著 ($P < 0.01$) 和显著正相关 ($P < 0.05$)，与超氧阴离子自由基清除率呈正相关，说明黄酮类化合物可能是青钱柳叶中主要的抗氧化活性成分之一。这与董彩军^[11]、陈玮玲^[12]等的研究结果相一致。许多研究证实黄酮类化合物是一种很强的活性氧自由基清除剂，已被广泛应用于医药领域^[19-20]。至于青钱柳叶中抗氧化活性的强弱取决于黄酮类化合物中的哪种结构成分还有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 中国科学院“中国植物志”编辑委员会. 中国植物志：第 21 卷[M]. 北京：科学出版社，1979：18-19.
- [2] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京：科学出版社，1994：159.
- [3] 张晓琦，叶文才，殷志琦，等. 青钱柳的化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2005，30（10）：791-792.
- [4] 李俊，陆园园，许子竞，等. 青钱柳中黄酮类成分的研究[J]. 中药材，2005，28（12）：1058-1059.
- [5] 张晓蓉，廖循，丁立生. 青钱柳的化学成分[J]. 应用与环境生物学报，2001，7（1）：90-91.
- [6] 李磊，谢明勇，易醒. 青钱柳多糖组分及其降血糖活性研究[J]. 江西农业大学学报，2001，23（4）：484-486.
- [7] 上官新晨，陈锦屏，吴少福，等. 青钱柳提取物对家兔实验性糖尿病模型降血糖作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2003，31（6）：117-120.
- [8] 黄敬耀，楼兰英，徐彭. 摇钱树叶的药理研究（简报）[J]. 中药通报，1986，11（11）：63.
- [9] 黄明圈，上官新晨，徐明生，等. 青钱柳多糖降血脂作用的研究[J]. 江西农业大学学报，2011，33（1）：157-161.
- [10] 赵静，吴茹，李楠，等. 青钱柳多糖对高脂血症小鼠 SOD、GSH-Px、CAT 基因 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业科学，2017，45（4）：124-127.
- [11] 董彩军，谢明勇，聂少平，等. 青钱柳提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学，2007，28（10）：31-34.
- [12] 陈玮玲，钟培培，王远兴. 青钱柳叶活性成分的抗氧化活性及 UPLC-QTOF-MS/MS 分析[J]. 食品科学，2017，38（8）：122-128.
- [13] 刘昕，王顺启，谢明勇，等. 青钱柳多糖对人宫颈癌 HeLa 细胞和人脐带内皮细胞生长的影响[J]. 食品科学，2007，28（10）：520-522.
- [14] 韩澄，聂少平，黄丹菲，等. 青钱柳多糖对人胃癌 MGC-803 细胞生长的影响[J]. 天然产物研究与开发，2009（21）：952-955.
- [15] 黄贝贝，肖凤仪，张文平，等. 青钱柳对小鼠免疫功能的影响[J]. 江西中医学院学报，2004，16（5）：59-60.
- [16] 陈家群. 青钱柳、罗汉果、Vc 对训练小鼠抗疲劳能力影响的实验研究[D]. 桂林：广西师范大学，2005.
- [17] 贾晓斌. 基于整体观中药物质基础认识与创新中药研发[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2017，19（9）：1430-1433.
- [18] 汪秋安，周冰，单杨. 天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展[J]. 化工生产与技术，2004，11（5）：29-32.
- [19] 陈薇，段小群，卢曦，等. 青钱柳提取物清除羟自由基和抑制脂质过氧化的作用[J]. 右江医学，2009，37（4）：381-383.
- [20] 刘莉华，宛晓春，李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展（综述）[J]. 安徽农业大学学报，2002，29（3）：265-270.
- [21] 成喜雨，崔馨，刘春朝，等. 中草药抗氧化活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2006，18：514-518.