

复序橐吾乙醇提取物的抗氧化及抑菌活性研究

于莉莉, 刘洪章, 朱梅, 张爽

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130000)

摘要:对长白山野生复序橐吾的乙醇提取物进行了抗氧化及抑菌活性研究。结果表明:复序橐吾乙醇提取物具有较明显的清除羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基作用,清除率与浓度之间存在着量效关系;复序橐吾乙醇提取物对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有明显的抑菌活性,对产气杆菌没有抑制作用。

关键词:复序橐吾;抗氧化;抑菌活性

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0029-03

复序橐吾(*Ligularia jaluensis* Kom.)为多年生草本植物^[1],别名多序橐吾。基生叶心状肾形或肾状三角形,头状花序排列成复总状,花黄色,冠毛白色,产东北长白山一带,多生于海拔 450~1 000 m 草甸子及林缘湿草地,为长白山特有种^[2]。橐吾属植物药用功能较多,主要有活血化瘀、止咳化痰、清热解毒、散寒润肺等功效^[3]。研究报道,橐吾属植物含有三萜类、倍半萜类、单萜类、苯并呋喃类、黄酮类、生物碱类等化学成分^[4-6]。许多资料与研究表明,在目前的医学研究中,人体自由基是否正常代谢是很多慢性疾病的导火索,在正常的生命过程中自由基为维持生命所必需^[7],其也是生物大分子、细胞和生物组织的杀手,清除体内多余自由基对人体健康有利^[8-9]。因此目前国内外大力开发新的具有抗氧化成分的天然食品及药品,以期能安全并且有效地清除人体内多余的自由基。橐吾属植物中多含有萜类及黄酮类等化合物,而萜类及黄酮类化合物均具有清除羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基作用。现以复序橐吾叶的乙醇提取物为研究对象,对其抗氧化活性和抑菌活性进行了研究,为长白山野生复序橐吾的开发利用提供基础性工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料

复序橐吾叶片采自吉林省临江市海拔 870 m 桦树林场林缘湿草地,置于通风处自然阴干。其它试剂、药

品为国产分析纯。供试菌种:大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、产气杆菌(*Anthraxi*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均由吉林农业大学生命科学学院微生物实验室提供。仪器设备:UV1800 紫外分析仪(岛津仪器有限公司),旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂),WB-9415B 超声波清洗器(北京六一仪器厂),恒温水浴锅(天津市泰斯仪器有限公司),电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),粉碎机(型号:FW100,天津泰斯特仪器公司),立式灭菌锅(上海博讯实业医疗设备厂),电子天平(型号:FA/JA 系列,上海惊天电子公司),振荡培养箱(型号 HZQ-F160,哈尔滨东联公司),超净工作台(型号:DL-CJ-2u,哈尔滨东联电子技术公司),离心机(SIGMA IN GERMANY)。

1.2 试验方法

1.2.1 复序橐吾乙醇粗提物的提取 将阴干的复序橐吾叶粉碎,过筛,加入体积分数为 70%的乙醇 10 倍超声破碎 60 min,重复 3 次得滤液,滤液进行减压抽滤得浸膏,将浸膏冷冻干燥得乙醇提取物粉末。称取适量样品进行颜色反应鉴别其所含物质。

1.2.2 复序橐吾提取物的抗氧化性测定 清除羟基离子测定:向损伤管中按表 1 加样,将试管置于 37℃ 水浴中 60 min 后,在 536 nm 波长下测其吸光值,得到损伤管的吸光度值 A_0 。空白管用蒸馏水代替双氧水溶液,得到空白管的吸光度值 A_2 。样品管则是用样品溶液代替蒸馏水。清除率 $E\% = (A_1 \text{ 样品管的吸光度值} - A_0 \text{ 损伤管的吸光度值}) / (A_2 \text{ 空白管的吸光度值} - A_0 \text{ 损伤管的吸光度值}) \times 100^{[10-11]}$ 。清除超氧阴离子的测定:试管中加 Tris-HCl 缓冲液 2.98 mL,10 mmol 邻苯三酚 0.01 mL,样品溶液 0.01 mL,然后将样品置于比色皿中比色,在 325 nm 下每间隔 30 s 打印 1 次 A 值,连续记录 6 min,通过计算样品的清除率来判断不同挥发油抗氧化能力

第一作者简介:于莉莉(1985-),女,在读硕士,研究方向为生物化学与分子生物学。

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,现主要从事长白山药用植物资源及其开发研究工作。E-mail:lhz999@126.com。

基金项目:吉林省科技厅科技支撑资助项目(20060222-2)。

收稿日期:2012-03-26

的强弱。清除率 $E\% = (\text{样品溶液吸光度值} - \text{空白组吸光度值}) \times 100\% / (\text{对照组吸光度值} - \text{空白组吸光度值}) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ [12-13]。清除 DPPH 自由基的测定:取试样溶液(浓度分别为 25~1 000 $\mu\text{g/mL}$),分别加入新配制的 0.4 mmol/L DPPH 乙醇溶液 1 mL,呈深紫蓝色,混合均匀后,反应 10 min [15]。用分光光度计在 540 nm 波长下测定其吸光值。DPPH 清除能力 $= (A_0 - A) / A_0 \times 100$, 式中 A_0 :控制组在 540 nm 波长下吸光值, A :试样在 540 nm 波长下的吸光值。

表 1 清除羟基离子自由基

Table 1 Clear hydroxyl radical cations

试剂 Reagent	样品管 Sample tube/mL	损伤管 Damage tube/mL	空白管 Blank tube/mL
0.75 mmol/L 邻二氮菲	1	1	1
pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液	2	2	2
0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液	4	4	4
蒸馏水	—	1	—
0.01% 双氧水溶液	—	—	1
样品溶液	1	—	—

1.2.3 复序囊吾乙醇粗提物的抑菌活性 LB 培养基的配制:1 L 液体培养基中加入胰蛋白胍(Tryptone)10 g/L,酵母提取物(Yeast extract)5 g/L,NaCl 10 g/L;固体培养基是在液体培养基的基础上 1 L 中加入 15 g 琼脂粉;将配好的培养基用报纸包好,灭菌,最后倒平板备用。菌种的活化:将菌种在平板中划线培养,在 38℃ 下培养,直到长出菌落;挑出菌落,放入液体培养基中,在 38℃,160 r/min 的条件下进行摇菌 12 h。纸片扩散法抑菌试验:①将菌液浓度稀释到 10^{-7} 倍,备用;②将提取物制成浓度为 100%、75%、50%、25%、0% 的浓度梯度,将剪好的小滤纸片放入浸泡在其中,备用;③将稀释好的菌液涂布在培养基中,再将相应的小滤纸片放到培养基的正中央,放入恒温培养箱中培养 1~3 d,观察试验结果。

2 结果与分析

2.1 复序囊吾乙醇提取物的颜色反应

由表 2 中各试剂的颜色反应得出,复序囊吾的乙醇提取物中含有黄酮类和萜类化合物。

表 2 复序囊吾乙醇提取物的颜色反应

Table 2 Color reaction of the ethanol extract of *Ligularia jaluensi*

方法 Method	颜色 Color	结果 Results
氯仿-浓硫酸法	氯仿红色、硫酸绿色荧光	萜类化合物
浓氨水法	亮黄色荧光	黄酮类化合物
三氯化铝反应	黄绿色荧光	黄酮类化合物
盐酸-镁粉反应	红紫色	游离黄酮或黄酮苷

2.2 清除羟自由基能力测定

由图 1 可知,复序囊吾乙醇提取物和维生素 C 都有着清除羟自由基的作用,当样品浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 以下时清除羟自由基的能力并不明显,但随着乙醇提取物浓

度的增加,对羟自由基的清除能力也逐渐加强。虽然复序囊吾乙醇提取物的清除作用比维生素 C 低,但其对清除羟自由基仍有一定作用。

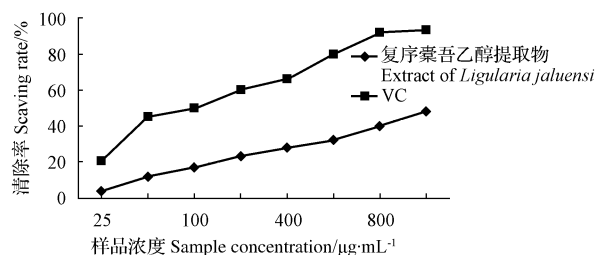


图 1 复序囊吾与维生素 C 对羟基自由基的清除作用

Fig. 1 The scavenging effect of *Ligularia jaluensi* and Vitamin C on hydroxyl free radical

2.3 清除超氧阴离子的测定

由图 2 可知,样品从浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时的清除率就已经达到 40%,并且清除率随着样品浓度的增加而增大,样品的清除超氧阴离子的能力稍弱于维生素 C,但基本已经与维生素 C 相抗衡。

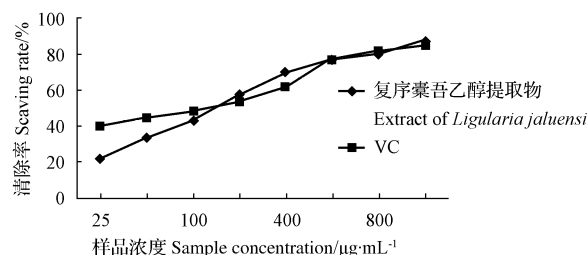


图 2 复序囊吾与维生素 C 对超氧自由基的清除作用

Fig. 2 The scavenging effect of *Ligularia jaluensi* and Vitamin C on superoxide anion free radical

2.4 清除 DPPH 自由基的测定

由图 3 可知,当样品浓度在 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 时,清除率为 14%~60%,而维生素 C 的清除率已经达到了 80%~90%。但是随着样品浓度增加到 400~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,其清除 DPPH 自由基的能力基本达到了维生素 C 的水平,清除率能达到 90%以上,维生素 C 溶液在该浓度范围内对 DPPH 的抑制率基本变化不大,清除率

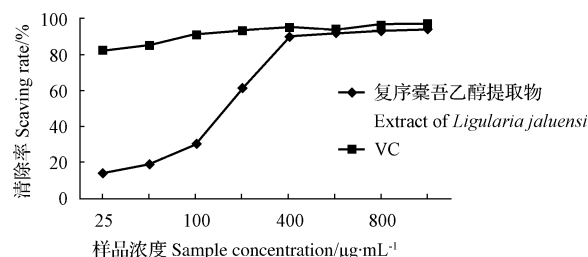


图 3 复序囊吾与 Vc 对 DPPH 的清除作用

Fig. 3 The scavenging effect of *Ligularia jaluensi* and Vitamin C on DPPH

都在 80% 以上。因此结果表明在相同浓度下的抑制率大于维生素 C。因此可以说明复序橐吾乙醇提取物在浓度较高的情况下具有清除 DPPH 自由基的作用。

2.5 抑菌活性

该试验采用的是滤纸片扩散法进行测定。由表 3 可知,野生复序橐吾乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌具有一定的抑菌活性,对产气杆菌完全没有抑制作用。样品稀释到 25% 时已经开始有了抑菌作用,金黄色葡萄球菌为 5 mm,枯草芽孢杆菌为 8 mm,大肠杆菌为 7 mm。随着稀释倍数的降低,抑菌圈直径越大。未经稀释的橐吾乙醇提取物抑菌圈直径最大,金黄色葡萄球菌为 11 mm,枯草芽孢杆菌为 13 mm,大肠杆菌为 14 mm,对大肠杆菌的抑制作用最明显。

表 3 复序橐吾乙醇提取物的抑菌圈直径

Table 3	The <i>Ligularia jaluensi</i> ethanol extract of the inhibition zone diameter				mm
稀释浓度	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	产气杆菌	大肠杆菌	
Dilution concentration	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Anthraxi</i>	<i>E. coli</i>	
CFU/%					
100	11	13	0	14	
75	10	12	0	13	
50	7	10	0	10	
25	5	8	0	7	
0	0	0	0	0	

3 结论与讨论

该试验采用了国际上普遍使用的清除超氧阴离子、羟基离子及 DPPH 自由基活性的方法以检验长白山野生复序橐吾叶片乙醇提取物的抗氧化活性^[14]。该方法操作简单明了,广泛用于评价抗氧化活性的好坏,可直接表明试验材料的抗氧化活性大小^[15]。

该试验结果表明,长白山复序橐吾的乙醇提取物能够清除部分超氧阴离子、羟基离子及 DPPH 自由基。在复序橐吾的样品浓度在 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,对它们的清除率分别是 48%、85% 和 93%,可见其对超氧阴离子和 DPPH 的清除率高于羟基离子但还弱于维生素 C。因此复序橐吾可以作为抗氧化剂使用,它能有效的打击人体

有害的自由基。抑菌试验表明,复序橐吾对复序橐吾乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌有明显的抑菌活性,对产气杆菌没有抑制作用。

复序橐吾乙醇粗提物是一种混合物,由定性试验可知,其中含有黄酮类及萜类化合物,但具体是哪种化合物起到了抗氧化及抑菌作用还不是很清楚。因此,对复序橐吾的化学成分及中药活性成分的进一步研究就成了重中之重,希望在未来的试验研究中能够得到更进一步的研究结果。以期对长白山野生橐吾的开发和利用提供理论上的可行性的指导。

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[M]. 77 卷. 北京: 科学出版社,1999:86,104.
- [2] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 2 版. 北京: 科学出版社,1995:685.
- [3] 张达治,余国莫,张勉,等. 橐吾属植物药用研究概况[J]. 中国野生植物资源,2003,22(2):4-7.
- [4] 卢光洲,闫福林,李卫林. 窄头橐吾化学成分的研究(II)[J]. 新乡医学院学报,2007,24(1):9-11.
- [5] 王琼,张朝凤,张勉,等. 大萹橐吾的化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志,2008,33(9):1018-1020.
- [6] Jung C M, Kwon H C, Soj J, et al. Twomonoterpene per-oxide glycosides from *Aster scaber* [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(7): 912-914.
- [7] 凌关庭. 抗氧化物质与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-10.
- [8] 孙长颢. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 110-128.
- [9] 毕和平, 张立伟, 韩长日, 等. 三叉苦提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 7-60.
- [10] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2 - Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [11] 聂芊, 廖顺雯, 刘涛. 四种粮食作物的花色苷抗氧化性能比较[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 46-48.
- [12] 邹国林, 桂兴芬. 一种 SOD 的测定方法—邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986(4): 71-73.
- [13] 程超, 朱玉昌, 莫开菊, 等. 零余子皂甙的抗氧化特性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 83-86.
- [14] 陈奕, 谢明勇, 弓晓峰. 黑灵芝提取物清除 DPPH 自由基的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 917-921.
- [15] 严成, 严夏. 枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 183-186.

Study on Antioxidant and Antibacterial Activity of Ethanol Extract of *Ligularia jaluensi*

YU Li-li, LIU Hong-zhang, ZHU Mei, ZHANG Shuang

(College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000)

Abstract: An experiment was conducted to study on antioxidant and antibacterial activity of ethanol extract of *Ligularia jaluensi* in changbai mountains. The results showed that the ethanol extract of *Ligularia jaluensi* had a distinct clear role of hydroxyl radicals, superoxide anion radical and DPPH radical, clearance rate and the concentration existed the dose-effect relationship. The ethanol extracts of *Ligularia jaluensi* had significant inhibitory activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, but no inhibition about the *Aerogenes*.

Key words: *Ligularia jaluensi*; antioxidant activity; antibacterial activity