

doi:10.11937/bfyy.20164715

## 青天葵总黄酮抗氧化及抑菌活性

许海棠, 李 浩, 赵彦芝, 周菊英, 杨立芳, 马少妹

(广西民族大学 化学化工学院, 广西林产化学与工程重点实验室, 广西 南宁 530008)

**摘 要:**以青天葵为试材,乙醇为溶剂,对青天葵进行总黄酮提取;采用清除羟自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和测定总还原能力的方法来评价青天葵总黄酮抗氧化活性;并通过测定其对 6 种试验菌的最低抑菌浓度来考察其抑菌活性。结果表明:青天葵黄酮提取液对羟自由基的清除优于同浓度的抗坏血酸溶液,清除 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  是  $17.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,清除超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$  是  $95.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,还原能力稍弱于抗坏血酸;对白色念珠球菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯氏菌的抑制作用较强,最低抑菌浓度均为  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**关键词:**青天葵;总黄酮;抗氧化活性;抑菌活性

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)16-0161-05

青天葵(*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.) 属兰科芋兰属植物,又名独叶莲、珍珠叶、天葵、地沙、半边伞、青莲、芋兰等,主要分布在广东、广西和海南等地,为华南地区的特有药材。全草可供药用,具有润肺止咳、清热解毒、散瘀止痛等功效,用于肺热咳嗽、口腔炎症、疮疡肿毒等症的治疗<sup>[1-3]</sup>。目前,从青天葵中分离出的化学成分有黄酮类、甾体类、三萜类、氨基酸类、挥发油类等<sup>[4-7]</sup>。

**第一作者简介:**许海棠(1975-),女,硕士,高级实验师,现主要从事中药植物资源开发与利用等研究工作。E-mail: xhthellen@163.com.

**责任作者:**周菊英(1979-),女,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事载药等研究工作。E-mail: zhoujuying@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81560713);国家民委资助项目(14GXZ012);广西高校科学资助项目(KY2015YB080)。

**收稿日期:**2017-02-28

对青天葵药理活性的研究已有报道<sup>[8-10]</sup>,但对其抗氧化方面的研究尚鲜见报道。目前已从青天葵分离出近 30 种黄酮类物质,黄酮类化合物因其具有防治心血管疾病、抗肿瘤、抗衰老等方面的药理作用,尤其是其抗氧化功能,而得到广泛的关注。目前,有证据表明氧化损伤可能引起细胞损伤、死亡而导致许多慢性疾病,如癌症、心脏病、阿尔茨海默病和帕金森氏症等<sup>[11]</sup>。黄酮类物质的抗氧化性已被证实可以缓解和防止自由基的形成,阻止氧化链反应而减轻这些症状<sup>[12]</sup>。因此,天然抗氧化剂被认为对健康有益,并被广泛应用于食品工业<sup>[13]</sup>。有研究表明,一些合成的抗氧化剂存在毒性和可能的致癌等不安全因素使其使用受限<sup>[14]</sup>。因此,从天然植物中开发更安全,无毒的抗氧化剂已成为研究热点。

为了更好地开发和利用青天葵,该研究拟采用 4 种体外抗氧化方法对青天葵黄酮提取液进行抗氧化活性评估,并通过测试青天葵黄酮提取液

medicinal plants had obvious characteristics of wild vegetable. As we know, medicinal and edible plants were abundant in Sichuan Province. Hence, there were enormous potential and broad prospects to expand there application by food development.

**Keywords:** Sichuan Province; medicinal plant; medicinal and edible plants; catalog; development and utilization

对6种试验菌的最低抑菌浓度来评估其抑菌活性,旨在更好地指导临床用药,并进一步分离活性成分,研制新型抗氧化剂和抑菌剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试青天葵购于广西南宁市老百姓大药房,产地广西,经广西民族大学药教研室杨立芳教授鉴定为青天葵(*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.)的全草。

供试试剂:DPPH(二苯代苦味酰自由基 Sigma 公司),芦丁对照品(批号 100080-200707 中国食品药品检定研究院),牛肉浸膏、蛋白胨、供试菌种(金黄色葡萄球菌 CMCC26003、大肠埃希菌 CMCC44102、铜绿假单胞菌 CMCC10104、肺炎克雷伯氏菌 CMCC46117、普通变形杆菌 CMCC49027、白色念珠球菌 ATCC10231)均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

供试仪器:LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),UV-1800 岛津紫外可见分光光度计(苏州岛津仪器有限公司),SPH-2102 型恒温摇床(上海世安实验设备有限公司),LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),RE-52 系列旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SPS401F 型电子天平(奥豪斯国际贸易有限公司),PL203 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),AJF-1001-U 型基础性纯水器(艾科浦公司),HH-S 型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 青天葵黄酮粗提物的提取

青天葵经粉碎后过 60 目筛,称取 50 g,用 60%乙醇溶液,在 70 ℃水浴提取 2 次,料液比为 1:30 g·mL<sup>-1</sup>。合并 2 次滤液,浓缩,干燥,得到总黄酮粗提物。

#### 1.2.2 总黄酮含量的测定

采用 AlCl<sub>3</sub>-HAc-NaAc 显色法<sup>[15]</sup>。精密量取 0.128 mg·mL<sup>-1</sup>的芦丁对照品溶液 1.5、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于 5 个 25 mL 容量瓶中,加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> AlCl<sub>3</sub> 溶液 1.5 mL,加 HAc-NaAc 缓冲溶液(pH 5.5) 1 mL,用 60%乙

醇溶液定容,摇匀即得。以不含芦丁的上述混合液做空白,在波长 405 nm 处测定吸光值,每个浓度样品溶液测 3 次。以吸光值(Y)对芦丁质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程为  $Y=0.0268X+0.0075$ ,  $r=1$ ;结果表明芦丁在 7.68~30.72 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与吸光值呈良好的线性关系。

#### 1.2.3 样品溶液的制备

抗氧化活性样品溶液:用 60%乙醇溶液溶解青天葵总黄酮粗提物,配制一系列浓度样品溶液,待测。抑菌试验的样品溶液:用二甲基亚砷溶解总黄酮粗提物,配制成含总黄酮 40 mg·mL<sup>-1</sup> 储备液,试验前用无菌水稀释至含总黄酮 4 mg·mL<sup>-1</sup>。

#### 1.2.4 抗氧化活性的测定

清除羟自由基能力的试验:根据谢晓凤等<sup>[16]</sup>方法,分别配制不同浓度的样品管(100、200、300、400、500 μg·mL<sup>-1</sup>)以及损伤管和未损伤管,3 根管为 1 组,37 ℃下保温 1 h,在 536 nm 处测定吸光值,平行测定 3 次,取平均值代入公式计算清除率。以抗坏血酸(VC)为对照品。清除率(%)= $(A_{\text{样}}-A_{\text{损}})/(A_{\text{未损}}-A_{\text{损}}) \times 100$ ,其中, $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{损}}$ 、 $A_{\text{未损}}$  分别为样品管、损伤管和未损伤管测得的吸光值。清除 DPPH 自由基能力试验:参照 SHAO 等<sup>[17]</sup>的方法,配制浓度为 5、10、20、30、40 μg·mL<sup>-1</sup> 的黄酮提取液以及 2、4、6、8、10 μg·mL<sup>-1</sup> VC 溶液。在每支试管中分别加入 DPPH·乙醇溶液,样品溶液和无水乙醇中的 2 种溶液各 5.0 mL,把各混合溶液振荡混匀后,避光放置 30 min,于 517 nm 处测定吸光值。平行操作测定 3 次,记录吸光值,取平均值计算清除率。清除率(%)= $[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100$ ,其中, $A_0$  为空白液的吸光值; $A_1$  为 DPPH·溶液和样品溶液混合液的吸光值; $A_2$  为不含 DPPH·溶液的样品溶液吸光值。清除超氧阴离子自由基的试验:试验前配制不同浓度的黄酮提取液(20、60、100、140、180 μg·mL<sup>-1</sup>)和 VC 溶液(20、30、40、50、60 μg·mL<sup>-1</sup>),参考李路宁等<sup>[18]</sup>方法,配制 50 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl(pH 8.2)缓冲溶液和 3 mmol·L<sup>-1</sup> 的邻苯三酚溶液。把混合溶液混匀,于 325 nm 处每隔 30 s 记录一次吸光值,直至 5 min。通过计算得到邻苯三酚自氧化速率  $V_0$  和样品清除超氧阴离子速率  $V_1$ ,再计算清除率,清除率(%)= $(V_0-V_1)/V_0 \times 100$ 。还原能力测

定: 配制不同质量浓度 (50、100、150、200、250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的样品溶液和 VC 溶液。参考 KE 等<sup>[19]</sup>方法, 配制混合溶液, 反应后于 700 nm 处测定吸光值, 平行操作 3 次, 取平均值表示还原能力的强度。

### 1.2.5 抑菌活性的测定

菌悬液的制备: 在超净工作台上挑取适量供试菌种到灭菌的液体培养基, 于恒温摇床培养。待各菌株活化后, 用无菌生理盐水稀释调整菌液浓度至  $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 作为上样菌悬液, 备用。最低抑菌浓度的测定: 用试管二倍稀释法。参照许海棠等<sup>[20]</sup>方法, 在 8 支灭菌试管中分别加入牛肉膏蛋白胨液体培养基 1 mL。在第 1 管中加入灭菌的青天葵样品溶液 (含总黄酮 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1 mL, 混匀后吸取 1 mL 加入到第 2 管中, 同样操作, 得到 1:2、1:4、1:8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  等一系列浓度的供试液。向样品管中加入 0.1 mL 菌悬液; 阳性对照管只含液体培养基和菌液 0.1 mL; 阴性对照管不加菌液。将各试管置于恒温培养箱培养, 观察结果。每浓度重复 3 次, 无菌生长的最低浓度即为最低抑菌浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 青天葵黄酮对羟自由基的清除能力

如图 1 所示, 在 100~500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内, 青天葵总黄酮和抗坏血酸对羟自由基的清除均随着浓度的增大呈上升趋势, 青天葵黄酮提取液清除率的提升幅度比抗坏血酸的高。当样品溶液浓度为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 青天葵黄酮的清除率为 2.6%, VC 的清除率为 0.7%; 当样品浓度为 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 青天葵黄酮的清除率为 83.5%, 远高于 VC 对羟自由基的清除率。由此可看出, 在清除羟自由基方面, 青天葵黄酮明显优于抗坏血酸。

### 2.2 青天葵黄酮对 DPPH 自由基的清除能力

由图 2 可知, 随着浓度的升高, 青天葵黄酮提取液和抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除作用明显增强。当青天葵黄酮提取液浓度为 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 其对 DPPH 自由基的清除率为 85%; 青天葵黄酮和抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率为 50% 时的浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别是 17.4、4.42  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由

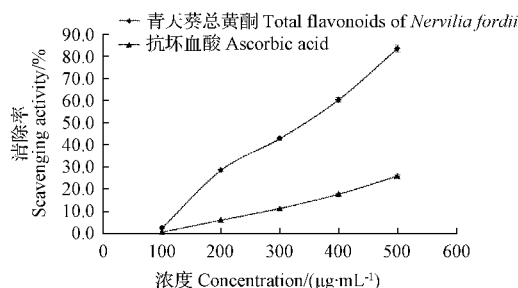


图 1 青天葵总黄酮和抗坏血酸清除羟自由基的能力

Fig. 1 Hydroxyl radical scavenging activity of total flavonoids from *Nervilia fordii* and ascorbic acid

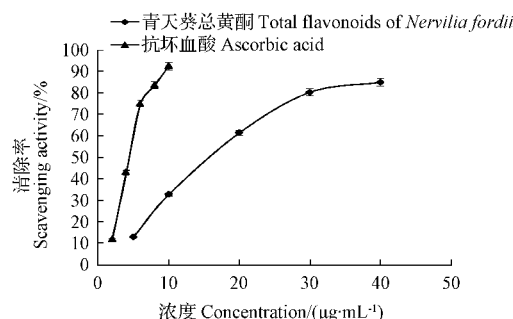


图 2 青天葵总黄酮和抗坏血酸清除 DPPH 自由基的能力

Fig. 2 DPPH radical scavenging activity of total flavonoids from *Nervilia fordii* and ascorbic acid

此可知, 青天葵黄酮提取液清除 DPPH 自由基的能力较强, 但稍低于抗坏血酸。

### 2.3 青天葵黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力

由图 3 可知, 青天葵总黄酮和抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除作用随着浓度的增大而增强, VC 的增幅比青天葵黄酮的高。青天葵黄酮提取液浓度从 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  增至 180  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对超氧阴离子自由基的清除率则从 23.0% 增为 73.8%; 而 VC 溶液从 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  增至 60  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 清除率则由 29.0% 增为 71.7%。青天葵黄酮的  $\text{IC}_{50}$  是 95.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而 VC 的  $\text{IC}_{50}$  是 41.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可见, 青天葵黄酮具有略低于抗坏血酸清除超氧阴离子自由基的能力。

### 2.4 青天葵的总还原能力

由图 4 可知, 青天葵黄酮提取液与抗坏血酸

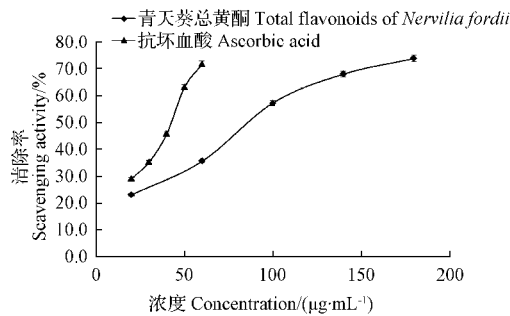


图3 青天葵总黄酮和抗坏血酸清除超氧阴离子自由基的能力

Fig. 3 Superoxide anion radical scavenging activity of total flavonoids from *Nervilia fordii* and ascorbic acid

的吸光值与浓度呈明显的量效关系,吸光值越大表明还原能力越强。当起始浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,青天葵黄酮提取液吸光值是 0.612, VC 是 0.547。但随着浓度增大,VC 还原能力增强的幅度更大,当浓度为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,青天葵黄酮提取液吸光值为 1.349, VC 为 2.599。可见,青天葵黄酮提取液具有略低于 VC 的还原能力。

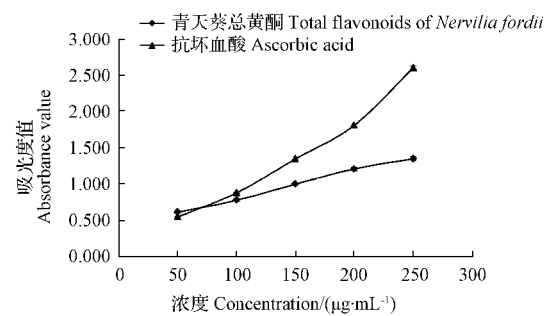


图4 青天葵总黄酮和抗坏血酸的还原能力

Fig. 4 Reducing power of total flavonoids from *Nervilia fordii* and ascorbic acid

## 2.5 青天葵总黄酮的最低抑菌浓度

由表1可以看出,在试验浓度范围内青天葵黄酮提取物对6种供试菌都具有抑制作用,其中对铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、白色念珠球菌的抑制效果最好,其MIC只有  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;其次是对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑制能力,其MIC是  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;对普通变形杆菌的抑制效果相对较差,MIC是  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表1

青天葵总黄酮的最小抑菌浓度

Table 1

MIC of total flavonoids from *Nervilia fordii*

菌株 Strain	样品浓度 Concentration/(mg · mL <sup>-1</sup> )						阴性管	阳性管
	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	0.062 5		
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	+	+	+	—	+
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	—	+	+	+	—	+
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	+	+	—	+
肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumonia</i>	—	—	—	—	+	+	—	+
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	—	—	+	+	+	+	—	+
白色念珠球菌 <i>Monilia albican</i>	—	—	—	—	+	+	—	+

注:“—”表示无菌生长,“+”表示有菌生长。

Note: ‘—’ means no growth of bacteria, ‘+’ means visual growth of bacteria.

## 3 讨论

通过采用4种体外抗氧化活性评价方法对青天葵黄酮提取物进行试验评估,发现青天葵具有良好的清除自由基的能力和较好的还原能力,尤其是对羟自由基的清除能力明显优于相同浓度的抗坏血酸,此结论与王英丽<sup>[21]</sup>结果基本一致。在抑菌性方面,青天葵黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠球菌的抑制性与文献报道的结果相吻合<sup>[22]</sup>,但该文献未对肺炎克

雷伯氏菌和普通变形杆菌的抑制做研究报道。肺炎克雷伯氏菌是一种典型的条件致病菌,可引起下呼吸道、泌尿道、消化道等多个部位感染。该研究表明青天葵黄酮对肺炎克雷伯氏菌有较强的抑制作用,为青天葵的抑菌活性数据做了进一步的补充。此外,青天葵黄酮提取物对铜绿假单胞菌、白色念珠球菌的抑制效果很好,提示其在外科、呼吸科、妇科、泌尿系统等方面有很好的应用前景。该研究为青天葵的抗氧化和抑菌方面的开发利用提供了参考依据。

## 参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1731.
- [2] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中药材,2007,30(8):942-945.
- [3] TIAN L W, PEI Y, ZHANG Y J, et al. 7-O-Methylkaempferol and quercetin glycosides from the whole plant of *Nervilia fordii*[J]. J Nat Prod, 2009,72:1057-1060.
- [4] ZHOU G X, LU C L, WANG H S, et al. An acetyl flavonol from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009,11(6):498-502.
- [5] 卢传礼,周光雄,王恒山,等. 青天葵中酚性成分研究[J]. 中药材,2009,32(3):373-375.
- [6] 赵珊,陈奇. 青天葵挥发油成分分析[J]. 中药新药与临床药理,2007,18(5):383-385.
- [7] HUA Z, PENG F, DENG F Z. Chemical constituents of petroleum ether extract from *Nervilia fordii*[J]. Pakistan J Biol Sci, 2006,9(8):1556-1558.
- [8] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(5):36-38.
- [9] 王振华,杜勤,张奉学,等. 青天葵抗甲、乙型流感病毒作用研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):2940-2941.
- [10] 杜勤,叶木荣,王振华,等. 青天葵镇咳、平喘药理作用研究[J]. 广州中医药大学学报,2006,23(1):45-47.
- [11] RAOUF O, PATRICE A R, ANDRE B. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2[J]. Life Sci, 2000,68:387-399.
- [12] DEY A, LAKSHMANAN J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver[J]. Food Funct, 2013(4):1148-1184.
- [13] YUAN J F, LIU X Q, YANG J X, et al. *Forsythia suspense* leaves, a plant; Extraction, purification and antioxidant activity of main active compounds[J]. Eur Food Res Technol, 2014, 238: 527-533.
- [14] NEDA F, REZA H, BEHNAZ A. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of peppermint (*Mentha piperita*) [J]. Food Measure, 2014(8):113-121.
- [15] 徐灵源,谢集照,谢云峰,等. 紫外分光光度法测定青天葵药材总黄酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):88-90.
- [16] 谢晓凤,童莲花,童德胜,等. 马齿苋总黄酮的提取及其浓缩汁抗氧化性研究[J]. 食品科技,2013,38(2):192-197.
- [17] SHAO P, CHEN X, SUN P. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae[J]. Int J Biol Macromol, 2013,62:155-161.
- [18] 李路宁,陈威,赵立仪,等. 蓝莓花青素的酰化及其抗氧化性评价[J]. 食品工业科技,2014,35(6):102-106.
- [19] KE C, QIAO D, GAN D, et al. Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*[J]. Carbohydr Poly, 2009,75(4):677-682.
- [20] 许海棠,卢建芳,赵彦芝,等. 山豆根提取物抗氧化和抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技,2015,36(14):111-114.
- [21] 王英丽. 青天葵黄酮类物质的初步研究[D]. 泸州:泸州医学院,2013:27-28.
- [22] 黄青萍,黎冬梅,蔡乐,等. 青天葵3种提取液对4种常见致病菌抑菌效果的比较[J]. 时珍国医国药,2012,21(12):3160-3161.

Antioxidant and Antibacterial Activity of Total Flavonoids From *Nervilia fordii*

XU Haitang, LI Hao, ZHAO Yanzhi, ZHOU Juying, YANG Lifang, MA Shaomei

(School of Chemistry and Chemistry Engineering, Guangxi University for Nationalities/Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Nanning, Guangxi 530008)

**Abstract:** *Nervilia fordii* was used as test material, total flavonoids were extracted from *Nervilia fordii* using ethanol as extraction solvent. The antioxidant activity was evaluated by  $\cdot\text{OH}$ , DPPH $\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radical scavenging assays and reducing power assay. And the antibacterial effects were investigated by its minimal inhibitory concentrations (MIC) for six test bacterias. The results showed that the extract from *Nervilia fordii* showed strong scavenging ability on hydroxyl radical, which was better than that of ascorbic acid solution at the same concentration. The  $\text{IC}_{50}$  of scavenging DPPH radical was  $17.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{IC}_{50}$  of scavenging  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radical was  $95.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and reducing power was relatively weak. The results of antibacterial tests indicated that total flavonoids from *Nervilia fordii* had good antibacterial ability on *Monilia albican*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, with MIC of  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

**Keywords:** *Nervilia fordii*; total flavonoids; antioxidant activity; antibacterial activity