

文章编号: 1673-1689(2011)05-0679-04

藤茶多酚体外抗氧化作用

肖浩^{1,2}, 郑小江^{* 1,2}, 朱玉婷²

(1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院 生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000)

摘要: 以 Vc 为对照, 采用 Fe^{3+} -还原法对藤茶多酚的还原能力进行测定; 采用 Fenton 反应法研究藤茶多酚对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用; 采用邻苯三酚自氧化法研究藤茶多酚对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的清除作用。结果表明: 在本试验质量浓度范围内, 藤茶多酚对 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 具有一定的清除能力; 在质量浓度相同的情况下, 藤茶多酚对 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的清除能力比 Vc 强, 其半数抑制率 IC_{50} 分别为 159.09 $\mu g/mL$ 和 30.97 $\mu g/mL$, 因而藤茶多酚是一种较好的天然抗氧化剂。

关键词: 藤茶; 多酚; 还原力; 自由基; 抗氧化

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Antioxidant Effects of Polyphenol from *Ampelopsis grossedentata*

XIAO Hao^{1,2}, ZHENG Xiao-jiang^{* 1,2}, ZHU Yu-ting²

(1. Key Laboratory of Hubei Province about Biological Resources Protection And Utilization, Enshi 445000, China; 2. College of Biological Science and Technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: In order to explain the oxidation resistance ability of polyphenol from *Ampelopsis grossedentata*, this manuscript take Vc as the comparison, the reducing power, the $\cdot OH$ and $O_2^{\cdot -}$ eliminate ability of polyphenol from *Ampelopsis grossedentata* were investigated. The results demonstrated that the ampelopsis grossedentata polyphenols could eliminated $\cdot OH$ and $O_2^{\cdot -}$. With the same concentration, the ampelopsis grossedentata polyphenol had stronger ability than that of Vc for elimination $\cdot OH$ and $O_2^{\cdot -}$, the half of suppression rate IC_{50} is 159.09 $\mu g/mL$ and 30.97 $\mu g/mL$, respectively. The above results strong suggested that the ampelopsis grossedentata polyphenols is one kind of good natural oxidation inhibitor.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; polyphenol; reducing power; radical; Antioxidant

藤茶为葡萄科 (*Vitaceae* *michx*) 蛇葡萄属 (*Ampelopsis*) 野生木质落叶藤本植物显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (*Hance* & *Mazz*) W. T.

Wang]^[1], 属于典型的类茶植物, 俗称山甜茶、白茶、甘露茶、白毛猴、白茶等, 主要分布于我国湖南、湖北、云南、贵州、广东、广西、福建等地^[2-4]。藤茶为

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 湖北省自然科学基金创新群体项目(2009CDA155); 国家民委科研项目(08HB04)。

* 通信作者: 郑小江(1958-), 男, 山东淄博人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事野生植物保护与可持续利用方面的研究。Email: hbzxjl23@126.com

药食两用植物,最初作为草药应用于民间。在我国广西、湖南、湖北等省区,壮族、瑶族、土家族、苗族人民常用其幼嫩茎叶入茶,夏天泡茶,数日不馊,有“神茶”之称^[5],已有数百年的历史。据《中草药汇编》、《广西药用植物名录》、《广东药用植物手册》等文献记载,该药性味甘淡、清热解暑,主治黄疸型肝炎、感冒风热、咽喉肿痛等^[6]。近年来,有关藤茶的研究主要集中在藤茶栽培、繁育及黄酮类化合物的功能活性等方面,而对藤茶的多酚类物质研究较少。作者以湖北民族学院藤茶课题组的藤茶为材料,对藤茶的多酚物质抗氧化作用进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

藤茶新叶:采自恩施州来凤县大河镇藤茶种植基地;没食子酸、酒石酸铁、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、邻苯三酚、VC、邻菲罗啉、硫酸亚铁、双氧水:均为分析纯。

202-1A型电热恒温干燥箱:天津市泰斯特仪器有限公司;BG-W203旋转蒸发器:上海贝凯生物化工设备有限公司;DZF-6090真空干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;UVWIN5型紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 材料的预处理 将新采摘的藤茶新叶放入60℃恒温干燥箱中干燥5h,取出后用粉碎机粉碎,过60目筛,装入棕色广口瓶中备用。

1.2.2 藤茶多酚的提取 称取藤茶粉末500g于2000mL烧杯中,按1:3的比例加入1500mL水,60℃下热浸提3h,提取2次,合并提取液,置于冷藏柜中放置一夜。取上清液用70%乙醇沉淀多糖,分离上清液,减压真空浓缩至200mL。然后用乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液,减压真空浓缩,回收乙酸乙酯,将浓缩液置于真空冷冻干燥箱干燥,得多酚粗品。

1.2.3 多酚粗品中总酚质量浓度测定 采用国标GB8313.87酒石酸铁法。配制1mg/mL没食子酸母液,分别吸取没食子酸母液0.02、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mL于25mL容量瓶中,用蒸馏水补足至5mL,再加5mL酒石酸铁溶液,置于一系列25mL的容量瓶中。用配制好的pH为7.5的磷酸缓冲溶液冲稀至刻度,摇匀。用可见分光光度计,在540nm处用1cm比色皿以蒸馏水代替没食子酸溶液作空白,测定吸光度。用所测的吸光度与对应的没

食子酸浓度绘制标准工作曲线,得回归方程 $y = 0.6179x - 0.0037$, $R^2 = 0.9994$ 。称取一定量的藤茶多酚样品并配成多酚溶液,按以上标曲制作方法测定,计算得样品多酚质量浓度。

1.2.4 样品还原能力的测定 加2.5mL的样品溶液、2.5mL 0.2mol/LPBS(pH 6.6), 2.5mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 于试管中混匀,在50℃水浴中反应20min,速冷并加入2.5mL 10%TCA,混匀后以3000r/min离心10min,取5mL上清液加入1mL 0.1% $FeCl_3$ 混匀,再加4mL蒸馏水摇匀后,在700nm下测定 A_{700} ^[7]。以 V_c 为阳性对照。样品多酚浓度设计:0、20、40、60、80、100 $\mu g/mL$ (样品质量浓度指加入反应体系前样品的质量浓度)。

1.2.5 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)清除率测定 取4.5mL pH 8.2、50mmol/L Tris-HCl缓冲液,4.2mL蒸馏水,混匀后在25℃水浴中保温20min,取出后立即加入在25℃预热过的3mmol/L邻苯三酚0.3mL(以10mmol/L HCl配制,空白管用10mmol/L HCl代替邻苯三酚的HCl溶液),迅速摇匀后倒入比色皿,325nm下每隔30s测定吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加^[8-9]。样品浓度设计:取0.2mg/mL样品溶液各0.3、0.6、0.9、1.2、1.5mL。

$$\text{抑制百分率}(\%) = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100\%$$

式中: ΔA_0 为邻苯三酚的自氧化速率; ΔA 为加入多酚样品后邻苯三酚的自氧化速率,单位均为吸光度每分钟的增值。

1.2.6 羟基自由基($\cdot OH$)清除能力测定

1) 损伤吸光度(A损伤):取5mmol/L邻二氮菲溶液0.6mL,加入0.4mL、0.75mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液混匀,加入5mmol/L硫酸亚铁溶液0.6mL,蒸馏水3.6mL,0.03%的双氧水0.8mL,混匀,37℃保温1h,于536nm处测定吸光度^[10]。

2) 空白吸光度(A空白):取5mmol/L邻二氮菲溶液0.6mL,加入0.4mL pH 7.4磷酸盐缓冲液混匀,加5mmol/L硫酸亚铁溶液0.6mL,蒸馏水4.4mL,混匀,37℃保温1h,于536nm处测定吸光度^[11]。

3) 样品吸光度(A样品):取5mmol/L邻二氮菲(邻菲罗啉)溶液0.6mL,加入0.4mL、pH 7.4磷酸盐缓冲液混匀,加5mmol/L硫酸亚铁溶液0.6mL。样品浓度设计为取1.5mg/mL样品溶液各0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL,0.1%的双氧水0.8mL,混匀,37℃保温1h,于536nm处测定吸光度。

IC₅₀值为自由基清除率达到50%时的样品浓度。

羟基自由基清除率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 藤茶多酚还原力的大小

还原力的测定可检验化合物是否为良好的电子供应体, 它所提供的电子可以使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 从而使体系溶液颜色改变, 即反映出体系中氧化还原状态的改变。体系溶液吸光值越大, 则表示被测物还原力越强, 抗氧化效果越佳^[12]。从图1可知, 在试验浓度范围内, 各样品的还原力与其质量浓度成明显的量效关系, 还原力大小为藤茶多酚 > VC。

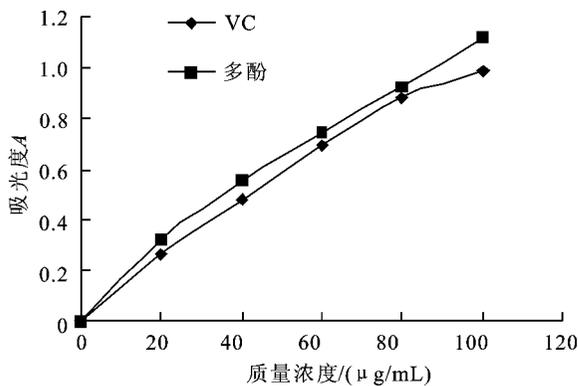


图1 还原力曲线

Fig. 1 Curve of reducing power

2.2 清除超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot -}$)效果

邻苯三酚自氧化过程为链式反应, 可产生 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 氧化产物的质量浓度可用分光光度仪检测。在 pH 值小于 9.0 时, 邻苯三酚自氧化速率与生成的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的浓度呈正相关, 可通过紫外可见光分光光度仪来定量测定抗氧化剂在此体系中对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除作用, 间接评价抗氧化剂的抗氧化能力^[13]。由图2可知, 藤茶多酚对超氧阴离子自由基清除作用要高于 VC 的作用。当溶液中多酚质量浓度达到 30.97 μg/mL 时, 清除率达到 50%。另外, 当加入样品 0.6 mL, 即溶液中样品质量浓度为 13.33 μg/mL 时, 样品才发挥明显作用。在试验质量浓度范围内, 随着多酚质量浓度的增大, 清除率逐渐增高。

2.3 清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的效果

邻二氮菲- Fe^{2+} 是一种常用的氧化还原指示剂, 其颜色变化可敏锐地反映溶液氧化还原状态的改变。 H_2O_2 与 Fe^{2+} 作用可通过 Fenton 反应产生羟基自由基, 邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟基自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后, 其在 536 nm 处最大吸收峰消

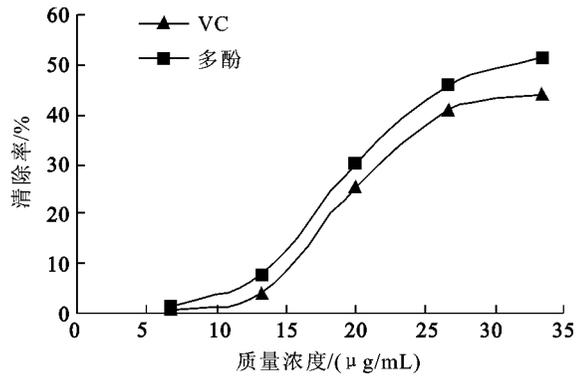


图2 藤茶多酚对超氧阴离子自由基清除作用

Fig. 2 Effect of ampelopsis grossedentata polyphenol on scavenging $\text{O}_2^{\cdot -}$

失。根据此原理, 我们可间接评价抗氧化剂的抗氧化能力。抗氧化剂提供 50% 抑制作用时的质量浓度 IC₅₀ 常用来表示抗氧化剂的抗氧化能力, IC₅₀ 值越小, 清除能力越强, 反之越弱^[14]。由图3可知, 藤茶多酚对羟基自由基的清除率要高于 VC。在试验质量浓度范围内, 清除率随溶液中多酚质量浓度的增高而增大, 其 IC₅₀ 为 159.09 μg/mL。

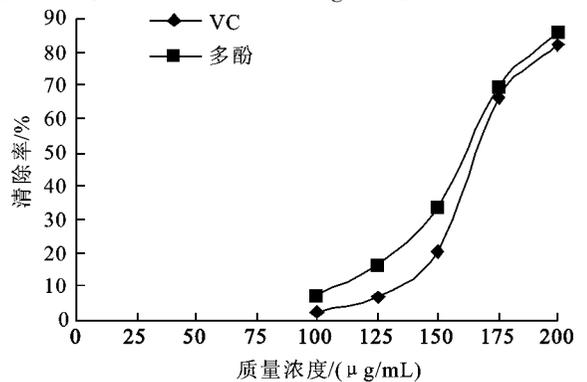


图3 藤茶多酚对羟基自由基的清除作用

Fig. 3 Effects of ampelopsis grossedentata polyphenol on scavenging $\cdot\text{OH}$

3 结语

藤茶多酚清除超氧自由基和羟基自由基的能力强于 VC, 其清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的 IC₅₀ 值为 30.97 μg/mL, 清除 $\cdot\text{OH}$ 的 IC₅₀ 值为 159.09 μg/mL。藤茶多酚有较强的还原能力, 其还原 Fe^{3+} 的能力要强于 VC。

藤茶多酚是一种较好的天然抗氧化剂, 在相同条件下, 其抗氧化能力要大于 VC。藤茶为药食两用植物, 有清热解毒解毒之功效, 对口舌生疮、中暑、风火、牙痛、便秘等症有明显的疗效, 且藤茶中多酚物质含量较高, 可达 10%, 有望用于与自由基相关的心血管疾病等的防治方面, 若以此为基础开

发新药,将具有广阔的应用前景。

参考文献(References):

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 34- 53.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(二册)[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 349- 356.
- [3] 罗祖友, 付晓芳, 吴谋成. 藤茶的研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 513- 516.
LUO Zi-you, FU Xiao-fang, WU Mo-cheng. Progress on the study of *Ampelopsis grossedentata*[J]. **Food Science**, 2005, 26(8): 513- 516. (in Chinese)
- [4] 易诚. 显齿蛇葡萄研究进展[J]. 经济林研究, 2004, 22(3): 51- 56.
YI Cheng. Research development of *Ampelopsis grossedentata*[J]. **Research on Economic Forest**, 2004, 22(3): 51- 56. (in Chinese)
- [5] 张学娟. 珍稀的药茶两用植物—藤茶[J]. 中国花卉盆景, 2007, (12): 15.
ZHANG Xue-juan. Treasure plant can be used as drugs and tea—*Ampelopsis grossedentata*[J]. **Chinese Flowers and Plants Bonsai**, 2007, 12: 15. (in Chinese)
- [6] 覃骊兰. 藤茶的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(6): 94- 96.
QIN Li-lan. Research advance in chemical components and pharmacological actions of rattan tea[J]. **Shanghai Journal of Chinese Medicine**, 2008, 42(6): 94- 96. (in Chinese)
- [7] 刘朝霞, 胡士德, 邹坤. 资木瓜乙醇提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2008, 30(4): 72- 75.
LIU Zhao-xia, HU Shi-de, ZOU Kun. Studies of antioxidation in vitro of ethanol extract from *Chaenomeles speciosa* (Swert) Nakai[J]. **Journal of Sanxia University: Natural Science**, 2008, 30(4): 72- 75. (in Chinese)
- [8] 弓晓峰, 谢明勇, 陈奕. 黑灵芝与赤灵芝提取物的抗氧化作用比较[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 44- 47.
GONG Xiao-feng, XIE Ming-yong, CHEN Yi. Comparison of the anti-oxidative effects of extracts from *Ganoderma atrum* and *Ganoderma lucidum*[J]. **Food Science**, 2006, 27(4): 44- 47. (in Chinese)
- [9] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造, 2009, 26(6): 155- 157.
HAN Shao-hua, ZHU Jing-bo, WANG Yan-yan. Measurement of the antioxidant activity by pyrogallol autoxidation[J]. **China Brews**, 2009, 26(6): 155- 157. (in Chinese)
- [10] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553- 555.
JIN Ming, CAI Ya-xin, LI Rong, et al. The neighbour two nitrogen Philippines- Fe²⁺ oxo-process examines the hydroxy free radical which H₂O₂/Fe²⁺ produces[J]. **Progress of Biochemistry and Biophysics**, 1996, 23(6): 553- 555. (in Chinese)
- [11] 牛广财, 朱丹, 王军, 等. 沙棘酒清除自由基作用的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 36-40.
LIU Guang-cai, ZHU Dan, WANG Jun, et al. Study on sea-buckthorn liquor elimination free radical function[J]. **Journal of Chinese Food**, 2010, 10(1): 36- 40. (in Chinese)
- [12] 张振东, 吴兰芳, 景永帅, 等. 仙茅提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(24): 3201- 3203.
ZHANG Zhen-dong, WU Lan-fang, JING Yong-shuai, et al. Study on antioxidant activities of extracts from *Curculigo orchoides* in vitro[J]. **Journal of Chinese Old Age Study**, 2009, 29(24): 3201- 3203. (in Chinese)
- [13] 龚钢明, 张赞彬, 王化田. 红景天多酚物质抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 91- 93.
GONG Gang-ming, ZHANG Zan-bin, WANG Hua-tian. Study on antioxidant effects of polyphenol from *Rodiola rosea*[J]. **Food Science**, 2008, 29(2): 91- 93. (in Chinese)
- [14] 李文明, 刘洪涛, 李佳佳, 等. 川芎有效成分的体外抗氧化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 64- 70.
LI Wen-ming, LIU Hong-tao, LI Jia-jia, et al. Isolation and antioxidative activity of the substrate isolated from chuanxiong [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1): 64- 70. (in Chinese)