

草果醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究^Δ

陈石梅^{1*}, 黄比翼², 黄锁义^{2,3#}(1.右江民族医学院基础医学院, 广西百色 533000; 2.右江民族医学院药学院, 广西百色 533000; 3.右江民族医学院广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室, 广西百色 533000)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0953-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.10

摘要 目的:评价草果醇提物4种不同极性部位的体外抗氧化活性,为该植物中抗氧化活性化学成分的开发研究奠定基础。方法:将草果的干燥果实粉碎后,用95%乙醇加热回流提取,经旋转蒸发浓缩、水浴蒸干后得到醇提取物浸膏;将该浸膏以水分散,再依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别合并各溶剂萃取液,并收集下层水相,再经旋转蒸发浓缩、水浴蒸干后得到石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位。采用经典体外抗氧化活性试验,以2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)作为阳性对照,考察草果醇提物不同极性部位对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、超氧阴离子自由基的清除能力和对三价铁离子(Fe^{3+})的还原能力。结果:草果醇提物4种极性部位对DPPH自由基的清除率均达到80%以上,其清除能力强弱排序为乙酸乙酯部位>BHT>正丁醇部位>石油醚部位>水部位;对超氧阴离子自由基的清除率大部分约为30%~40%,其清除能力强弱排序为正丁醇部位>石油醚部位>水部位>乙酸乙酯部位>BHT,但整体弱于其对DPPH自由基的清除能力;对 Fe^{3+} 也有一定的还原能力,其还原能力强弱排序总体上为正丁醇部位>BHT>乙酸乙酯部位>石油醚部位>水部位,但当水部位质量浓度为4.0 $\mu g/mL$ 时其还原能力升至最强。结论:草果的不同极性部位均具有一定的体外抗氧化能力,但在不同抗氧化活性试验中的抗氧化活性能力强弱排序并不一致;乙酸乙酯部位对DPPH自由基的清除能力最强,正丁醇部位对超氧阴离子自由基的清除能力和对 Fe^{3+} 的还原能力最强。

关键词 草果;醇提物;极性部位;抗氧化活性;体外

Study on *in vitro* Antioxidant Activities of Different Polar Parts of Ethanol Extract from *Amomum tsao-ko*

CHEN Shimei¹, HUANG Biyi², HUANG Suoyi^{2,3}(1. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China; 2. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China; 3. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Characteristic Ethnic Medicine of Youjiang Valley, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate *in vitro* antioxidant activities of 4 different polar parts of ethanol extract from *Amomum tsao-ko*, and to lay a foundation for the research and development of antioxidant chemical components in the plant. METHODS: The dried fruits of *A. tsao-ko* were crushed, then were hearted and reflux extracted with 95% ethanol. The extraction fluid was concentrated by rotary evaporation and evaporated in water bath to obtain the ethanol extract. The extract was dispersed in water, and then extracted with petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol organic solvents one by one. Each solvent extract was combined and the lower water phase were collected. Finally, the petroleum ether part, ethyl acetate part, *n*-butanol part and water part were obtained, after rotary evaporation concentration and water bath evaporation. Through *in vitro* antioxidant activity tests, using 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) as positive control, DPPH radical, superoxide anion radical scavenging ability and Fe^{3+} reducing ability of different polar parts of ethanol extract from *A. tsao-ko* were investigated. RESULTS: The scavenging rates of 4 polar parts of ethanol extract from *A. tsao-ko* on DPPH radical were all over 80%; the order of scavenging ability was ethyl acetate part>BHT>*n*-butanol part>petroleum ether part>water part. Those of the 4 polar parts to superoxide anion radical were between about 30%-40% mostly; the order of scavenging ability was *n*-butanol part>petroleum ether part>water part>ethyl acetate part>BHT; but those were weaker than their scavenging ability to DPPH radical. The polar parts of ethanol extract also had a certain reduction ability to Fe^{3+} ; the order of the reduction ability was *n*-butanol part>BHT>ethyl acetate part>petroleum ether part>water part on the whole, but that of water part rose to the strongest when its concentration was 4.0 $\mu g/mL$. CONCLUSIONS: The different polar parts of ethanol extract from *A. tsao-ko* have certain *in vitro* antioxidant capacity, but the order of antioxidant activity of different polar parts was not the same in different antioxidant activity tests; ethyl acetate part has the strongest scavenging effect on DPPH radical, *n*-butanol part

^Δ 基金项目:广西科技计划项目(No.桂科AB18221095);右江民族医学院高层次人才科研项目(No.01002018079);右江民族医学院教学名师培养计划项目——国家级教学名师培养计划项目(No.右医字[2018]98号)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物免疫机制、卫生检验与检疫。E-mail:1439042410@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然药物免疫机制、天然产物化学、药物化学等。电话:0776-2827263。E-mail:huangsuoyi@163.com

has the strongest scavenging ability on superoxide anion radical and reducing ability on Fe^{3+} .

KEYWORDS *Amomum tsao-ko*; Ethanol extract; Polar parts; Antioxidant activity; *in vitro*

草果(*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemarie)是姜科豆蔻属多年生草本植物,主要分布于我国云南、广西、贵州等省区^[1]。草果是药食两用中药材大宗品种之一,主要作为香料应用于食品加工领域,也应用于中药和其他领域,其主要成分有挥发油、醇类、醛类、酮类、蛋白质以及微量元素等^[2]。干燥成熟的草果果实既是生活中常见的调味香料,也是一种传统中药,具有燥湿健脾、除痰截疟的功能^[3]。在民间,草果主要用于治疗疟疾、咽喉感染、腹痛、胃功能失调、消化不良、恶心呕吐、腹泻等,还具有降血糖、抗氧化、抗肿瘤等功效^[4-6]。近年来,随着对草果研究的深入,其药用价值日益受到国内外学者的重视,其提取方法、化学成分和抗氧化活性已经成为了研究热点。

目前,国内外关于草果化学成分的研究主要集中在其挥发油成分^[7-9],关于其抗氧化活性研究则多见于草果精油、挥发油以及醇提取物^[6,10-12],而草果不同溶剂提取物的抗氧化活性的比较研究报道较少。基于此,本文将草果干燥果实醇提物的石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位为研究对象,通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、超氧阴离子自由基清除试验,以及三价铁离子(Fe^{3+})还原试验,考察草果醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性,筛选草果中具有抗氧化活性的部位,为该植物抗氧化活性成分的开发研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

FA1204B型电子天平(上海天美天平仪器有限公司);SHB-B88型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);RE-3000A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6020型真空干燥箱(广州市星烁仪器有限公司);HH-Z4型数显恒温水浴锅(金坛市城东光芒仪器厂);L-530型多管架自动平衡离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);N4S型紫外-可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

草果药材购自广西玉林市,经右江民族医学院民族医教研室覃道光副教授鉴定为姜科豆蔻属多年生草本植物草果(*A. tsao-ko* Crevost et Lemarie)的干燥果实。将其粉碎成粗粉,于通风干燥条件下贮存,备用。

2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT,上海晶纯试剂有限公司,优级纯);DPPH(上海金穗生物科技有限公司); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (上海实意化学试剂有限公司);邻苯三酚(津市福晨化学试剂厂);95%乙醇、无水乙醇、石油醚

(60~90℃)、乙酸乙酯、正丁醇、浓盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等其他试剂均购自成都市科隆化学品有限公司;水为蒸馏水。

2 方法

2.1 草果醇提物不同极性部位的提取

参照文献方法^[13],称取草果粗粉5 kg,加入3倍量95%乙醇(L/kg)加热回流提取,重复提取3次,每次2 h;过滤,合并滤液,在约50℃下旋转蒸发浓缩,再水浴蒸干至无醇味后,得醇提取物浸膏623.2 g(得率为12.46%)。取该醇提取物浸膏适量,加入1倍量水(mL/g)分散制成混悬液,再依次加入石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(每次均按体积比1:1加入溶剂,多次萃取至上层有机层接近澄清无色后继续加入下一种溶剂提取)进行萃取。分别合并不同上层有机溶剂萃取液,并收集下层水相,在约50℃下旋转蒸发浓缩,再水浴蒸干,分别得到石油醚部位浸膏23.05 g(得率为3.69%)、乙酸乙酯部位浸膏18.83 g(得率为3.02%)、正丁醇部位浸膏12.34 g(得率为1.98%)、水部位浸膏39.94 g(得率为6.41%)。

2.2 草果醇提物不同极性部位的抗氧化活性测定

2.2.1 工作溶液的配制 分别称取“2.1”项下制备的4种不同极性部位浸膏以及BHT(阳性对照)各0.05 g,用甲醇溶解并定容至50 mL,制得石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位以及BHT质量浓度均为1 g/L的母液;取上述母液各适量,加甲醇分别稀释成质量浓度均为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列工作溶液,于4℃低温保存,备用。

2.2.2 不同极性部位对DPPH自由基的清除能力测定

参照文献方法^[13]并作部分调整后,取“2.2.1”项下4种极性部位以及BHT工作溶液分别进行DPPH自由基的清除试验。每种极性部位样品及BHT均设置11个具塞比色管,编为0~10号:在0号比色管中加入0.1 mmol/L DPPH工作溶液2 mL和无水乙醇2 mL,作为空白管;在1~5号比色管中分别加入0.1 mmol/L DPPH工作溶液2 mL和相应药物的系列工作液(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各2 mL,作为试验管;在6~10号管中分别加入无水乙醇2 mL和相应药物的系列工作液(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各2 mL,作为对照管。各比色管混匀后,在30℃下避光反应30 min。以无水乙醇进行调零,采用紫外-可见分光光度计在517 nm波长处测定各反应溶液的吸光度(A)值,按公式计算DPPH自由基清除率: DPPH自由基清除率(%) = $[1 - (A_{\text{试验}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}} \times 100\%$ 。每种样品均重复测定3次。

2.2.3 不同极性部位对超氧阴离子自由基的清除能力

测定 参照邻苯三酚自氧化方法^[14]并作部分调整后,取“2.2.1”项下4种极性部位以及BHT工作溶液分别进行超氧阴离子自由基清除试验。每种极性部位样品及BHT均设置11个具塞比色管,编号为0~10号;0号比色管加入1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)4 mL、2.5 mmol/L邻苯三酚溶液0.4 mL和无水乙醇1 mL,作为空白管;1~5号比色管加入1 mol/L Tris-HCl缓冲液4 mL、2.5 mmol/L邻苯三酚溶液0.4 mL和相应药物的系列工作液(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL)各1 mL,作为试验管;6~10号比色管加入1 mol/L Tris-HCl缓冲液4 mL、水0.4 mL和相应药物的系列工作液(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL)各1 mL,作为对照管。各比色管混匀后,在室温下反应5 min,然后滴加8 mmol/L HCl溶液1 mL终止反应。以水进行调零,采用紫外-可见分光光度计在320 nm波长处测定各反应溶液的A值,按公式计算超氧阴离子清除率:超氧阴离子清除率(%)=[1-(A_{试验}-A_{对照})/A_{空白}]×100%。每种样品均重复测定3次。

2.2.4 不同极性部位对Fe³⁺的还原能力测定 参照文献方法^[15],取“2.2.1”项下4种极性部位以及BHT工作溶液分别进行Fe³⁺还原试验。每种极性部位样品及BHT均设置15 mL离心管5支,分别加入相应药物的系列工作液(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL)各1 mL、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 6.6)2.5 mL和1%铁氰化钾溶液2.5 mL。各离心管在50℃水浴中加热反应20 min后,加入10%三氯乙酸溶液2.5 mL终止反应,然后以3 000 r/min离心10 min;取上清液2.5 mL于具塞比色管中,加入水2.5 mL和0.1% FeCl₃溶液0.5 mL,混匀,静置反应10 min。以水进行调零,采用紫外-可见分光光度计在波长700 nm处测定各反应溶液的A值。以A值表示待测药物对Fe³⁺的还原能力,A值越大,则表示药物的还原能力越强^[15]。每种样品均重复测定3次。

3 结果

3.1 草果醇提取物不同极性部位对DPPH自由基的清除能力

草果醇提取物4种极性部位对DPPH自由基的清除率均达80%以上,表明清除能力均较强。其中,当样品质量浓度为4 μg/mL时,乙酸乙酯部位对DPPH自由基清除的能力最强,清除率为99.82%,接近100%;其次为阳性对照BHT,清除率为95.26%;正丁醇部位、石油醚部位、水部位的清除率分别为91.79%、87.96%、83.76%,详见图1。总体而言,各样品对DPPH自由基的清除能力强弱排序为:乙酸乙酯部位>BHT>正丁醇部位>石油醚部位>水部位。

3.2 草果醇提取物不同极性部位对超氧阴离子自由基的清除能力

草果醇提取物的4种极性部位对超氧阴离子自由基的清除率大部分为30%~40%,清除能力明显弱于其对

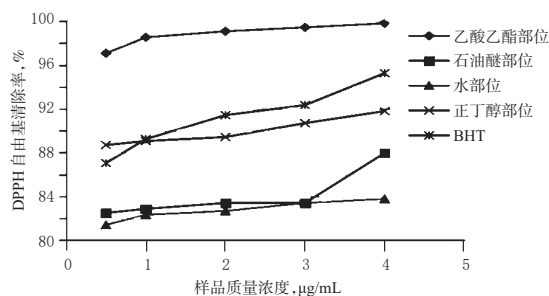


图1 草果醇提取物不同极性部位对DPPH自由基的清除率

Fig 1 Scavenging rate of different polar parts of ethanolic extract from *A. tsao-ko* to DPPH radical

DPPH自由基的清除能力。在相同的质量浓度条件下,4种极性部位对超氧阴离子自由基的清除率均强于BHT;其中,正丁醇部位对超氧阴离子自由基的清除能力最强,当其质量浓度从3.0 μg/mL升至4.0 μg/mL时,其清除率大幅增强,从44.76%升至74.65%;其余3种部位和阳性对照BHT对超氧阴离子自由基的清除率较为接近,均低于40%,详见图2。总体而言,各样品对超氧阴离子自由基的清除能力强弱排序为:正丁醇部位>石油醚部位>水部位>乙酸乙酯部位>BHT。

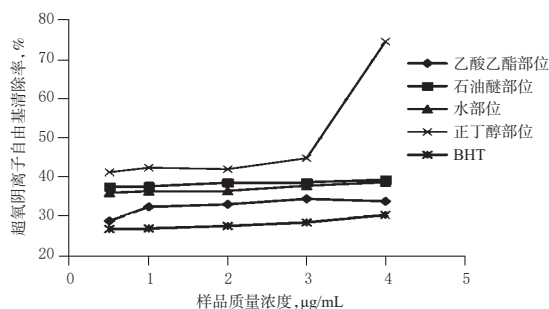


图2 草果醇提取物不同极性部位对超氧阴离子自由基的清除率

Fig 2 Scavenging rate of different polar parts of ethanolic extract from *A. tsao-ko* to superoxide anion radical

3.3 草果醇提取物不同极性部位对Fe³⁺的还原能力

随着草果醇提取物不同极性部位质量浓度的增加,其对Fe³⁺的还原能力也在不断增强。当样品质量浓度在0.5~3.0 μg/mL范围内时,正丁醇部位对Fe³⁺的还原能力强于其他部位;但当样品质量浓度达到4.0 μg/mL时,水部位对Fe³⁺的还原能力大幅增强,并稍强于正丁醇,详见图3。总体而言,各样品质量浓度较低时,对Fe³⁺的还原能力强弱排序为:正丁醇部位>BHT>乙酸乙酯部位>石油醚部位>水部位;但样品质量浓度升高至一定程度时,水部位对Fe³⁺的还原能力最强。

4 讨论

抗氧化是指抗氧化自由基的简称,人体与外界持续接触时,由于呼吸(氧化反应)、外界污染、放射线照射等因素,会不断地产生自由基^[16]。紫外线辐射、环境污染、

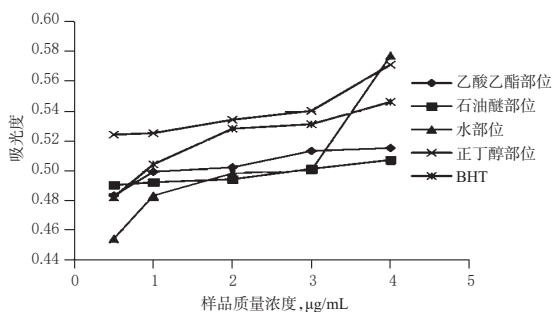


图3 草果醇提物不同极性部位对Fe³⁺的还原能力

Fig 3 Reduction ability of different polar parts of ethanolic extract from *A. tsao-ko* to Fe³⁺

吸烟、熬夜等都可诱导皮肤产生过多活性氧自由基,导致氧化应激损伤,进而导致皮肤衰老、肝损伤、脑损伤、炎症、肿瘤等多种不良后果^[16-20]。目前,抗氧化剂多作为食品防腐剂应用于食品的保鲜和加工中,而天然来源的抗氧化剂开发成相关药物,具有天然、高效、危害性小的特点,更易于被人们接受^[21]。

本研究采用不同溶剂对草果干燥果实的醇提物分别进行萃取后,获得不同极性部位样品,并通过经典抗氧化试验,考察上述极性部位的体外抗氧化活性,旨在为后续明确并开发利用高效的天然植物来源抗氧化活性化合物提供基础。本研究选择的阳性对照为BHT,又名2,6-二叔丁基对甲酚,是目前国际上广泛应用的廉价抗氧化剂,也是体外抗氧化试验中通用的抗氧化对照试剂^[22]。

本研究考察了草果醇提物的石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位对DPPH自由基、超氧阴离子自由基的清除能力以及对Fe³⁺的还原能力。结果发现,上述4种极性部位对DPPH自由基均具有较强的清除效果,清除率均在80%以上;对超氧阴离子自由基具有一定清除能力,但清除率明显弱于其对DPPH自由基的清除率;对Fe³⁺也有一定的还原作用。其中,乙酸乙酯部位对DPPH的清除能力最强,正丁醇部位对超氧阴离子自由基的清除能力和对Fe³⁺的还原能力最强;但当样品质量浓度升高至一定程度时,水部位对Fe³⁺的还原能力最强。

综上所述,草果醇提物不同极性部位均具有抗氧化活性,但抗氧化活性能力强弱顺序并不一致,而且水部位的还原能力随着样品质量浓度的升高而大幅增强的原因尚未明确。笔者认为这可能是不同部位所含具有抗氧化作用的化学成分不同所导致的,有待进一步通过药效物质基础及活性化合物的提取分离、结构鉴定等进行深入研究。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 239.
 [2] 丁艳霞, 崔秀明, 戴云. 草果的研究进展[J]. 特产研究, 2005, 27(4): 60-63.
 [3] 权美平. 草果精油功能性研究进展[J]. 中国调味品, 2016,

41(3): 142-145.
 [4] YANG Y, YUE Y, RUNWEI Y, et al. Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 4205-4211.
 [5] 何明庚, 赵文胜, 张益俊, 等. 滇西地区民族民间疟疾验方80首[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(11): 28-35.
 [6] 咸魁锋, 尹虹. 豆蔻属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1831-1836.
 [7] 杨志清, 徐绍忠, 张薇, 等. 云南草果茎叶挥发油含量及主要化学成分分析[J]. 中药材, 2019, 42(2): 339-343.
 [8] 张世洋, 王晶, 李生茂, 等. 四种常见姜科化湿中药挥发油化学成分及体外抗菌活性比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2378-2385, 2462.
 [9] CUI Q, WANG LT, LIU JZ, et al. Rapid extraction of *Amomum tsao-ko* essential oil and determination of its chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.08.001.
 [10] 郭森, 宋江峰, 豆海港. 超声波辅助提取草果精油及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 58-61.
 [11] 万红焱. 滇产草果中有效成分的提取工艺及抗氧化活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015.
 [12] 闫倩. 草果甲醇溶出物的抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.
 [13] 喻巧容, 黄锁义. 不同极性薏苡仁提取物抗氧化活性研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(19): 20-23.
 [14] 易湘西, 李家怡, 高程海, 等. 无瓣海桑果实乙醇提取物及其不同极性萃取物抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 27-30.
 [15] 黄忠有, 黄锁义, 喻巧容, 等. 薏苡根不同极性组分的抗氧化活性分析[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(1): 17-20.
 [16] 王晓芊. 抗氧化 抗衰老的有效途径[J]. 中国化妆品, 2019(7): 101-103.
 [17] 覃红娟, 谭守勇, 邝浩斌, 等. 抗氧化剂预防抗结核药物致肝损伤的随机开放研究[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(12): 1867-1870.
 [18] 孟卫霞, 钱燕. 抗氧化剂对高氧损伤新生大鼠脑细胞的保护作用研究[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2015, 32(3): 252-254.
 [19] 宁灿健, 余四旺. 基于核因子E₂相关因子2/抗氧化反应元件信号通路探讨白藜芦醇对胃癌的化学预防作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(21): 2682-2686.
 [20] 沈云辉, 陈长勋. 抗氧化应激研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2715-2719.
 [21] 周颖超, 左昕怡, 王芙蓉, 等. 植物源抗氧化剂在水产品保鲜和加工中的应用研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 203-207.
 [22] 赵策强. 抗氧化剂BHT的研究与应用[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(4): 62-63.

(收稿日期: 2019-08-08 修回日期: 2020-02-22)

(编辑: 段思怡)