

昆仑雪菊不同溶剂萃取物抗氧化活性研究

邵冬冬¹, 陈千¹, 李赫宇², 肖文平^{1,3,*}

(1. 黄冈师范学院 化学化工学院, 催化材料与制备湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 天津益倍生物科技集团, 天津 300457; 3. 湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼((1, 1 diphenyl -2- trinitrobenzene hydrazine, DPPH)法分别测定4个提取部位的抗氧化活性, 结果表明, 正丁醇部位的抗氧化活性最强, 绝对清除率达到96.97%, 其次是乙酸乙酯部位, 绝对清除率达到93.86%。用水杨酸法进行了其清除·OH的测定, 结果表明, 乙酸乙酯部位对羟基自由基清除能力最强。采用铁离子还原能力测定法测定各提取部位的总还原能力, 乙酸乙酯部位总还原能力最强。对乙酸乙酯部位进行进一步的分离, 得到一个苯丙酸类化合物, 用¹H-NMR初步鉴定了化合物的结构。

关键词: 昆仑雪菊; 抗氧化; 提取; 分离

Study on Antioxidant Activity of the Extraction of Coreopsis Tinctoria

SHAO Dong-dong¹, CHEN Qian¹, LI He-yu², XIAO Wen-ping^{1,3,*}

(1. Hubei Key Laboratory of Processing and Application of Catalytic Materials, College of Chemistry and Chemical Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, Hubei, China; 2. Tianjing Ubasic Biotech Group, Tianjin 300457, China; 3. Pharmacy of Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: The antioxidant activity of 4 extracted parts were determined by DPPH (1,1 diphenyl -2 - trinitrobenzene hydrazine). Results showed that the strongest antioxidant activity was n-butyl alcohol part, absolute clearance rate was 96.97%, followed by ethyl acetate, absolute clearance rate was 93.86%. The results showed that the strongest hydroxyl radical scavenging ability was ethyl acetate part. The total reduction ability of each extraction site was determined by the determination of iron ion reduction ability, and the total reduction ability of ethyl acetate part was the strongest. Further separation of ethyl acetate extract was carried out, and a propionic acid was obtained. The structure of the compound was identified by ¹HNMR.

Key words: Coreopsis Tinctoria; antioxidant activity; extraction; separation

引文格式:

邵冬冬, 陈千, 李赫宇, 等. 昆仑雪菊不同溶剂萃取物抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(15): 28-31

SHAO Dongdong, CHEN Qian, LI Heyu, et al. Study on Antioxidant Activity of the Extraction of Coreopsis Tinctoria [J]. Food Research and Development, 2018, 39(15): 28-31

昆仑雪菊是维吾尔族人民传统的养生保健的天然植物, 当地人称其为“古丽恰尔”。由于其生长环境

基金项目: 湖北省教育厅科技项目(B2015219); 黄冈师范学院科学研究项目(2013019403)

作者简介: 邵冬冬(1995—), 男(汉), 本科在读, 研究方向: 天然药物的提取分离。

* 通信作者: 肖文平(1980—), 女(汉), 讲师, 研究方向: 天然药物提取分离。

较少污染, 富含多种对人体有益的成分, 故现今已逐渐作为一种茶饮普及开来。雪菊, 学名两色金鸡菊(Coreopsis Tinctoria)蛇目菊, 为菊科金鸡菊属(Coreopsis)多年生草本植物, 在我国新疆尤其是和田地区、云南部分地区有一定规模栽培。目前雪菊的提取方法主要有水提法, 醇提法, 醇水混合提取, 微波及超声波提取及超临界二氧化碳提取等。其主要的化学成分有酮、有机酸、萜烯、多糖等, 迄今已报导的雪菊活性主要

包括抗炎、降脂、降压、降糖、抗凝血、抗氧化、抗病毒等^[1-9]。国内外很多学者研究雪菊,但大部分是关于含量测定和生物活性的,而关于雪菊粗提物的分离和雪菊中化合物的结构研究报道较少^[10-21]。

抗氧化物质与人们的生产和生活密不可分,疾病治疗、食品加工、生活用品中都可能用到。研究来源无害、不造成环境污染的天然抗氧化物质—植物源抗氧化剂成为了近年来食品界研究的热点。雪菊作为一种新型的植物抗氧化剂原料越来越受到重视,由于其产量在新疆地区丰富,在该地区分布广泛,其挥发油、有机酸和黄酮产量丰富,具有抑菌和抗氧化、促生长等作用而成为需要大力开发的资源^[6]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

昆仑雪菊:江西致和堂中药饮片有限公司。

所有试剂均为市售分析纯。

UV-3802 型紫外可见分光光度计:尤尼柯仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;DG-120 型四两装中药材粉碎机:浙江省瑞安市春海药材器械厂。

1.2 石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位的制备

参考文献方法^[22],取雪菊 30 g,粉碎至 10 目左右,每次加入 75%的乙醇 400 mL^[9],90℃加热回流提取 3 次,回流时间分别是 1 h、1 h、40 min。放冷,合并 3 次提取液进行减压抽滤,滤液通过旋转蒸发器浓缩至无醇味。浓缩液分别用与其体积比为 1:1 的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别回收至干燥,得到石油醚部位 76.9 mg、氯仿部位 677.2 mg、乙酸乙酯部位 498.4 mg、正丁醇部位 2 747.3 mg。

1.3 抗氧化活性的测定^[23]

1.3.1 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除率

将 1.2 中得到的石油醚部位用 75%的乙醇溶解,定容至 50 mL 的容量瓶中,用移液枪取 5 mL 上述溶液,用 75%的乙醇定容至 10 mL,此为待测液。称取 5 mg DPPH,用 75%的乙醇溶液定容至 250 mL 容量瓶中,避光备用。将 2 mL 待测液及 2 mL DPPH 溶液置于一具塞试管中,摇匀,放置 30 min,以 75%乙醇加 DPPH 溶液为空白,以待测液加 75%乙醇为对照,于 517 nm 处测定吸光度,并以下式计算清除率。

以同样的方法测定氯仿部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位的清除率。另取 70 mgV_c 加 75%的乙醇定

容至 50 mL,用移液枪取上述溶液 5 mL,用 75%的乙醇定容至 10 mL,测定清除率。

1.3.2 雪菊各提取部位清除·OH 的能力的测定

分别取 1.2 中的提取物 25 mg,用乙醇定容至 25 mL。在 10 mL 试管中分别加入 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 1 mL,分别加入上述溶液 1.0 mL,再加 6 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 1.0 mL,摇匀,放置 10 min,再加入 6 mmol/L 的水杨酸溶液 3 mL,摇匀,37℃恒温反应 30 min,于 510 nm 处测吸光度,空白试剂代替样品为空白组,以空白试剂代替水杨酸为对照组,V_c 为阳性对照,每个样品重复 3 次,取平均值。按以下公式计算各提取部位的清除率。

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

式中:A_c 为空白组吸光度;A_i 为待测样品的吸光度;A_j 为对照组吸光度。

1.3.3 总还原能力的测定

采用铁离子还原能力测定法测定 1.2 中各种提取物的总还原能力。分别取 1.2 中的提取物 25 mg,用乙醇定容至 25 mL,用移液枪取 10 mL 上述溶液,用乙醇定容至 25 mL。分别取 1 mL 上述溶液,分别依次加入 pH6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 mL(0.2 mol/L)和 1%的铁氰化钾溶液 2.5 mL,混匀,于 50℃恒温反应 20 min,急速冷却后,加 2.5 mL 10%的三氯乙酸,混匀后 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,分别加蒸馏水 2.5 mL 和 0.1%三氯化铁溶液 0.5 mL,混匀,静置 10 min 后,在 700 nm 测定吸光度。以空白试剂作为阴性对照,以 V_c 溶液为阳性对照,每个样品重复测 3 次,取平均值。吸光度值越大,表明样品总还原能力越强。

1.4 乙酸乙酯部分的提取分离

结合参考文献^[22,24],另取雪菊 235 g,重复 1.2 的操作,得到乙酸乙酯部分 3.3 g。将乙酸乙酯部分加少量 10%乙醇溶解,经过预处理的大孔树脂柱中,依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液冲洗。流出液点硅胶薄层,如图 1,70%乙醇冲洗液斑点清晰可见。70%乙醇部分回收至完全干燥,用少量无水乙醇溶解,加入少量柱层析硅胶,加热,待无水乙醇完全蒸干得到硅胶样品。将样品上入硅胶柱中,依次用氯仿、氯仿:甲醇(9:1,体积比)、氯仿:甲醇(8:2,体积比)、氯仿:甲醇(7:3,体积比)冲洗,流出液分别点硅胶薄层,如图 2,氯仿:甲醇(9:1,体积比)部分的流^[24]出液斑点清晰可见。将氯仿:甲醇(9:1,体积比)的部分回收,用丙酮重结晶,抽滤,减压真空(60℃)干燥 24 h,得到化合物 1。



图1 70%乙醇流出液的硅胶薄层

Fig.1 Silica gel thin-layer chromatography of 70% ethanol solution

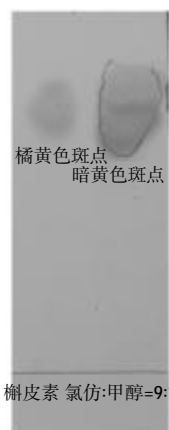


图2 氯仿:甲醇(9:1)流出液硅胶薄层

Fig.2 Silica gel thin-layer chromatography of chloroform:methanol (9:1) solution

2 结果与讨论

2.1 抗氧化活性的结果

2.1.1 DPPH 法进行了抗氧化活性的测定

将石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位分别用 DPPH 法进行抗氧化活性的测定,结果显示,正丁醇部位清除率为 96.97%,其次是乙酸乙酯部位为 93.86%,石油醚部位清除率为 87.72%。但若与相同浓度的 V_c 相比,正丁醇部位的抗氧化活性不如 V_c 的抗氧化活性。结果表明,正丁醇提取部位发挥清除 DPPH 自由基作用的成分较多,且这些成分大部分是极性较大的成分,可能多为黄酮类化合物的苷类物质。

2.1.2 雪菊各提取部位清除·OH 的能力

将石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位分别用水杨酸法进行清除·OH 的测定,结果显示,当所有提取部位浓度为 1 mg/mL 时,乙酸乙酯部位对羟基的清除能力最强,达到 85.96%,其次是正丁醇部位,达到 80.23%,石油醚部位对羟基的清除能力最

低,只有 21.31%。但若与相同浓度的 V_c 相比,清除羟基自由基的能力均小于等于相同浓度 V_c 。结果表明,雪菊各提取部位清除羟基自由基的能力与提取部位的浓度和各提取部位的化学成分相关。雪菊清除羟基自由基的能力可能与黄酮类化合物的苷元相关。

2.1.3 总还原能力的测定

将石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位分别用铁离子还原能力法进行总还原能力的测定,结果显示,当所有提取部位浓度为 1 mg/mL 时,其还原能力由强到弱依次为乙酸乙酯提取部位>正丁醇提取部位>氯仿提取部位>石油醚部位。结果表明,不同溶剂提取部位的总还原能力不同,乙酸乙酯部位最大,可能与其黄酮类成分含量最高有关系。

2.2 化合物 1 的表征

化合物 1 的红外光谱如图 3 所示,3 440 cm^{-1} 是 -OH 伸缩振动吸收峰,1 638 cm^{-1} 是苯环上 C=C 骨架振动的吸收峰,827 cm^{-1} 是苯环上 C-H 面外弯曲振动的吸收峰。

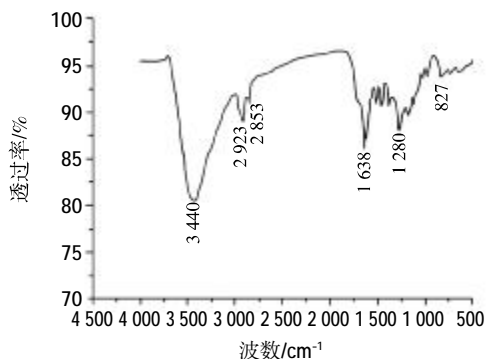


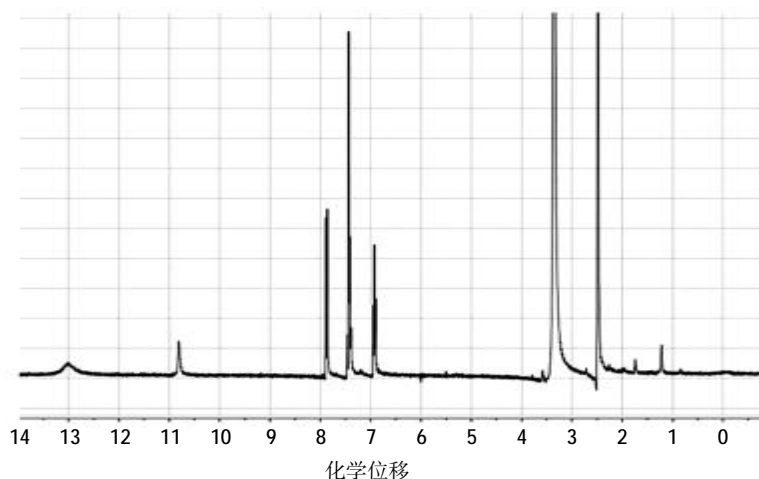
图3 化合物 1 的红外图谱

Fig.3 The IR spectrum of compound 1

化合物 2 的 $^1\text{H NMR}$ 如图 4 所示,根据文献推断^[23],其结构可能为对羟基苯丙烯酸。在化学位移值 7.5 左右的峰是苯环上的氢,化学位移 6.9 和 7.9 的峰分别是碳碳双键上的 2 个氢,化学位移 10.81 是 -OH 的峰,13.00 是 -COOH 的峰。

3 结论

用 75% 的乙醇加热回流提取法提取昆仑雪菊中的化学成分,有机溶剂分别萃取得了石油醚部位,氯仿部位,乙酸乙酯部位,正丁醇部位。DPPH 法分别测定 4 个提取部位的抗氧化活性,结果表明,正丁醇部位的抗氧化活性最强,其次是乙酸乙酯部位。用水杨酸法进行了其清除·OH 的测定,结果表明,乙酸乙酯部位对羟基自由基清除能力最强。采用铁离子还原能力测定法测定各提取部位的总还原能力,乙酸乙酯部

图4 化合物1的¹H-NMR图谱Fig.4 The ¹H-NMR spectrum of compound 1

位总还原能力最强。用分别用大孔树脂柱和硅胶柱对乙酸乙酯部位进行了分离,得到化合物1。由红外图谱和¹H-NMR进行结构鉴定,结合参考文献[22],得到的化合物1为苯丙烯酸的类似物。

参考文献:

- [1] 张媛,木合布力·阿不力孜,李志远. 金鸡菊属药用植物研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2633-2638
- [2] 李冬明. 昆仑雪菊的药学研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(10): 776-777
- [3] 梁淑红, 庞市宾, 刘晓燕, 等. 金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010(8): 234-235
- [4] 崔康康, 姬凤彩, 王志琴, 等. 新疆昆仑雪菊水提液对大鼠血压的影响[J]. 畜牧兽医科技信息, 2013(7): 17-19
- [5] 曹燕, 庞市宾, 徐磊, 等. 金鸡菊提取物对血管环舒张作用的探讨[J]. 农垦医学, 2011, 33(2): 148-152
- [6] 明婷, 孙玉华, 胡梦颖, 等. 金鸡菊提取物降压及体内抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 249-252
- [7] 张燕, 李琳琳, 王丽凤, 等. 新疆昆仑雪菊5种提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 166-169
- [8] 明婷, 庞市宾, 刘晓燕, 等. 金鸡菊提取物对微循环及抗凝血作用的实验研究[J]. 农垦医学, 2012, 34(1): 17-19
- [9] 肖文平, 胡琳妮. 紫外分光光度法测定雪菊中总黄酮的含量[J]. 黄冈师范学院学报, 2014, 34(6): 21-23
- [10] Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2004, 36(7): 829-837
- [11] Gossiau A, Li S, Ho CT, et al. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 74-82
- [12] Zhang Y, Shi SP, Zhao MB, et al. A novel chalcone from *Coreopsis tinctoria* Nutt [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2006, 34(10): 766-769
- [13] Shimokoriyama M. Anthochlor pigments of *Coreopsis tinctoria* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1957, 79(1): 214-220
- [15] Sun Y H, Zhao J, Jin H T, et al. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of *Coreopsis tinctoria* [J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(9): 1158-1164
- [16] Abdureyam A, Abliz M, Sultan A, et al. Phenolic compounds from the flowers of *Coreopsis tinctoria* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2013, 48(6): 1085-1086
- [17] Crisan CC, Caclinescu I, Zalaru C, et al. Techniques for extracting polyphenols from *Coreopsis tinctoria* Nutt. fruits [J]. UPB Science Bulletin B, 2013, 75(4): 169-178
- [18] Dias T, Bronze M R, Houghton P J, et al. The flavonoid-rich fraction of *Coreopsis tinctoria* promotes glucose tolerance regain through pancreatic function recovery in streptozotocin-induced glucose-intolerant rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(2): 483-490
- [19] Dias T, Mota-Filipe H, Liu B, et al. Recovery of oral glucose tolerance by Wistar rats after treatment with *Coreopsis tinctoria* infusion [J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(5): 699-705
- [20] Inguk H, Hyunyoung K, Keumil J, et al. Biological activities of *Coreopsis tinctoria* Nutt. flower extracts [J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 2010, 28(5): 857-863
- [21] Liu Y, Zhang Y, Liu X M, et al. Interactions between thrombin and natural products of *Coreopsis tinctoria* Nutt and *Cistanchedeserticola* Ma in capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 15(1): 38-44
- [22] Li N, Meng DL, Pan Y, et al. Anti-neuroinflammatory and NQO1 inducing activity of natural phytochemicals from *Coreopsis tinctoria* [J]. Journal of Functional Foods, 2015(17): 837-846
- [23] 严敏. 利用 DPPH 自由基清除率评价啤酒内源性抗氧化能力 [J]. 研究与探讨, 2005, 26(8): 82-83
- [24] 宋焯威. 昆仑雪菊中黄酮类化合物的提取分离及抗氧化活性评价 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 220-223