

何 静, 吴 磊, 李鹏霞, 等. 莲蓬壳提取物不同极性部位的生物活性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 679-684.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.034

莲蓬壳提取物不同极性部位的生物活性

何 静^{1,2}, 吴 磊², 李鹏霞³, 胡卫成², 张闫闫², 刘 帅², 刘恩雪², 尤 龙²,
王新风², 白羽嘉¹, 冯作山¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 淮阴师范学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300; 3. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了确定莲蓬壳的生物活性物质, 采用有机溶剂萃取法将莲蓬壳提取物分为正己烷相、二氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相 5 个不同极性部位, 测定不同极性部位提取物中总黄酮及多酚含量, 分析其还原能力及对过氧化氢、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基的清除能力, 比较莲蓬壳提取物不同极性部位提取物的抗氧化作用。同时还考察了莲蓬壳不同极性部位提取物对乳腺癌细胞(MCF-7)的抑制作用。结果显示: 莲蓬壳提取物的不同极性部位提取物均有抗氧化活性作用, 其中乙酸乙酯部位提取物和正丁醇部位提取物抗氧化能力较强于其他萃取相部位提取物; 正己烷相提取物和二氯甲烷相提取物可显著抑制 MCF-7 细胞的增殖。

关键词: 莲蓬壳; 极性部位; 自由基; 细胞增殖

中图分类号: S645.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0679-06

Bioactivities of different fractions of lotus receptacle

HE Jing^{1,2}, WU Lei², LI Peng-xia³, HU Wei-cheng², ZHANG Yan-yan², LIU Shuai², LIU En-xue²,
YOU Long², WANG Xin-feng², BAI Yu-jia¹, FENG Zuo-shan¹

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Huaiyin Normal University / Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huai'an 223300, China; 3. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Five fractions of lotus receptacle, hexane, dichloromethane(CH_2Cl_2), ethyl acetate(EtOAc), n-butanol(N-BuOH) and water(H_2O), extracted with ethanolic were determined for their total phenolic and flavonoid contents and antioxidative activities. Total phenolic and flavonoid contents exhibited the highest contents in EtOAc fraction, followed by N-BuOH fraction and water fraction in order. Antioxidations of all five fractions were shown by the strong scavenging abilities to hydrogen peroxide, superoxide anion and 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. The two fractions, EtOAc and N-BuOH, outperformed other three in antioxidation, while other two fractions, CH_2Cl_2 and hexane, were superior in inhibiting the proliferation of human breast cancer cell(MCF-7).

Key words: lotus receptacle; fraction; free radical; cell proliferation

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)3079]

作者简介: 何 静(1989-), 女, 新疆轮台人, 硕士研究生, 主要从事食品生物化学的研究。(E-mail) hejing2012279@163.com

通讯作者: 李鹏霞, (E-mail) jsnky203@163.com; 冯作山, (E-mail) fengzuoshan@126.com

自由基是一类具有高度活性的物质, 在人体新陈代谢中起着重要的作用。正常情况下, 人体内的自由基处于稳定的动态平衡中, 当这一平衡被打破时, 机体内的器官将会发生病变, 引发疾病和衰老^[1]。近年来, 寻找和制备特效自由基清除剂和抗氧化剂愈发受到人们的重视, 其中从中药植物中提

取天然抗氧化剂已成为热点话题^[2-3]。

莲蓬壳为莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) 的成熟花托, 又名莲房。据《本草纲目》记载, “莲房, 消淤散血。酒煮服之, 治血涨腹痛及产后胎衣不下。”^[4], 民间常用炭制莲房作为一种止血药使用。莲主要分布于中国长江、黄河、珠江以及洪湖等湖的浅水区。现代药理试验结果表明, 莲蓬壳能有效地清除自由基的生成, 且对二苯基苦味酰基苯肼 (DPPH) 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力均高于维生素 C, 其对 Fe^{3+} 的还原能力与维生素 C 基本一致^[5-6]。除此之外, 大量文献报道莲蓬壳具有改善小鼠记忆性障碍^[7-8], 抑制黑色素瘤细胞^[9-10], 延缓衰老^[11], 调解血脂和保护心血管系统等生物活性^[12-14]。国内外学者研究发现莲蓬壳含有丰富的莲房原花青素和以金丝桃苷、槲皮素为主的黄酮类化合物以及少量的生物碱等活性成分^[15]。莲蓬壳作为莲的非可食用部分, 通常作为废弃物直接丢弃, 造成生物资源的极大浪费和环境的严重污染。本试验采用萃取分离方法获得莲蓬壳萃取物, 通过采用化学发光法、还原能力测定法及 DPPH 自由基清除等方法, 对莲蓬壳萃取物抗氧化活性进行研究, 旨在揭示莲蓬壳的抗氧化能力及其活性部位, 为莲蓬壳的合理开发利用提供理论依据, 也为天然抗氧化剂和功能性食品开发提供新的资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莲蓬壳(采自江苏省金湖县, 2013 年 9 月), 经干燥脱水后, 粉碎过 80 目筛, 得莲蓬壳粉末, 置常温干燥处备用。

芦丁标准品、没食子酸标准品、DPPH、鲁米诺 (luminol)、5-氟尿嘧啶、甲氮甲唑蓝 (MTT) 及台盼蓝均购于 Sigma 公司。DMEM 培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司。抗坏血酸、邻苯三酚、过氧化氢、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、氯化铁、铁氰化钾、三氯乙酸、无水乙醇、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、正丁醇、十二烷基硫酸钠 (SDS) 均为分析纯试剂。

MTT 工作液配制: 精密称取 0.10 g 甲氮甲唑蓝试剂后, 加入到 20 ml 水中, 混匀避光过滤, 配制成 5 mg/ml MTT 溶液。

MTT 终止液配制: 精密称取 20.00 g SDS 试剂, 加入 0.176 ml 的盐酸溶液后, 用水定容至 20 ml 即可。

1.2 仪器与设备

分析天平, 购自北京赛多利斯仪器系统有限公司; Tecan infinite M200PRO 酶标仪, 购自瑞士 Tecan 公司; KQ-500B 超声波清洗器, 购自昆山市超声仪器有限公司; 二氧化碳培养箱, 购自日本 SANYO 公司; 倒置显微镜, 购自日本 Olympus 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 莲蓬壳不同极性溶剂提取物制备 在乙醇体积分数 80%、料液比 1:20、温度 50 °C 条件超声提取 1 h, 提取 2 次, 过滤; 将滤液低压浓缩至膏状物质, 取部分冷冻干燥, 得到醇提物干样; 加入定量的水将上述剩余的膏状物质溶解后, 充分摇匀, 转入分液漏斗中。以 1:1 的配比依次用正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇溶剂各萃取 3 次, 得到正己烷部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水提部位的萃取物。将各组萃取物减压浓缩后, 真空冷冻干燥至恒质量, 密封置于冰箱冷藏备用。

1.3.2 芦丁标准溶液制备 准确称取经 120 °C 烘干至恒质量的芦丁标准品 0.05 g, 80% 乙醇溶解后定容至 50 ml, 摇匀, 得 1 mg/ml 芦丁标准溶液。

1.3.3 芦丁标准曲线制作 参照 Hossain 等^[16]的方法加以改进。分别精密量取 1 mg/ml 芦丁标准溶液 0.1 ml、0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml、0.5 ml 置于 10.0 ml 试管中, 各加 80% 乙醇溶液至 1.0 ml, 再加入 0.3 ml 5% 亚硝酸钠溶液, 摇匀, 避光静置反应 5 min 后, 加入 0.3 ml 的 10% 硝酸铝, 摇匀, 静置 6 min, 加入 2.0 ml 的 4% 氢氧化钠, 摇匀放置 15 min 后, 于波长 510 nm 处测定其吸光值。以芦丁浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制芦丁标准曲线, 标准方程 $Y=0.003x+0.017$, $R^2=0.995$ 。式中 Y 为吸光度; x 为黄酮质量浓度。

1.3.4 没食子酸溶液制备 准确称取经 120 °C 烘干至恒质量的没食子酸标准品 0.05 g, 80% 乙醇溶解定容至 50 ml, 得到 1 mg/ml 没食子酸标准溶液。

1.3.5 没食子酸标准曲线制作 采用 Ghimeray 等^[17]方法加以改进。用 80% 乙醇配制不同浓度的没食子酸标准溶液 (0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.3 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml), 各吸取 200 μl 后加入 1.0 ml 蒸馏水、福林酚试剂 0.2 ml 混匀, 静置 3 min 后, 加入 7.5% 碳酸钠溶液 0.6 ml 后混匀, 室温静置 40 min 后, 于波长 765 nm 下测定器吸光值。以没食子酸浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制没食子酸标准曲

线,标准方程 $Y=0.004x+0.101$, $R^2=0.998$ 。式中 Y 为吸光度; x 为多酚质量浓度(mg/ml)。

1.3.6 莲蓬壳不同极性部位中总黄酮、多酚含量测定 准确称取莲蓬壳萃取物 0.01 g,溶于 10 ml 80% 乙醇中,配制成 1 mg/ml 溶液,代入到各标准曲线中,测定萃取物中总黄酮、多酚含量。

1.3.7 抗氧化能力测定

1.3.7.1 莲蓬壳不同极性部位清除 DPPH 自由基的测定^[18] 分别向板孔内加入 100 μ l 不同质量浓度莲蓬壳萃取段溶液和 100 μ l 0.2 mmol/L DPPH 溶液,混匀后避光反应 30 min,在波长 517 nm 处测定吸光度,重复 3 次,取平均值。

$$\text{DPPH 清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$$

式中, A_1 : DPPH 溶液与待测液的吸光度之和; A_2 :待测液与溶剂的吸光度之和; A_3 : DPPH 溶液与溶剂的吸光度之和。

1.3.7.2 还原能力测定^[18] 量取 0.2 ml 不同质量浓度莲蓬壳萃取段溶液(0.05 mg/ml、0.10 mg/ml、0.20 mg/ml、0.40 mg/ml),依次加入 0.5 ml 0.2 mol/L pH 6.6 磷酸缓冲溶液、1% 铁氰化钾溶液 0.5 ml,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30 min 后,加入 10% 三氯乙酸溶液(TCA)0.5 ml 摇匀,10 000 r/min 5 min 离心,吸取上清溶液 0.5 ml,加入 0.5 ml 蒸馏水和 0.1 ml 0.1% 氯化铁溶液,混合均匀,静置 10 min。于波长 700 nm 处测定吸光度,重复 3 次,取平均值。

1.3.7.3 清除 H_2O_2 能力测定^[19] 配制不同浓度(0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、100.0 $\mu\text{g/ml}$)莲蓬壳萃取物溶液 100 μ l,加入 0.03 mol/L H_2O_2 50 μ l 和 0.04 mmol/L 鲁米诺碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH 9.4) 50 μ l 后,立即启动反应。每间隔 2 s 计数 1 次,记录 180 s 内的发光强度。重复 3 次,取平均值。发光抑制率按下式计算:

$$\text{发光抑制率} = [(\text{对照发光强度} - \text{样品发光强度}) / \text{对照发光强度}] \times 100\%。$$

1.3.7.4 清除 O_2^- 能力^[19] 配制 不同浓度(10 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$)莲蓬壳萃取物溶液 100 μ l,加入 50 μ l 1 mmol/L 邻苯三酚,以及 50 μ l 1 mmol/L 鲁米诺碳酸钠缓冲液(0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH 10.16) 后,立即启动反应。每间隔 2 s 计数 1 次,测定 180 s 内的发光强度。重复 3 次,取平均值。

1.3.8 莲蓬壳不同极性部位对乳腺癌细胞细胞增殖的影响^[20]

1.3.8.1 MCF-7 细胞培养 MCF-7 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 培养液(4.5 g/L 葡萄糖、4.5 g/L L-谷氨酸胺、110 mg/L 丙酮酸钠)中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞生长至融合率达 80% 时,用 1 ml 0.25% 胰酶+0.02% EDTA 消化 2 min,按 1:7 进行传代培养。

1.3.8.2 莲蓬壳萃取部分对 MCF-7 细胞存活率的影响 取对数生长期细胞 MCF-7,调整细胞数至 1 ml 4×10^5 个,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μ l,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 16 h 后,加入浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 莲蓬壳萃取物共培养,每孔均设 3 复孔。处理 24 h、48 h 后,吸取上清液,每孔加入 100 μ l MTT 工作液,于二氧化碳培养箱内培养 4 h 后,加入 100 μ l MTT 终止液,待完全溶解后,在酶联免疫检测仪上于 550 nm 处测量各孔的吸光值,计算细胞生长率。

2 结果与分析

2.1 莲蓬壳提取物不同极性部位总黄酮和多酚含量

莲蓬壳不同极性部位多酚和总黄酮结果(表 1)显示,不同极性部位中总黄酮含量为 54.03 ~ 351.58 mg/g,含量差异较大。其含量从高到低依次为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水提部位,而正己烷部位和二氯甲烷部位则未检测到含有黄酮物质。多酚含量为 13.69 ~ 564.21 mg/g,按照含量从高到低依次为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水提部位>二氯甲烷部位>正己烷部位。值得注意的是二氯甲烷部分和正己烷部分可检测出含有少量活性物质多酚,可能是少量的多酚物质溶于弱极性溶剂中。

表 1 莲蓬壳提取物不同极性部位总黄酮和多酚含量

Table 1 Total flavonoids and phenolics contents of different fractions extracted from lotus receptacle

样 品	总黄酮含量(mg/g)	多酚含量(mg/g)
正己烷部位	ND	13.69 \pm 0.52
二氯甲烷部位	ND	53.36 \pm 2.97
乙酸乙酯部位	351.58 \pm 18.87	564.21 \pm 8.80
正丁醇部位	137.53 \pm 4.47	484.88 \pm 3.42
水提部位	54.03 \pm 5.17	156.25 \pm 7.70

ND:未检测到。

2.2 莲蓬壳不同极性部位提取物抗氧化作用

2.2.1 对 DPPH 自由基清除能力 DPPH 是一种稳定的以氮为中心的自由基,当体系中存在抗氧化剂时,DPPH 自由基由紫色还原为黄色的非自由基 DPPH-H 形式,在 517 nm 处的吸光度发生变化,一定范围内,其变化程度与自由基清除程度呈线性关系。为了便于比较不同抗氧化剂能力的强弱,常用 IC_{50} 值表示,即对自由基清除率为 50% 时所对应抗氧化剂的质量浓度。 IC_{50} 值越小,表明该物质清除自由基的能力越强。此方法已普遍被运用于中药材抗氧化能力的测定中^[21]。由表 2 可知,莲蓬壳不同极性部位提取物对 DPPH 均具有较强的清除能力,且清除 DPPH 能力大小依次为乙酸乙酯部位提取物>正丁醇部位提取物>水提部位提取物>正己烷部位提取物>二氯甲烷部位提取物。其中乙酸乙酯部位提取物和正丁醇部位提取物对 DPPH 清除的能力均高于叔丁基对苯二酚和维生素 C,具有很强清除 DPPH 自由基的能力, IC_{50} 分别为 $(3.79 \pm 0.40) \mu\text{g/ml}$ 和 $(4.22 \pm 1.50) \mu\text{g/ml}$ 。可能的原因是清除 DPPH 自由基活性成分主要富集在乙酸乙酯部位和正丁醇部位。

表 2 莲蓬壳不同极性部位提取物对 DPPH 自由基清除能力

Table 2 DPPH free radical scavenging activities of different fractions extracted from lotus receptacle

样 品	对 DPPH 清除率, IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
正己烷部位提取物	87.25 ± 1.89
二氯甲烷部位提取物	94.51 ± 9.47
乙酸乙酯部位提取物	3.79 ± 0.40
正丁醇部位提取物	4.22 ± 1.50
水提部位提取物	36.34 ± 4.88
叔丁基对苯二酚提取物	8.57 ± 0.29
维生素 C	7.89 ± 0.15

2.2.2 还原能力 采用铁离子还原能力 (FRAP) 法测定抗氧化物质氧化还原的潜力,其作用机理是在较低 pH 值环境下,抗氧化物质能将三吡啶三嗪三价铁的物质还原为蓝色的三吡啶三嗪二价铁。还原能力大小通过在 700 nm 处的吸光值来检测,吸光度越大还原能力越强即抗氧化能力越强^[22]。如图 1 所示,莲蓬壳不同极性部位提取物均表现出不同

程度的还原能力,且具有明显的量效关系。可以看出莲蓬壳不同极性部位提取物的还原能力最强的是乙酸乙酯部位提取物,正丁醇部位提取物和水提部位提取物次之,二氯甲烷部位和正己烷部位还原能力最弱,均弱于阳性对照。

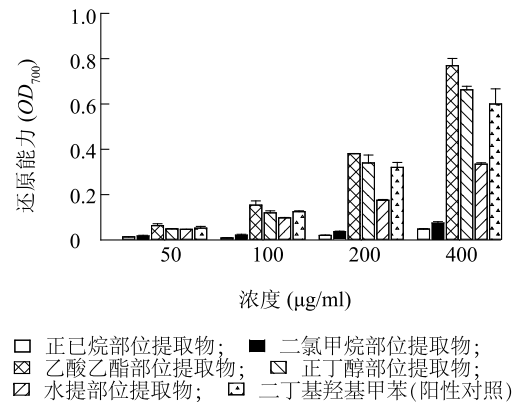


图 1 莲蓬壳不同极性部位提取物 Fe^{3+} 还原能力

Fig. 1 Reducing power abilities of different fractions extracted from lotus receptacle

2.2.3 对过氧化氢清除能力 过氧化氢 (H_2O_2) 在有氧和碱性的条件下,能够氧化体系中的鲁米诺,产生化学发光。由表 3 可知,在测定浓度范围内,莲蓬壳不同极性部位提取物对 H_2O_2 均有一定的清除能力,且对 H_2O_2 的清除率随着莲蓬壳不同极性部位提取物浓度的增加而提高,具有一定剂量依赖关系。其中以乙酸乙酯部分提取物、正丁醇部分提取物对 H_2O_2 清除能力最强,100 $\mu\text{g/ml}$ 乙酸乙酯部分提取物和正丁醇部分提取物对过氧化氢清除率分别为 99.88% 和 99.25%,接近于维生素 C (阳性对照,99.58%)。说明在乙酸乙酯部位提取物和正丁醇部位提取物清除 H_2O_2 的活性可能较高。

2.2.4 对超氧阴离子自由基清除能力 采用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系检测样品对超氧阴离子的清除作用。邻苯三酚在碱性条件自动氧化生成超氧阴离子 (O_2^-), O_2^- 向化学发光剂鲁米诺发起进攻,鲁米诺受到激发后处于激发态,继而会从激发态返回到基态,同时伴随着能量的释放,产生化学反应^[23]。由表 4 可以看出,在测定范围内,莲蓬壳不同极性部位提取物对 O_2^- 均具有一定的清除作用,且随着莲蓬壳不同极性部位提取物浓度的升高,清除率也逐渐增强,呈一定的剂效关系。清除 O_2^- 能

力依次为乙酸乙酯部位提取物>水提部位提取物>正丁醇部位提取物>正己烷部位提取物>二氯甲烷部位提取物。其中 400 $\mu\text{g/ml}$ 维生素 C 具有很强清

除 O_2^- 的能力,清除率达到 96.78%,而乙酸乙酯部位提取物略低于维生素 C,清除率为 85.39%。

表 3 莲蓬壳不同极性部位提取物对过氧化氢的清除作用

Table 3 The scavenging abilities of different fractions from lotus receptacle on H_2O_2

样 品	过氧化氢清除率(%)				
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1.0 $\mu\text{g/ml}$	10.0 $\mu\text{g/ml}$	100.0 $\mu\text{g/ml}$
正己烷部位提取物	26.97 \pm 2.59	41.99 \pm 1.51	45.52 \pm 1.07	48.54 \pm 3.21	84.73 \pm 1.26
二氯甲烷部位提取物	27.05 \pm 1.68	31.56 \pm 1.21	39.25 \pm 2.91	77.99 \pm 1.54	89.21 \pm 3.32
乙酸乙酯部位提取物	75.02 \pm 5.60	91.98 \pm 2.47	95.16 \pm 1.16	97.84 \pm 1.07	99.88 \pm 0.06
正丁醇部位提取物	27.81 \pm 2.52	66.13 \pm 2.80	74.61 \pm 2.86	93.75 \pm 0.82	99.25 \pm 0.06
水提部位提取物	34.27 \pm 3.36	39.18 \pm 5.90	46.34 \pm 3.97	83.02 \pm 0.44	92.94 \pm 0.72
维生素 C	78.61 \pm 2.77	92.79 \pm 0.34	94.96 \pm 0.54	98.47 \pm 0.26	99.58 \pm 0.33

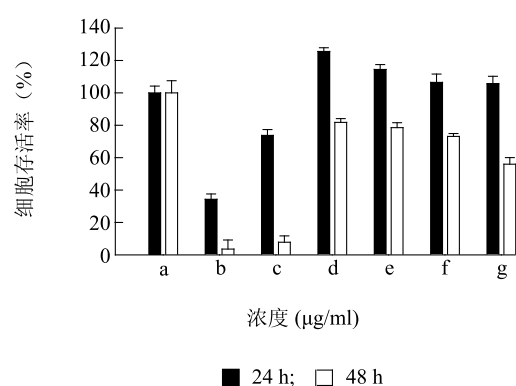
表 4 莲蓬壳不同极性部位提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

Table 4 The scavenging abilities of different fractions from lotus receptacle on $\text{O}_2^{\cdot-}$

样 品	超氧阴离子自由基清除率(%)				
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1.0 $\mu\text{g/ml}$	10.0 $\mu\text{g/ml}$	100.0 $\mu\text{g/ml}$
正己烷部位提取物	3.47 \pm 1.79	4.97 \pm 2.29	12.33 \pm 2.59	22.65 \pm 1.72	25.18 \pm 1.69
二氯甲烷部位提取物	6.08 \pm 2.76	18.04 \pm 2.71	19.47 \pm 3.79	20.58 \pm 3.87	23.97 \pm 1.25
乙酸乙酯部位提取物	19.93 \pm 1.05	38.19 \pm 3.58	56.97 \pm 0.66	74.36 \pm 0.96	85.39 \pm 1.01
正丁醇部位提取物	16.54 \pm 1.00	27.88 \pm 5.54	34.66 \pm 0.74	53.14 \pm 2.00	72.20 \pm 1.91
水提部位提取物	6.37 \pm 2.60	25.18 \pm 3.79	44.11 \pm 2.52	61.33 \pm 1.36	79.50 \pm 1.00
维生素 C	14.74 \pm 1.10	44.08 \pm 1.02	67.36 \pm 0.07	88.89 \pm 0.39	96.78 \pm 0.59

2.3 MTT 法检测细胞增殖率

以未加药物的细胞为对照,加入抗癌药物 5-氟尿嘧啶作为阳性对照。由图 2 所示,当细胞与药物共同孵育 24 h 时,莲蓬壳不同极性部位提取物与对照相比,乙酸乙酯部位提取物、正丁醇部位提取物和水提部位提取物均有促进细胞生长的趋势,而正己烷部位提取物和二氯甲烷部位提取物对 MCF-7 细胞增殖有一定的抑制作用,且正己烷部位提取物抑制作用高于二氯甲烷部位提取物,两者细胞存活率分别为 34.00% 和 73.00%。当细胞与药物共同孵育 48 h 时,与对照相比,莲蓬壳不同极性部位提取物均对 MCF-7 细胞生长有不同程度的抑制作用,且正己烷部位提取物和二氯甲烷部位提取物抑制作用最强,其细胞存活率分别为 3.57% 和 7.80%。



a: 对照; b: 正己烷部位提取物; c: 二氯甲烷部位提取物; d: 乙酸乙酯部位提取物; e: 正丁醇部位提取物; f: 水提部位提取物; g: 5-氟尿嘧啶。

图 2 莲蓬壳不同极性部位提取物处理下 MCF-7 细胞存活率
Fig. 2 Cell survival rate of MCF-7 treated by different fractions extracted from lotus receptacle

3 讨论

由于不同抗氧化检测方法的反应机理不同,为获得可靠的试验结果,本试验采用 DPPH 自由基清除法、还原能力测定法、清除 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的方法对莲蓬壳不同极性溶剂提取物的抗氧化能力进行评价。研究发现莲蓬壳不同极性部位提取物对 DPPH、 Fe^{3+} 、 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均具有良好的抗氧化活性。在对 DPPH 自由基、 H_2O_2 清除和还原 Fe^{3+} 试验中,以中等极性乙酸乙酯部位提取物和正丁醇部位提取物的活性最强,强极性水提物的抗氧化活性中等,而弱极性二氯甲烷部位提取物和正己烷部位提取物抗氧化作用最弱。试验发现莲蓬壳不同极性部位提取物中的总黄酮和多酚含量与抗氧化活性间呈正相关性,即总黄酮、多酚含量越高,提取物的抗氧化活性越强。细胞试验发现正己烷部位提取物和二氯甲烷部位提取物对 MCF-7 细胞具有很强的抑制作用。研究结果表明乙酸乙酯部位提取物和正丁醇部位提取物为莲蓬壳提取物中主要抗氧化活性物质,可通过进一步分离提取其有效活性成分,确定莲蓬壳抗氧化作用的物质基础,为莲蓬壳的开发利用提供依据。

参考文献:

- [1] 李 勇,孔令青,高 洪,等. 自由基与疾病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.
- [2] 焦 岩,常 影,余世峰,等. 大果沙棘渣黄酮体外抗氧化活性 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 285-287.
- [3] 张 伟,张焕新,施 洋,等. 银杏叶中黄酮类物质提取及其抗氧化活性 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 230-234.
- [4] 陈超群. 莲房的化学成分 [D]. 昆明:云南中医学院,2013.
- [5] 凌智群,谢笔钧. 莲房原花青素对氧自由基和脂质过氧化的作用 [J]. 营养学报, 2002, 24(2): 121-125.
- [6] 郑丽璠,吴研斌,吴建国,等. 莲房不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用 [J]. 福建中医药, 2012, 43(1): 54-56.
- [7] 张 丽,许继取,荣 爽,等. 莲房原花青素对东莨菪碱所致小鼠记忆获得性障碍的改善作用 [J]. 华中科技大学学报:医学版, 2009, 38(3): 335-358.
- [8] 龚玉石,唐 瑛,肖俊松,等. 莲房原花青素改善小鼠学习记忆障碍的研究 [J]. 营养学报, 2006, 28(4): 318-321.
- [9] 段玉清,张海晖,吴 佳,等. 莲房原花青素对黑色素瘤 B16 细胞的诱导分化作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(5): 377-380.
- [10] 段玉清,周 密,张海晖,等. 莲房原花青素对黑色素瘤 B16 细胞的抑制作用 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(2): 103-106.
- [11] 陈 戈,唐 瑛,杨 李,等. 莲房原花青素对 D-半乳糖衰老小鼠脑组织抗氧化的作用 [J]. 中国药师, 2009, 12(8): 1023-1025.
- [12] 凌智群,谢笔均,周顺长,等. 莲房原花青素对家兔血脂及肝组织形态的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 62-64.
- [13] 张晓晖,张 斌,龚培力,等. 莲房原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 药理学, 2004, 39(6): 401-405.
- [14] 凌智群,谢笔均,江 涛,等. 莲房原花青素对大鼠实验性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6): 687-690.
- [15] 陈红梅,谢 翎. 莲房黄酮微波辅助提取工艺优化及其抗氧化性能 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 224-231.
- [16] HOSSAIN M A, KALBANI M S, FARSI S A, et al. Comparative study of total phenolics, flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of different polarities fruits crude extracts of *Datura metel* L. [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2014, 4(5): 378-383.
- [17] GHIMERAY A K, SHARMA P, HU W C, et al. Far infrared assisted conversion of isoflavones and its effect on total phenolics and antioxidant activity in black soybean seed [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2013, 7(17): 1129-1137.
- [18] SI C L, SHEN T, JIANG Y Y, et al. Antioxidant properties and neuroprotective effects of isocampneoside II on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells [J]. Food and chemical toxicology, 2013, 59: 145-152.
- [19] 邓乾春,陈春艳,田斌强,等. 化学发光法测定白蛋白白蛋白的体外抗氧化活性 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 685-690.
- [20] HU W C, HAN W, HUANG C Q, et al. Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress *in vitro* and *in vivo* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011, 31: 42-50.
- [21] 郭雪峰,岳永德,汤 锋,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1578-1582.
- [22] 刘小兵. 生物活性物质的抗氧化能力评价方法及其研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(5): 440-444.
- [23] 李培培,戚向阳,罗 彤,等. 化学发光法研究杨梅黄酮提取物的抗氧化活性 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(7): 190-194.

(责任编辑:袁 伟)