

枸杞提取物的抗氧化性研究

李春兰 毛利 蒙宇玲 方仪 邓海贤 郭丽娟*

(长沙医学院 湖南 长沙 410219)

摘要: 目的 探讨枸杞提取物的抗氧化性研究。方法 取 3g 左右的枸杞粉末放在标准容量杯内加 95%乙醇 20mL, 放入超声波清洗器内超声提取 30min, 随后过筛, 对滤渣同样处理, 并过筛后, 用蒸发皿或在水浴锅中萃取物提取浓缩, 所得浓度分别为 50、100、200、300、500、1000 $\mu\text{g/mL}$, 测定枸杞提取物清除 DPPH 自由基能力、总抗氧化能力(FRAP 法)以及清除 $\cdot\text{OH}$ 能力。结果 枸杞提取物对 DPPH 自由基清除能力, 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率为 0, 随着浓度的增大, 清除能力增强, 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 开始趋于平衡, 清除率为 $52.35 \pm 0.03\%$ 。FRAP 值作为总抗氧化能力值, 枸杞的抗氧化性随着浓度的增加, 抗氧化性增强, 与清除羟自由基和 DPPH 的能力变化趋势基本一致。 $\cdot\text{OH}$ 是自由基中最活泼、氧化性最强的一种, 几乎可以和所有的生物大分子发生不同类型的反应, 能够引起膜脂蛋白质和核酸的氧化损伤, 加速人体的衰老, 并能导致产生各种疾病。清除 $\cdot\text{OH}$ 能力方面, 随着浓度的增加, 呈现出较高的清除力。结论 枸杞提取物具有较强的抗氧化能力。
关键词: 枸杞; 抗氧化性; DPPH; $\cdot\text{OH}$

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 是一种药食同源的名贵植物, 属于茄科枸杞属落叶灌木, 主要富含多糖、黄酮多酚、类胡萝卜素、生物碱、维生素、氨基酸、无机盐、酚酸、酶类等这些化合物具有显著的生物化合物活性和一定的药用效果[1], 其中宁夏枸杞中所含有的枸杞多糖和黄酮多酚类化合物是良好的天然抗氧化剂, 我国动植物资源丰富, 存在巨大的市场潜力[2-3]。其药理活性和药学应用也在不断的拓展, 很多研究已经证实枸杞多糖具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、免疫调节、神经保护、肝脏保护、降血糖、保肝、神经保护、降血脂、抗诱变等作用[4]。其抗氧化性主要体现在清除自由基, 降低丙二醛和增强超氧化物歧化酶等方面[5]。本文拟探讨枸杞复合提取物的抗氧化性研究为提高枸杞的生物利用率, 有着非常重大的意义, 且有望开发成新一代保健品原料。

1 材料和仪器

1.1 材料

本实验中所用枸杞由长沙医学院中医学院研究中心提供并鉴定。所取枸杞置于 50℃烘箱中干燥, 粉碎, 过 30 目筛, 保存于密封容器中备用。

1.2 仪器和试剂

试剂: 95%乙醇、ABTS、DPPH(1,6-二(二苯基磷基)己烷)、水杨酸、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、 H_2O_2 、硫酸亚铁、水杨酸-乙醇溶液、浓硫酸、邻苯三酚、(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司)、2, 4, 6-三吡啶基三嗪(TPTZ); 盐酸 (分析纯, 泰安市嘉叶生物科技有限公司)。

仪器: SB25-12DT 超声波清洗机、AUW-120 天平、W-2802 型紫外可见分光光度计、30 目筛、水浴锅、50℃烘箱。

1.3 实验方法

1.3.1 枸杞有效成分的提取实验

取 3g 左右的枸杞粉末放在标准容量杯内加 95%乙醇 20mL, 放入超声波清洗器内超声提取 30min, 随后过筛, 对滤渣同样处理, 并过筛后, 用蒸发皿或在水浴锅中萃取物提取浓缩。精确称取 0.2g 提取物用 95%乙醇定容到 20mL, 容量瓶中作为母液, 得到的母液浓度为 $C = 10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 并将母液稀释, 所得浓度分别为 50、100、200、300、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 备用。

表 1 枸杞提取物的抗氧化性

浓度($\mu\text{g/mL}$)	清除率 (%)	总抗氧化能力 (mmol/L)	清除 $\cdot\text{OH}$ 能力 (U/mL)
50	0	1.14 ± 0.12	97.5 ± 2.45
100	8.24 ± 0.01	1.05 ± 0.05	125.32 ± 2.65
200	17.29 ± 0.04	4.23 ± 0.08	131.22 ± 2.84
300	26.94 ± 0.02	9.15 ± 0.17	154.84 ± 1.98
500	52.35 ± 0.03	15.04 ± 0.02	174.56 ± 2.37
1000	52.42 ± 0.02	15.12 ± 0.03	188.24 ± 2.08

1.3.2 清除DPPH自由基能力

将枸杞提取物与 0.4 g/L 的 DPPH 醇溶液混合后避光反应 30 min, 在 517 nm 测吸光值为 A_1 , 未加样品的吸光值为 A_0 , 代入公式计算清除率。清除率 (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$

1.3.3 总抗氧化能力(FRAP法)

按 FRAP 法适当修改测提取物的总抗氧化能力。分别将 10 mmol/L TPTZ、20 mmol/L FeCl_3 、300 mmol/L 醋酸缓冲液按 1:1:10 配制成 FRAP 工作液, 37℃ 预热, 现用现配。将样品稀释到适当倍数后, 取 200 μL 样品加入 1.5 mL 蒸馏水和 1.5 mL FRAP 工作液, 静置 4 min 后于 593 nm 测吸光值代入标准曲线计算。

1.3.4 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力

将枸杞提取物配成 50、100、200、300、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液, 稀释至适当倍数后按试剂盒操作测清除 $\cdot\text{OH}$ 能力; 标准空白管: 蒸馏水 0.4ml, 试剂三应用液 0.4ml; 标准管: 0.03% H_2O_2 标准应用液 0.2ml, 蒸馏水 0.2ml, 试剂三应用液 0.4ml; 对照管: 底物应用液 0.2ml, 蒸馏水 0.2ml, 试剂三应用液 0.4ml; 测定管: 样品 0.2ml, 底物应用液 0.2ml, 试剂三应用液 0.4ml。37℃ 反应 60 S 后立即加显色剂终止反应, 一次测一个样品。室温放置 20 min 后, 550 nm 测吸光值。并代入以下公式计算, 标准品浓度为 8.824 mmol/L。抑制羟自由基能力 (u/mL) = $(\text{对照OD} - \text{测定OD} / \text{标准OD} - \text{空白OD}) \times \text{标准品浓度} \times 1 \text{ mL} / \text{取样量} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS24.0 进行统计分析。各指标数据经过正态性检验和方差齐性检验, 指标数据符合方差齐性检验, 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间用 LSD 进行两两比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 枸杞提取物DPPH自由基和总抗氧化能力

枸杞提取物对 DPPH 自由基清除能力, 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率为 0, 随着浓度的增大, 清除能力增强, 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 开始趋于平衡, 清除率为 $52.35 \pm 0.03\%$ 。FRAP 值作为总抗氧化能力值, 枸杞的抗氧化性随着浓度的增加, 抗氧化性增强, 与清除羟自由基和 DPPH 的能力变化趋势基本一致。见表 1, 图 1。

2.2 枸杞提取物清除·OH能力

·OH是自由基中最活泼、氧化性最强的一种，几乎可以和所有的生物大分子发生不同类型的反应，能够引起膜脂蛋白质和核酸的氧化损伤，加速人体的衰老，并能导致产生各种疾病。清除·OH能力方面，随着浓度的增加，呈现出较高的清除力。见表1，图2。

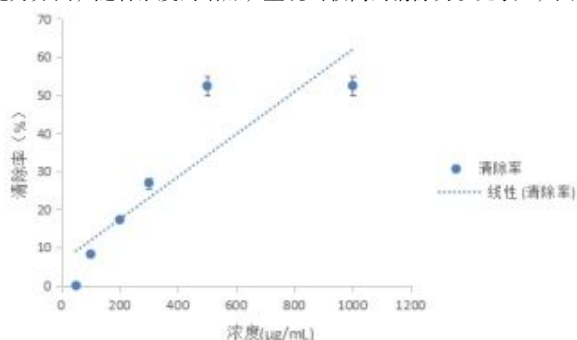


图1 DPPH自由基清除率

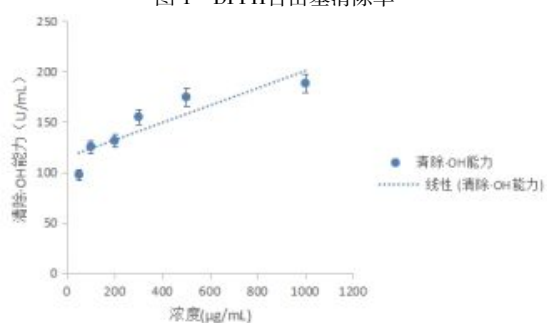


图2 ·OH自由基清除力

3 讨论

枸杞，主要分布于中亚地区，具极高的营养保健价值。枸杞极高的营养保健及药用价值，使得国内外市场需求剧增，研究人员对枸杞的人工培育开展了研究，探索出了扦插育苗、种子繁殖、组织培养等方法，但这些研究都处于起步阶段，尚未形成系统化应用推广技术[6]。研究指出枸杞的成熟果实中富含天然花色苷类植物色素，其主要成分包括飞燕草素、芍药素、牵牛花色素、锦葵色素及其衍生物等。花色苷对眼疲劳、眼底出血、白内障等眼部疾病具有良好的保健作用[7]。同时，高浓度的花色苷对体外氧化低密度脂蛋白所致人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用，其机理可能是通过清除细胞内氧自由基，从而阻断氧自由基引发的过氧化反应和氧化反应，使生物膜系统免受损伤[8]。

枸杞提取物对DPPH自由基清除能力，浓度为 50 μg/mL时清除率为 0，随着浓度的增大，清除能力增强，浓度为 500 μg/mL开始趋于平衡，清除率为 52.35 ± 0.03%。FRAP值作为总抗氧化能力值，枸杞的抗氧化性随着浓度的增加，抗氧化性增强，与清除羟自由基和DPPH的能力变化趋势基本一致。·OH是自由基中最活泼、氧化性最强的一种，几乎可以和所有的生物大分子发生不同类型的反应，能够引起膜脂蛋白质和核酸的氧化损伤，加速人体的衰老，并能导致产生各种疾病。清除·OH能力方面，随着浓度的增加，呈现出较高的清除力。

目前抗氧化能力的测定方法有很多。主要原因是由于以下几方面的原因：1)生物体中有多个抗氧化系统，目前认为至少4个，包括：抗氧化酶系统(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶)；蛋白质等大分子；多酚、维生素、抗坏血酸等小分子；激素。这些存在于体内的抗氧化系统的工作原理、相互之间的关系还没有搞清楚，所以很难对抗氧化物质进行综合评价[9]。2)在系统中存在多种自由基和抗氧化剂资源(羟自由基、超氧阴离子、过氧自由基、脂质自由基、单线态氧、氮自由基等)，他们各自都有不同的化学和物理特征。某一抗氧化剂可能在单一系统中同时有多重机制，或者在不同系统中表现出不同的机制。此外对于不同的自由基，抗氧化剂的清除机制也不相同，例如类胡萝卜素与酚类物质相比其清除过氧自由基能力较弱，但它具有强的清除单线态氧的能力。3)现在采用的抗氧化方法大多为体外抗氧化测定，无法真实模拟生理环境，且各方法都仅测定了抗氧化能力中的某一方面，故无法模拟生理条件下的多条抗氧化途径。4)测定的样品大多为混合物如食品等，其成分非常复杂，各抗氧化物质的抗氧化作用无法用单一的机制解释。由此可以看出真实反映物质的抗氧化能力是非常困难的。因此具体机制，还需多角度的深入的研究。

参考文献：

- [1]杨露,赵冉,吴镇槐,等.枸杞原浆抗氧化及增强免疫活性研究[J].食品与机械,2022,38(09):18-21+28.
- [2]张文艳,林宇琪,刘宏莹,等.枸杞中黄酮类化合物降糖活性研究[J].黑龙江科学,2022,13(16):1-3+18.
- [3]盖永强,蓝天婵,张乐宏,等.枸杞黄芪复合多糖多种提取方法的比较[J].食品工业,2022,43(08):78-81.
- [4]Qiao Feng et al. Analysis of flavonoid metabolism during fruit development of Lycium chinense.[J]. Journal of plant physiology, 2022, 279 : 153856-153856.
- [5]Wang Yanping and Fu Jingxian and Yang Dong. In Situ Stability of Anthocyanins in Lycium ruthenicum Murray[J]. Molecules, 2021, 26(23) : 7073-7073.
- [6]刘鹏,李达,纪海玉,等.枸杞多糖的提取及其体外抗氧化活性[J].食品研究与开发,2022,43(10):111-116.
- [7]王娟,孙瑞琳,刘欣,等.藜麦黑枸杞酸奶的工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2022,43(12):240-245.]
- [8]董誉婷,庞俊涛,李瑞瑶,等.宁夏有机红枸杞发展现状及提升路径[J].全国流通经济,2021(21):107-109.
- [9]尹民强,吴金龙,王天琦,等.黑果枸杞抗氧化能力评价及比较研究[J].中国果菜,2019,39(11):52-56.

项目基金：国家级大学生创新创业训练计划项目：201910823021；湖南省大学生创新创业训练计划项目：湘教通[2019]219号2381；长沙医学院大学生创新创业训练计划项目：长医教[2019]61号-014；

第一作者：李春兰 1996.10，女，回族，宁夏回族自治区，本科，临床医学专业；

通讯作者：郭丽娟，1982，08，女，汉，湖北武穴，硕士，副教授，研究方向：纳米材料与计算化学。