

大蒜不同极性萃取物的体外抗氧化活性*

邢利沙,陈海霞,王佳,王艳伟

(天津大学 药物科学与技术学院,天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室,天津,300072)

摘要 为了研究大蒜不同极性萃取物的抗氧化活性,确定大蒜的活性部位,促进大蒜资源在天然抗氧化剂和药品等领域的应用,文中采用体积分数 80% 乙醇回流提取、梯度萃取得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物 4 个不同极性部位。以清除二苯代苦味酰基(DPPH) 自由基、还原力和对肝脂质过氧化抑制力为评价指标研究其体外抗氧化活性。结果表明:大蒜不同极性萃取物均有一定的抗氧化活性,其抗氧化能力与不同极性萃取物的质量浓度呈现出良好的线性依赖关系,抗氧化效果因反应体系不同而有所不同。正丁醇萃取物在 3 个体外抗氧化活性模型中均表现出较好的抗氧化活性,其清除 DPPH 自由基和肝脂质过氧化抑制活性的半数抑制浓度分别为 0.46 mg/mL 和 0.36 mg/mL。大蒜正丁醇萃取物得率较高(7.86%),抗氧化活性较好,可以作为新型有效的天然抗氧化物质进行开发利用。

关键词 大蒜;DPPH;还原力;肝脂质过氧化抑制

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属植物,在我国南北方均有种植。大蒜鳞茎既是人们喜爱的调味品,又是常用的植物药。大蒜的主要成分是水、蛋白质和糖类,微量成分有脂类、酶类、肽类、氨基酸、苷类、维生素和微量元素等^[1]。大蒜功能成分主要分为挥发性化合物和非挥发性化合物两大类;挥发性化合物主要包括硫代亚磺酸酯类和其他脂溶性有机硫化物,非挥发性功能物质主要包括水溶性有机硫化物、类固醇皂苷、甾体类、黄酮类、酚类等^[2]。大蒜具有清热解毒、杀菌消炎、预防和治疗高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、提高机体免疫力和防癌抗癌等医疗保健作用^[3]。大蒜药物制剂在临床上可用于治疗心脑血管疾病、感染性疾病、治疗口腔溃疡、慢性结肠炎和脂肪肝等疾病^[4]。目前,关于大蒜抗氧化活性的研究虽已有报道,但研究对象和评价方法不尽相同,而且关于大蒜不同极性萃取物体外抗氧化活性的研究鲜有报道。本研究中采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇有机溶剂对大蒜的乙醇提取物进行萃取,并分析了不同极性萃取物的体外抗氧化活性结果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大蒜,购自天津大学附近的市場。

DPPH 自由基,购自于 Sigma 公司,其余的试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

UV-9200 紫外分光光度计(Rayleigh);电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);旋转蒸发仪和数显恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂);FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大蒜活性成分的提取

取去皮大蒜 200 g,洗净冷冻干燥得到脱水大蒜 60.43 g,按 1:7(g:mL)的比例加入体积分数 80% 乙醇回流提取 2 h,过滤滤渣同法提取 2 次。合并 3 次滤液,于 45 ℃下减压浓缩回收溶剂,得到大蒜粗提物(Crude -Extract)11.67 g。

将大蒜乙醇粗提物混悬于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别减压回收溶剂,真空冷冻干燥得石油醚萃取物(PE-F):0.17 g,乙酸乙酯萃取物(EA-F):0.14 g,正丁醇萃取物(n-Bu-F):4.75 g,水萃取物(W-F):6.23 g。

1.3.2 多酚含量的测定

采用福林-酚比色法测定粗提物和不同极性萃取物的总多酚含量^[5]。以没食子酸为标准品绘制标准

第一作者:硕士研究生(陈海霞教授为通讯作者,E-mail:chenhx@tju.edu.cn)。

* 国家自然科学基金(No:31371879)资助

收稿日期:2014-12-24,改回日期:2015-01-14

曲线,得到标准曲线方程为: $Y = 0.0044A_{760} + 0.001$ ($R^2 = 0.996$)。向反应体系中加入粗提物及不同极性萃取物的样品溶液,在 760 nm 波长下测定其吸收值 A ,通过多酚的标准曲线计算样品中多酚含量。

1.3.3 抗氧化活性测定方法

1.3.3.1 大蒜不同极性萃取物对 DPPH 自由基清除作用

大蒜不同极性萃取物清除 DPPH 自由基的活性按照文献^[6]的方法进行测定。在 517 nm 下测定不同样品溶液的吸光度 A ,不加样品的反应体系作为对照,每个样品测定 5 个不同质量浓度。样品对 DPPH 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = \frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

1.3.3.2 大蒜不同极性萃取物的还原力测定

配制不同浓度的样品溶液,按照文献^[7]的测定方法测定还原力活性。向 0.1 mL 不同浓度的样品溶液中加入 0.2 mol/L pH 值为 6.6 的磷酸盐缓冲液 0.7 mL 和 30 mmol/L 的 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液 2 mL, 50 °C 水浴 20 min 后加入 10% 三氯乙酸 2 mL,混匀后静置 10 min。取上述溶液的上清液 1 mL 加入 $FeCl_3$ 3 mL 静置 10 min,700 nm 波长测吸光度 A ,吸光值越大则还原力越强。

1.3.3.4 大蒜不同极性萃取物对 Fe^{2+} -Vc 诱导小鼠肝脂质过氧化抑制活性

参考文献^[8]的测定方法,小鼠禁食 12 h 后,脱颈椎处死,迅速取出肝脏,在 4 °C 下加入 30 倍体积生理盐水制成肝匀浆。向不同浓度的 0.1 mL 样品溶液中分别加入 100 μ mol/L 的 Vc、10 μ mol/L 的 $FeSO_4$ 溶液各 0.25 mL, pH 为 7.4、0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 0.9 mL,肝匀浆 0.5 mL,以不加 Vc 和 $FeSO_4$ 的反应体系作为对照。将上述反应体系在 37 °C 中保温 30 min,加入 20% 的三氯乙酸(TCA)1 mL 终止反应,再加入显色剂 0.67% 的硫代巴比妥酸(TBA)1 mL,充分混匀后,100 °C 沸水浴显色反应,冰水浴终止显色反应,3 800 r/min 离心 15 min,取上清液,在 532 nm 波长测吸光度 A 。每个样品平行操作 3 次取平均值。样品对肝脂质过氧化抑制率的计算公式为:

$$I/\% = \frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 大蒜不同极性萃取物得率及多酚含量

大蒜不同极性萃取物经过减压浓缩,冷冻干燥,得到不同极性部位的样品,其得率和多酚含量见表 1。由表 1 可知,由于溶剂极性不同对萃取产物的得率,萃取产物的成分组成有较大的影响,其中正丁醇萃取物得率和多酚的含量分别为 $(7.861 \pm 0.541)\%$ 和 $(3.784 \pm 0.023)\%$ 。

表 1 不同极性部位的大蒜提取物得率和多酚含量

Table 1 Yields and content of polyphenol of different fractions of garlic

	乙醇粗提物	石油醚萃取物	乙酸乙酯萃取物	正丁醇萃取物	水萃取物
得率/%	19.312 ± 0.791	0.281 ± 0.006	0.232 ± 0.004	7.861 ± 0.541	10.309 ± 0.381
多酚含量/%	0.316 ± 0.027	0.259 ± 0.011	1.037 ± 0.017	3.784 ± 0.023	0.148 ± 0.027

2.2 大蒜不同极性萃取物对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 是一种稳定的有机自由基,已经被广泛用来测定不同植物的抗氧化活性,因此可以通过测定样品对 DPPH 自由基的清除能力来评价抗氧化剂的性能^[9-10]。由图 1 可以得出,大蒜不同极性萃取物对 DPPH 自由基均有一定的清除能力,其清除率与不同极性萃取物样品的质量浓度呈现良好的剂量-效应关系。在检测的浓度内(0.17 ~ 0.83 mg/mL):乙醇粗提物、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物对 DPPH 的清除能力的线性相关系数 R^2 分别为 0.964、0.989、0.971、0.975 和 0.946。正丁醇、乙酸乙酯和石油醚萃取物对 DPPH 自由基的半数清除率(IC_{50})

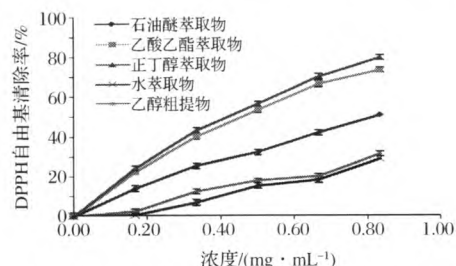


图 1 大蒜水提取物对 DPPH 自由基的清除作用 ($n=3$)

Fig. 1 Scavenging activity against DPPH free radicals of different extracts from garlic ($n=3$)

分别为 0.46、0.50 和 0.79 mg/mL;其清除 DPPH 自由基活性均比粗提物的活性好,且有显著性差异($P < 0.01$)。多酚含量较高的正丁醇萃取物比其他各

层萃取物清除 DPPH 自由基能力强。

2.3 大蒜不同极性萃取物的还原力测定

抗氧化剂的还原力与其抗氧化性之间存在联系,还原能力的高低可以间接反映抗氧化能力的强弱,因此还原力检测被广泛用来检测植物药抗氧化活性^[11-12]。由图 2 可知大蒜粗提物及其不同极性萃取物均有一定的还原能力,还原能力强弱次序为:正丁醇萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 石油醚萃取物 > 粗提物 > 水萃取物。正丁醇萃取物的还原力明显优于粗提物和其它极性萃取物的活性,在显著性水平检验中正丁醇萃取物的还原力活性与其他样品之间均存在显著性差异($P < 0.01$)。在 $0 \sim 0.13 \text{ mg/mL}$ 的浓度范围内,正丁醇萃取物的还原力活性具有较好的线性浓度依赖关系($R^2 = 0.996$)。由试验结果可以得出,大蒜的粗提物通过不同极性溶剂分级后抗氧化活性成分多酚在正丁醇萃取物得到富集,这可能是正丁醇萃取物还原力活性明显优于其它样品的原因之一。

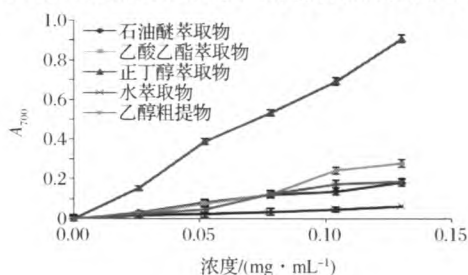


图 2 大蒜提取物还原力活性测定结果 ($n = 3$)

Fig. 2 Reducing power of different extracts from garlic ($n = 3$)

2.4 大蒜不同极性萃取物对 Fe^{2+} -Vc 诱导的小鼠肝脂质过氧化抑制测定

脂质过氧化是细胞膜上的多元不饱和脂肪酸的氧化降解过程。丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化的中间产物之一,其含量的高低可反映机体内脂质过氧化的程度。抗氧化剂通过抑制脂质过氧化的发生减少 MDA 的生成。通过测定 MDA 的吸光度可以反映脂质过氧化抑制活性的大小,吸光度越小抗氧化剂对脂质过氧化的抑制作用就越强^[13-14]。从图 3 可以看出,在检测的浓度范围内 ($0.125 \sim 0.625 \text{ mg/mL}$) 不同的样品对脂质过氧化的抑制能力随浓度的增大呈逐步上升的趋势。石油醚萃取物,乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物均有较好的肝脂质过氧化抑制活性且石油醚萃取物的抑制活性优于其他萃取物的活性。石油醚萃取物,乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的半数抑制浓度分别为 $0.20, 0.39$ 和 0.36 mg/mL ,在测

定的浓度范围内粗提物和水萃取物部分均未得到半数抑制浓度。该测定结果与清除 DPPH 自由基和还原力活性的结果不同,可能是由于石油醚提取物的极性较小,更容易进入细胞膜进而抑制细胞膜上不饱和脂肪酸的氧化降解,降低了 MDA 的生成量,较其他萃取物更好地抑制了肝脂质过氧化。

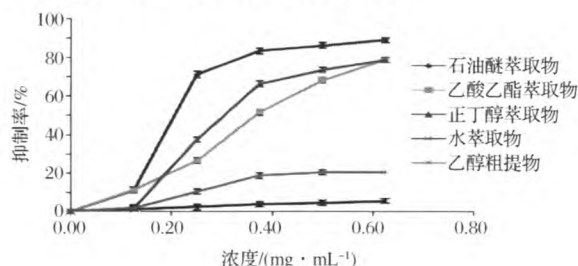


图 3 大蒜提取物对 Fe^{2+} -Vc 诱导小鼠肝脂质过氧化的抑制 ($n = 3$)

Fig. 3 Inhibition effect of different extracts from garlic on liver lipid peroxidation ($n = 3$)

3 结论

采用体积分数 80% 乙醇回流提取、梯度萃取得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物。通过 DPPH 自由基清除活性,还原力和肝脂质过氧化抑制活性评价分析了粗提物 and 不同极性萃取物的体外抗氧化活性。结果表明,大蒜粗提物 and 不同极性萃取物均有抗氧化活性,其抗氧化活性大小与样品具有较好的剂量-效应依赖关系。在不同抗氧化体系中,大蒜不同极性萃取物的抗氧化活性强弱不同,其中清除 DPPH 自由基和还原力的强弱一致大小次序均为:正丁醇萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 石油醚萃取物 > 粗提物 > 水萃取物。肝脂质过氧化抑制活性的强弱顺序为:石油醚萃取物 > 正丁醇萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 粗提物 > 水萃取物。在清除 DPPH 自由基和还原力的抗氧化活性测定中,得率 and 多酚含量较高的正丁醇萃取物具有较好的抗氧化活性。石油醚萃取物具有较好的肝脂质过氧化抑制活性,分析原因可能是由于采用的抗氧化体系不同,不同极性萃取物抗氧化成分的种类和结构有所差异。结果表明,与大蒜的乙醇粗提物和其他萃取物相比,正丁醇萃取物在清除 DPPH 自由基和还原力体外抗氧化模型中表现出较好的抗氧化活性,在肝脂质过氧化抑制活性模型中也表现出较好的抗氧化活性,是大蒜的活性部位,其抗氧化活性与多酚的含量呈正相关的关系。综上所述,得率 and 多酚含量较高的正丁醇萃取物具有较

好体外抗氧化活性,作为天然抗氧化剂的开发研究具有开发利用价值。

参 考 文 献

- [1] 田莉,杨秀伟,陶海燕. 大蒜化学成分的气-质联用分析[J]. 天然产物研究与开发,2006,17(5):533-538.
- [2] 闫森森,许真,徐蝉,等. 大蒜功能成分研究进展[J]. 食品科学,2010,31(5):312-318.
- [3] Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic [J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(3):716S-725S.
- [4] 杨德明. 大蒜的药理研究概况[J]. 时珍国药研究, 1991,2(4):185-187.
- [5] 王毕妮,曹炜,高慧,等. 红枣酱的体外抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业,2012,38(7):128-131.
- [6] Kallel F, Driss D, Chaari F, et al. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 62:34-41.
- [7] TIAN J, CHEN H, CHEN S, et al. Comparative studies on the constituents, antioxidant and anticancer activities of extracts from different varieties of corn silk [J]. Food & Function, 2013, 4(10):1526-1534.
- [8] MA L, CHEN H, ZHANG Y, et al. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2):371-378.
- [9] Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, et al. Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs [J]. Phytotherapy Research, 2006, 20(11):961-965.
- [10] Matthäus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(12):3444-3452.
- [11] Custódio L, Fernandes E, Escapa A L, et al. Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13):7005-7012.
- [12] XING R, YU H, LIU S, et al. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates *in vitro* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(4):1387-1392.
- [13] Ferreira I C F R, Barros L, Soares M E, et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations [J]. Food Chemistry, 2007, 103(1):188-195.
- [14] LI X L, ZHOU A G, HAN Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* *in vitro* [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(1):34-42.

Studies on the antioxidant activities of different fractions of garlic extract

XING Li-sha, CHEN Hai-xia, WANG Jia, WANG Yan-wei

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High-Efficiency, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

ABSTRACT To investigate the *in vitro* antioxidant activities of different fractions of garlic extract and to find out the active fraction of garlic for exploitation in natural antioxidant and drug applications, the extracts were prepared by 80% ethanol circumfluence extraction. Four fractions were obtained by extraction with different polar solvents including petroleum ether, ethyl acetate, normalbutyl alcohol and water. The antioxidant activities of the fractions were compared and assessed by three *in vitro* antioxidant assays including 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing power and inhibition on liver lipid peroxidation. Results showed that all the fractions had antioxidant activity and the antioxidant capacity was different. There was a good linear dependence between the capacity and the concentration. N-butyl alcohol fraction showed better antioxidant activity. The half inhibition concentration of DPPH scavenging rate was 0.46 mg/mL and half inhibition concentration of liver lipid peroxidation was 0.36 mg/mL. N-butanol extract had higher yields (7.86%) and good antioxidant activity, therefore could be used as a good source of natural antioxidants.

Key words garlic; antioxidant activities; DPPH; ferric reducing power; inhibition of liver lipid peroxidation