

石韦提取物抗氧化及抑制亚硝化作用研究

庄远杯^{1,2}, 凌梅娣¹, 詹佳虹¹, 李榕娣^{1,2}, 张超¹, 魏爱红^{1,2}, 张声源^{1,2*}¹嘉应学院医学院; ²嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所, 梅州 514031

摘要:研究石韦不同溶剂提取物的总酚、总黄酮含量和抗氧化及抑制亚硝化活性,并分析其相关性。采用福林酚比色法和硝酸铝络合分光光度法分别测定各提取物中总酚、总黄酮的含量,以 DPPH 法、ABTS 法和普鲁士蓝法分别测定各提取物的自由基清除能力和铁离子还原力,采用盐酸茶乙二胺法和 α -萘胺法分别测定石韦各提取物对亚硝酸盐的清除率和对亚硝胺合成的阻断率,采用 Pearson 法分析总酚、总黄酮含量与抗氧化及抑制亚硝化活性的相关性。结果表明:石韦不同溶剂提取物的总酚和总黄酮含量存在显著性差异,其中正丁醇提取物的总酚、总黄酮含量均最高,分别为 29.85 ± 2.15 和 37.23 ± 2.41 mg/g。各提取物均具有较强的抗氧化和抑制亚硝化活性,以正丁醇提取物的效果最显著,其 DPPH 自由基清除能力 ($IC_{50} = 44.14 \pm 1.21$ μ g/mL)、ABTS 自由基清除能力 ($IC_{50} = 97.47 \pm 12.10$ μ g/mL) 和还原能力 (822.08 ± 24.82 μ mol Vc/g),以及对亚硝酸盐的清除能力 ($IC_{50} = 7.071 \pm 0.231$ mg/mL)、对亚硝胺合成的阻断能力 ($IC_{50} = 15.010 \pm 1.224$ mg/mL) 均最强,并显著强于其他提取物 ($P < 0.05$)。相关性研究显示,石韦各提取物的抗氧化活性和抑制亚硝化活性与其总酚和总黄酮含量呈显著正相关 ($P < 0.05$),表明总酚类和总黄酮类物质是石韦发挥作用的物质基础。通过对石韦不同提取物的总酚和总黄酮含量的测定、抗氧化和抑制亚硝化作用评价及相关性分析,为石韦的进一步开发利用提供实验数据和参考依据。

关键词:石韦;抗氧化;抑制亚硝化;总酚;总黄酮

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)4-0681-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.4.019

Antioxidant and inhibitory effect on nitrosation of extracts from *Pyrrrosia lingua* (Thunb.) FarwellZHUANG Yuan-bei^{1,2}, LIN Mei-di¹, ZHAN Jia-hong¹,
LI Rong-di^{1,2}, ZHANG Chao¹, WEI Ai-hong^{1,2}, ZHANG Sheng-yuan^{1,2*}¹Medical College of Jiaying University;²Institute of Hakka Medicinal Bio-resources, Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031, China

Abstract: The total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and nitrosation activity of different solvent extract from *Pyrrrosia lingua* (Thunb.) Farwell were compared and analyzed for correlation. The contents of total phenolic and total flavonoid from *P. lingua* were determined by Folin-Ciocalteu colorimetric method and $Al(NO_3)_3$ complexation spectrophotometric method. DPPH, ABTS, and Prussian blue method were used to determine the free radical scavenging and iron reducing power of extracts from *P. lingua*. The removal rate of nitrite and the blocking rate of nitrosamine synthesis were determined by naphthylethylenediamine hydrochloride method and α -naphthylamine method, and Pearson correlation analysis method was used to measure their relationships. The results showed that there were significant differences in the contents of total phenolics and total flavonoids among different solvent extracts. The *N*-butyl alcohol phase contained the highest amount of total phenolics 29.85 ± 2.15 mg/g and total flavonoids 37.23 ± 2.41 mg/g. All the extracts showed strong antioxidant and nitrosation activity. The *N*-butyl alcohol phase also had the highest antioxidant activity and inhibitory activity among the four extracts ($P < 0.05$), which showed DPPH radical scavenging activity ($IC_{50} = 44.14 \pm 1.21$ μ g/mL), ABTS radical scavenging activity ($IC_{50} = 97.47 \pm 12.10$ μ g/mL), reducing ferric (822.08 ± 24.82 μ mol Vc/g), scavenging rate for nitrate ($IC_{50} = 7.071 \pm$

收稿日期:2019-09-25 接受日期:2020-04-01

基金项目:梅州市医药卫生科研课题(2019-B-10);梅州市社会发展科技计划(2018B057);广东省大学生创新创业项目(201910582267);广东省高等教育“冲补强”提升计划重点建设学科(农业资源与环境)建设项目(130B0103)

*通信作者 E-mail:mcduzzhang@yeah.net

0.231 mg/mL) and blocking rate of nitrosamine ($IC_{50} = 15.010 \pm 1.224$ mg/mL), and were significantly stronger than those of other extracts ($P < 0.05$). The results of correlation analysis showed that there were significant correlations between the contents of total phenolic and total flavonoids and antioxidant activity, inhibitory activity on nitrosation ($P < 0.05$) of all extracts, and the material basis of antioxidant activity inhibitory activity on nitrosation of *P. lingua* may be phenolics and flavonoids. The evaluation of index components, activities, and related analysis of different solvent extract from *P. lingua* will provide experimental data for quality evaluation and rational utilization of *P. lingua*.

Key words: *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell; antioxidant; inhibition of nitrosation; total phenolics; total flavonoids

自由基的化学性质活泼,可攻击细胞内 DNA、蛋白质、脂质等多种生物分子,导致细胞膜、遗传因子严重损伤,进而诱发癌变、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病^[1-2]。天然抗氧化剂广泛存在于果蔬和药用植物中,能够保护机体免受自由基诱导的氧化应激损伤,相对于合成的抗氧化剂,如丁羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)及叔丁基对苯二酚(TBHQ),具有安全、低毒等特点。亚硝胺的前体物质,如亚硝酸盐和胺类,广泛存在于腌制食物中,两者在胃液酸性条件下极易发生亚硝化反应转化为强致癌物—亚硝胺,进而引起鼻咽癌、食道癌、胃癌等多种器官恶性肿瘤,甚至通过胎盘屏障使下一代致癌^[3]。清除体内亚硝酸盐和阻断亚硝胺的合成是预防亚硝胺所致癌症的一项有效途径。现代药理研究表明,许多天然成分如黄酮类^[4]、酚类^[5]等能起到清除体内亚硝酸盐和阻断亚硝胺合成的作用,从而达到预防癌症的效果。从天然产物中挖掘安全低毒的抗氧化剂和抑制亚硝化剂已成为食品科学领域的研究热点。

石韦(*Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell)为水龙骨科(Polypodiaceae)石韦属(*Pyrrhosia*)的多年生草本植物,又名石皮、金星草,主产广东、浙江、湖北等地,始载于《神农本草经》,为《中国药典》收载,具有利尿通淋、清肺止咳、凉血止血等功效,临床用于治疗热淋,血淋,石淋,小便不通等^[6]。现代研究表明,石韦含有黄酮类、多酚、总皂苷、多糖等药用成分,其中黄酮类、多酚类成分含量较高,具有抗菌、抗肿瘤、调节免疫功能、降血压、降血糖等药理活性^[7,8]。国内外学者研究显示,同属植物有柄石韦具有良好的抗氧化活性^[9-11]。但对石韦抗氧化活性和抑制亚硝化活性及其与总酚、总黄酮含量相关性的研究未见报道。

本实验以石韦为研究对象,系统溶剂萃取分离,测定各提取物的总酚、总黄酮含量,比较各溶剂提取物的抗氧化活性和抑制亚硝化活性,并分析成分含量与活性的相关性,为石韦抗氧化活性和抑制亚硝

化活性成分的分离指导提供实验基础,为开发利用石韦作为防癌抗癌保健食品和天然抗氧化剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

药材石韦(*Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell)于2016年4月采自广东省梅州市阴那山自然保护区,经鉴定为水龙骨科(Polypodiaceae)石韦属(*Pyrrhosia*)多年生草本植物。

没食子酸标准品(上海金穗生物科技有限公司;批号20160410);福林酚试剂(上海金穗生物科技有限公司;批号2016108);芦丁标准品(成都昂赛斯生物科技有限公司;批号20160815);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH;美国Sigma公司;批号STBB0829V);2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS;美国Sigma公司;批号K1517067);维生素C(Vc;西陇科学有限公司;批号20161213);硝酸铝(天津市科密欧化学试剂有限公司;批号20150202);过硫酸钾、铁氰化钾、三氯乙酸、无水三氯化铁、无水柠檬酸、对氨基苯磺酸、二甲胺、1-萘胺、盐酸萘乙二胺、亚硝酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);试剂均为分析纯。

UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);WFT-203B三用紫外线分析仪(上海精科实业有限公司);N-1100V型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);FA2004型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);TG16-WS台式高速离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司);JP-100S型超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司);WJX-A1000型多功能摇摆粉碎机(上海缘沃工贸有限公司);DHG-9246A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 石韦醇提取物及不同溶剂提取物的制备

石韦2.0 kg,经50℃烘干,粉碎,用2倍量的95%乙醇超声提取3次,合并提取液,减压浓缩得浸

膏(230 g)。取浸膏 200 g 分散于适量蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂得石油醚提取物(PL-P, 25 g),乙酸乙酯提取物(PL-E, 66 g),正丁醇提取物(PL-B, 53 g),水提取物(PL-W, 50 g),置于玻璃真空干燥器中保存备用。

1.2.2 总酚含量测定

Folin-酚法测定总酚含量^[12]。精密称取真空干燥至恒重的没食子酸标准品 20.0 mg,用蒸馏水溶解并定容于 100 mL 棕色量瓶中,得质量浓度为 0.2 g/L 没食子酸标准溶液。分别精密移取没食子酸标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 于 10 mL 棕色具塞比色管中,依次加入 6.0 mL 蒸馏水,0.5 mL 福林试剂,充分摇匀,室温避光静置 2 min,再加入 2.0 mL 7.5% 碳酸钠溶液,蒸馏水至刻度,混匀后常温避光反应 90 min,于波长 760 nm 处测定吸光度。各提取物的总酚含量参考没食子酸(gallic acid, GA)标准曲线用没食子酸当量(每克干样品中酚类化合物相当于没食子酸的毫克数,mg/g)表示。每个提取物平行测定 3 次。

1.2.3 总黄酮含量测定

硝酸铝法测定总黄酮含量^[13]。精密称取芦丁标准品 20.0 mg,用 60% 乙醇溶解并定容至 100 mL 棕色量瓶中,得质量浓度为 0.2 g/L 芦丁标准溶液。分别精密移取芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 25 mL 棕色具塞比色管中,依次加入蒸馏水至 7.0 mL,5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,摇匀,静置 4 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.0 mL,摇匀,静置 4 min,加入 4% 氢氧化钠试液 10.0 mL,再加蒸馏水至刻度,摇匀,放置 10 min,于波长 500 nm 处测定吸光度。各提取物的总黄酮含量参考芦丁(rutin, RT)标准曲线用芦丁当量(每克干样品中黄酮类化合物相当于芦丁的毫克数,mg/g)表示。每个提取物平行测定 3 次。

1.2.4 抗氧化活性研究

1.2.4.1 DPPH 法

DPPH 自由基清除能力的测定参考文献^[14],稍作改进。分别精密移取 1.0 mL 不同质量浓度的样品和 Vc 溶液于 10 mL 试管中,分别加入 0.1 mmol/L DPPH 甲醇溶液 1.0 mL,室温避光静置 20 min,以甲醇作为空白对照,于波长 517 nm 处测定吸光度(A_i);同时测定 1.0 mL DPPH 甲醇溶液与 1.0 mL 甲醇溶液混合后在波长 517 nm 处的吸光度(A_0);测定 1.0 mL 甲醇溶液与 1.0 mL 样品溶液在波长

517 nm 处的吸光度(A_j);每个样品平行测定 3 次。根据公式(1)计算出石韦不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除率。

DPPH 自由基清除率 =

$$[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4.2 ABTS 法

ABTS 自由基清除能力测定参考文献^[15],稍作改进。将 7.0 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合,室温避光静置 12 ~ 16 h,制备 ABTS 自由基母液。用 10 mmol/L (pH 7.4) 磷酸缓冲溶液将 ABTS 自由基母液稀释,使其在波长 734 nm 处吸光度达到 0.70 ± 0.02 。分别将 0.1 mL 不同质量浓度样品溶液和 Vc 溶液加入 4.0 mL ABTS 自由基溶液中,振荡 30 s 后室温静置 10 min,于波长 734 nm 处测量吸光度(A_i);同时测定 4.0 mL ABTS 自由基溶液与 0.1 mL 甲醇溶液混合后在波长 734 nm 处的吸光度(A_0);测定 4.0 mL (10 mmol/L; pH 7.4) 磷酸缓冲溶液与 1.0 mL 样品溶液在波长 734 nm 处的吸光度(A_j);每个样品平行测定 3 次。根据公式(2)计算出石韦不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除率。

ABTS 自由基清除率 =

$$[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4.3 普鲁士蓝法

铁还原力的测定参考文献^[16]。分别精密移取 2.0 mL 不同质量浓度的样品和 Vc 溶液于 10 mL 试管中,再分别加入 2.0 mL 磷酸缓冲溶液(2.0 mol/L, pH 6.6)和 2.0 mL 1% 铁氰化钾,摇匀,于 50 °C 恒温水浴 20 min 后取出急速冷却,再分别加入 2.0 mL 10% 三氯乙酸溶液。将上述溶液离心 10 min (6 000 rpm),取上清液 2.0 mL,加入 1.5 mL 蒸馏水及 0.5 mL 0.1% FeCl_3 溶液混匀,静置 10 min 后于 700 nm 测定吸光度,每个样品平行测定 3 次,铁还原力大小用每克样品的 Vc 当量表示($\mu\text{mol/g}$)。

1.2.5 抑制亚硝化活性研究

1.2.5.1 盐酸萘乙二胺法

亚硝酸盐清除率的测定参考文献^[17]。pH 3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 2.0 mL,分别加入不同质量浓度的样品和 Vc 溶液 1.0 mL,5 $\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸钠溶液 2.0 mL 于 25 mL 比色管中,在 37 °C 水浴 1 h,取出,立即加入 0.4% 对氨基苯磺酸 2.0 mL,混匀,静置 3 ~ 5 min,各加 1.0 mL 0.2% 盐

酸萘乙二胺溶液。加蒸馏水至刻度,混匀,静置 15 min,在 538 nm 下测定吸光度,每个样品平行测定 3 次。根据公式(3)计算出石韦不同溶剂提取物对亚硝酸盐的清除率。

亚硝酸盐清除率 =

$$[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_0 为空白对照组的吸光度值(蒸馏水代替样品溶液); A_i 为样品组的吸光度值; A_j 为未加亚硝酸钠溶液的吸光度值(蒸馏水代替亚硝酸钠溶液),下同。

1.2.5.2 α -萘胺法

亚硝胺合成阻断率的测定参考文献^[18]。分别移取不同质量浓度的样品和 Vc 溶液 5.0 mL 于 25 mL 比色管中,加入 pH3.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 10.0 mL、1 mmol/L NaNO_2 溶液 1.0 mL、1 mol/L 的二甲胺溶液 1.0 mL,加入蒸馏水至 25.0 mL,在 37 °C 下恒温 1 h。吸取 1.0 mL 上述溶液至 25 mL 小烧杯中,加入质量分数 0.5% Na_2CO_3 溶液 0.5 mL,于紫外分析仪上(254 nm)照 15 min。取出后加入质量分数 1% 对氨基苯磺酸 1.5 mL,再加入质量分数 0.1% α -萘胺 1.5 mL、蒸馏水 0.5 mL,摇匀,静置 15 min,在最大吸收波长 525 nm 处测定吸光度,每个样品平行测定 3 次。根据公式(4)计算出石韦不同溶剂提取物对亚硝胺合成的阻断率。

亚硝胺合成的阻断率 =

$$[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (4)$$

1.3 数据统计分析

实验重复 3 次,采用 Origin 8.5 软件进行数据处理,结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并得到相应的半数清除浓度 (IC_{50})。多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。Pearson 法进行总酚、总黄酮含量与抗氧化活性、抑制亚硝化活性的相关性分析。

表 1 石韦不同溶剂提取物的总酚和总黄酮含量

Table 1 Total polyphenol, flavonoid contents of different polarity parts from *P. lingua*

成分 Component	PL-B	PL-W	PL-E	PL-P
总酚 Total polyphenol (mg/g)	29.85 \pm 2.15 ^a	12.85 \pm 1.36 ^b	5.76 \pm 1.27 ^c	2.47 \pm 0.22 ^d
总黄酮 Total flavonoid (mg/g)	37.23 \pm 2.41 ^a	18.69 \pm 1.62 ^b	10.15 \pm 1.13 ^c	5.82 \pm 0.43 ^d

注:同行肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$),下同。

Note: Different data in the same row means significant difference ($P < 0.05$), the same below.

2 结果与分析

2.1 石韦各提取物总酚和总黄酮含量

没食子酸标准曲线如图 1 所示,线性拟合方程 $Y = 0.1046X + 0.0322$, $R^2 = 0.997$,线性关系良好。

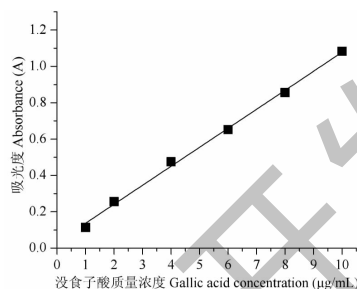


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 Gallic acid standard curve

芦丁标准标准曲线如图 2 所示,线性拟合方程 $Y = 0.0133X - 0.0072$, $R^2 = 0.997$,线性关系良好。

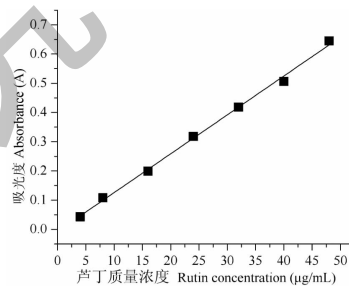


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 Rutin standard curve

石韦 4 个不同溶剂提取物总酚和总黄酮含量如表 1 所示。结果显示,总酚和总黄酮在不同溶剂提取物中的含量差异显著 ($P < 0.05$),且总酚和总黄酮含量大小均为 $\text{PL-B} > \text{PL-W} > \text{PL-E} > \text{PL-P}$ 。其 PL-B 中的总酚、总黄酮含量最高,分别为 29.85 ± 2.15 和 37.23 ± 2.41 mg/g,明显大于其余 3 个提取物。表明正丁醇可高度富集石韦醇提取物中的酚类和黄酮类成分,对 PL-B 的进一步分离纯化以研究石韦酚类和黄酮类成分具有重要的指导意义。

2.2 体外抗氧化活性测定结果

2.2.1 DPPH 自由基清除能力

石韦不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除率测定结果见图 3、表 2。由图 3 可知,在 40 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内,石韦各溶剂提取物对 DPPH 自由基均具有一定程度的清除作用,清除率随质量浓度的增大而增大,呈一定的量效关系。在相同质量浓度下,PL-B 对 DPPH 自由基的清除率最高,最高可达 90.76%。

由表 2 可知,石韦各溶剂提取物清除 DPPH 自由基能力大小依次为 PL-B > PL-W > PL-E > PL-P,其中 PL-B 和 PL-W 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值较为接近,且显著小于 PL-E 和 PL-P,表明石韦清除

表 2 石韦各溶剂提取物清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值

Table 2 The IC_{50} values of scavenging DPPH radical of different extracts obtained from *P. lingua*

项目 Item	PL-B	PL-W	PL-E	PL-P	Vc
IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	44.14 ± 1.21^b	72.70 ± 2.38^c	142.43 ± 13.14^d	266.85 ± 22.01^e	6.09 ± 0.22^a

2.2.2 ABTS 自由基清除能力

石韦不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除率测定结果见图 4、表 3。由图 4 可知,石韦各溶剂提取物清除 ABTS 自由基能力随质量浓度的增大而增强。当质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率由高到低依次为:PL-B > PL-W > PL-E > PL-P,其中 PL-B 的清除率高达 90.08%,接近于阳性对照 Vc(95.67%)。

由表 3 可知,石韦各溶剂提取物清除 ABTS 自由基能力具有显著性差异($P < 0.05$),清除能力大小依次为 PL-B > PL-W > PL-E > PL-P。其中 PL-B 清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 值为 $97.47 \pm 12.10 \mu\text{g}/\text{mL}$,远远小于其它 3 个溶剂提取物,表明石韦对

表 3 石韦各溶剂提取物清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 值

Table 3 The IC_{50} values of scavenging ABTS radical of different extracts obtained from *P. lingua*

项目 Item	PL-B	PL-W	PL-E	PL-P	Vc
IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	97.47 ± 12.10^b	397.66 ± 23.01^c	955.51 ± 103.01^d	954.25 ± 251.12^e	14.33 ± 0.33^a

2.2.3 铁还原能力的测定

石韦不同溶剂提取物对铁还原能力的测定结果见图 5。由图 5 可知,石韦 PL-B 的铁还原能力最强($822.08 \pm 24.82 \mu\text{mol Vc}/\text{g}$),单因素方差分析和多重比较(Duncan 法)结果显示,PL-B 的铁还原能力与其它溶剂提取物存在显著性差异($P < 0.05$),表明石韦对铁还原能力的活性物质主要集中在正丁

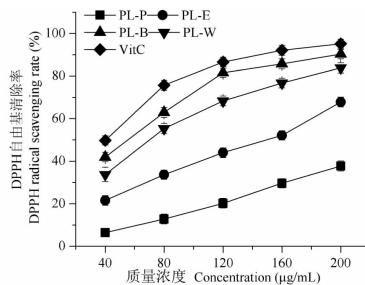


图 3 石韦各溶剂提取物对 DPPH 自由基清除能力的影响
Fig. 3 Effect of different solvent extracts from *P. lingua* on scavenging rate for DPPH radical

DPPH 自由基的活性物质主要集中在较大极性的水提取物和正丁醇提取物。

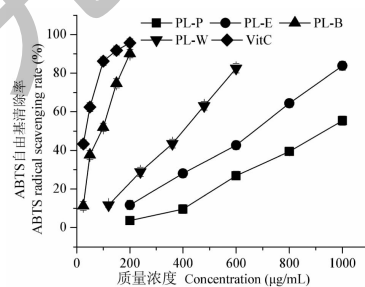


图 4 石韦各溶剂提取物对 ABTS 自由基清除能力的影响
Fig. 4 Effect of different solvent extracts from *P. lingua* on scavenging rate for ABTS radical

ABTS 自由基清除的活性物质可有效富集在正丁醇提取物。

醇提取物。

2.3 体外抑制亚硝化活性测定结果

2.3.1 亚硝酸盐的清除能力

石韦不同溶剂提取物对亚硝酸盐的清除率测定结果见图 6、表 4。由图 6 可知,在模拟胃酸条件下,石韦各溶剂提取物具有一定的清除亚硝酸盐的能力,随质量浓度增大而增强。

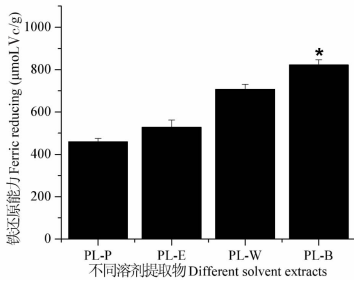


图5 石韦各溶剂提取物对铁还原能力的影响

Fig. 5 Effect of different solvent extracts from *P. lingua* on reducing ferric

由表4可知,石韦各溶剂提取物清除亚硝酸盐能力大小依次为 PL-B > PL-W > PL-E > PL-P。其中 PL-B 清除亚硝酸盐的 IC_{50} 值为 7.071 ± 0.231 mg/

表4 石韦各溶剂提取物清除亚硝酸盐的 IC_{50} 值Table 4 The IC_{50} values of scavenging nitrate of different extracts obtained from *P. lingua*

项目 Item	PL-B	PL-W	PL-E	PL-P	Vc
IC_{50} (mg/mL)	7.071 ± 0.231^b	13.212 ± 1.141^c	15.959 ± 1.432^e	20.101 ± 2.012^d	2.909 ± 0.242^a

2.3.2 亚硝胺合成的阻断能力

石韦不同溶剂提取物对亚硝胺合成的阻断力测定结果见图7、表5。由图7可知,石韦各溶剂提取物具有一定的阻断亚硝胺合成的能力,随质量浓度增大而增强,呈一定的量效关系。其中,PL-B对亚硝胺合成的阻断能力最强,在质量浓度为20.0 mg/mL时,阻断率达65.03%。

由表5可知,石韦各溶剂提取物阻断亚硝胺合成能力大小依次为 PL-B > PL-W > PL-E > PL-P。其中 PL-B 阻断亚硝胺合成的 IC_{50} 值为 15.010 ± 1.224 mg/mL,明显小于其余三个溶剂提取物,表明石韦阻

表5 石韦各溶剂提取物阻断亚硝胺合成的 IC_{50} 值Table 5 The IC_{50} values on blocking rate of nitrosamine of different extracts obtained from *P. lingua*

项目 Item	PL-B	PL-W	PL-E	PL-P	Vc
IC_{50} (mg/mL)	15.010 ± 1.224^b	34.242 ± 2.128^c	46.933 ± 3.229^d	69.844 ± 3.702^e	2.151 ± 0.225^a

2.4 总酚和总黄酮含量与抗氧化活性和抑制亚硝化活性的相关性分析

石韦不同溶剂提取物总酚、总黄酮含量与抗氧化活性和抑制亚硝化活性的相关性结果见表6。

由表6可知,石韦各溶剂提取物总酚、总黄酮含量与 ABTS 自由基清除能力、亚硝胺合成的阻断能力呈极显著正相关 ($P < 0.01$),与 DPPH 自由基清

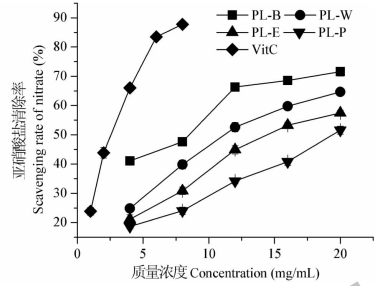


图6 石韦各溶剂提取物对亚硝酸盐清除能力的影响

Fig. 6 Effect of different solvent extracts from *P. lingua* on scavenging rate of nitrate

mL,明显小于其余三个溶剂提取物,表明石韦对亚硝酸盐清除的活性物质主要集中在正丁醇提取物。

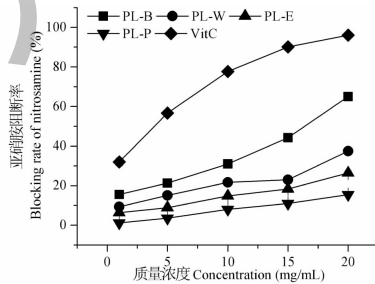


图7 石韦各溶剂提取物对亚硝胺合成阻断能力的影响

Fig. 7 Effect of different solvent extracts from *P. lingua* on blocking rate of nitrosamine

断亚硝胺合成的活性物质主要集中在正丁醇提取物。

除能力、铁还原能力、亚硝酸盐清除能力呈显著正相关 ($P < 0.05$)。表明石韦各溶剂提取物总酚、总黄酮含量与抗氧化活性和抑制亚硝化活性具有显著相关性,其中总酚、总黄酮含量对 ABTS 自由基清除能力及亚硝胺合成的阻断能力的影响大于 DPPH 自由基清除能力、铁还原能力、亚硝酸盐清除能力。

表 6 相关性分析结果

Table 6 Results of correlation analysis

指标 Index	总酚 Total polyphenol	总黄酮 Total flavonoid
DPPH 自由基清除能力 DPPH scavenging ability	0.952 *	0.938 *
ABTS 自由基清除能力 ABTS scavenging ability	0.973 **	0.985 **
铁还原能力 Ferric reducing power	0.957 *	0.946 *
亚硝酸盐清除能力 Nitrate scavenging ability	0.928 *	0.927 *
亚硝胺合成的阻断能力 Nitrosamine blocking ability	0.963 **	0.978 **

注: ** 双侧极显著相关($P < 0.01$), * 双侧显著相关($P < 0.05$)。

Note: ** indicates significant correlation at 0.01 level(both sides); * indicates significant correlation at 0.05 level(bilateral).

3 结论与讨论

石韦为常用中药,临床用于膀胱炎、泌尿系结石、尿血的治疗^[7],疗效确切,其资源分布较广,有良好的开发前景,但其发挥活性作用的物质基础尚不明确。

实验以药材石韦为原料,对其总酚、总黄酮含量及其抗氧化和抑制亚硝化活性进行了系统研究。试验结果表明,各提取物均含有总酚、总黄酮,其中正丁醇提取物(PL-B)中总酚、总黄酮的含量较高,并显著高于其他提取物,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。活性研究显示,各提取物均有不同程度的还原力、自由基清除作用以及抑制亚硝化作用,并呈一定的量效关系。从整体上看,正丁醇提取物(PL-B)表现出较强的DPPH、ABTS自由基清除作用和较强的 Fe^{3+} 还原作用,且明显强于其他提取物($P < 0.05$)。与此同时,正丁醇提取物(PL-B)对亚硝化反应有较好的抑制作用,能够清除亚硝酸盐和阻断亚硝胺的合成,并优于其他提取物,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。以上实验结果提示,石韦抗氧化和抑制亚硝化活性成分主要存在于极性较大的正丁醇提取物中,这可能与富含黄酮类、酚酸类活性成分有关^[19],学者 Mizuno 等^[20]也从石韦正丁醇提取物中分离得到了绿原酸,且含量丰富,现已为药典规定的石韦指标性成分。相关性分析显示,总酚、总黄酮含量对ABTS自由基清除能力及亚硝胺合成阻断能力呈极显著正相关($P < 0.01$),对DPPH自由基清除能力、铁还原能力、亚硝酸盐清除能力呈显著正相关($P < 0.05$)。因此,石韦提取物中,石韦正丁醇提取物具有较强的体外抗氧化和抑制亚硝化活性,总酚、总黄酮是其发挥作用的物质基础。石韦正丁醇提取物可用于天然抗氧化剂开发,同时极有可能是一种新的防癌抗癌天然保健品。提示应以ABTS

自由基清除和亚硝胺合成阻断能力为活性指标对石韦正丁醇提取物中的总酚和总黄酮进一步分离纯化,明确活性物质基础,并对抗氧化和抑制亚硝化活性成分的构效关系、作用机制、以及活性成分间的协同或拮抗作用等方面开展系统性研究,将有助于阐明石韦药用科学内涵,为开发石韦作为防癌抗癌保健食品和天然抗氧化剂提供参考。

参考文献

- 1 Labat-Robert J, Robert L. Longevity and aging: role of free radicals and xanthine oxidase. *Pathol Biol*, 2014, 62(2):61-66.
- 2 Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease; implications for health[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2015, 45:765-98.
- 3 Jurado-Sanchez B, Ballesteros E, Gallego M. Automatic screening method for the preconcentration and determination of n-nitrosamines in water[J]. *Talanta*, 2007, 73:498-504.
- 4 Ye M, Shao YP. Free radicals scavenging and nitrosation inhibition activities of total flavonoids from *Crotalariaf erruginea* Grah[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:667-671.
- 5 Wang XB, Cai YB, Liang XH, et al. The effect of vegetable polyphenols on anti-oxidation and inhibition of nitrosation[J]. *Mod Prevent Med*(现代预防医学), 2013, 40:3927-3929.
- 6 Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典中国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:90.
- 7 Mao K, Xia XZ, Zhang H, et al. Research on pharmacological action and clinical application of *Pyrrhosia* [J]. *J Yangtze Univ: Nat Sci*(长江大学学报:自科版), 2014, 11:110-113.
- 8 Zhang YF, Li YY, An XX, et al. The antiviral flavonoids and effective chemical components in *Pyrrhosia lingua*. *J Jinan*

- Univ; Nat Sci & Med) (暨南大学学报: 自然科学与医学版), 2018, 39: 470-480.
- 9 Hsu CY. Antioxidant activity of *Pyrrosia petiolosa* [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(1): 64-66.
 - 10 Kim MB, Park JS, Lim SB. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea [J]. *Food Chem*, 2010, 122: 546-552.
 - 11 Ding WH, Chong PP, Shao W, et al. Antioxidant activity of extracts of ethanol in *Pyrrosia petiolosa* [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 2016, 45(1): 13-16.
 - 12 Li J, Ma XX, Li SX, et al. Determination of total phenols in *Dendrobii officinalis* Caulis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(24): 60-62.
 - 13 Lian MN, Zhu YH, Xu CL, et al. Contents of total polyphenols and flavonoids from alpine plants from Qilianshan Mountains and their antioxidant activity [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin* (西北植物学报), 2012, 32: 2492-2497.
 - 14 Zhang SY, Zhuang YB, Luo LK, et al. Antioxidant and inhibitory effect on nitrosation of extracts from *Balanophora harlandii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 2081-2086.
 - 15 Huang Y, Chen HG, Zhou X, et al. Determination of total polyphenols and evaluation of antioxidant activities of *Sambucus chinensis* Lindl. in Guizhou [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 255-263.
 - 16 Li PY, Lu RM, Su W, et al. Total flavonoid content and antioxidant activity of *Dioscorea futschauensis* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 1303-1304.
 - 17 Wang XB, Li JF, Wang M, et al. The flavonoids antioxidant and inhibition effect of nitrosation from mangosteen shell [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2013, 34(6): 9-13.
 - 18 Zhong XQ, Liang SS, Cai QC, et al. Effect of tea infusions on inhibition of nitrosification [J]. *Food Sci Tech J* (食品科技), 2014, 39(3): 45-48.
 - 19 Chen LJ, Ma YJ, Li YP, et al. Advance on the chemical and pharmacological studies on plants of *Pyrrosia* genus [J]. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 5786-5787.
 - 20 Mizuno M, Iinuma M, Imai T, et al. The chemical constituents of *Pyrrosia lingua* [J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报: 英文版), 1986, 28: 339-340.

(上接第 658 页)

- 12 Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Circ Res*, 2009, 104: 952-960.
- 13 Fang L, Green SR, Baek JS, et al. *In vivo* visualization and attenuation of oxidized lipid accumulation in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Clin Invest*, 2011, 121: 4861-4869.
- 14 Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: an important tool for liver disease research [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149: 1361-1377.
- 15 Bootorabi F, Manouchehri H, Changizi R, et al. Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1550.
- 16 Wang C, Dai XY, Gong LH, et al. Effects of emodin on lipid metabolism in zebrafish with hyperlipidemia [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2019, 31: 1873-1879.
- 17 Parente V, Balasso S, Pompilio G, et al. Hypoxia/reoxygenation cardiac injury and regeneration in zebrafish adult heart [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e53748.
- 18 Heo KS, Fujiwara K, Abe J. Shear stress and atherosclerosis [J]. *Mol Cells*, 2014, 37: 435-440.
- 19 Baeyens N. Fluid shear stress sensing in vascular homeostasis and remodeling: towards the development of innovative pharmacological approaches to treat vascular dysfunction [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 158: 185-191.
- 20 Lee SJ, Choi W, Seo E, et al. Association of early atherosclerosis with vascular wall shear stress in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0142945.
- 21 Mao JM, Wan ZF, Wen XM, et al. Research progress on the role of neutrophils in the occurrence and development of atherosclerosis [J]. *Shandong Med J* (山东医药). 2018, 58: 108-110.
- 22 Perrotta I, Aquila S. The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 130315.
- 23 Yu XH, Zhang DW, Zheng XL, et al. Cholesterol transport system: an integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 73: 65-91.