

萝卜清除 DPPH 自由基活性研究

段艳波, 蒋福宇, 高品一, 刘学贵* (沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁沈阳 110142)

摘要 [目的]研究萝卜清除 DPPH 自由基的活性。[方法]通过对萝卜叶水提取物、水提取物不同极性部位萃取物、萝卜中脂肪油类有效成分 β -谷甾醇进行清除 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基活性测试,对萝卜的抗氧化能力进行评价。[结果]以柠檬酸为对照其清除能力大小顺序为:乙酸乙酯层 > 二氯甲烷层 > 萝卜叶水提取物 > β -谷甾醇 > 石油醚层 > 柠檬酸。[结论]萝卜具有较好的抗氧化能力。
关键词 萝卜叶水提取物;不同极性部位萃取物; β -谷甾醇;DPPH 自由基
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)19-06155-02

Research on DPPH Free Radical Scavenging Activity of Radish

DUAN Yan-bo, LIU Xue-gui et al (College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142)

Abstract [Objective] To study DPPH free radical scavenging activity of radish. [Method] This paper clears testing DPPH (1,1-diphenyl-3-nitrophenylhydrazine) free radical scavenging activity of the different polarities of water extracts from Radish leaves and the compound of β -sitosterol by isolating from radish. [Result] Using citric acid as standard, the order of the scavenging ability is ethyl acetate layer > dichloromethane layer > radish leaf extract > sitosterol > petroleum ether layer > citric acid. [Conclusion] Radish has a good antioxidant capacity.

Key words Radish leaf extract; Different polar parts; β -sitosterol; DPPH free radical scavenging

萝卜(*Raphanus sativus* L.)又名菜菔、芦菔、菜头、雹突等,为十字花科萝卜属(*Raphanus*)1年或2年生的草本植物,在我国具有悠久的食品和药品的使用历史^[1]。据国内外文献报道,萝卜中的化学成分主要有生物碱、黄酮、三萜皂苷、脂肪油、挥发油、硫代葡萄糖苷、有机酸和多糖等^[2-3]。萝卜成熟的种子、根、叶中的有效成分均有很好的药用价值。研究显示,萝卜具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗癌、降压、止咳化痰、止血、利尿和增加小肠的蠕动等药理作用^[4-12]。萝卜的产量大、种植栽培技术成熟,且容易贮存,是具有广泛应用价值的药食两用植物。

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基是合成的一种稳定的氮中心的自由基,主要由于其3个苯环的共轭稳定作用及空间障碍,导致氮原子电子不能与电子成对。清除 DPPH 自由基试验的原理为清除剂和 DPPH 自由基孤对电子配对,使紫色消失变为黄色,在紫外 517 nm 波长处测得的吸光度变小,清除剂的清除能力越强吸光度越小(图 1)。因为其结构简单并且容易控制反应,所以清除 DPPH 自由基是现今抗氧化活性评价和筛选应用最广泛的方法之一^[13-15]。笔者以柠檬酸为对照品,对萝卜叶水提取物、水提取物不同极性部位萃取物、萝卜中脂肪油类的有效成分 β -谷甾醇进行清除 DPPH 自由基活性研究,对萝卜的抗氧化能力进行评价,以期为萝卜抗氧化活性成分的跟踪分离研究提供试验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 研究对象。白萝卜叶,产地辽宁省沈阳市,经鉴定为萝卜(*Raphanus sativus* L.)的新鲜叶。

1.1.2 主要仪器。RE-5205 旋转蒸发器,购自上海亚荣有

限公司;TD5102 电子天平,购自余姚市金诺天平仪器有限公司;GZX-D(III)循环式真空水泵,购自巩义市予华仪器有限责任公司;UV-3 系列紫外可见分光光度计,购自上海光谱达仪器有限公司;HZC 超声波清洗器,购自福州志科学仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),购自 TCI 公司;柠檬酸,购自天津是永大化学试剂有限公司;抗坏血酸,购自中国国药化学试剂公司;其他试剂均为分析纯,购自中国国药化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 总提取物及其不同极性部位萃取物的制备。将采集的萝卜叶晾干,取干燥的萝卜叶放入水浴锅中,在 20 °C 条件下水浴提取 18 h,提取完毕,过滤,收集滤液。取滤液 500 ml,分别用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯 1 000 ml,萃取 3 次,萃取完毕,旋蒸,挥干,制得,3 个极性部位萃取物的浸膏,待用^[16]。

1.2.2 DPPH 自由基储备液的配置。准确称取 DPPH 粉末置于 15 ml EP 管中,量取 10 ml 无水乙醇加入 EP 管中配置得到 2 mmol/L 的 DPPH 储备液。取 1 ml 储备液加 9 ml 无水乙醇置于 15 ml EP 管得到 0.2 mmol/L 的 DPPH 待用。

1.2.3 样品储备液及其浓度梯度的配置。准确称取样品粉末(石油醚组分、二氯甲烷组分、乙酸乙酯组分、萝卜叶水提取物、 β -谷甾醇、柠檬酸)5 mg 置于 15 ml EP 管中,量取 10 ml 浓度 70% 无水乙醇加入 EP 管中,配置得到 0.5 mg/ml 的样品储备液;再用浓度 70% 无水乙醇将 7 种样品储备液分别稀释至质量浓度梯度为 1.0、5.0、10.0、20.0、30.0 和 40.0 μ g/ml,得到试验样品。

1.2.4 DPPH 自由基最大波长的确定。对 0.2 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液在 350 ~ 800 nm 范围进行波长扫描^[17-18],考察最佳测定波长。

1.2.5 DPPH 自由基稳定性试验。用 0.2 mmol/L 的 DPPH

作者简介 段艳波(1991-),男,内蒙古赤峰人,本科,专业:天然药物化学。*通讯作者,副教授,博士,从事天然产物及其衍生物的活性和制备工艺研究。

收稿日期 2014-06-06

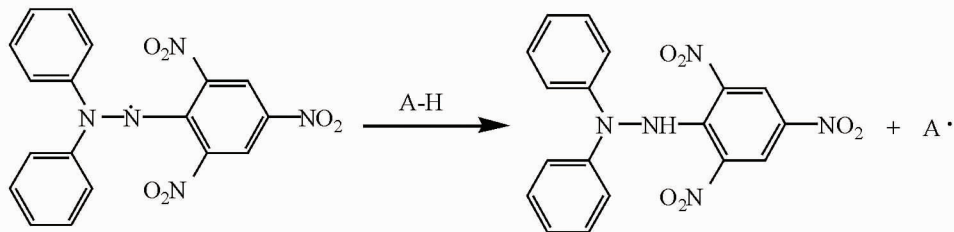


图1 DPPH 自由基结构及作用原理

自由基溶液与 0.04 mmol/L 的抗坏血酸混合,在波长 517 nm 处监测其吸光度,每隔 2 min 记录 1 次,建立吸光度(Y)与时间(X)的关系。

1.2.6 清除 DPPH 自由基试验。配置萝卜叶不同极性段样品质量浓度梯度(1.0、5.0、10.0、20.0、30.0 和 40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 0.2 mmol/L 的 DPPH。样品组:用移液枪准确移取 100 μl 的 DPPH 和 100 μl 不同浓度梯度的样品置于 96 孔板孔中,避光反应 40 min,在 517 nm 下测其吸光度值为 A_i 。样品本底组:准确移取 100 μl 的样品和 100 μl 的无水乙醇,其吸光度值为 A_j ;空白对照组:准确移取 100 μl 的 DPPH 和 100 μl 的无水乙醇,其吸光度值 A_c 。每组进行 3 次平行试验。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = \left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right] \times 100\%$$

根据不同浓度梯度的样品对 DPPH 自由基的清除率,绘制 6 种不同样品对 DPPH 自由基的清除率曲线,并对各曲线进行线性拟合,得到 6 种不同样品的 IC_{50} 值^[20]。

2 结果与分析

2.1 DPPH 自由基最大波长的确定 结果显示,DPPH 自由基约在 517 nm 处有最大吸收峰。

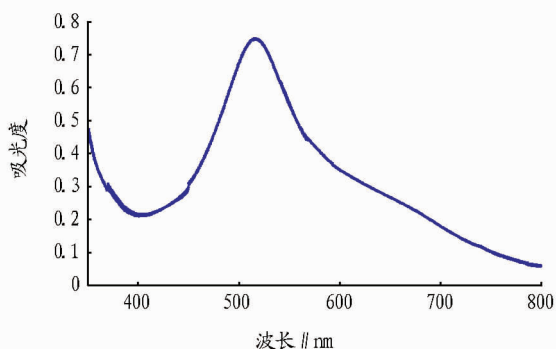


图2 0.2 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液全波长扫描结果

2.2 DPPH 自由基稳定性试验 图 3 表明,0~2 min 随时间变化吸光度呈线性迅速下降;2~35 min 后变化很小,吸光度趋近于稳定状态,35 min 后吸光度基本无变化。因此,由 DPPH 自由基稳定性试验可以确定,为了提高清除 DPPH 自由基测试精确性,在加入样品反应 35~40 min 后测量反应物吸光度^[19]。

2.3 样品的 DPPH 自由基清除曲线 图 4 表明,各样品对 DPPH 的清除率接近指数关系,在样品浓度梯度较低时清除率随着浓度增加近似为线性关系,而浓度较大时清除率趋于稳定。在近似线性范围内,根据质量浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)X,清除率

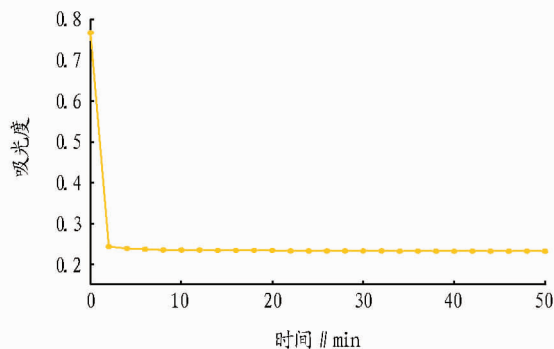


图3 DPPH 自由基稳定性试验

(%)Y 的关系对各曲线进行线性拟合^[21]。

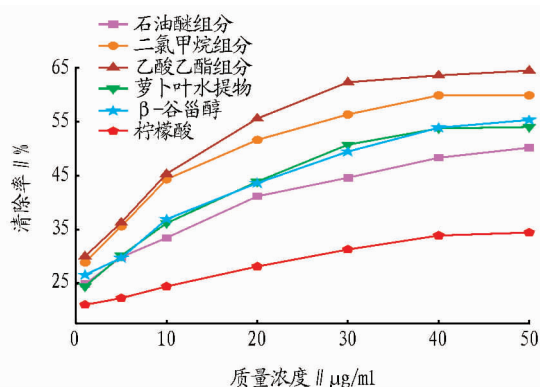


图4 6种样品对 DPPH 自由基的清除曲线

2.4 样品清除 DPPH 自由基的能力确定 根据 6 种样品的清除曲线,确定各样品的 IC_{50} 值(见表 1)^[22]。结合图 4 和表 1 可以确定,6 种样品的清除能力的大小顺序为:乙酸乙酯层 > 二氯甲烷层 > 萝卜叶水提取物 > β -谷甾醇 > 石油醚层 > 柠檬酸。

表1 6种样品的线性方程、线性范围、 R^2 及 IC_{50} 值

样品	样品名称	线性方程	线性范围		R^2	IC_{50} 值
			$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$		
1	石油醚组分	$Y=0.5069X+27.6001$	1~50	0.9274	48.6	
2	二氯甲烷组分	$Y=0.7633X+32.5873$	1~40	0.8936	18.0	
3	乙酸乙酯组分	$Y=1.1100X+31.2337$	1~30	0.9546	14.6	
4	萝卜叶水提取物	$Y=0.7469X+26.6388$	1~40	0.9465	28.9	
5	β -谷甾醇	$Y=0.6031X+28.7442$	1~50	0.9322	31.4	
6	柠檬酸	$Y=0.3365X+20.8885$	1~40	0.9962	-	

3 结论

试验以 DPPH 自由基最大波长的确定试验、DPPH 自由基稳定性考察为基础,对萝卜叶水提取物、水提取物的不同极

kg/hm²叶面喷施偏迟且繁茂性较好的亲本;尿素 60~120 kg/hm²根施偏早且长势瘦弱的亲本;调花宝 60~90 g/hm²叶面喷施幼穗分化已达到V期以后的偏迟亲本。花期调节原则为:以微调多次为主;以调节父本为主,调节母本为辅;多种措施相结合,避免使用喷施多效唑和割叶、割兜等措施。

2.7 全程去杂,时时监控防治病虫害 去杂是优质制种的一个重要环节,贯穿整个制种周期。秧田期去杂效率最高,可以去除父母本中的异色株和明显的异型株;大田营养生长期主要根据株叶形态差异进行去杂;抽穗扬花期主要根据子粒的型、色和花粉育性进行去杂,此期间是去除母本中可育株的关键时期,也是整个去杂工作的重中之重。

虫害防治与大田生产相近,秧田期主要防治稻蓟马、蚜虫;大田营养生长期主要防治各类螟虫;抽穗期至成熟期主要防治稻纵卷叶螟、稻飞虱等。病害主要通过田间肥水管理和优化栽培技术进行预防,不采取化学措施防治。

2.8 科学喷施“九二〇”,改良异交形态 国香 8A 包颈程度与肥力相关,对“九二〇”喷施时间非常敏感,对剂量相对不敏感。因此,把握喷施时机是关键。中等肥力条件下,国香 8A 的平均包颈度为 30% 左右。抽穗及破口率达 10% 时,开始喷施“九二〇”(质量比为 4% 的乙醇水溶液),用量为 60 g/hm²,次日增加到 90 g/hm²,第 3 天根据抽穗情况确定用量:若抽穗及破口率达到 60% 以上,则将剂量增加到 180 g/hm²,次日再喷施 90 g/hm²;若未达到 60%,则继续喷施 90 g/hm²。父本“九二〇”总用量为 90~180 g/hm²,主要目的是保持一定的高度优势,利于授粉,其次是解决因高肥力条件下可能存在的一定包颈现象。“九二〇”使用的首要原则是控制母本高度,宁迟勿早。发育完全成熟的颖花和颖壳也是

达到优质制种的重要条件。

2.9 人工辅助授粉,择晴收获,防止混杂 水稻是自花授粉作物,所以做好人工辅助授粉是取得制种高产的关键。目前流行的人工辅助授粉方式为气动喷雾器吹风授粉,此方法操作简便,效率高,效果好。辅助授粉时间为 11:00~14:00,阴天适当推迟。坚持有粉必授的原则。授粉结束后随时查看种子成熟度,90% 以上黄熟时便可收获。收获过程中要严格操作,避免机械混杂。

3 讨论

(1) 笔者通过 10 多年水稻制种实践总结认为,杂交水稻制种应该兼顾高产与优质^[1-5]。所谓优质制种主要包含两方面内容:①种子纯度高;②种子成熟度一致。做好优质制种主要在于以下几个重要环节:①搞好去杂工作;②培育均匀一致的群体结构;③严格控制无效分蘖,缩短母本群体花期;④科学使用“九二〇”;⑤防止倒伏与穗萌。

(2) 杂交水稻制种种子的品质与产量同等重要,而目前很多种子企业往往重视产量而忽视质量。优质制种不仅可以提高品种产量和品质,而且有助于打造公司品牌优势,扩大行业影响力。因此,重视优质制种具有一定的现实意义。

参考文献

- [1] 汤楚宙,王慧敏,李明,等. 杂交水稻制种机械授粉研究现状及发展对策[J]. 农业工程学报,2012(4):1-7.
- [2] 雷东阳,陈立云. 我国杂交水稻制种的回顾与展望[J]. 作物研究,2006(5):367-370.
- [3] 易若虎,呼格吉乐图,陈詹,等. 两系法杂交水稻制种技术研究进展[J]. 作物研究,2008(S1):386-389.
- [4] 顾海永,李传国,梁世胡,等. 杂交水稻制种几种花期调节方法的综合比较[J]. 广东农业科学,2009(1):19-21.
- [5] 刘文炳,郝旋,林琼,等. 谈三系杂交水稻超高产制种配套组装技术[J]. 中国稻米,2010(5):54-58.
- [6] 郑一美,周福富. 莱菔叶的药效应用及有效成分的提取分离研究[J]. 亚太传统医药,2008,4(11):49-50.
- [7] 李东华,叶春苗. 萝卜籽中活性成分提取及抑菌效果的研究[J]. 沈阳化工大学学报,2013,27(1):25-26.
- [8] 修丽丽,钮昆亮. 十字花科植物中的硫代葡萄糖苷及其降解产物[J]. 浙江科技学院学报,2004,16(3):187-188.
- [9] 赵功玲,梁新红,杨淑媛,等. 萝卜籽油对大豆油和花生油的抗氧化作用[J]. 中国油脂,2012,37(9):54-56.
- [10] 余跃东,郁建平. 萝卜籽油成分研究[J]. 食品科学,2005,26(8):331-332.
- [11] 熊双丽,卢飞,史敏娟,等. DPPH 自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(8):380-381.
- [12] 韦龙宾,陈从瑾,朱栗琼,等. 马鞭草科一些植物鲜叶提取物清除 DPPH 自由基活性的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(20):6011-6012.
- [13] 谭福新,叶涛,刘湘新,等. 植物提取物抗氧化成分及机理研究进展[J]. 食品科学,2010,31(15):288-289.
- [14] 郭志琴,吕海宁,陈巧莲,等. 野坝子体外清除自由基活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):180-181.
- [15] 卢台雯,李晓芬,项朋志,等. 没食子酸清除 DPPH 自由基的紫外-可见吸收光谱研究[J]. 食品工业科技,2014,35(2):124-125.
- [16] 陈从瑾,黄克瀛,孙崇鲁. 白英果提取物清除 DPPH 自由基活性研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(10):45-46.
- [17] 贺晓华,许龙,谈满良,等. 不同提取方法赶黄草提取物清除 DPPH 自由基的作用研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1924-1925.
- [18] 赵爽,严铭铭,赵大庆,等. 小飞蓬总黄酮提取工艺优选及体外抗氧化活性研究[J]. 中成药,2011,33(2):350.
- [19] 郑德勇,安鑫南. 竹叶提取物清除 DPPH 自由基的测定方法[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(1):60-62.
- [20] 皮子凤,侯广月,艾军,等. 化学计量学方法研究北五味子中木脂素含量与抗氧化活性的相关性[J]. 中国中药杂志,2012,7(8):1133-1135.

(上接第 6156 页)

性部位萃取物、萝卜中的脂肪油类化合物 β-谷甾醇进行 DP-PH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基清除能力试验。结果表明,在乙醇体系、波长 517 nm 的条件下,测定 6 种样品清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值,判断其清除 DPPH 自由的活性大小顺序为:乙酸乙酯层 > 二氯甲烷层 > 萝卜叶水提物 > β-谷甾醇 > 石油醚层 > 柠檬酸。由此得出结论,萝卜具有较好的抗氧化能力。同时,对萝卜抗氧化活性成分的跟踪分离提供试验依据。

参考文献

- [1] 汪隆植,何启伟. 中国萝卜[M]. 北京:科学技术文献出版社,2005:1-6.
- [2] 段礼新,蔡光明,陈芳,等. 莱菔的研究进展[J]. 解放军药学报,2007,23(3):204-206.
- [3] 赵功玲,郝睿,由宏,等. 八种萝卜籽油的组成与抗氧化活性[J]. 中国油脂,2011,36(12):73-76.
- [4] 谭鹏,姜虹玉,吕文海. 莱菔子研究概况[J]. 实用中医药杂志,2005,21(4):254-257.
- [5] 陈素美,徐江雁. 中药莱菔子药理及临床应用研究回顾[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3117-3118.
- [6] 张旭,马波,杜钢军,等. 白萝卜提取物对小鼠胃排空、肠推进及家兔离体回肠平滑肌的影响[J]. 河南大学学报:医学版,2011,30(1):36-38.
- [7] NAKAMURA Y, NAKAMURA K, ASAI Y, et al. Comparison of the Glucosinolate-Myrosinase Systems among Daikon (*Raphanus sativus*, Japanese White Radish) Varieties [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(8):2702-2707.