

蒙自蹄盖蕨醇提物的不同萃取物的 抗氧化、降血糖及抗炎活性

李红锐¹,孙静贤¹,蒋孟圆¹,王 韦¹,刘宏程²,邵金良²,普晓云¹,李育逵¹,黄相中^{1,*}

(1.云南民族大学民族医药学院,民族药资源化学国家民族

事务委员会-教育部重点实验室,云南昆明 650500;

2.农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明),云南昆明 650223)

摘 要:为探究蒙自蹄盖蕨醇提物的不同萃取物的抗氧化、降血糖及抗炎活性,采用 95% 乙醇回流提取蒙自蹄盖蕨制备提取物,并以有机溶剂萃取法进行纯化,得石油醚部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水相,采用 Folin-Ciocalteu 法分别测定其多酚含量,通过 DPPH 法、ABTS 法、 α -葡萄糖苷酶抑制活性和脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症模型评价蒙自蹄盖蕨各萃取物的体外抗氧化、降血糖和抗炎活性。结果显示,蒙自蹄盖蕨醇提物中多酚含量丰富,经萃取分段后乙酸乙酯萃取物中多酚含量最高,可达 (258.6 ± 1.7) mg/g。蒙自蹄盖蕨醇提物及其各萃取物均对 DPPH、ABTS 自由基表现出不同程度的清除活性,其中乙酸乙酯萃取物清除自由基的能力最强,同时该萃取物对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制活性,IC₅₀ 为 (93.4 ± 3.7) μ g/mL,其作用强度与阳性对照阿卡波糖相当。石油醚萃取物显示出良好的抗炎活性,在 12.5~50.0 μ g/mL 浓度范围内均能极显著降低脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞释放一氧化氮的水平($p < 0.01$),且对细胞的正常增殖无明显影响。

关键词:蒙自蹄盖蕨,抗氧化活性,降血糖活性,抗炎活性

Antioxidant, Hypoglycemic and Anti-inflammatory Activities of Different Parts Partitioned from the Ethanol Extracts of *Athyrium Mengtzeense* Hieron

LI Hong-rui¹, SUN Jing-xian¹, JIANG Meng-yuan¹, WANG Wei¹, LIU Hong-cheng²,
SHAO Jin-liang², PU Xiao-yun¹, LI Yu-kui¹, HUANG Xiang-zhong^{1,*}

(1.Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission
and Ministry of Education, School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China;

2.Supervision & Testing Center for Farm Product Quality, Ministry of Agriculture (Kunming), Kunming 650223, China)

Abstract: *Athyrium mengtzeense* Hieron were extracted by ethanol, and then partitioned by system solvents with petroleum ether, ethyl acetate, butanol and water to afford four different fractions and their total phenolics content were analyzed by Folin-Ciocalteu method. In addition, radicals scavenging (DPPH and ABTS), α -glucosidase inhibitory, lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells assays were carried out to evaluate their antioxidant, hypoglycemic and anti-inflammatory activities. The results showed that the ethyl acetate fraction had the highest total polyphenols contents ((258.6 ± 1.7) mg/g) and all the extracts from *Athyrium mengtzeense* possessed scavenging capacities for both DPPH and ABTS radicals in different degree, the ethyl acetate fraction was in the highest degree, this fraction also showed an equally α -glucosidase inhibitory activity, whose IC₅₀ was (93.4 ± 3.7) μ g/mL as that of positive control (acarbose). The petroleum ether fraction (12.5~50.0 μ g/mL) displayed a significant inhibitory effect on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells, but no obvious effect on cell proliferation.

Key words: *Athyrium mengtzeense* Hieron; antioxidation; hypoglycemic activity; anti-inflammatory activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)14-0062-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.14.010

引文格式: 李红锐, 孙静贤, 蒋孟圆, 等. 蒙自蹄盖蕨醇提物的不同萃取物的抗氧化、降血糖及抗炎活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 62-67.

收稿日期: 2018-09-18

作者简介: 李红锐(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: 2261665443@qq.com。

* 通讯作者: 黄相中(1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: xiangzhongh@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460535); 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室(云南民族大学)开放基金项目(2017KF01)。

蒙自蹄盖蕨 (*Athyrium mengtzeense* Hieron) 系蹄盖蕨科 (*Athyriaceae*) 蹄盖蕨属 (*Athyrium*) 植物, 主要分布于云南和四川, 多生长于山间林下或灌木丛中^[1]。药用蹄盖蕨属植物具有清热解毒、利尿消肿、驱虫、止血之功效, 民间用其治疗痢疾、消肿止痛、外伤出血、驱蛔虫、疮毒疖肿及配伍治疗肺癌、淋巴白血病, 蹄盖蕨的提取物可以单独或与抗癌剂配合使用, 对肿瘤生长及肿瘤诱导的血管生成和转移作用具有良好的抑制作用^[2-4]。

鉴于蹄盖蕨属植物具有广泛的生物活性, 吸引了部分学者对该属植物的化学成分及药理活性等方面开展研究工作。刘冬梅等^[5]、钟方丽等^[6]研究发现该属植物的化学成分主要为多酚、单萜、酚酸及甾体类化合物, 其中多酚类化合物含量较高, 且多酚类化合物具有抗氧化、抗炎、降血糖、降血脂、防止动脉硬化、降血压、抑制细菌与癌细胞生长等多种生物活性^[7-8]。然而, 关于蹄盖蕨属植物的研究大多还局限于粗提物的生物活性上, 对粗提物进行初步纯化再评估生物活性的研究较少, 很多药理活性及其目标成分尚不清楚。目前, 未见关于蒙自蹄盖蕨的主要活性成分及其生物活性研究的相关报道, 其食用价值及药用价值仅限于民间经验。

为了明确蒙自蹄盖蕨的食用及药用价值, 本文采用不同极性的溶剂对蒙自蹄盖蕨乙醇提取物进行萃取, 并测定各萃取物的多酚含量。同时, 对各萃取物进行了抗氧化、抗炎及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的测定, 为进一步研究和开发利用该植物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蒙自蹄盖蕨 采自云南省新平县, 经云南大学陆树刚教授鉴定为蹄盖蕨属植物蒙自蹄盖蕨 (*Athyrium mengtzeense* Hieron) 的干燥全草; 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基 (DPPH)、2,2-联氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺) 二氨盐 (ABTS) 梯希爱化成工业发展有限公司; α -葡萄糖苷酶、脂多糖-4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) Sigma 公司; 阿卡波糖 百灵威科技有限公司; RAW264.7 细胞系 中国科学院昆明动物研究所; 一氧化氮检测试剂盒 碧云天生物技术公司; Folin-Ciocalteus 试剂、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、DMSO 试剂 均为国产分析纯。

CY-500A 型高速多功能粉碎机 上海塞耐机械有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司; MS105DU 电子分析天平 云南光琛科技有限公司; 722 可见分光光度计 上海现科分光仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蒙自蹄盖蕨提取物及萃取物制备 取采于6月的蒙自蹄盖蕨在 25℃ 下室内自然风干至恒重, 将其粉碎, 过 40 目筛备用, 称取粗粉 20.0 g 按料液比 1:15 (w:v) 加入 95% 乙醇, 80℃ 水浴加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 抽滤并收集滤液, 45℃ 减压浓缩至乙

醇挥发完全即得蒙自蹄盖蕨乙醇提取物 (AMH)。

采用有机溶剂萃取法对蒙自蹄盖蕨乙醇提取物进行纯化, 即称取 2.0 g AMH 加纯净水稀释至提取物完全溶解, 用等体积的石油醚反复萃取样品至石油醚层无色, 按同样的方法依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取, 得石油醚萃取物 (AMP)、乙酸乙酯萃取物 (AME)、正丁醇萃取物 (AMB) 和水相 (AMW)。

1.2.2 蒙自蹄盖蕨醇提物及其各萃取物中多酚含量的测定

1.2.2.1 测定波长的选择 参照国标法 GB/T 8313-2008《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》^[9] 中的多酚测定方法, 分别配制没食子酸标准液及蒙自蹄盖蕨的各待测样品溶液, 并将其浓度均稀释为 30 $\mu\text{g/mL}$, 采用紫外可见分光光度计于 300~900 nm 波长范围内进行全扫描, 结果显示最佳波长为 760 nm。

1.2.2.2 标准曲线的绘制 准确称取 2.5 mg 干燥的没食子酸标准品, 加纯净水稀释, 配制成浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸标准液。分别取 0.00、0.10、0.20、0.40、0.80、1.20、2.00 mL 没食子酸标准液, 按 1.2.2.1 中的方法, 于 760 nm 处分别测定其吸光度, 经线性拟合得回归方程: $A = 0.0079C + 0.0148$, 决定系数 $R^2 = 0.9961$, 实验表明没食子酸在 0.00~50.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内没食子酸浓度与吸光度呈现出良好的线性关系 (A 为吸光度, C 为没食子酸浓度)。

1.2.2.3 多酚含量的测定 按照 1.2.2.1 的实验方法配制待测样品溶液, 于 760 nm 处测定其吸光度, 以纯净水代替待测样品为空白对照。每组实验平行测定 3 次。蒙自蹄盖蕨各待测样品多酚含量表示为 mg 没食子酸当量/g 蒙自蹄盖蕨粉末质量, 计算公式如下:

$$\text{待测样品多酚含量 } Y = \frac{cV_k}{m}$$

式中: c 为待测样品稀释后的多酚浓度由标准曲线拟合得出 (mg/mL); V 为蒙自蹄盖蕨各待测样品提取液总体积 (mL); K 为待测样品提取液稀释倍数; m 为蒙自蹄盖蕨粉末的质量 (g)。

1.2.3 清除 DPPH 自由基的活性 参照文献 [10-11], 用无水乙醇配制 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液, 取 2.0 mL 不同质量浓度的各待测样品溶液 (浓度分别为 5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$), 加入 2.0 mL DPPH 溶液, 充分摇匀, 室温下避光反应 30 min, 用紫外可见分光光度计于 517 nm 处测定吸光度, 按同样的方法, 测定样品对照组 (A_2) 以无水乙醇代替 DPPH 溶液、空白对照组 (A_0) 以无水乙醇替代待测样品的吸光值。以 V_c 作为阳性对照, 每组实验设置 3 组平行实验。DPPH 自由基清除率计算公式为:

$$\text{清除率 } S(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

式中: A_1 为 2.0 mL 待测样品 + 2.0 mL DPPH 溶液反应后的吸光值; A_2 为 2.0 mL 待测样品 + 2.0 mL 无水乙醇反应后的吸光值; A_0 为 2.0 mL 无水乙醇 + 2.0 mL DPPH 溶液反应后的吸光值。

1.2.4 清除 ABTS 自由基的活性 参照文献 [12-13] 的方法稍作改动, 取 0.2 mL 不同质量浓度

表1 体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性实验反应体系配比情况(μL)Table 1 Proportion of experimental components for inhibiting the α -hypoglycemic activity *in vitro* (μL)

溶液	空白对照组	空白组	样品组	样品对照组
磷酸盐缓冲液	50	50	50	50
α -葡萄糖苷酶溶液	-	20	20	-
底物(pNPG)	-	20	20	-
样品溶液	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
Na_2CO_3 溶液	50	50	50	50

注:“-”代表未添加。

的待测样品溶液(浓度分别为5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与0.8 mL ABTS⁺工作液充分混匀,室温下反应6 min后于734 nm处测定吸光值。以同样的方法测定空白对照组(A_0)和阳性对照的吸光值,以 V_c 为阳性对照,每组实验设置3组平行实验。ABTS自由基清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S(\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 为0.2 mL无水乙醇+0.8 mL ABTS工作液的吸光值; A_s 为0.2 mL不同质量浓度的待测样品溶液+0.8 mL ABTS工作液的吸光值。

1.2.5 抑制 α -葡萄糖苷酶活性的测定 参考文献[14-16]的实验方法稍作改动,具体操作步骤如下:通过96孔板对各待测样品的 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行测定,实验中设置空白组、空白对照组、样品组、样品对照组。样品组:各管分别加入50 μL PBS、10 μL 样品和20 μL α -葡萄糖苷酶溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应5 min后,各管加入底物20 μL ,接着在37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续恒温反应15 min,再加入0.2 mol/L碳酸钠溶液50 μL 终止反应,于紫外可见分光光度计405 nm处测定吸光度值(A),待测样品的浓度范围为12.5~200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每组实验设置3个复孔,总体积为150 μL 。样品对照组:以PBS缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶液和底物;空白组:以PBS缓冲液代替样品溶液;空白对照组:以PBS缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶液和底物;以阿卡波糖作为阳性对照,其他试剂同样品组。具体反应体系配比情况见表1。

$$\text{样品对 } \alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100$$

1.2.6 体外抗炎活性的测定

1.2.6.1 RAW264.7 细胞的培养 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,用含10%小牛血清、青霉素(1×10^5 U/L)及链霉素(100c)的DMEM培养基培养。待RAW264.7细胞生长至对数期后备用。

1.2.6.2 对RAW264.7细胞增殖的影响 参照戴建国等^[17]、黄洋等^[18]的方法,将对数生长期的RAW264.7细胞接种于96孔培养板上,并调整细胞密度为 1×10^5 个/L,每孔体积100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养24 h后,实验组加入50 μL 不同浓度的各萃取物(6.3、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),阳性对照组加入50 μL L-NMMA(浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每个浓度设3个复孔,药物作用4 h后,实验组、阳性对照组和LPS组均加入50 μL 浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS溶液,空白组不加药物。空白对照孔为不接种细胞的

空白孔。培养24 h后,各孔加20 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续培养4 h。弃各孔上清,分别加150 μL DMSO溶液,于室温避光振荡15 min,以酶标仪于波长490 nm处测定OD值。并按公式计算细胞相对增殖率。细胞存活率($\%$)=(实验组光吸收值-空白对照组光吸收值)/(空白组光吸收值-空白对照光吸收值) $\times 100$ 。

1.2.6.3 对LPS刺激的RAW264.7细胞NO分泌量的影响 参照文献[19]报道的方法,取对数期生长的RAW264.7细胞稀释为单细胞悬液,并调整浓度为 1×10^8 个/L,将细胞悬液接种于96孔板上,每孔100 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱环境下培养24 h。实验设置实验组、阳性对照组、LPS组和空白组。实验组:分别加入蒙自蹄盖蕨各萃取物(终浓度分别为6.3、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),各浓度设3个复孔。阳性对照组:以L-NMMA(用药剂量终浓度为10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)代替实验组中的样品。LPS组:加入50 μL 含1% DMSO的培养液,空白组加入100 μL 含1% DMSO的培养液。药物作用后,除空白组其余各组均加入脂多糖(LPS)刺激细胞,每孔50 μL /孔(终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于相同的细胞培养环境下继续培养24 h,分别取各组培养体系的上清,按照试剂盒说明测定NO浓度。具体方法为取70 μL 细胞培养体系上清液,加入50 μL Griess I试剂,充分摇匀10 min后再加入50 μL Griess II,于540 nm波长处测吸光度。绘制标准曲线并比对标准管即可得出细胞培养体系上清液NO含量。

1.3 数据处理

每组实验重复3次,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Excel 2010、Origin 9.0和Graphpad prism 6.0对数据进行处理及统计学分析。

2 结果与分析

2.1 蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物多酚的含量

蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物多酚含量的测定结果如表2所示。实验测得蒙自蹄盖蕨乙醇提取物中多酚含量为(142.8 ± 2.1) mg/g,而乙酸乙酯萃取物中多酚含量可高达(258.6 ± 1.7) mg/g。此前,王晓林等^[20]对同属植物猴腿蹄盖蕨中的多酚含量进行研究,其研究结果表明猴腿蹄盖蕨中的多酚提取率最高可达169.27 mg/g,相比之下,本实验中蒙自蹄盖蕨的多酚提取含量低于猴腿蹄盖蕨,但采用

表2 蒙自蹄盖蕨醇提取物及其各萃取物的多酚含量
Table 2 Total phenols content of different fractions of *A.mengtzeense*

样品名称	AMH	AMP	AME	AMB	AMW
多酚含量(mg/g)	142.8 ± 2.1	21.5 ± 3.6	258.6 ± 1.7	78.3 ± 2.4	34.6 ± 1.3

注:结果表示为平均值 ± 标准偏差, n = 3; 表3~表5同。

不同极性的有机溶剂对提取物进行萃取分段后,蒙自蹄盖蕨的乙酸乙酯萃取物中多酚含量则远远高于猴腿蹄盖蕨粗提取物中的多酚含量。蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物中多酚含量依次为 AME > AMH > AMB > AMW > AMP。蒙自蹄盖蕨中多酚集中分布于乙酸乙酯萃取部分,小极性的多酚所占比例较少,采用不同极性的有机溶剂对乙醇提取物进行萃取分段,可实现初步富集和分离蒙自蹄盖蕨中多酚的目的。

2.2 清除 DPPH 自由基活性的测定

蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物清除 DPPH 自由基活性测定结果见图1。蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物均对 DPPH 自由基显示出不同程度的清除活性。当浓度低于 60 μg/mL 时,随着待测样品浓度增加,其对 DPPH 自由基的清除活性也随之增强,当浓度超过 60 μg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率逐渐趋于平缓。其中,AME 清除 DPPH 自由基的活性最强,且与阳性对照维生素 C 相当(IC₅₀值分别为 12.3 和 11.6 μg/mL),AMH 和 AMB 对 DPPH 自由基的清除活性次之(IC₅₀值分别为 13.7 和 38.2 μg/mL),相同浓度下 AMW 和 AMP 对 DPPH 自由基的清除作用远远弱于 AME。蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物对 DPPH 自由基清除作用的大小依次为 AME > AMH > AMB > AMW > AMP,实验结果提示蒙自蹄盖蕨具有抗氧化活性的成分主要集中于乙酸乙酯萃取部分,通过萃取可以实现富集活性成分的目的。

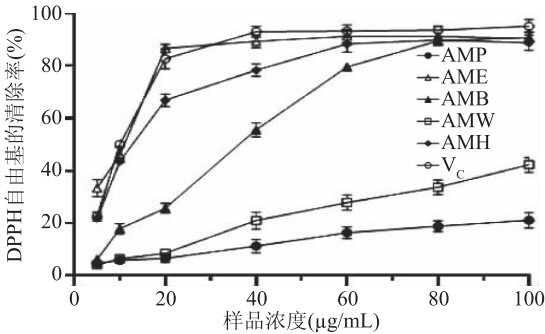


图1 蒙自蹄盖蕨醇提取物及其各萃取物对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 DPPH radical scavenging activities of the parts partitioned from the ethanol extraction from *A.mengtzeense*

2.3 清除 ABTS 自由基活性的测定

蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物对 ABTS 自由基均表现出不同程度的清除作用,实验结果如图2所示。在实验浓度范围内,AME 清除 ABTS 自由基的活性最强;当浓度为 100 μg/mL 时,AME 对 ABTS 自由基的清除率可高达 93.2%,其清除作用与阳性对照维生素 C 相当,强于同浓度的 AMH 和 AMB

对自由基的清除活性(清除率分别为 89.6% 和 89.1%),且明显强于相同浓度下 AMW 和 AMP 对 ABTS 自由基的清除活性(清除率分别为 43.5% 和 19.5%);蒙自蹄盖蕨醇提取物及其各萃取物对 ABTS 自由基清除作用的大小依次为 AME > AMH > AMB > AMW > AMP,AME、AMH 和 AMB 的 IC₅₀ 值分别为 12.4、26.7 和 32.3 μg/mL,在实验浓度范围内 AMW 和 AMP 对自由基的清除作用较弱,未能通过 Origin 9.0 程序拟合得出 IC₅₀ 值。进一步提示蒙自蹄盖蕨具有抗氧化活性的成分主要集中于乙酸乙酯萃取部分,通过萃取可以实现定向分离。

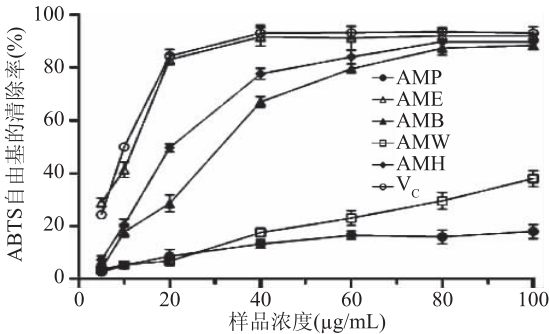


图2 蒙自蹄盖蕨醇提取物及其各萃取物对 ABTS 自由基的清除率

Fig.2 ABTS radical scavenging activities of the parts partitioned from the ethanol extraction from *A.mengtzeense*

关于蹄盖蕨属植物中多酚类化合物的研究还不十分清楚,Ueno^[21]和 Tadataka 等^[22]分别从蹄盖蕨属植物 *Athyrium mesosorum* 中分离得到降蹄盖蕨素(Norathyriol)、芒果苷(Mangiferin)、蹄盖蕨素(Athyriol)等多种酚类化合物,并对其中的降蹄盖蕨素、芒果苷、蹄盖蕨素、异蹄盖蕨素等天然成分进行了抗氧化活性测试,结果发现降蹄盖蕨素的抗氧化活性最强。刘冬梅等^[5]从猴腿蹄盖蕨的根茎中分离得到原儿茶酸甲酯和原儿茶酸两个化合物,并采用铁氰化钾还原法测定这两个化合物的还原能力,实验结果显示两种化合物均有较强的还原能力,其中原儿茶酸的还原能力强于原儿茶酸甲酯。孙志恒^[23]采用 DPPH 法探究猴腿蹄盖蕨的抗氧化活性时发现猴腿蹄盖蕨(鲜)提取物的抗氧化活性明显优于猴腿蹄盖蕨(干)的抗氧化活性(IC₅₀值分别为 17.46 和 42.37 μg/mL),而本实验中蒙自蹄盖蕨的乙醇提取物及其乙酸乙酯萃取物对 DPPH 自由基的清除活性均比同属植物猴腿蹄盖蕨强,综合 DPPH 法和 ABTS 法的抗氧化评价结果可知,蒙自蹄盖蕨抗氧化活性显著,有待更深入的开发和研究。

2.4 体外抑制 α-葡萄糖苷酶活性的测定

α-葡萄糖苷酶抑制剂能竞争性抑制位于小肠的各种 α-葡萄糖苷酶,从而降低淀粉分解为葡萄糖的

表3 蒙自蹄盖蕨醇提物及其各萃取物在体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性Table 3 α -Glucosidase inhibitory activity of the parts partitioned from the ethanol extraction from *A.mengtzeense*

样品名称	AMH	AMP	AME	AMB	Acarbose
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	180.8 $\pm$ 2.6	>200	93.4 $\pm$ 3.7	158.1 $\pm$ 3.2	105.4 $\pm$ 7.8

表4 蒙自蹄盖蕨各萃取物对 RAW264.7 细胞存活率

Table 4 The parts partitioned from the ethanol extraction from *A.mengtzeense* on cell livability in RAW264.7

组别	细胞存活率(%)			
	AMP	AME	AMB	
空白组	101.0 $\pm$ 4.8			
LPS 组	135.7 $\pm$ 2.3			
L-NMMA	98.7 $\pm$ 3.6			
6.3 $\mu\text{g/mL}$	130.4 $\pm$ 1.2	123.8 $\pm$ 1.3	114.1 $\pm$ 1.8	
12.5 $\mu\text{g/mL}$	133.3 $\pm$ 0.9	123 $\pm$ 1.4	111.0 $\pm$ 1.5	
25.0 $\mu\text{g/mL}$	143.4 $\pm$ 0.7	127 $\pm$ 2.3	100.4 $\pm$ 2.3	
50.0 $\mu\text{g/mL}$	101.8 $\pm$ 2.3	122.6 $\pm$ 1.6	103.3 $\pm$ 2.0	
100.0 $\mu\text{g/mL}$	48.3 $\pm$ 1.8	101.4 $\pm$ 1.2	105.1 $\pm$ 1.9	

表5 蒙自蹄盖蕨各萃取物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

Table 5 The effect of the parts partitioned from the ethanol extraction from *A.mengtzeense* on secretion of NO in RAW264.7

组别	各萃取物的样品浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	-	6.3	12.5	25.0	50.0	100.0
空白组	5.03 $\pm$ 0.45					
LPS 组	16.13 $\pm$ 0.72 ^{##}					
阳性对照组	1.17 $\pm$ 0.46 ^{**}					
LPS + AMP		15.21 $\pm$ 1.02	14.03 $\pm$ 0.72 [*]	12.75 $\pm$ 1.13 [*]	9.67 $\pm$ 0.85 ^{**}	7.67 $\pm$ 1.82 ^{**}
LPS + AME		15.32 $\pm$ 0.88	15.34 $\pm$ 0.97	13.37 $\pm$ 0.76 [*]	12.33 $\pm$ 1.02 [*]	9.35 $\pm$ 0.54 ^{**}
LPS + AMB		15.42 $\pm$ 1.27	15.29 $\pm$ 1.12	13.72 $\pm$ 0.67	12.07 $\pm$ 1.20 [*]	11.04 $\pm$ 0.60 ^{**}

注:与空白对照比较,##代表 $p < 0.01$;与模型组比较,**和*分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.05$ 。

速度,进而减缓肠道对葡萄糖的吸收,达到降血糖的目的^[15]。本实验通过测定蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,进而评估其降血糖活性。实验结果如表3所示,在本实验选定的浓度范围内,未检测到AMP对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用(IC₅₀ > 200 $\mu\text{g/mL}$)。AMH、AMB对 α -葡萄糖苷酶活性具有一定的抑制作用,而AME[IC₅₀ = (93.4 $\pm$ 3.7) $\mu\text{g/mL}$]能明显地抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,其抑制作用与阳性对照阿卡波糖相近。

2.5 体外抗炎活性的测定

2.5.1 蒙自蹄盖蕨各萃取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 由表4可以看出,在实验过程中阳性对照组(L-NMMA浓度为20 $\mu\text{g/mL}$)、LPS组(2 $\mu\text{g/mL}$)和空白组对RAW264.7细胞的活力均没有影响。样品组中经浓度为6.3~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的蒙自蹄盖蕨各萃取物处理后的RAW264.7细胞存活率与空白组相比未出现下降趋势,在此浓度范围内蒙自蹄盖蕨各萃取物对RAW264.7细胞的正常增殖没有明显影响,但是,当样品浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时,经AMP样品作用后的RAW264.7细胞活力受到影响,细胞存活率约为空白组的一半,而样品AME和AMB在该浓度下对细胞增殖仍没有明显影响。

2.5.2 蒙自蹄盖蕨各萃取物对 LPS 刺激的 RAW264.7

细胞 NO 分泌量的影响 采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞系建立体外炎症模型评价蒙自蹄盖蕨各萃取物的抗炎活性。由表5可知,模型组LPS刺激的RAW264.7细胞分泌了大量NO,与空白对照组相比差异具有统计学意义($p < 0.01$)。LPS刺激的RAW264.7细胞经蒙自蹄盖蕨各萃取物干预后,NO的释放量均有不同程度的降低,且具有浓度依赖性。实验结果表明,在实验浓度范围内,AMP(12.5~100.0 $\mu\text{g/mL}$)、AME(25.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$)及AMB(50.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$)均能明显地降低细胞上清液中NO的含量(见表5)。其中,当浓度为100.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,加入待测样品的实验组中NO含量与模型组相比差异性较为显著($p < 0.01$),其抑制炎症细胞释放NO的效果明显;当浓度为6.3 $\mu\text{g/mL}$ 时,AMP、AME、AMB抑制NO释放的作用均不明显,各组细胞上清液NO含量与模型组相比无显著性差异($p > 0.05$)。

综合考虑蒙自蹄盖蕨各萃取物对RAW264.7细胞增殖及LPS刺激RAW264.7细胞NO分泌量的影响,在不影响细胞正常增殖的情况下,即当浓度为50.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,AMP抑制NO的分泌比AME和AMB都强,初步推断抗炎的活性成分集中于AMP部分。

3 结论

多酚是蒙自蹄盖蕨乙醇提取物中主要的化学成

分,含量为 (142.8 ± 2.1) mg/g,通过进一步萃取分离后乙酸乙酯萃取物的多酚含量最高,达 (258.6 ± 1.7) mg/g。蒙自蹄盖蕨乙醇提取物及其各萃取物均有清除 DPPH 和 ABTS 自由基的活性且有浓度依赖性,其中乙酸乙酯萃取物清除两种自由基的能力与阳性对照(V_c)相当,但 AMP 和 AMB 的清除能力相对较弱。蒙自蹄盖蕨醇提物及其不同萃取物中,AMH、AME 和 AMB 均能不同程度地抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,其中 AME 的抑制作用最强,其抑制作用与阳性对照阿卡波糖相近,而 AMP 则无明显的抑制活性($IC_{50} > 200$ μ g/mL)。在 100.0 μ g/mL 浓度下,蒙自蹄盖蕨乙醇提取物的各萃取物均有极显著降低炎症细胞释放 NO 的能力($p < 0.01$),其中 AMP 的抑制效果最为明显。蒙自蹄盖蕨醇提物及其不同萃取物中,抗氧化及降血糖的活性成分多集中分布于乙酸乙酯萃取物中,而抗炎的活性成分多富集于石油醚萃取部分。

参考文献

- [1] 王金虎.中国蹄盖蕨属(蹄盖蕨科)的分类学修订[D].南京:南京林业大学,2009.
- [2] 杨明惠,杨雪琼,汪国松,等.蹄盖蕨属植物化学成分和药理活性研究进展[J].中国药房,2008,19(15):1189-1191.
- [3] 乔星,杨颖.中国食用蕨类植物研究进展[J].食品工业科技,2013,34(10):375-380.
- [4] 赵能武,张敬杰,赵俊华,等.贵州产蹄盖蕨科药用植物的种类和分布研究[J].时珍国医国药,2009,20(1):97-98.
- [5] 刘冬梅,盛继文,王思宏,等.猴腿蹄盖蕨根茎化学成分及其还原能力[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(21):59-62.
- [6] 钟方丽,王文姣,王晓林,等.猴腿蹄盖蕨、玉竹总黄酮的体外抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2016(6):65-72.
- [7] 翟清波,李诚,王静,等.植物多酚降血糖和降血脂作用研究进展[J].中国药房,2012(3):279-282.
- [8] 吴建华,吴志瑰,裴建国,等.多酚类化合物的研究进展[J].中国现代中药,2015,17(6):630-636.
- [9] 周卫龙,许凌,徐建峰,等.GB/T 8313-2008 第二法茶叶中茶多酚测定的研究比较[J].中国茶叶加工,2009(1):40-41.
- [10] 王超,汪江英,时磊,等.红湘莲蓬皮粉提取物的抗氧化性能[J].食品工业科技,2013,34(17):142-145.
- [11] Lv H, Chen S, Xu X, et al. Isolation of linoleic acid from *Sambucus williamsii* seed oil extracted by high pressure fluid and its antioxidant, antiglycemic, hypolipidemic activities [J]. International Journal of Food Engineering, 2015, 11 (3): 383-391.
- [12] 卢传礼,董丽华.傣药九翅豆蔻不同溶剂提取物的化学成分分析及其抗氧化、抗炎和降血糖活性研究[J].中国民族民间医药,2017,26(12):31-36.
- [13] Li J, Zhang Q, Cui J, et al. Characterization and antioxidant activity of flash-assisted extracted dihydroquercetin from wood sawdust of *Larix gmelinii* using a response surface methodology [J]. International Journal of Food Engineering, 2016, 12 (6): 587-597.
- [14] 王兴婷,王德萍,李层层,等.桑叶 DNJ 提取物体外降血糖及抗氧化作用研究[J].食品科技,2017(8):215-219.
- [15] 郭启煜. α -葡萄糖苷酶抑制剂:降低餐后高血糖[J].糖尿病新世界,2005(6):42-43.
- [16] 刘伟,任艳利,让凤菊,等.准噶尔山楂叶抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J].食品研究与开发,2017,38(3):20-24.
- [17] 戴建国,李超,黄培林.高密度壳聚糖对 L-929 细胞的毒性研究[J].东南大学学报:医学版,2008,27(1):54-57.
- [18] 黄洋,李康,邵慧凯,等.小叶榕叶对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 和 TNF- α 的影响[J].中药新药与临床药理,2014,25(2):124-127.
- [19] 谢勇,曾建伟,郑燕芳,等.基于炎症细胞模型的草珊瑚抗炎活性部位筛选[J].康复学报,2010,20(5):35-38.
- [20] 王晓林,钟方丽,薛健飞.猴腿蹄盖蕨总多酚的超声提取工艺研究[J].广东农业科学,2013,40(13):98-100.
- [21] Ueno A. Pharmaceutical studies on ferns. XVII. Components of *Athyrium mesosorum* Makino [J]. Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1962, 82 (11): 1486-1488.
- [22] Tadatak N, Akira U, Masako M, et al. Inhibitors of xanthine oxidase from *Athyrium mesosorum* [J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32 (11): 4455.
- [23] 孙志恒.长白山 3 种野菜中有效成分提取及生物活性研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2017.
- [24] 刘延奇,吴史博,秦令祥,等.配体对淀粉晶型结构的影响[J].粮食与饲料工业,2009(5):26-27.
- [25] Zobel H F. Starch crystal transformations and their industrial importance [J]. Starch-Starke, 2010, 40(1): 1-7.
- [26] 刘延奇,杨留枝,于九皋,等.微晶淀粉的制备及影响微晶晶型的因素研究[J].中国粮油学报,2007,22(1):56-59.
- [27] 张文杰.藜麦全粉与淀粉的理化性质与结构研究及应用[D].郑州:郑州轻工业学院,2016.
- [28] 彭凯,吴薇,龙蕾,等.非淀粉成分对淀粉糊化特性的影响[J].粮食与饲料工业,2015(5):41-44.
- [29] 翟娅菲,刘秀妨,张华,等.藜麦淀粉理化特性研究[J].食品工业科技,2017,38(24):48-52.
- [30] Ahamed N T, Singhal R S, Kulkarni P R, et al. Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* starch [J]. Carbohydrate Polymers, 1996, 31 (2): 99-103.
- [31] 周慧颖,彭小松,欧阳林娟,等.支链淀粉结构对稻米淀粉糊化特性的影响[J].中国粮油学报,2018,33(8):25-30.
- [32] 陈佩.不同链/支比玉米淀粉的形态及其在有/无剪切力下糊化的研究[D].广州:华南理工大学,2010.

(上接第 61 页)

料工业,2007(8):22-23.

- [24] 刘延奇,吴史博,秦令祥,等.配体对淀粉晶型结构的影响[J].粮食与饲料工业,2009(5):26-27.
- [25] Zobel H F. Starch crystal transformations and their industrial importance [J]. Starch-Starke, 2010, 40(1): 1-7.
- [26] 刘延奇,杨留枝,于九皋,等.微晶淀粉的制备及影响微晶晶型的因素研究[J].中国粮油学报,2007,22(1):56-59.
- [27] 张文杰.藜麦全粉与淀粉的理化性质与结构研究及应用[D].郑州:郑州轻工业学院,2016.
- [28] 彭凯,吴薇,龙蕾,等.非淀粉成分对淀粉糊化特性的影响[J].粮食与饲料工业,2015(5):41-44.
- [29] 翟娅菲,刘秀妨,张华,等.藜麦淀粉理化特性研究[J].食品工业科技,2017,38(24):48-52.
- [30] Ahamed N T, Singhal R S, Kulkarni P R, et al. Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* starch [J]. Carbohydrate Polymers, 1996, 31 (2): 99-103.
- [31] 周慧颖,彭小松,欧阳林娟,等.支链淀粉结构对稻米淀粉糊化特性的影响[J].中国粮油学报,2018,33(8):25-30.
- [32] 陈佩.不同链/支比玉米淀粉的形态及其在有/无剪切力下糊化的研究[D].广州:华南理工大学,2010.

欢迎订阅《食品工业科技》