

番木瓜叶总黄酮的生物活性研究

肖健, 谭恩灵

(广州市增城质量技术监督检测所, 广东广州 511300)

摘要: 采用分光光度法、牛津杯法和改良的微量二倍稀释法对番木瓜叶总黄酮的抗氧化能力、抑菌能力、炎症抑制能力进行研究。结果表明: 番木瓜叶总黄酮有很强的抗氧化、抑菌和消炎能力, 其中番木瓜叶总黄酮的还原能力强于同浓度的 V_C 和 BHT; 番木瓜叶总黄酮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 8、4、4 mg/mL, MBC 分别为 8、4、4 mg/mL; 番木瓜叶总黄酮对脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞炎症反应的 IC₅₀ 值为 1.93 mg/mL。

关键词: 番木瓜叶, 黄酮, 抗氧化, 抑菌, 消炎

文章编号: 1673-9078(2012)5-508-512

Bioactivity of Total Flavonoids from *Carica Papaya L.* Leaves

XIAO JIAN, TAN En-ling

(Guangzhou Zhencheng Quality Technology Supervision & Testing Institute, Guangzhou 511300, China)

Abstract: Using spectrophotometry, Oxford cup and two-fold dilution methods were adopted to study the antioxidant capacity, antimicrobial capability and anti-inflammatory capability of total flavonoids from *Carica Papaya L.* Leaves. The results showed that total flavonoids from *Carica Papaya L.* Leaves had great capability on antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. It had stronger reducing capability than V_C and BHT at the same concentration. And the MIC of the extracts on *E. coli*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis* were 8, 4 and 4 mg/mL, respectively. And the MBC on *E. coli*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis* was 8, 4 and 4 mg/mL, respectively. The IC₅₀ of anti-inflammatory capability was 1.93mg/mL.

Key words: papaya leaves; total flavonoid; antioxidant; antimicrobial; anti-inflammatory

番木瓜 (*Pawpaw*, *Carica Papaya L.*) 属番木瓜科番木瓜属植物, 亦被称作万寿果、乳果或乳瓜, 原产于南美热带地区, 流传到西印度群岛, 得到广泛栽种, 17 世纪时传入我国, 目前, 我国番木瓜栽培面积为 9700 多 hm², 产量 52 万 t, 主要分布在广东、广西、福建、海南、云南和台湾等省区, 其中以广东和台湾栽培最多。番木瓜素有“岭南果王”的美称, 根据中药理论, 番木瓜味甘、性平、无毒, 归入肝、脾经, 有舒筋活络、和胃祛湿之功效。现代临床医学研究表明, 番木瓜有护肝、降酶、抗炎抑菌、降血脂的作用, 还具有强心、利尿、抗衰老等功效^[1]。有学者对番木瓜叶的活性进行了研究: Bamidele 等^[2]研究了番木瓜叶乙醇提取物对卡拉胶诱导的大鼠爪子水肿、棉球肉芽肿和甲醛诱导的关节炎模型的作用, 结果表明, 口服 25~200 mg/kg 提取物, 大鼠的各种炎症症状明显减轻, 番木瓜叶乙醇提取物有消炎作用; Antonella 等^[3]利用 GC-MS 法检测了番木瓜叶中的酚类物质, 结果测得咖啡酸为 0.25 mg/g(干叶)、p-香豆酸为 0.33 mg/g(干叶)、儿茶酸为 0.11 mg/g(干叶)、5,7-二甲基香

豆素是 0.14 mg/g(干叶)。

鉴于番木瓜叶具有广阔的经济、药用前景, 本文将对番木瓜叶总黄酮的抗氧化能力、抑菌能力和消炎能力进行研究, 旨在为番木瓜叶的药用活性提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

番木瓜(品种为“穗王”)叶购自广东省广州市番禺区肥华木瓜园。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538、枯草芽孢杆菌(*Bacillus stbtilis*) ATCC9372: 由广东省微生物研究所提供。

巨噬细胞: 由中山大学实验动物中心细胞库提供。

DMEM 高糖培养基干粉美国 GBICO 公司, 胎牛血清杭州四季青生物工程材料有限公司, 青-链双抗杭州吉诺生物医药技术有限公司, 甲醇、乙醇天津大茂化学试剂厂, 酵母膏美国 OXOID 公司, 琼脂粉、脂多糖(LPS)美国 Sigma 公司, 蛋白胨美国 OXOID

收稿日期: 2012-02-04

作者简介: 肖健(1984-), 男, 硕士研究生, 从事食品检验工作

公司。

Griess 试剂: 分为 A、B 液, 4 °C 保存可使用 2 h, 使用时 A、B 液 1:1 混合, 3 h 内使用。A 液: 称取 500 mg 盐酸乙二胺, 用双蒸水定容到 500 mL, 配置成 0.1% 的盐酸乙二胺溶液; B 液: 称取 5 g 磺胺, 用 5% 磷酸溶液定容到 500 mL, 配置成 1% 的磺胺溶液。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计 (U-3010) HITACHI; 旋转蒸发器 (N-1001) EYELA; 电子分析天平 (EL204-IL) METTLER; 高速冷冻离心机 (5810R) EPPENDORF; 中药粉碎机 (114 摇摆式) 浙江省瑞安市环球药械厂; 电热恒温水浴锅 (HH-S11-4) 上海悦丰仪器仪表有限公司; DHP 恒温培养箱 (重庆四达实验设备有限公司); CO₂ 培养箱 SHEL LAB。

1.3 实验方法

1.3.1 番木瓜叶总黄酮提取物的制备^[4]

称取一定质量的番木瓜叶粉, 按照料也 1:20 加入 50% 的乙醇溶液, 在 70 °C 的水浴中浸提 2 h, 重复 3 次, 合并提取液, 浓缩得到浸膏, 低温保存备用。

1.3.2 番木瓜叶总黄酮的抗氧化能力

1.3.2.1 还原能力的测定^[5] (分光光度法)

分别吸取 0.5 mL 不同浓度的样品溶液和 2.5 mL 的磷酸缓冲溶液 (0.2 M, pH 6.6), 加入 2.5 mL 的 10 mg/mL 铁氰化钾试剂中, 混合, 混合物置于 50 °C 的水浴中加热 20 min。然后加入 2.5 mL 的 10% 的三氯乙酸, 摇匀, 以 3500~4000 r/min 离心 10 min, 然后取 2.5 mL 的上清液与 2.5 mL 的去离子水、0.5 mL 的 1.0 mg/mL 的三氯化铁溶液进行混合, 静置 30 min, 于 700 nm 处测量反应物的吸光值 ($A_{\text{样品}}$), 实验重复 3 次。取蒸馏水代替铁氰化钾试剂作样品对照 ($A_{\text{对照}}$), 吸光度越大表明样本还原能力越强。结果按下式计算:

$$\text{吸光度} = A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}$$

1.3.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定^[6,7,8]

吸取 0.5 mL 不同浓度的样品溶液, 加入 3 mL 的 DPPH 甲醇溶液 (浓度为 0.02 g/L), 将其迅速摇匀, 并在室温下暗处放置 30 min, 在 515 nm 下测定其吸光值。用其吸光值来计算清除 DPPH 自由基的活性 (SR%):

$$\text{SR}/\% = \frac{A_{t=0} - A_{t=30}}{A_{t=0}} \times 100\%$$

1.3.3 番木瓜叶总黄酮的抑菌活性

1.3.3.1 抑菌圈的测定^[9,10]

用接种环挑取少量菌体于装有 10 mL 无菌水的试管中, 用力振荡, 然后用浊度仪测菌液的麦氏度, 以无菌水作空白对照。使菌液的麦氏度为 0.5 (扣除空白

后), 通常认为, 菌液浓度配成 0.5 麦氏度时, 相当于 1.0×10^8 cfu/mL。然后取 1 mL 菌悬液按照 1:100 稀释至合适的浓度, 使其含菌量为 1.0×10^6 cfu/mL。

用移液枪吸取一定浓度的菌悬液 0.1 mL 至已经凝结的培养基上, 用无菌涂布棒把菌液均匀地涂在培养基表面。并用镊子将无菌的牛津杯轻轻地放入培养皿中, 在水平放置的平皿中均匀地放置 3 只牛津杯。吸取 0.1 mL 抑菌液 (包括各个浓度的番木瓜叶总黄酮提取液和浓度为 0.3 mg/mL 的氯霉素) 于牛津杯中, 以无水甲醇作为对照。平板上的 3 个牛津杯注入相同的抑菌液。于 37 °C 恒温环境下培养细菌 24 h。定时取出, 观察测量抑菌圈的大小, 用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.3.3.2 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定^[10,11,12]

使用改良的微孔板二倍稀释法。将稀释到 0.5 麦氏度的菌原液用无菌水按 1:10000 进行稀释, 得到含菌量 1.0×10^4 cfu/mL 稀释菌液。在 96 孔板孔中加入按照二倍稀释法稀释成不同浓度 (8 mg/mL、4 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL、0.03125 mg/mL) 的番木瓜叶总黄酮提取物溶液 100 μ L, 然后用移液枪吸取稀释菌液 100 μ L 于 96 孔板中另设不加菌液仅加不同浓度的番木瓜叶总黄酮提取物溶液的孔作为阴性对照。摇匀后置于 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h 后取出, 与阴性孔进行对比, 以无浑浊孔的药物浓度作为最小抑菌浓度。

1.3.3.3 最小杀菌浓度 (MBC) 的测定^[10,11,12]

吸取 MIC 孔及邻近低浓度的 3 个孔中的培养基 100 μ L 接种于营养琼脂平板上, 每孔接种 2 个平板, 倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后取出, 以平板上菌落生长数 ≤ 10 个的药物浓度作为最小杀菌浓度。

1.3.4 番木瓜叶总黄酮的对巨噬细胞炎症的抑制能力^[13]

巨噬细胞用 DMEM 完全培养基培养至 1×10^6 CFU 后, 转入 96 孔板中每孔 100 μ L, 培育 24 h 后, 加入 50 μ L 按照二倍稀释法稀释的样品溶液, 培育 1 h, 然后加入 50 μ L LPS (最终浓度 1 μ g/mL=原 4 μ g/mL), 培育 24 h, 然后吸取 100 μ L 细胞上清于 96 孔板中, 加入 Griess 试剂, 摇匀 10 min 后在 550 nm 下测定, 根据吸光度计算对巨噬细胞炎症的抑制率 (SR%)。

$$\text{SR}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{阳性}}}$$

2 结果与分析

2.1 番木瓜叶总黄酮的抗氧化能力测定结果

2.1.1 还原能力的测定结果

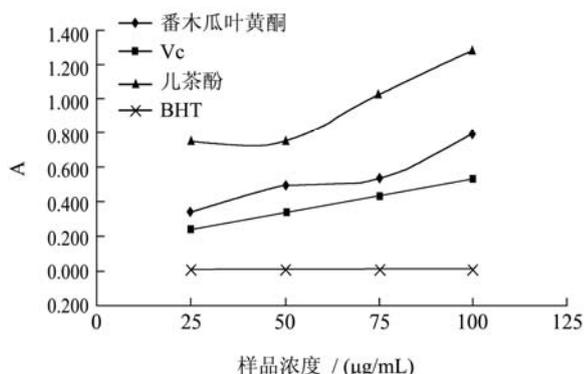


图1 番木瓜叶总黄酮的还原能力

Fig.1 Reducing capability of total flavonoids from *Carica Papaya L. leaves*

由图1可知, 番木瓜叶总黄酮的还原能力随着浓度的增大而增加, 在同 Vc、BHT 和儿茶酚的还原能力对照中, 番木瓜叶总黄酮的还原能力低于儿茶酚, 但是高于同浓度的 Vc 和 BHT。说明在同浓度条件下, 它们还原能力的大小顺序为: 儿茶酚>番木瓜叶黄酮>Vc>BHT。

2.1.2 DPPH 自由基清除能力测定结果

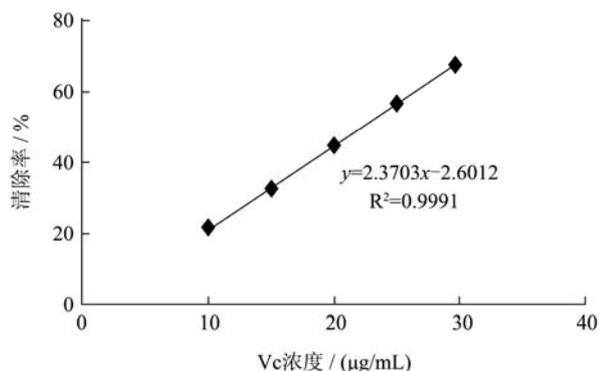


图2 VC对DPPH自由基的清除能力

Fig.2 DPPH· scavenging rate of Vc

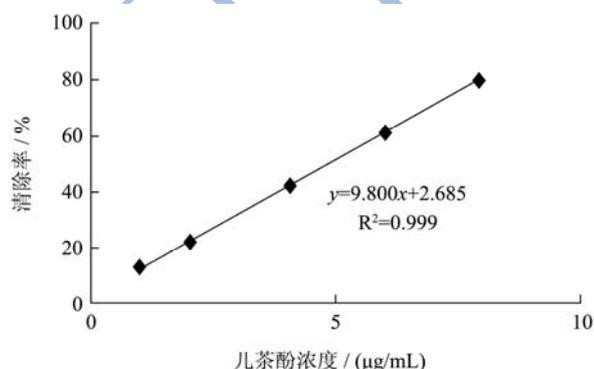


图3 儿茶酚对DPPH自由基的清除能力

Fig.3 DPPH· scavenging rate of catechol

由图2~5可以看出, 番木瓜叶总黄酮、Vc、儿茶酚和 BHT 对 DPPH 自由基的清除能力随着浓度的增

大而增大, 且它们的浓度和清除率之间呈现线性关系, 因此对它们进行线性回归, 得到表1中的方程和相关系数。

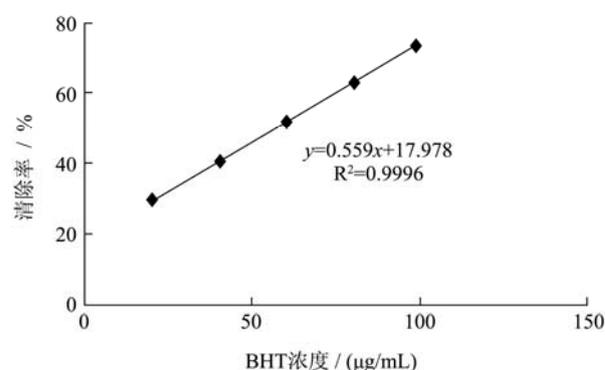


图4 BHT对DPPH自由基的清除能力

Fig.4 DPPH· scavenging rate of BHT

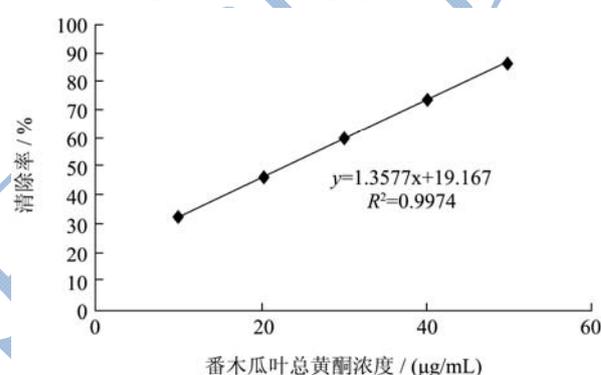


图5 番木瓜叶总黄酮对DPPH自由基的清除能力

Fig.5 DPPH· scavenging rate of total flavonoids from *Carica Papaya L. leaves*

表1 番木瓜叶总黄酮 DPPH 自由基清除能力

Table 1 DPPH· scavenging capability of total flavonoids from

Carica Papaya L. leaves

样品	回归方程	R ²	IC ₅₀ /(mg/mL)
番木瓜叶总黄酮	y=1.3577x+19.167	0.997	21.72
儿茶酚	y=9.8006x+2.6855	0.999	4.83
Vc	y=2.3703x+2.6012	0.999	22.19
BHT	y=0.559x+17.978	0.999	57.28

2.2 番木瓜叶总黄酮的抑菌能力测定结果

2.2.1 抑菌圈的测定结果

IC₅₀ 越小说明物质的清除能力越强, 反之亦然。从表1可以看出, 全部样品都展现了对 DPPH 自由基较强的清除能力, 从结果可以看出, 番木瓜叶总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力与 Vc 相当, 且明显强于 BHT, 但不及儿茶酚。各样品 DPPH 自由基清除能力的递减顺序: 儿茶酚>番木瓜叶总黄酮>Vc>HT。

从表2可以看出, 随着番木瓜叶总黄酮浓度的增加, 三种细菌的抑菌圈直径也逐渐增加, 其中大肠杆菌对番木瓜叶总黄酮的耐受性强于金黄色葡萄球菌和

枯草芽孢杆菌, 与对照物氯霉素进行比较, 在浓度为 50 mg/mL 时, 提取物对大肠杆菌的抑菌圈直径为 15.3 mm, 小于 0.3 mg/mL 氯霉素的抑菌圈; 在浓度为 40 mg/mL 时, 提取物对金黄色葡萄球菌的抑制能力与 0.3

mg/mL 的氯霉素相当; 在浓度为 40 mg/mL 时, 提取物对枯草芽孢杆菌的抑制能力与 0.3 mg/mL 的氯霉素相当。

表 2 番木瓜叶总黄酮对三种细菌的抑菌环直径

Table 2 Diameter of inhibition zone of total flavonoids from *Carica Papaya L.* leaves

项目	甲醇对照	不同氯霉素浓度的抑菌环直径/mm				
		0.3 mg/mL	20 mg/mL	30 mg/mL	40 mg/mL	50 mg/mL
大肠杆菌	0	18.2±0.31	-	6±0.17	9.3±0.13	15.3±0.11
金黄色葡萄球菌	0	20.5±0.15	8.8±0.23	14.2±0.15	19.7±0.16	-
枯草芽孢杆菌	0	14.5±0.17	6.5±0.13	10.7±0.22	13±0.21	-

2.2.2 最小抑菌能力 (MIB) 和最小杀菌能力 (MBC) 测定结果

表 3 番木瓜叶总黄酮对三种细菌的最小抑菌浓度 (MIC)

Table 3 MIC of total flavonoids from *Carica Papaya L.* leaves

项目	最小抑菌浓度 MIC/(mg/mL)
大肠杆菌	8
金黄色葡萄球菌	4
枯草芽孢杆菌	4

表 4 番木瓜叶总黄酮对三种细菌的最小杀菌浓度 (MBC)

Table 4 MBC of total flavonoids from *Carica Papaya L.* leaves

项目	最小杀菌浓度 MBC/(mg/mL)
大肠杆菌	8
金黄色葡萄球菌	4
枯草芽孢杆菌	4

结果见表 3~4, 由结果可以看出, 番木瓜叶总黄酮提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 8、4、4 mg/mL, MBC 分别为 8、4、4 mg/mL, 说明番木瓜叶总黄酮提取物对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果要优于大肠杆菌。

2.3 番木瓜叶总黄酮的消炎活性测定结果

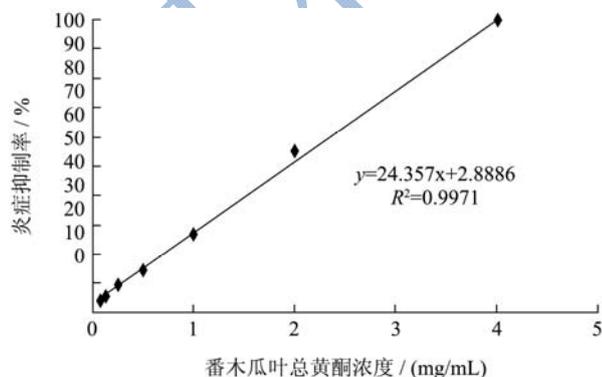


图 6 番木瓜叶总黄酮的消炎活性

Fig.6 Anti-inflammatory capability of total flavonoids from *Carica Papaya L.* leaves

结果如图 6 所示, 由图 6 可以看出番木瓜叶总黄酮对巨噬细胞炎症的抑制能力随着浓度的增大而增

大, 在浓度为 4 mg/mL 时, 番木瓜叶总黄酮对巨噬细胞炎症的抑制率达到 98.76%, 且当番木瓜叶总黄酮的浓度在 0.0625~8 mg/mL 之间时, 其对巨噬细胞炎症的抑制率与其浓度呈现线性关系, 因此可以计算其 IC₅₀ 值来评价番木瓜叶总黄酮的消炎能力, 结果见表 5。

表 5 番木瓜叶黄酮消炎活性的 IC₅₀ 值

Table 5 IC₅₀ of anti-inflammatory capability of total flavonoids

from *Carica Papaya L.* leaves

回归方程	R ²	IC ₅₀ /(mg/mL)
y=24.35x+2.888	0.997	1.93

由表 5 可以看出, 番木瓜叶总黄酮对炎症的半数抑制率 IC₅₀ 值为 1.93 mg/mL。

3 结论

3.1 番木瓜叶总黄酮在同等浓度下的抗氧化活性明显高于常用的抗氧化剂 V_C 和 BHT, 但是不及儿茶酚。究其原因, 主要是由于本次实验的样品为粗提取物, 尚未进行提纯, 经过测定, 提取物中总黄酮的含量约为 25%, 因此, 下一步实验应对番木瓜叶总黄酮提取物进行纯化和分离, 进一步确定其中的抗氧化有效成分。

3.2 番木瓜叶总黄酮对革兰氏阴性杆菌大肠杆菌的抑制能力明显弱于对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌能力, 说明番木瓜叶的抑菌活性只要体现在对革兰氏阳性细菌的作用上。目前文献上在研究天然产物的 MIC 和 MBC 时所采用的方法多为试管稀释培养法, 本文采用改良的微孔二倍稀释法对产物的抑菌活性进行研究, 与前法相比, 本文的方法具有样品使用量小、操作简单快速和数据平行性好等优点。

3.3 番木瓜叶总黄酮对 LPS 诱导的巨噬细胞的炎症反应的半数抑制浓度为 1.93 mg/mL。目前文献上查阅到的研究天然产物消炎能力的方法多为小鼠耳肿胀法, 这种方法实验周期长, 平行数据间差异较大, 数

据不稳定,本文采用的LPS诱导巨噬细胞炎症反应的实验方法相对于小鼠耳肿胀法具有实验周期短(3 d)、样品使用量小、实验操作简单和数据平行性好等优点。

参考文献

- [1] 孙连娜,洪永福. 简述中药木瓜的化学、药理与、临床应用研究[J]. 药学实践杂志,1999,17(5):281
- [2] B V Owoyele, O M Adebukola, A A Funmilayo, et al. Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves [J]. *Inflammopharmacology*, 2008, 16: 168-173
- [3] A Caninia, D Alesiania, G D'Arcangelo, et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. Leaf [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20: 584-590
- [4] 肖健,吴荣顺,吴青. 桦树胆提取物抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2010,26(7):697-699
- [5] 李慎新,曹新志,钟俊波,等. 几种中草药抗氧化性成分的还原能力及总酚含量比较研究[J]. 安徽农业科学,2008, 36(29):12755-12756
- [6] 彭长连,陈少薇. 用清除有机自由基 DPPH·法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,6:27
- [7] G MILIAUSKASA, P R VENSKUTONISA, T A VAN BEEKB. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85: 231-237
- [8] 吴建中,欧仕益,汪勇. 甘蔗叶中黄酮类物质的提取及其抗氧化性研究[J]. 现代食品科技,2009,25(2):165-167
- [9] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):110-111
- [10] 戚向阳,陈福生,陈维军,等. 苹果多酚抑菌作用的研究[J]. 食品科学,2003,24(5):33-36
- [11] 王瑶,惠曦,田吉. 橄榄多酚对口腔致病菌的体外抑菌实验研究[J]. 泸州医学院学报,2008,31(6):613-66
- [12] 陶文琴,雷晓燕,麦旭峰,等. 4 种中药贯众原植物提取物的体外抗菌活性研究[J]. 武汉植物学研究,2009,27(4):412-416
- [13] Y K Rao, S H Fang, Y Mi Teng. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100: 249-253