

雪灵芝醇提物不同极性萃取部分的体外抗氧化活性

许本善¹, 雷宁^{1*}, 吕亚丽², 马萍¹, 杜树山³, 申佳佳¹

(1. 中国人民解放军第二炮兵总医院, 北京 100088;

2. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020;

3. 北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875)

[摘要] 目的:通过体外抗氧化和还原活性评价实验,研究藏药雪灵芝乙醇提取物不同极性溶剂萃取部分的抗氧化作用。方法:用体积分数95%的乙醇回流提取雪灵芝粉末,浓缩的乙醇浸膏依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,各部分分别配制成适当浓度的溶液,采用1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基法,2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸-6)二铵盐(ABTS)自由基法和铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)法分别测定各部分的自由基清除能力和铁离子还原力。结果:雪灵芝醇提物的4个萃取部分均具有一定的体外抗氧化作用,其中乙酸乙酯与正丁醇部分清除DPPH·, ABTS⁺·及还原Fe³⁺的能力均比二氯甲烷与石油醚部分强。结论:雪灵芝提取物清除能力与提取物样品浓度在一定范围内具有良好的量效关系,其中极性较大的乙酸乙酯部分和正丁醇部分的抗氧化活性及还原能力相对较强。

[关键词] 雪灵芝; 抗氧化; DPPH自由基清除能力法; ABTS自由基清除能力法; 铁离子还原法

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0061-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020061

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0948.004.html>

[网络出版时间] 2014124 9:48

Antioxidant Activity of *Arenaria kansuensis* Extracts in vitro XU Ben-shan¹, LEI Ning^{1*}, LYU Ya-li², MA Ping¹, DU Shu-shan³, SHEN Jia-jia¹ (1. Department of Pharmacy, the Second Artillery General Hospital, Beijing 100088, China; 2. Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China; 3. Beijing Normal University, Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine of Beijing Area Major Laboratory, College of Resources Science and Technology, Beijing 100875, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant activity of *Arenaria kansuensis* extracts in vitro. **Method:** The air-dried and powdered herb of *A. kansuensis* was extracted over 2 hours with 10 times of 95% alcohol refluxing for 2 times and the combined alcohol extracts were concentrated under vacuum drying. The resultant residue was partitioned in petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol orderly. The four extracts were configured to the appropriate solution. The antioxidant activity of four extracts were analyzed by 1, 1-diphenyl-2-picryl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, 2, 2-amino-di (3-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt (ABTS) radical scavenging, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. **Result:** The ethyl acetate and n-butanol extract of *A. kansuensis* showed stronger scavenging activity against DPPH·, ABTS⁺· and reducing antioxidant power of 2, 4, 6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) than other extracts, but showed lower capacity than positive control of vitamin C. **Conclusion:** The scavenging effects showed a dose-response relationship at the selected concentration with the extracts of *A. kansuensis*. The ethyl acetate and n-butanol extract have the strongest free radical scavenging activity.

[Key words] *Arenaria kansuensis*; antioxidant activity; 1, 1-diphenyl-2-picryl-2-picrylhydrazyl; 2, 2-amino-di (3-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt; ferric reducing antioxidant power

[收稿日期] 20140411(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403184)

[第一作者] 许本善, Tel:18911632870, E-mail: benshan.xu@163.com

[通讯作者] *雷宁, 博士, 主管药师, 从事天然药物药效物质基础研究, Tel:010-66343252-8002, E-mail: lilyzebra@163.com

雪灵芝来源于石竹科植物甘肃蚤缀 *Arenaria kansuensis* 的干燥全草,主要分布于我国青海、西藏、甘肃南部以及云南北部、四川西部等地,是一种珍贵的野生藏族药资源^[1]。早在公元 7 世纪藏族同胞就已发现其独特的药用价值,其全草味苦、性寒,具清热润肺、退热止咳之功效,藏族医药常用于治疗各种肺病、淋巴结核、黄疸、风湿、肾结石以及筋骨疼痛等。关于雪灵芝的研究报道大都集中在近 10 年,主要发现雪灵芝提取物具有抗病原微生物、抗缺氧、抑制肿瘤、保护肝脏、促进消化等作用^[2-3],但这些报道大都局限于对粗提物的评价,其物质基础及其体内过程仍是研究盲区。本文通过 1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)自由基法,2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸-6)二铵盐(ABTS)自由基法和铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)法,分别对雪灵芝醇提物的不同溶剂萃取部分的体外抗氧化活性进行了评价,为民间使用的合理性与资源有效利用提供依据。

1 材料

雪灵芝样品购自青海省西宁药材市场,经北京师范大学资源学院杜树山教授鉴定,为石竹科蚤缀属植物雪灵芝 *Arenaria kansuensis* 的干燥全草,标本现保存于北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室。水为自制三蒸水,DPPH(Alfa Asesar),ABTS(Solon Ind. Pkwy), Fe^{3+} -三吡啶三啉嗪(TPTZ, Sigma),维生素 C(VC,美国 Sigma); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $K_2S_2O_8$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$,石油醚,二氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇,二甲基亚砜,甲醇,无水乙醇,盐酸,冰醋酸,无水乙酸钠等均为国产分析纯。

Multiskan Go 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher),RE-52AA 型旋转蒸发器和 SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂),6202 型高速粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司),JM-B20002 型电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司),SZ-97 型自动三重水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),CP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius),96 孔酶标板(美国 Corning Costar 3599),精密移液器(美国 Gilson)。

2 方法

2.1 雪灵芝提取物的制备 雪灵芝干燥全草粉碎后,以 95% 乙醇浸泡 30 min 后,于索氏提取器中连续回流提取 1.5 h,滤过,药渣同法提取 2 次,合并滤液,浓缩成浸膏,70 °C 减压真空干燥至含水量 < 5%,备用。取适量雪灵芝干浸膏以水分散均匀,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,

制备雪灵芝醇提物的不同极性萃取部分,作为抗氧化实验的样品。

2.2 抗氧化活性评价方法

2.2.1 DPPH 法 参考文献[4,6-7],将雪灵芝醇提物的不同极性溶剂萃取物用 DMSO 配制成不同浓度的溶液,向 96 孔板中等体积加入样品溶液和浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的 DPPH 自由基工作液,反应体系为 300 μL,室温、避光静置 30 min,于 517 nm 波长下测定吸光度(A),实验平行操作 3 次。DPPH 自由基的清除率公式为:

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

A_0 为未加样的 DPPH·工作液的吸光度, A_i 为样品溶液 + DPPH·工作液的吸光度, A_j 为样品溶液的吸光度。

2.2.2 ABTS 法 参考文献[5-7],称取适量 ABTS 溶于三蒸水后转入量瓶中,再加入适量 $K_2S_2O_8$ 并用三蒸水定容至刻度,使得 ABTS 终浓度为 7 mmol·L⁻¹, $K_2S_2O_8$ 终浓度为 2.464 mmol·L⁻¹,避光反应 12 ~ 16 h,制备成 ABTS⁺·储备液,用前以三蒸水稀释成在 734 nm 波长下的 A 为(0.70 ± 0.02) 的 ABTS⁺·工作液(现用现配)。以 VC 为阳性对照,向 96 孔板中等体积加入不同浓度样品溶液和 ABTS⁺·工作液,反应体系为 300 μL,室温、避光静置 6 min,测定 734 nm 波长下 A,实验平行操作 3 次。ABTS 自由基的清除率公式为:

$$\text{清除率} = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

A_0 为未加样的 ABTS⁺·工作液的吸光度, A_i 为样品溶液 + ABTS⁺·工作液的吸光度, A_j 为样品溶液的吸光度。

2.2.3 FRAP 法 参考文献[6-7],配制 300 mmol·L⁻¹ 的醋酸缓冲液(pH 3.6),10 mmol·L⁻¹ 的 TPTZ 溶于 40 mmol·L⁻¹ HCl 和 20 mmol·L⁻¹ $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ 作为储备液。从中精密量取 100 mL 醋酸缓冲液与 TPTZ + HCl, $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ 溶液各 10 mL 混匀,配制工作液(现用现配)。向 96 孔板中等体积加入不同浓度样品溶液和工作液,反应体系为 300 μL,室温、避光静置 10 min,测定 593 nm 波长下吸光度,实验平行操作 3 次。还原性由反应后的 A 表示, $A = A_i - A_j - A_0$, A_0 为对照样品(即三蒸水)的吸光度, A_i 为样品溶液反应后的吸光度, A_j 为样品溶液的吸光度。FRAP 当量为单位样品的还原能力相当于多少量 $FeSO_4$ 的还原能力,结果表示为每克样品代表的 $FeSO_4$ 的物质的量。

2.2.4 IC₅₀ 的计算 IC₅₀ 是指清除率为 50% 时所需

要的抗氧化剂的浓度,根据不同浓度样品的清除率做曲线求出。

3 结果

3.1 清除 DPPH 自由基的作用 DPPH·在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其孤对电子在 517 nm 处有最大吸收,当有机清除剂存在时,其与 DPPH·孤对电子配对,导致 DPPH·孤对电子在 517 nm 吸收消失或减弱,因此通过测定光吸收减弱的程度,即可评价样品抗氧化活性的强弱^[8]。根据该法测定结果得到样品和对照品的回归方程(表 1),计算雪灵芝醇提物的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物和 VC 的 IC₅₀依次为 0.461,0.254,0.121,0.170 g·L⁻¹和 4.713 mg·L⁻¹。从表 1 显示,雪灵芝各样品的 DPPH·清除率随着质量浓度的升高而增加,抗氧化作用主要集中于乙酸乙酯和正丁醇部分。

3.2 清除 ABTS 自由基的作用 ABTS 是一种水溶性的自由基引发剂,经活性氧氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS⁺·,向其中加入被测物质,当待测物质中含有抗氧化物时,该物质会与 ABTS⁺·

表 2 雪灵芝醇提物各萃取部分对 ABTS⁺·的清除作用

Table 2 ABTS⁺· scavenging effects of *Arenaria kansuensis* extracts

提取物	量效曲线	r	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
石油醚部分	$Y = 35\ 710.75X^3 - 13\ 894.14X^2 + 1\ 730.07X - 2.09$	0.998 0	0.044
二氯甲烷部分	$Y = 101\ 759.39X^3 - 35\ 100.21X^2 + 3\ 414.65X + 4.17$	0.995 0	0.016
乙酸乙酯部分	$Y = 148\ 703.42X^3 - 47\ 545.51X^2 + 3\ 929.10X + 26.12$	0.900 0	0.007
正丁醇部分	$Y = 136\ 255.84X^3 - 44\ 424.77X^2 + 3\ 843.14X + 17.71$	0.968 0	0.009
VC	$Y = 32.817X + 8.6766$	0.999 2	0.001

3.3 还原 Fe³⁺ 的作用 FRAP 法是通过铁离子氧化还原反应,对样本总的抗氧化能力进行评价。TPTZ 可被试样中的还原物质还原为 Fe²⁺-TPTZ 而呈现蓝色,并于 593 nm 处有最大 A。根据 A 的大小,对照 FeSO₄ 的标准曲线来计算出试样中对应的 Fe²⁺ 当量,得出药物的抗氧化活性的强弱。结果用 Fe²⁺ 当量来表示药物的抗氧化能力(表 3)。它反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性,而是样品的总还原能力^[10]。从表 3 显示,雪灵芝醇提物各萃取部分中,乙酸乙酯和正丁醇部分还原 Fe³⁺ 的能力较强[FRAP 分别为(2 096.14 ± 0.89), (898.70 ± 1.01) μmol·g⁻¹]。

3.4 3 种方法的比较 3 种方法的结果显示,雪灵芝醇提物 4 个萃取部分的总体抗氧化能力的顺序为乙酸乙酯部分 > 正丁醇部分 > 二氯甲烷部分 > 石油醚部分。其中以极性相对较大的乙酸乙酯和正丁醇

表 1 雪灵芝醇提物各萃取部分对 DPPH·的清除作用

Table 1 DPPH· scavenging effects of *Arenaria kansuensis* extracts

提取物	量效曲线	r	IC ₅₀ /g·L ⁻¹
石油醚部分	$Y = 96.596X + 5.4531$	0.976 6	0.461
二氯甲烷部分	$Y = 185.63X + 2.922$	0.994 2	0.254
乙酸乙酯部分	$Y = 416.1X - 0.5104$	0.998 7	0.121
正丁醇部分	$Y = 292.18X + 0.2962$	0.999 1	0.170
VC	$Y = 3.0986X + 35.397$	0.999 1	4.713×10^{-3}

发生反应而使反应体系颜色褪去,在 734 nm 处有最大吸收,即可反映物质的抗氧化活性^[9]。此实验中,雪灵芝提取物的各萃取部分在一定浓度范围内的量效关系拟合为 3 次曲线回归方程(表 2),计算雪灵芝醇提物的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物和 VC 的 IC₅₀依次为 0.044,0.016,0.007,0.009,0.001 g·L⁻¹。从表 2 显示,雪灵芝各样品的 ABTS⁺·清除能力随其质量浓度的升高而增加,并且乙酸乙酯和正丁醇萃取部分清除 ABTS⁺·的能力相对显著。

部分的活性相对较好。

表 3 雪灵芝醇提物各萃取部分对 Fe³⁺ 的还原能力

Table 3 Fe³⁺ reduction abilities of *Arenaria kansuensis* extracts

提取物	量效曲线	r	Trolox/($\bar{x} \pm s$) μmol·g ⁻¹
石油醚部分	$Y = 1.0927X + 0.0382$	0.987 6	214.06 ± 0.52
二氯甲烷部分	$Y = 2.1863X + 0.0690$	0.989 2	462.26 ± 1.01
乙酸乙酯部分	$Y = 9.4548X + 0.2027$	0.997 5	2 096.14 ± 0.89
正丁醇部分	$Y = 4.1281X + 0.1045$	0.999 5	898.7 ± 1.01
FeSO ₄	$Y = 0.0809X + 0.1611$	0.997 2	-

4 讨论

自由基及其诱导的氧化反应是导致生物衰老和人体多种疾病的主要起因之一,而抗氧化剂可有效清除自由基,达到预防和治疗某些疾病的目的。近年来,在植物中寻找天然抗氧化剂已逐渐成为研究

热点^[11]。因此, 草药等天然植物的抗氧化活性研究对其应用和开发具有重要的现实意义。

本文采用 DPPH 法, ABTS 法和 FRAP 法, 首次对传统雪灵芝的醇提物不同极性溶剂萃取部分的体外抗氧化能力和还原活性进行了评价和比较。实验结果显示, 各组分均具有不同程度的清除自由基及还原能力, 其中以乙酸乙酯和正丁醇萃取部分的活性相对较强。

在清除 ABTS 自由基的实验中, 除阳性对照 VC 的回归分析呈线性相关外, 雪灵芝醇提物各萃取部分均呈 3 次曲线。分析这一现象的原因, 可能由于 ABTS⁺· 和单一化合物的反应机制不同于和复杂样本的反应机制。抗氧化剂使自由基失活主要基于氢质子转移和电子转移两种机制, 前者通常在分秒内就能完成, 而后者反应较慢, 需要更长时间^[12]。与单一成分的抗氧化剂比较, 天然提取物由于成分复杂, 其与 ABTS⁺· 的反应机制可能是氢质子转移、电子转移或者两者共同作用的结果, 故达到反应平衡点需要的时间会更长, 甚至反应动力学曲线会出现多个拐点^[13]。

课题组前期对雪灵芝醇提物的化学组成进行过较为系统的分析, 从中分离鉴定了包括黄酮苷元、黄酮碳苷、黄酮氧苷以及黄酮木脂素在内的 13 个黄酮类化合物^[14-16]。大量的体内外研究表明, 黄酮类化合物具有较强的抗氧化和清除自由基的活性, 同时还具有抑菌、降血脂、降血压等生理功能^[17-18], 是一类极具开发前景的天然有机抗氧化剂。笔者将进一步结合前期化学成分的研究结果探讨雪灵芝的综合抗氧化能力是否与其含有较多的黄酮类物质相互关联, 为这一历史悠久的珍贵野生藏药资源的有效利用与合理开发积累研究基础。

[参考文献]

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 青海: 青海人民出版社, 1991: 449-451.
[2] 雷宁, 张文生, 杜树山. 蚤缀属植物的种群分布、化学及药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(10): 929-931.
[3] 陈薇, 段小群. 雪灵芝药理作用的研究进展[J]. 华夏医学, 2009, 22(4): 795-797.
[4] 赵磊, 黄山, 金岩, 等. 藏药松生等醇提取物不同极性提取部分体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学

杂志, 2013, 21(19): 210-213.

[5] 徐敏, 沈勇, 张坤, 等. 山核桃叶总黄酮苷元及其主要单体成分球松素查尔酮的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 204-208.
[6] Stéphanie D, Xavier V, Philippe C, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(5): 1768-1774.
[7] Kriengsak T, Unaroj B, Kevin C, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. J Food Compos Anal, 2006, 19(1): 669-675.
[8] 王园美, 张莉萍, 李文武. 三叶人字草总黄酮的抗氧化作用评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 276-280.
[9] 朱玉昌, 焦必宁. ABTS 法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(8): 77-80.
[10] 郭长江, 杨继军, 李云峰, 等. FRAP 法测定水果不同部分抗氧化活性[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(7): 841-843.
[11] 杜玉, 娄红祥. 天然植物抗氧化剂的作用机制研究概况[J]. 中药材, 2006, 29(7): 739-743.
[12] Prior R L, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10): 4290-4302.
[13] 林恋竹, 赵谋明. 反应时间对 DPPH·法、ABTS⁺·法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 63-67.
[14] 雷宁, 杜树山, 李林, 等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 918-922.
[15] 雷宁, 杜树山, 欧阳捷, 等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 II [J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2008, 44(3): 263-265.
[16] 雷宁, 杜树山, 欧阳捷, 等. 藏药甘肃蚤缀的化学成分研究 III [J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2010, 46(4): 510-512.
[17] Cook N C, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources [J]. Nutr Biochem, 1996, 7(2): 66-76.
[18] 曾祥伟, 杨丽燕, 陈金龙, 等. 黄酮类成分抗自由基氧化活性进展[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2694-2697.

[责任编辑 邹晓翠]