

天葵子各提取部位体外抗氧化活性及成分研究

周训蓉¹, 徐冉², 肖婉², 王建塔², 肖海涛², 汤磊^{2*}

(1. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 551002; 2. 贵阳医学院, 贵阳 551000)

[摘要] **目的:**研究天葵子各提取部位体外抗氧化活性以及主要成分。**方法:**将天葵子醇提物依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取,分别得到乙酸乙酯层(TK-Y) 正丁醇层(TK-Z) 和水层(TK-S),其中水层通过醇沉法得到水层多糖(TK-D),并以维生素C(VC)为对照,通过Fenton法和邻苯三酚法测定天葵子各部位和水层中的多糖对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除能力,研究天葵子的抗氧化活性,并以此为导向分离主要活性成分。**结果:**天葵子抗氧化活性顺序为TK-D > TK-S > TK-Z > TK-Y,其中TK-D对超氧自由基的清除率与浓度呈正相关($Y = 54.94X + 27.15$, $R^2 = 0.9983$), IC_{50} 为 $0.42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;从正丁醇中分离得到5个化合物,分别鉴定为紫草甙(1),东方唐松草苷(2),格列风内酯(3), β -谷甾醇(4),胡萝卜苷(5)。**结论:**首次证实了天葵子提取物中水层和正丁醇层是其抗氧化活性部位,其中水层中的抗氧化活性物质为多糖,化合物紫草甙,东方唐松草苷,格列风内酯是天葵子的主要化学成分。

[关键词] 天葵子; 抗氧化; 羟基自由基($\cdot\text{OH}$); 超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$); 化学成分

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0116-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150116

Antioxidative Properties and Components of Different Extraction Fractions from Semiaquilegiae Radix *in vitro*

ZHOU Xun-rong¹, XU Ran², XIAO Wan², WANG Jian-ta², XIAO Hai-tao², TANG Lei^{2*} (1. The Second Affiliated Hospital of Guiyang Traditional Medical College, Guiyang 551002, China; 2. Guiyang Medical University, Guiyang 551000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity of different fractions and chemical constituents from Semiaquilegiae Radix *in vitro*. **Method:** Different extraction fractions from Semiaquilegiae Radix were ethyl acetate extraction (TK-Y), *n*-butanol extraction (TK-Z), water extraction (TK-S) and polysaccharide (TK-D). Under the chemical simulation conditions *in vitro*, the antioxidant activities of different extraction fractions and polysaccharide were determined by $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging experiments. Furthermore, the chemical compounds were isolated from bio-active fraction. **Result:** The antioxidant activities of different extraction fractions from strong to weak were as follows: TK-D > TK-S > TK-Z > TK-Y. Scavenging activity of TK-D for $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ were positively correlated ($Y = 54.94X + 27.15$, $R^2 = 0.9983$), $\text{IC}_{50} = 0.42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Five major components were isolated and identified from TK-Z as lithospermoside (1), thalictricoside (2), griffonilide (3), β -sitosterol (4), daucosterol (5). **Conclusion:** The polysaccharide, *n*-butanol extraction and water extraction are active fractions and it identified the active fractions of Semiaquilegiae Radix for the first time. Lithospermoside, thalictricoside and griffonilide were found as main contribution.

[Key words] Semiaquilegiae Radix; antioxidant; $\cdot\text{OH}$; $\text{O}_2^{\cdot-}$; chemical compounds

天葵子为毛茛科植物天葵的干燥块根,为《中国药典》收录的中药品种,味甘、苦,性寒,有小毒;具清热解毒,消肿散结之功效;用于瘰疬、脓肿、疔疮、跌打损伤、毒蛇咬伤等。该种植物分布于我国长

[收稿日期] 20141125(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(21102025);贵州省科技厅中药攻关项目(黔科合 ZY[2011]3006号);贵阳医学院青年基金项目(2012017)

[第一作者] 周训蓉,副主任药师,从事中药有效成分研究,E-mail:2398662779@qq.com

[通讯作者] *汤磊,教授,从事药物化学研究,Tel:0851-6908318,E-mail:tlei1974@163.com

江流域亚热带地区,主产于江苏、湖南、湖北省,此外贵州、安徽、云南、广西、江西、浙江等地亦产^[1]。天葵子作为较常用的传统中药,在贵州民间有人用于治疗动物白内障疾病,但未见其抗氧化活性的报道。在前期研究中,笔者对天葵子提取物治疗白内障的作用进行了相关的药理学验证工作,结果发现天葵提取物具有明显的抗氧化作用^[2]。为全面考察天葵子的抗氧化活性,本研究采用体外化学模拟的方法研究天葵各部位的抗氧化活性,并对活性部位的化学成分进行分离,为明确天葵子抗氧化活性部位物质基础及拓展其药用价值提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 药物 天葵子购于贵州省贵阳市,由贵阳中医药大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为毛茛科天葵属植物天葵 *Semiaquilegia adoxoides* 的干燥块茎。

1.2 试剂 FeSO₄ (重庆北碚化学试剂厂,批号 901223), H₂O₂ (重庆江川化东有限公司,批号 20120512), 磷酸盐缓冲液 (pH 8.2, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 维生素 C (VC, 上海试四赫维化工有限公司, 批号 1307101), 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 UV-3100 型紫外-可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司), AB104-N 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), TDL-5A 型离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司), 旋转蒸发器 (EYELA), 恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

2 方法

2.1 天葵子不同提取部位的制备 称取天葵子 20 kg, 粉碎后用甲醇回流提取 4 次 (每次 3 h), 减压浓缩得甲醇浸膏。将所得的甲醇浸膏用水分散, 水悬液依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取。回收溶剂得到正丁醇萃取物 TK-Z (0.97 kg), 乙酸乙酯萃取物 TK-Y (0.11 kg), 水层 TK-S (1.5 kg)。水层浓缩至合适浓度, 取上述浓缩液加无水乙醇, 于 4 ℃ 冰箱中静置 12 h 后离心, 收集沉淀, 冷冻干燥, 得多糖 TK-D。得率计算方法: 得率 = (萃取物质量 / 干药材质量) × 100%

2.2 待测样品及 VC 溶液的配制 精密称取各部位提取物及 VC, 加适当的溶剂溶解定容于 100 mL 的量瓶中, 配制成 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g·L⁻¹ 的溶液, 乙酸乙酯部位用 95% 乙醇为溶剂, 正丁醇部位, 水部位和 VC 以去离子水为溶剂。

2.3 清除·OH 能力的测定^[3-4] 在比色管中依次加入 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 1 mL, 6 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙

醇 1 mL, 待测样品溶液 1 mL, 再以 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 启动反应, 在 37 ℃ 下反应 0.5 h, 以水为参比, 在 510 nm 下测定加入样品后吸光度 A, 以 FeSO₄, 水杨酸-乙醇, 样品溶液以及水各 1 mL 作为本底 A_{X0}。该实验重复 3 次。按下式计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_x - A_{X0}) / A_0] \times 100\%$$

A₀-空白, A_x-加入样品后, A_{X0}-本底吸光度

2.4 清除超氧自由基 O₂⁻^[3-4] 取 9 mL 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 8.2) 与 1 mL 供试品溶液混合, 25 ℃ 恒温水浴下 15 min, 取 3 mL 混合液, 加入 0.1 mL 45 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚, 摇匀, 在第 4 min 加入 10 mol·L⁻¹ 盐酸 1 滴终止反应, 在 325 nm 处测定 A_x, 同时分别测定不加邻苯三酚的样品液与磷酸盐缓冲液混合液的吸光度 A_{X0} 和以 1 mL 蒸馏水代替供试品溶液的磷酸盐缓冲液和邻苯三酚混合液的吸光值 A₀。该实验重复做 3 次。

$$\text{清除率} = [1 - (A_x - A_{X0}) / A_0] \times 100\%$$

2.5 化合物分离

2.5.1 柱色谱分离 TK-Z (500 g) 通过 D101 大孔树脂, 依次用 CH₃OH-H₂O (纯水, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) 洗脱, 减压回收溶剂, 得到 6 个部位。各部分再经反复正相及反相 RP-18 硅胶柱色谱, MCI, Sephadex LH-20 等柱色谱分离, 分别用三氯甲烷-甲醇 (100:0 ~ 0:100), 石油醚-丙酮 (100:0 ~ 0:100), 水: 甲醇 (100:0 ~ 0:100) 梯度洗脱, 洗脱物再经反复分离纯化, 重结晶得到化合物 1 (350 mg), 2 (90 mg), 3 (30 mg), 4 (40 mg), 5 (25 mg)。

2.5.2 HPLC 成分分析 天葵子各部位用适量水和甲醇溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 以甲醇为流动相 A, 以 0.05% 磷酸水为流动相 B, 按表 1 中规定进行梯度洗脱; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 260 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。

表 1 HPLC 洗脱条件

Table 1 Elution conditions of HPLC

时间/min	流动相	
	A (甲醇)/%	B (0.05% 磷酸水)/%
0 ~ 20	3	97
20 ~ 30	3 ~ 20	97 ~ 80
30 ~ 50	20 ~ 40	80 ~ 60
50 ~ 60	40 ~ 60	60 ~ 40

3 结果

3.1 天葵子各提取部位的提取率 天葵子水层萃取物相对得率最高可达 7.5%, 正丁醇层相对得率

4.9%, 乙酸乙酯萃取段的得率为 0.55%。由此可见,天葵子醇提取物的主要成分都集中在大极性部分。

3.2 天葵子各部位清除·OH的能力 天葵子各样品 TK-D, TK-S, TK-Z 和 VC 在实验浓度范围内对·OH的清除能力呈良好的量效关系,但均弱于 VC。天葵子各部位中,清除率随极性增大而增大,水层的极性最大,其次是正丁醇层和乙酸乙酯层。其中对水层进行醇沉后的样品 TK-D 随着浓度的升高清除率逐渐超过 TK-S,具有明显的清除·OH作用。见表2。

表2 天葵子各部位对羟基自由基的清除作用(n=3)
Table 2 Effect of eliminating ·OH of different fractions from Semiaquilegiae Radix (n=3)

质量浓度 /g·L ⁻¹	清除·OH能力/%				
	VC	TK-D	TK-S	TK-Z	TK-Y
0.2	41.2	12.6	23.7	3.9	27.1
0.4	93.7	48.3	28.2	16.1	16.5
0.6	99.8	59.9	52.6	27.9	15.1
0.8	100	67.8	56.3	35.8	20.8
1.0	100	68.1	60.5	53.7	23.9

3.3 天葵子各部位清除O₂⁻·的能力 天葵子各样品 TK-D, TK-S 和 VC 在实验浓度范围内对超氧自由基的清除能力呈良好的量-效关系,其中 TK-D 清除效果最好,且呈良好的线性关系。量效相关性分析表明 TK-D 对超氧自由基的清除率 Y 与浓度 X 呈正相关(Y = 54.94X + 27.15, R² = 0.998 3), IC₅₀为 0.42 g·L⁻¹,但均弱于 VC。见表3。

表3 天葵子各部位对超氧自由基的清除作用(n=3)
Table 3 Effect of eliminating O₂⁻· of different fractions from Semiaquilegiae Radix (n=3)

质量浓度 /g·L ⁻¹	清除O ₂ ⁻ ·能力/%				
	VC	TK-D	TK-S	TK-Z	TK-Y
0.2	80.1	37.1	40.2	34.1	9.4
0.4	95.8	49.8	43.1	32.0	5.6
0.6	99.8	61.8	46.5	27.5	10.1
0.8	100	71.9	59.3	25.1	15.1
1.0	100	81.8	61.2	15.8	12.4

3.4 结构鉴定

化合物1 白色粉末,溶于水,mp 274 ~ 276 °C。ESI-MS m/z 462.2 [M]⁺。¹H-NMR (重水, 400 MHz) δ: 6.20 (1H, dd, J = 1.2, 10.0 Hz, H-2),

5.99 (1H, dd, J = 3.0, 10.5 Hz, H-3), 5.47 (1H, br s, H-7), 4.15 (1H, m, H-6)。¹³C-NMR (重水, 100 MHz) δ: 155.3 (C-1), 136.1 (C-3), 127.0 (C-2), 117.7 (C-8), 102.5 (C-1'), 97.1 (C-7), 76.1 (C-5), 75.8 (C-3'), 75.8 (C-5'), 73.9 (C-4), 72.8 (C-2'), 69.9 (C-6), 69.7 (C-4'), 60.8 (C-6'), 氢谱、碳谱数据与文献[5]报道一致,故鉴定该化合物为紫草萘苷。

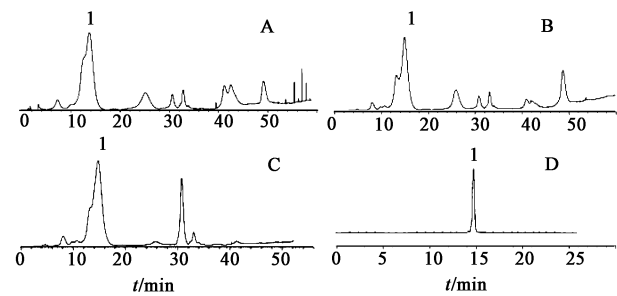
化合物2 白色针状结晶(甲醇), mp 125 ~ 126 °C。ESI-MS m/z 330.1 [M]⁺。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2,6), 7.07 (1H, dd, J = 6.8 Hz, H-3), 7.05 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-5), 4.86 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1'), 4.66 (1H, t, J = 7.1 Hz, H-8)。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 158.1 (C-4), 131.7 (C-1), 130.8 (C-2), 130.8 (C-6), 118.1 (C-3), 118.1 (C-5), 105.3 (C-1''), 102.2 (C-1'), 77.8 (C-3'), 77.6 (C-3''), 77.5 (C-5'), 77.4 (C-8), 74.9 (C-2'), 74.9 (C-2''), 71.4 (C-4'), 71.2 (C-4''), 69.7 (C-6'), 66.8 (C-5''), 33.5 (C-7), 氢谱、碳谱数据与文献[5]报道一致,故鉴定该化合物为东方唐松草苷。

化合物3 白色结晶(甲醇), mp 178 ~ 179 °C。EI-MS m/z 168 [M]⁺。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6.62 (1H, dd, J = 2.5, 9.8 Hz, H-4), 6.26 (1H, dd, J = 2.0, 9.8 Hz, H-5), 5.89 (1H, s, H-3), 4.90 (1H, dd, J = 2.0, 10.0 Hz, H-7a), 4.32 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, dd, J = 2.4, 10.4 Hz, H-7)。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ: 173.9 (C-1), 164.8 (C-3), 144.3 (C-5), 120.6 (C-4), 112.6 (C-2), 85.2 (C-8), 80.0 (C-7), 73.5 (C-6), 氢谱、碳谱数据与文献[6]报道一致,故鉴定该化合物为格列风内酯。

化合物4 白色针晶(甲醇), mp 143 ~ 144 °C。EI-MS m/z 414 [M]⁺, 396, 381, 329, 303, 273, 255, 213, 145, 43。与β-谷甾醇对照品对比, Rf 值一致,且混合熔点不降低,故鉴定为β-谷甾醇。

化合物5 白色粉末, mp 280 ~ 281 °C。与胡萝卜苷对照品对比, Rf 值一致,且混合熔点不降低,故鉴定为胡萝卜苷。

3.5 HPLC 分析 通过 HPLC 分析及天葵子各提取部位的得率可以看出,天葵子的主要成分及抗氧化活性物质集中在大极性部位,其中 1 号峰是其主要成分紫草萘苷。见图1。



A. 天葵子醇提物; B. TK-Z; C. TK-S; D. 紫草氰苷; 1. 紫草氰苷

图 1 天葵子各部位 HPLC 色谱

Fig.1 Chromatogram of different fractions from *Semiaquilegiae Radix*

4 结论

不同的抗氧化体系具有不同的抗氧化作用机制,本实验通过考察天葵子不同部位提取物对两种自由基清除效果对其抗氧化活性进行了综合评价,结果显示天葵子各部位抗氧化活性从大到小依次为 TK-D > TK-S > TK-Z > TK-Y, 其中以 TK-D 的抗氧化活性最强,对超氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用呈良好的线性关系。量效相关性分析表明 TK-D 对超氧自由基的清除 Y 与浓度 X 呈正相关 ($Y = 54.94X + 27.15$, $R^2 = 0.9983$), IC_{50} 为 $0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上样品虽均低于阳性对照 VC,但一般当 $IC_{50} < 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,说明具有良好的抗氧化能力^[7]。因此正丁醇层和水层是天葵子抗氧化的 2 个活性部位。

通过 HPLC 分析及天葵子各部位的得率可以看出,天葵子的主要成分及抗氧化活性物质集中在大极性部位,已有不少学者对天葵子中化学成分进行了不同程度的研究,其中大极性部位主要成分有糖类和苷类,但都未见其抗氧化方面的报道^[8-9]。水层中一般主要物质为蛋白质,多糖等大分子化合物,本文通过醇沉的方法得到水层中多糖类成分 (TK-D),体外抗氧化实验显示其清除自由基的能力明显

提高。证明多糖是天葵子中抗氧化活性物质。

通过化学成分分析可知,苷类成分是天葵子中的主要化学成分,其中正丁醇部位的主要活性成分为紫草氰苷,东方唐松草苷和格列风内酯。

本实验通过简单的体外抗氧化模型完成了天葵子活性部位的初筛,首次证实了天葵子的抗氧化活性部位及部分活性物质基础,研究结果可为进一步深入开展天葵子抗氧化活性评价提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:55.
- [2] 汤磊. 一种天葵提取物及其制备方法和应用[P]. 中国专利:200910312563.3, 20100714.
- [3] 黄琼,黄晓梅,张平金,等. 针菇多糖的抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(4):66-69.
- [4] 王晓梅,王小青,王新玲,等. 新疆鼠尾草总酚酸的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9):162-165.
- [5] Han Q B, Jiang B, Ding G, et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*[J]. Fitoterapia, 2001, 72(1):86-88.
- [6] Erdemgil F Z, Baser K H C, Akbay P, et al. Thalictricoside, a new phenolic compound from *Thalictrum orientale*, zeitschrift fuer naturforschung, C [J]. J Bio, 2003, 58(4):632-635.
- [7] Lee Yu-Ling, Yen Ming-Tsung, Mau Jeng-Leun. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*[J]. Food Chem, 2007, 104(1):1-9.
- [8] 牛锋,谢光波,崔征,等. 天葵子的化学成分研究[J]. 中国药物科学杂志, 2006, 15(4):251-254.
- [9] Zhang H, Liao Z X, Yue J M. Cryano-and nitro-containing compounds from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*[J]. Chin J Chem, 2004, 22(10), 1200-1203.

[责任编辑 聂淑琴]