

大苞雪莲总黄酮体外抗氧化活性

蒙萍^{1,2}, 马慧萍², 王宁², 景临林², 贾正平^{1,2*}

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000;

2. 兰州军区兰州总医院, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**研究大苞雪莲总黄酮体外自由基清除能力及抗氧化活性。**方法:**采用体外清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·),2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐阳离子自由基(ABTS⁺·),超氧阴离子(O₂⁻·),羟基自由基(·OH),一氧化氮(NO),以及测定金属螯合能力、还原力、总抗氧化能力共8种方法对大苞雪莲总黄酮的自由基清除能力及抗氧化活性进行了评价。每组实验平行3次。**结果:**大苞雪莲总黄酮在一定浓度下能够有效地清除DPPH·,ABTS⁺·,O₂⁻·,·OH,NO,对DPPH·,ABTS⁺·,·OH,NO的半数清除质量浓度分别为52.52,71.71,60.38,203.95 mg·L⁻¹,对超氧阴离子的半数清除质量浓度为271.06 mg·L⁻¹,小于维生素C(VC,380.10 mg·L⁻¹),半数金属螯合质量浓度为184.52 mg·L⁻¹,并且具有一定的还原力和总抗氧化能力。**结论:**大苞雪莲总黄酮具有较强的体外自由基清除能力及抗氧化活性,是一种具有较高研究价值和潜力的天然抗氧化物质。

[关键词] 大苞雪莲;总黄酮;体外抗氧化;自由基

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0092-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170092

Antioxidant Activity of Total Flavonoids of *Saussurea involucrate* in Vitro MENG Ping^{1,2}, MA Hui-ping², WANG Ning², JING Lin-lin², JIA Zheng-ping^{1,2*} (1. Pharmacy School, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Lanzhou Military Region Lanzhou General Hospital, Key Laboratory of Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage of PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To study the free radical scavenging capacity and antioxidant activity of total flavonoids of *Saussurea involucrate* in vitro. **Method:** Eight methods, namely the *in vitro* scavenging of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·), 2, 2-nitrogen based bis-(3-ethyl benzene and thiazole-6-sulfonic acid) diamine salt cation radical (ABTS⁺·), superoxide free radicals (O₂⁻·), hydroxyl radical (·OH), nitric oxide (NO) and the determination of metal chelating capacity, reducing power and total antioxidant capacity, were adopted to evaluate the capacity of free radical scavenging capacity and antioxidant activity of total flavonoids of *S. involucrate*. **Result:** Total flavonoids of *S. involucrate* can effectively scavenge DPPH·, ABTS⁺·, ·OH, NO at certain concentrations. Its 50% inhibition concentration (IC₅₀) values for DPPH·, ABTS⁺·, ·OH, NO were 52.52, 71.71, 60.38, 203.95 mg·L⁻¹, respectively, and its IC₅₀ for O₂⁻· was 271.06 mg·L⁻¹, which was less than vitamin C (VC, 380.10 mg·L⁻¹), and its concentration of half metal chelate was 184.52 mg·L⁻¹. Moreover, it also had a certain reducing power and total antioxidant capacity. **Conclusion:** Total flavonoids of *S. involucrate* has a strong free radical scavenging capacity and antioxidant activity *in vitro* and are type of natural antioxidant substances with a high research value and potential.

[Key words] *Saussurea involucrate*; total flavonoids; *in vitro* antioxidant; free radical

氧化是机体的正常生理变化,但是在一定条件下,体内的氧化与抗氧化系统会失衡,产生氧化应

[收稿日期] 20141209(018)

[基金项目] 全军医药卫生科研基金项目(LZ13GY07,CLZ14JA01,CLZ11JA06)

[第一作者] 蒙萍,在读硕士,从事抗缺氧新药研究,Tel:0931-8994671, E-mail:mengping35@163.com

[通讯作者] *贾正平,博士生导师,教授,Tel:0931-8994671, E-mail:mahuipingcxr@aliyun.com

激,导致胞内活性氧和活性氮的大量累积,损伤DNA,蛋白质及线粒体功能,在神经退行性疾病、炎症、糖尿病等疾病的发生和发展中扮演着重要的角色。因此,寻找有效、毒副作用少的自由基清除剂和抗氧化剂对于这些疾病的治疗十分必要。

大苞雪莲也被称为天山雪莲或新疆雪莲,为菊科凤毛菊属,是多年生草本植物,主要分布于我国新疆、青海、甘肃等地。雪莲是我国一种名贵的中药材,药用雪莲有12个种,一个变种^[14]。研究表明,雪莲含有多种化合物,包括芦丁、高车前素、山柰酚、槲皮素、金合欢素等^[5-6],具有广泛的药理活性,包括抗炎镇痛和心血管作用,以及抗氧化、抗疲劳、终止早期妊娠、抗癌、增强机体免疫力等,作为民间用药已久^[7]。

黄酮类化合物是自然界中存在的具有较高抗氧化活性的物质,因此,本实验采用相关实验方法对大苞雪莲总黄酮的体外自由基清除及抗氧化能力进行研究,旨在发现更高效、低毒新的天然抗氧化物质。

1 材料

1.1 药物与试剂 大苞雪莲 *Saussurea involucrate*, 2010年8月购自新疆参茸中药饮片有限公司,经兰州大学药学院生药研究所杨永建教授鉴定;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, Sigma, 批号101029108),2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS,批号1001393091),氯化硝基四氮唑蓝(NBT,批号1001330368),均为Sigma公司,菲啰啉(批号47787),还原型辅酶(NADH I,批号C1202018),吩嗪硫酸甲酯(PMS,批号48805),均为Aladdin公司,维生素C(VC,上海中奉化学试剂有限公司,批号20121111),乙二胺四乙酸(EDTA, Aladdin公司,批号46631),其他试剂为市售分析纯。

1.2 仪器 MULTISKAN MK3型酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司),UV2800SPC型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器公司),AE240型分析天平(上海梅特勒-托利多)。

2 方法

2.1 雪莲总黄酮的制备 称取药材200g,粉碎成粗粉,加15倍量70%乙醇浸泡过夜,回流提取2次,每次2h,过滤,合并滤液,回收乙醇至无醇味,将浓缩液上样于预先处理好的HPD-722型大孔吸附树脂柱,吸附12h后,先以蒸馏水冲洗上述大孔树脂至无色,然后用40%乙醇洗脱充分,收集乙醇洗脱液,真空干燥,粉碎,称定质量为3.53g,测定总黄

酮质量分数44.18%。

2.2 雪莲总黄酮的体外自由基清除试验

2.2.1 DPPH法测定抗氧化能力 依据文献[8],并稍作改进。将不同质量浓度(20~100 mg·L⁻¹)的样品溶液125 μL,分别加入0.1 mmol·L⁻¹ DPPH乙醇溶液125 μL中,置暗处室温反应30 min,以乙醇溶剂做空白对照,测量其在波长517 nm处的吸光度A_i。测定DPPH乙醇溶液125 μL与DMSO 125 μL混合后在517 nm处的吸光度A₀;测定乙醇溶液125 μL与样品液125 μL在517 nm处的吸光度A_j。按(1)式计算其清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2 自由基阳离子(ABTS⁺·)法测定抗氧化能力 依据文献[9]并稍作改进,将等体积的7 mmol·L⁻¹ ABTS溶液与2.45 mmol·L⁻¹过硫酸钾混合使之反应并置于暗处16 h,制备ABTS⁺·。用乙醇将ABTS⁺·溶液稀释直至其在734 nm处吸光度0.70±0.02。将100 μL不同质量浓度(20~100 mg·L⁻¹)样品液加入3.9 mL ABTS⁺·溶液中,室温放置6 min,测量其在734 nm处的A_i;测定3.9 mL ABTS⁺·溶液与100 μL DMSO混合后在734 nm处的A₀;测3.9 mL乙醇溶液与100 μL样品液在734 nm处的A_j。按(1)式计算其清除率。

2.2.3 超氧阴离子自由基清除能力(SRSA)法测定抗氧化能力 依据文献[10]并稍有改进,将不同质量浓度(50~600 mg·L⁻¹)的样品溶液100 μL,依次加入50 μL 500 μmol·L⁻¹的NADH(溶解于0.2 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液,pH 7.4),50 μL 200 μmol·L⁻¹的NBT和50 μL 20 μmol·L⁻¹的PMS。置于25℃条件下反应8 min,测量其在560 nm处的A_i。测定50 μL NADH,50 μL NBT和50 μL PMS与100 μL DMSO混合后在560 nm处的A₀;测定50 μL NADH,50 μL NBT和50 μL水与100 μL样品液在560 nm处的A_j。按(1)式计算其清除率。

2.2.4 羟自由基清除 参照文献[11]方法的基础上进行了改进,在酶标板中加入不同浓度样品溶液40 μL,依次加入4.5 mmol·L⁻¹的水杨酸-乙醇50 μL,4 mmol·L⁻¹ FeSO₄溶液50 μL,1 mmol·L⁻¹ H₂O₂溶液40 μL,摇匀,静置30 min后,于510 nm处测得A_i,用水代替水杨酸时测得A_j,用DMSO代替样品时测得A₀。按(1)式计算其清除率。

2.2.5 NO清除 按照文献[12]方法进行。将不同质量浓度的样品溶液(25~600 mg·L⁻¹)0.1 mL,加入0.1 mL的10 mmol·L⁻¹硝普钠(溶解在磷酸缓

冲液中 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4), 混合后 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 150 min, 加入 0.9 mL 水和 0.5 mL 对氨基苯磺酸(33%, 溶解在 20% 的乙酸溶液中), 室温放置 5 min, 最后加入盐酸萘乙二胺(0.1%) 0.5 mL, 室温放置 30 min 后, 测定 540 nm 处的 A_i 。用磷酸缓冲液代替硝普钠时测得 A_j , 用 DMSO 代替样品溶液时测得 A_0 。按(1)式计算其清除率。

2.2.6 金属螯合 参照文献[13]的方法上进行了改动, 不同质量浓度的样品溶液 1 mL, 加入 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 μL 和 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrozine 40 μL , 振荡混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 10 min 后, 测定 562 nm 处 A_i 。用水代替 Ferrozine 时测得 A_j , 用 DMSO 代替样品溶液时测得 A_0 。按(1)式计算其螯合率, 并计算当清除率为 50% 时所对应的药物浓度 (IC_{50})。

2.2.7 还原力测定 参照文献[14]方法并进行了改进, 将不同质量浓度的样品溶液 ($50 \sim 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 mL, 加入 2.5 mL $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.6), 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 得混合溶液, 置于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴保温 20 min, 再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 将所得混合溶液离心 ($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 倾取上清液, 精密吸取 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 在 700 nm 处检测 A。

2.2.8 总抗氧化能力法测定抗氧化能力 按照文献[13]方法, 将不同质量浓度的样品溶液 ($100 \sim 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.1 mL, 加入 1.0 mL 试剂溶液 (试剂溶液中包括 $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸, $28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钠, $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钼酸铵)。混合液置于 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴孵育 90 min。放冷至室温, 以蒸馏水为空白, 于波长 695 nm 处测 A。

2.2.9 统计学方法 使用 Excel 软件对结果进行统计分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对清除率-浓度在 Excel 软件中做线性回归方程 ($Y = aX + b$), IC_{50} 是指当清除率为 50% 时所对应的药物浓度。

3 结果

3.1 对 DPPH· 的清除 当大苞雪莲总黄酮浓度在 $20 \sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 随着大苞雪莲总黄酮浓度的增加, 其对 DPPH· 的清除作用逐渐增强, 并且有较好的量效关系, 经计算机拟合为 $Y = 0.5922X + 18.899$, $r = 0.9873$ 。由上述线性方程计算得出大苞雪莲总黄酮对 DPPH· 的 IC_{50} 见表 1。

3.2 对 ABTS⁺· 的清除 在实验浓度范围内大苞雪莲总黄酮对 ABTS⁺· 自由基的清除能力随其浓度的

表 1 大苞雪莲总黄酮清除自由基及其金属螯合能力

Table 1 Free radical scavenging and metal chelating ability of total flavonoids of Saussurea involucrate

样品	$\text{IC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					
	DPPH·	ABTS ⁺ ·	$\text{O}_2^{\cdot-}$	·OH	NO	金属螯合
大苞雪莲总黄酮	52.52	71.71	271.06	60.38	203.95	184.52
VC	30.44	18.30	380.10	43.82	153.95	-
EDTA	-	-	-	-	-	62.07

增加而显著增强, 在 $20 \sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y = 0.6583X + 2.7956$, $r = 0.9956$ 。大苞雪莲总黄酮对 ABTS⁺· 的 IC_{50} 见表 1。

3.3 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除, 采用 NADH/NBT/PMS 体系, 大苞雪莲总黄酮在 $50 \sim 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除呈现较好的线性关系, 线性方程为 $Y = 0.1247X + 16.199$, $r = 0.9764$, IC_{50} 见表 1。

3.4 对 ·OH 的清除 大苞雪莲总黄酮在 $12.5 \sim 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 ·OH 的清除率随着浓度的增大而增大。经计算, 大苞雪莲总黄酮对 ·OH 的 IC_{50} 见表 1。

3.5 对 NO 的清除 当大苞雪莲总黄酮在 $25 \sim 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 NO 的清除率随着浓度的增大而增大, 当浓度大于 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 大苞雪莲总黄酮对 NO 的清除率逐渐趋于稳定, 经计算, 大苞雪莲总黄酮对 NO 的 IC_{50} 见表 1。

3.6 金属螯合能力 大苞雪莲总黄酮具有一定的金属螯合能力, 经计算机拟合, 大苞雪莲总黄酮半数螯合质量浓度见表 1。

3.7 还原力测定 在大苞雪莲总黄酮质量浓度为 $100 \sim 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随浓度增大吸光度提高, 与 VC 作用趋势一致。见表 2。

3.8 总抗氧化能力测定 大苞雪莲总黄酮和 VC 在 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 于 695 nm 下测定总抗氧化能力得到的吸光度分别为 0.765 和 1.039, 在 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度, 其测定总抗氧化能力得到的吸光度分别为 1.179 和 1.876。见表 3。

4 结论

本实验对大苞雪莲总黄酮体外清除 DPPH·, ABTS⁺·, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ·, ·OH, NO 及其金属螯合能力、还原力、总抗氧化能力进行了研究, 结果显示, 大苞雪莲总黄酮对 DPPH·, ABTS⁺·, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ·, ·OH, NO 均具有一定的清除能力, 其中对 DPPH·, ABTS⁺·, ·OH 和 NO 的 IC_{50} 分别为 52.52, 71.71, 60.38, 203.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,

表 2 大苞雪莲总黄酮不同质量浓度的还原力测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Reducing power of total flavonoids of *S. involucrate* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	还原力/A			
	50 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹	300 mg·L ⁻¹
大苞雪莲总黄酮	-	0.445 ± 0.009	0.860 ± 0.009	1.234 ± 0.036
VC	0.346 ± 0.005	0.749 ± 0.004	1.341 ± 0.006	-

表 3 大苞雪莲总黄酮不同质量浓度的总抗氧化能力测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Total antioxidant activity of total flavonoids of *S. involucrate* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	总抗氧化能力/A				
	100 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹	300 mg·L ⁻¹	400 mg·L ⁻¹	500 mg·L ⁻¹
大苞雪莲总黄酮	0.256 ± 0.022	0.475 ± 0.009	0.765 ± 0.010	0.970 ± 0.039	1.179 ± 0.058
VC	0.325 ± 0.012	0.677 ± 0.011	1.039 ± 0.015	1.402 ± 0.014	1.876 ± 0.014

对超氧阴离子的 IC₅₀ 为 271.06 mg·L⁻¹, < VC (380.10 mg·L⁻¹), 并且具有一定的金属螯合能力、还原力和总抗氧化能力, 在一定范围内, 随着总黄酮浓度的增加, 其抗氧化活性增加, 并且呈一定的量效关系。综上, 大苞雪莲是一个有一定研究和开发价值的天然抗氧化物质。

[参考文献]

[1] 徐晨, 张沾, 于萍, 等. 天山雪莲醇提方法研究[J]. 新疆医学, 2013, 43(9):13-15.
 [2] 袁晓凡, 赵兵, 王玉春. 雪莲的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(12):1424-1426.
 [3] 鲁宵宇, 覃建兵. 新疆雪莲研究进展[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2009, 37(9):38-41.
 [4] 翟科峰, 王聪, 高贵珍, 等. 天山雪莲的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11):2869-2873.
 [5] 王瑛, 张本印, 陶燕铎, 等. 雪莲的化学成分与药理作用研究进展[J]. 光谱实验室, 2013, 30(2):530-535.
 [6] 肖皖, 李宁, 波拉提马卡比力, 等. 雪莲化学成分和药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5):344-348.
 [7] 尹辉. 雪莲化学成分、药理活性及临床应用研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(7):1010-1012.
 [8] Adesegun S A, Alabi S O, Olanbani P T, et al. Evaluation of antioxidant

potential of *melanthera scandens* [J]. J Acupunct Meridian Stud, 2010, 3(4):267-271.
 [9] Sanjiv K, Rajat S, Sudarshan O. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves [J]. BMC Research Notes, 2014, 7:560.
 [10] Oktay T, İlhami G, Süleyman G, et al. Antioxidant activity of 5,10-dihydroindeno[1,2-*b*]indoles containing substituents on dihydroindeno part [J]. Bioorgan Med Chem, 2009, 17(18):6583-6589.
 [11] Xiang Y, Xu X, Li J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4):1899-1905.
 [12] Ebrahimzadeh M A, Nabavi S F, Nabavi S M, et al. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants [J]. Afr J Biotechnol, 2013, 9(32):5212-5217.
 [13] Sun L J, Zhang J B, Lu X Y, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(10):2689-2696.
 [14] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity [J]. J Agr Food Chem, 1995, 43(1):27-32.

[责任编辑 聂淑琴]