

## 刺五加根有效组分的抗氧化活性分析

樊星<sup>1</sup>, 闫静<sup>1\*</sup>, 刘舒<sup>2</sup>, 周慧<sup>3</sup>, 宋凤瑞<sup>2</sup>, 刘志强<sup>2</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150036; 2. 中国科学院 长春应用化学研究所, 长春 130022;  
3. 吉林大学 珠海学院, 广东 珠海 519041)

**[摘要]** 目的:研究刺五加根有效组分在不同质量浓度下的体外抗氧化活性,筛选最佳有效组分,为刺五加根的研究和开发提供参考。方法:采用紫外分光光度法测定各组分中总黄酮和总皂苷含量,检测波长分别为510,550 nm。利用超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )清除法,羟基自由基( $\cdot OH$ )清除法,1,1-二苯基-2-苦基肼基(DPPH)自由基清除法和亚铁还原能力实验(FRAP)法测定刺五加根不同有效组分的抗氧化活性。结果:不同有效组分的刺五加根在一定质量浓度范围内均有一定的抗氧化活性,且随着质量浓度的增加抗氧化能力越强。在 $O_2^-$ 清除法模型中,质量浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,30%乙醇洗脱部位清除率( $91.61 \pm 2.59$ )%。在 $\cdot OH$ 清除法模型中,质量浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,30%乙醇洗脱部位清除率( $90.29 \pm 2.06$ )%。在DPPH自由基清除法模型中,质量浓度为 $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,30%乙醇洗脱部位清除率清除率达( $84.45 \pm 0.14$ )%。在FRAP法中,质量浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,30%乙醇洗脱部位的FRAP值 $3\,474 \pm 36.84$ 。结论:刺五加根各有效组分均有一定的抗氧化活性,30%乙醇洗脱部位的抗氧化能力最强,可开发成天然的植物抗氧化剂。

**[关键词]** 刺五加根; 抗氧化性; 超氧阴离子清除法; 羟基自由基清除法; 总皂苷; 总黄酮

**[中图分类号]** R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0005-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090005

## Antioxidant Activity of Effective Components from Roots of Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis

FAN Xing<sup>1</sup>, YAN Jing<sup>1\*</sup>, LIU Shu<sup>2</sup>, ZHOU Hui<sup>3</sup>, SONG Feng-ru<sup>2</sup>, LIU Zhi-qiang<sup>2</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150036, China;  
2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;  
3. Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on antioxidant activity of effective components in Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis roots. **Method:** Contents of total saponins and total flavonoids were determined by UV. Antioxidant activity of effective components in Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis roots were conducted with superoxide anion free radical scavenging method, hydroxyl free radical scavenging method, DPPH scavenging method and FRAP method. **Result:** Different effective components in a certain concentration range had some antioxidant activities. When the concentration increased, antioxidant ability enhanced. Clearance of 30% ethanol eluted site on  $O_2^-$  was ( $91.61 \pm 2.59$ )% at the concentration of  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Clearance of 30% ethanol eluted site on  $\cdot OH$  was ( $90.29 \pm 2.06$ )% at the concentration of  $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Clearance of 30% ethanol eluted site on DPPH was ( $84.45 \pm 0.14$ )% at the concentration of  $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . FRAP value of 30% ethanol eluted site was  $3\,474 \pm 36.84$  at the concentration of  $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** All the

**[收稿日期]** 20151120(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81403077,81573574);吉林省科技发展计划自然科学基金项目(20150101078JC);广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310494);吉林省医药产业发展专项(20130727002YY)

**[第一作者]** 樊星,在读硕士,中草药分析与研究,Tel:0451-187267050,E-mail:15948739183@163.com

**[通讯作者]** \*闫静,博士,教授,中药开发与分析,Tel:0451-187267050,E-mail:yanjing\_002@163.com

effective components of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots have a certain antioxidant activity. Antioxidant activity of 30% ethanol eluted site is the highest.

**[Key words]** *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots; antioxidant activity; superoxide anion free radical scavenging method; hydroxyl free radical scavenging method; total saponins; total flavonoids

刺五加具有补肾安神、舒筋活血、益气健脾、祛风除湿等功效<sup>[1-2]</sup>。当人体内自由基的产生和清除无法达到平衡状态时,会导致衰老和疾患,需要利用抗氧化剂加以调节<sup>[3-6]</sup>。目前,刺五加对于清除自由基的功能性作用得到了普遍的认可和重视<sup>[7]</sup>,可考虑将其研发为抗氧化剂。

使用单一方法筛选抗氧化剂并不能全面、有效、科学地评价物质抗氧化活性的能力,有必要采用多种方法进行综合评价<sup>[8-9]</sup>。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法可对抗氧化剂主要自由基的清除能力进行检测<sup>[9]</sup>。亚铁还原能力实验(FRAP)是一种以氧化还原反应为基础的测定物质总抗氧化能力的方法,两者可联合用于抗氧化剂的筛选,具有灵敏、易于操作、便于重复等优点<sup>[9-10]</sup>。HeMar的自由基代谢理论提出,自由基主要包括超氧阴离子、羟基和过氧化氢等<sup>[11]</sup>,说明选用 $O_2^-$ 清除法和 $\cdot OH$ 清除法考察抗氧化剂清除自由基的能力是合理可行的。本实验拟通过系列抗氧化活性试验评价刺五加根中各洗脱部位的抗氧化能力,找出刺五加根中抗氧化性最强的组分,为该植物的天然抗氧化剂开发提供参考。

## 1 材料

HSC-24A型氮气吹干仪(上海楚定分析仪器有限公司),Spectra FLOUR plus型酶标仪(瑞士 Tecan 公司),Genesys 10S型可见分光光度计(上海君翼仪器设备有限公司),BS110S型电子分析天平(北京赛多利斯有限公司),Alpha 2-4型冻干机(德国 Martin Christ 公司)。

刺五加购自北京同仁堂药店,经长春中医药大学王淑敏教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* 的干燥根;芦丁(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201004),齐墩果酸(中国食品药品检定研究院,批号 200304),1,1-二苯基-2-苦基肼基(DPPH)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $Na_2$ ) (美国 Sigma 公司),抗坏血酸(VC)和碱性藏红花(藏红 T)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,上海晶纯实业有限公司),AB-8型大孔吸附树脂(山东鲁抗立科药业有

限公司),WST-1(南京旋光科技有限公司),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 刺五加根各有效组分的制备** 取刺五加干燥根 3 kg,加 10 倍量水浸泡 0.5 h,保持微沸状态回流提取 1 h,冷却至室温,过滤,得上清液;加 10 倍量水按相同方法提取,将 2 次所得药液合并浓缩,得刺五加根的总水提物(即原液)。刺五加根总水提取物,一半冻干成粉末,另一半经 70% 乙醇沉淀过夜,浓缩上清液后上 AB-8 型大孔树脂柱,分别用水和体积分数为 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇洗脱,分段收集洗脱液,旋转蒸发浓缩,冷冻干燥,得刺五加根原液及不同洗脱部位粉末<sup>[3]</sup>,冻干粉质量分别为 62.25、22.50、11.75、16.70、6.3、1.63、0.91 g,相当于原药材的提取率依次为 4.15%、1.50%、0.78%、1.11%、0.42%、0.11%、0.06%。

**2.2 总黄酮的含量测定** 将芦丁对照品配置成  $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,精密吸取芦丁对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置于 10 mL 离心管内(不足 1 mL 用 60% 乙醇补足),加入 5% 亚硝酸钠 200  $\mu\text{L}$ ,摇匀,静置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 200  $\mu\text{L}$ ,摇匀,静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 1 mL,加入 60% 乙醇稀释至 5 mL,静置 15 min,以 60% 乙醇为空白,于 510 nm 处测定吸光度  $A$ 。以  $A$  为纵坐标,质量浓度为横坐标,得芦丁标准曲线  $Y = 10.6X + 0.004$  ( $r = 0.9982$ ),线性范围  $0.016 \sim 0.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将 7 种刺五加不同洗脱部位提取物粉末稀释到一定浓度,各取 3 个平行样,结果原液,水洗部位,10% 乙醇部位,30% 乙醇部位,50% 乙醇部位,70% 乙醇部位,90% 乙醇部位中总黄酮质量分数以芦丁计分别为  $(27.52 \pm 4.8)\%$ 、 $(11.07 \pm 1.3)\%$ 、 $(21.37 \pm 3.5)\%$ 、 $(30.91 \pm 0.76)\%$ 、 $(53.10 \pm 0.52)\%$ 、 $(55.43 \pm 3.5)\%$ 、 $(17.48 \pm 4.8)\%$ 。

**2.3 总皂苷的含量测定** 配制  $0.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  齐墩果酸对照品溶液,精密吸取该溶液 50、100、150、200、250、300  $\mu\text{L}$ ,分别置于 10 mL 离心管中,氮气吹干,加入 5% 香草醛-冰乙酸溶液 200  $\mu\text{L}$  和高氯酸溶液 800  $\mu\text{L}$ ,混匀后于 70  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 15 min,流水冷却

2 min,继续加入冰乙酸 5 mL,摇匀于 550 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 40.56X + 0.003$  ( $r = 0.999 0$ ),线性范围  $0.002 5 \sim 0.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 7 种刺五加不同组分提取物粉末稀释到一定浓度( $n = 3$ ),结果刺五加根原液,水洗部位,10% 乙醇部位,30% 乙醇部位,50% 乙醇部位,70% 乙醇部位,90% 乙醇部位中总皂苷质量分数以齐墩果酸计分别为  $(8.93 \pm 3.7)\%$ ,  $(8.63 \pm 4.3)\%$ ,  $(10.63 \pm 2.1)\%$ ,  $(28.97 \pm 2.6)\%$ ,  $(37.03 \pm 3.6)\%$ ,  $(30.82 \pm 2.2)\%$ ,  $(7.9 \pm 4.8)\%$ 。

## 2.4 抗氧化活性的测定

### 2.4.1 $\text{O}_2^-$ 清除法评价抗氧化活性

用  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液(pH 9.3)溶解样品和稀释溶液。使用前,将水配制的  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA- $\text{Na}_2$  用缓冲液稀释 10 倍,水配制的  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  WST-1 用缓冲液稀释 10 倍, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻苯三酚储备液用水稀释至  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 96 孔板中,取 EDTA- $\text{Na}_2$  溶液  $40 \mu\text{L}$ ,加入样品溶液和 WST-1 溶液各  $40 \mu\text{L}$  后,加入邻苯三酚溶液  $40 \mu\text{L}$  启动反应作为样品组;以等体积水代替邻苯三酚溶液作为样品对照组。取 EDTA- $\text{Na}_2$  溶液  $40 \mu\text{L}$ ,加入水和 WST-1 溶液各  $40 \mu\text{L}$ ,加入邻苯三酚溶液  $40 \mu\text{L}$  启动反应作为空白组,以同体积水代替邻苯三酚溶液成为空白对照组。每个样品均做 3 个平行样,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光静置 0.5 h,利用酶标仪在  $450 \text{ nm}$  处测定各孔 A,见图 1。

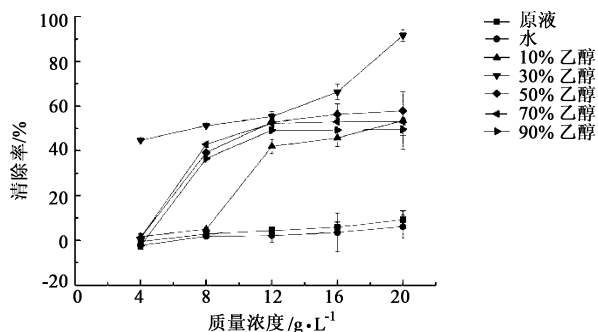


图 1 不同质量浓度的刺五加根各有效组分对  $\text{O}_2^-$  清除率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Influence of effective components in *Acanthopanax Senticosid Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots with difference concentration on clearance of  $\text{O}_2^-$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

结果显示刺五加根各部位对  $\text{O}_2^-$  的清除能力随着质量浓度的增加呈现一定的增强趋势,说明清除率与质量浓度在着一定的量效关系。其中 30% 乙醇部位对于  $\text{O}_2^-$  清除能力最强,50% 乙醇和 70% 乙醇组分清除能力也较好。采用 SPSS 18.0 软件计算 30% 乙醇,50% 乙醇和 70% 乙醇部位的半数抑制

率 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别为  $(6.410 \pm 0.245)$ ,  $(13.492 \pm 0.540)$ ,  $(14.107 \pm 0.320) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.4.2 $\cdot\text{OH}$ 清除法评价抗氧化活性

该反应体系及样品配置所用的溶液为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 7.4)。EDTA- $\text{Na}_2$  与  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  按比例 1:1 溶解于水中,得  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA-Fe 溶液,将藏红-T 用缓冲液配成  $520 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  用水稀释至 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  备用。在每孔中加入 EDTA-Fe  $50 \mu\text{L}$ ,缓冲液  $50 \mu\text{L}$  和藏红 T 溶液  $10 \mu\text{L}$  作为反应底物,样品组和样品对照组各加入样品溶液  $50 \mu\text{L}$ ;空白组和空白对照组均以等体积水代替样品溶液,而后样品组和空白组均加入 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液  $40 \mu\text{L}$  启动反应;样品对照组和空白对照组用等体积水代替 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液。每个样品平行 3 份,利用酶标仪在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光静置 0.5 h,于  $515 \text{ nm}$  处测定各孔 A,见图 2。结果显示刺五加根不同洗脱部位对  $\cdot\text{OH}$  均有一定的抑制作用,在  $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,清除能力随着质量浓度的增加而增强。30% 乙醇部位具有最显著的清除能力, $\text{IC}_{50}$   $(0.322 \pm 0.004) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

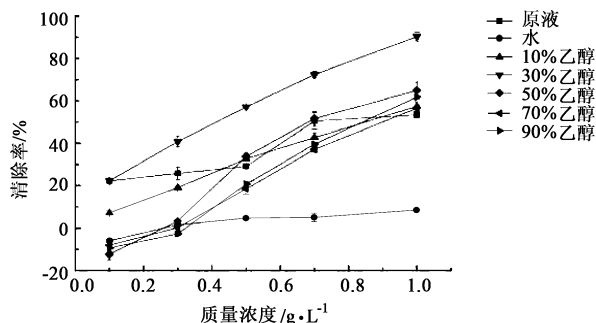


图 2 不同质量浓度的刺五加根各有效组分对  $\cdot\text{OH}$  清除率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Influence of effective components in *Acanthopanax Senticosid Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots with difference concentration on clearance of  $\cdot\text{OH}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.4.3 DPPH 法评价抗氧化活性<sup>[12]</sup>

DPPH 溶于 95% 乙醇中,终浓度  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。刺五加根不同组分的粉末用 60% 乙醇溶解配制成不同浓度。取待测样品各  $100 \mu\text{L}$  加入 96 孔板中,加入  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DPPH 溶液  $100 \mu\text{L}$  作为样品组;空白组加入 60% 乙醇和 DPPH 溶液各  $100 \mu\text{L}$ ;样品对照孔加入各待测样和 60% 乙醇各  $100 \mu\text{L}$ 。每个样品平行 3 份,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光静置 0.5 h,利用酶标仪于  $517 \text{ nm}$  处测定各孔 A,见图 3。结果显示不同质量浓度的刺五加根不同洗脱部位对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,呈现良好的量效关系。其中刺五加根原液和 30% 乙醇部位清除能力最佳, $\text{IC}_{50}$  分别为

(0.410 ± 0.004), (0.533 ± 0.005) g · L<sup>-1</sup>。

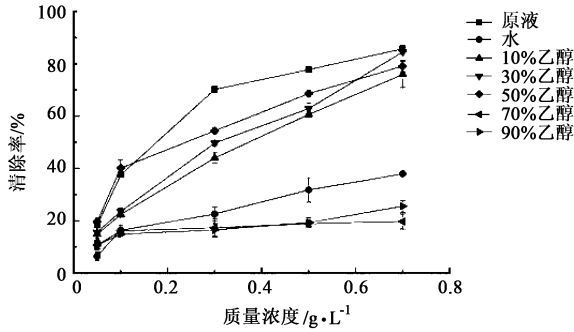


图 3 不同质量浓度的刺五加根各有效组分对 DPPH 清除率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Influence of effective components in *Acanthopanax Senticosus Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots with difference concentration on clearance of DPPH ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.4.4 FRAP 法评价总抗氧化活性** pH 3.6 的 CH<sub>3</sub>COONa 缓冲体系, 10 mmol · L<sup>-1</sup> TPTZ 溶液溶于 40 mmol · L<sup>-1</sup> 盐酸中, 20 mmol · L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> 溶液, 将这 3 个溶液以 10:1:1 比例混合配成 FRAP 试剂, 现用现配。500 μmol · L<sup>-1</sup> VC 或不同质量浓度的样品溶液各 5 μL 加至 96 孔板中, 快速加入 FRAP 试剂 150 μL。每个样品均做 3 个平行样, 分别在 0, 4 min 于 592 nm 处测定 A。结果显示当样品质量浓度由 0.1 g · L<sup>-1</sup> 增加至 1.0 g · L<sup>-1</sup> 时, 相应的 FRAP 值也由低到高出现递增的趋势。其中 30% 乙醇和 50% 乙醇洗脱部位的 FRAP 值较高, 说明这 2 个部位拥有较强的总抗氧化能力, 且升高的趋势明显。

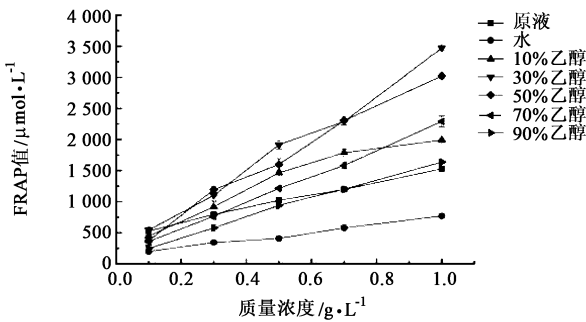


图 4 不同质量浓度的刺五加根各有效组分对总抗氧化活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Influence of effective components in *Acanthopanax Senticosus Radix et Rhizoma Seu Caulis* roots with difference concentration on total antioxidant activity ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

本文建立的 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, ·OH 抗氧化体系中, 刺五加不同有效组分均表现出了一定的清除自由基能力, 说明其具有一定的抗自由基活性, 其中 30% 乙醇洗脱部位的抗氧化活性最强。在抗氧化活性方面, 刺

五加原液和 30% 乙醇洗脱部位强于 50% 乙醇和 10% 乙醇洗脱部位, 更优于其他洗脱部位。刺五加根各有效组分均具有一定的抗氧化作用, 且在选择的浓度范围内, 随着质量浓度的增加, 抗氧化能力也随之增强, 具有一定的浓度依赖性。综合考量, 30% 乙醇洗脱部位整体的体外抗氧化活性能力最强。经过总黄酮和总皂苷含量测定, 发现 30% 乙醇洗脱部位和 50% 乙醇洗脱部位中总黄酮和总皂苷含量均较高, 说明发挥抗氧化作用的主要成分为黄酮和皂苷类成分。虽然 30% 乙醇洗脱部位中总黄酮和总皂苷的含量没有 50% 乙醇洗脱部位高, 但抗氧化活性却优于后者, 说明极性较大的黄酮类和皂苷类成分抗氧化活性较好。

对于抗氧化剂而言, 单一方法不能综合、准确、有效地评价抗氧化活性。因此, 通过对 7 种刺五加根不同有效组分进行黄酮类和皂苷类的含量测定及其抗氧化活性的能力评价, 可促进刺五加根有效组分在抗氧化方面的研究。

### [参考文献]

- [1] 王欣, 海春旭, 梁欣. 刺五加提取物在自由基模型中的活性作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2009, 21(2): 127-131.
- [2] 台玉萍, 黄新辉, 李新忠. 刺五加的化学成分分析及其药用价值[J]. 化工时刊, 2012, 26(8): 37-40.
- [3] 王俊标, 赵红丹, 徐春玲, 等. 刺五加叶不同部位抗氧化活性的研究[J]. 人参研究, 2012, 24(3): 11-15.
- [4] 赵保路. 自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老[J]. 生物物理学报, 2010, 26(1): 26-36.
- [5] 李向荣. 抗氧化剂和自由基与血清白蛋白相互作用的微量热和谱学研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2014.
- [6] 梁云. 几种天然抗氧化剂抗氧化性能比较研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [7] 孙永杰. 刺五加茎叶中总黄酮的提取及其抗氧化功效研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [8] 周昇昇, 杨月欣. 抗氧化能力体外评价方法的进展和比较[J]. 卫生研究, 2010, 39(2): 164-167.
- [9] 张明. 几种体外抗氧化检测方法的评价研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2010.
- [10] 傅裕. 体外抗氧化功能评价方法研究进展[J]. 肉类研究, 2010(11): 41-46.
- [11] 高天. 鹿骨胶原蛋白的制备及其水解物抗氧化活性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [12] 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.

[责任编辑 刘德文]