

藏药松生等醇提物不同极性提取部分体外抗氧化活性研究

赵磊^{1*}, 黄山², 金岩^{2*}, 裴小娜², 许丹²

(1. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃中医学院, 兰州 730000;
2. 青岛科技大学, 山东 青岛 266042)

[摘要] **目的:**通过体外还原力和抗氧化评价方法研究藏药松生等提取物的抗氧化活性。**方法:**将松生等用 70% 乙醇浸泡、提取、浓缩所得浸膏依次用石油醚, 二氯甲烷, 乙酸乙酯, 正丁醇、乙醇进行萃取, 各组分都配制成适当稀释倍数的溶液, 通过普鲁士蓝法、Fenton 法和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法分别测定各组分的还原力, ·OH 自由基的清除能力以及抗氧化的活性, 并计算各组分的 IC₅₀。**结果:**3 种抗氧化实验表明乙酸乙酯、正丁醇、乙醇部分都具有明显抗氧化的作用。其中用 DPPH 法测得的 IC₅₀ 分别是乙酸乙酯 0.060 5 g·L⁻¹, 正丁醇 0.076 3 g·L⁻¹, 乙醇 0.083 3 g·L⁻¹。**结论:**提取物清除率与样品浓度存在明显的量效关系, 浓度大于 1.0 g·L⁻¹ 时其还原能力几乎接近于维生素(VC), 清除能力接近甚至超过 60%。其中在大极性溶液层还原力和抗氧化的能力最强。

[关键词] 松生等; 普鲁士蓝法; Fenton 法; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH); 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0210-04

[doi] 10.11653/syjf20131210210

Antioxidant Effect of Each Part of Ethanol Extrac of *Rhamnella gilgitica* in vitro

ZHAO Lei^{1*}, HUANG Shan², JIN Yan^{2*}, PEI Xiao-na², XU Dan²

(1. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines (TCM) of the College of Gansu Province, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China;
2. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

[Abstract] **Objective:** To study the scavenging activity *in vitro* of each part of ethanol extract of *Rhamnella gilgitica* Mansfeld et Melch. **Method:** *R. gilgitica* was extracted with 70% ethanol, then was extracted by petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, n-butyl alcohol, ethanol the each part was configured to the appropriate solution, Prussian blue method Fenton method and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrozyl (DPPH) were used to measure the antioxidant activity. **Result:** The ethyl acetate, n-butyl alcohol and ethanol extract of *R. gilgitica* showed obvious scavenging effects, IC₅₀ of the ethyl acetate, n-butyl alcohol and ethanol extract of *R. gilgitica* with DPPH was 0.060 5, 0.076 3, 0.083 3 g·L⁻¹, respectively. **Conclusion:** The scavenging activity showed a dose-response relationship, even reach 60% by the above 1.0 g·L⁻¹ concentrations. The high polarity of solvents layer extract has the strongest free radical scavenging activity.

[Key words] *Rhamnella gilgitica*; Prussian blue method; Fenton method; DPPH; antioxidant activity

[收稿日期] 20130503(015)

[基金项目] 甘肃省教育厅硕士生导师项目(1106-02)和青岛科技大学人才引进基金(0022380)

[通讯作者] * 赵磊, 教授, 从事中药化学研究, E-mail: luckleizhao@126.com;

金岩, 博士, 从事天然药物修饰及药理活性研究, E-mail: qaz309@126.com

藏药松生等(又音译为上升登,森等),系鼠李科猫乳属植物西藏猫乳茎的干燥木质部(俗称心材)。产于察隅、芒康,生于海拔2 600~2 900 m的山地灌木丛林中,分布于云南西北部、四川西南部,巴基斯坦也有分布,其茎干入药,在《藏医藏药初步整理》(1965)中记载为进口药物,为藏医常用药物之一^[1]。其作为一种传统中药曾为《中国药典》一部(1977年版)和藏药标准所收载,据晶珠本草记载,松生等性凉,燥湿,活血,有祛风湿,敛干黄水,消肿止痛等功效,可治疗类风湿性关节炎,黄水病,高山多血症,外用能消肿,治疮毒等^[2]。关于松生等的报道,只有20世纪90年代有少数文献记载^[3-6],对其活性的研究鲜有记载。本文通过普鲁士蓝法、Fenton法和DPPH法^[7]抗氧化活性体外评价体系测定松生等醇提物各极性组分的抗氧化活性,为该植物民间用药的合理性和该资源利用提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 松生等采自西藏芒康地区,由成都中医药大学龙飞副教授鉴定为鼠李科猫乳属植物西藏猫乳(*Rhamnella gilgitica* Mansfield et Melch)茎的干燥木质部。普鲁士蓝(上海迈坤化工有限公司); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (嘉峪关市群恒工贸有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, Sigma-Fluka公司产品);维生素C(VC,上海源叶生物技术有限公司,批号20090525);芦丁(中国食品药品检定研究院,批号100080-200707);水杨酸(上海南翔试剂有限公司);3% H_2O_2 溶液(上海贵纯化工有限公司);乙醇、二氯甲烷、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇等均为分析纯。

1.2 仪器 AL204型电子天平(梅特勒-托利公司);T6系列可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);RE-52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),HH-S4数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

2 方法

2.1 原料的预处理及松生等提取物的提取分离 将松生等粉碎后,用70%乙醇浸泡4次,每次10 d,合并溶剂、浓缩、制备成浸膏。将浸膏用热水溶解,依次用乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取制备不同极性提取浸膏。

2.2 松生等木材部提取物的抗氧化活性测定

2.2.1 普鲁士蓝法

2.2.1.1 样品及VC、芦丁溶液的配制 准确称取干燥至恒重的石油醚部分、二氯甲烷部分、乙酸乙酯

部分、正丁醇部分、乙醇部分浸膏100 mg,加入适量95%乙醇超声溶解,溶液转移至100 mL量瓶中,加入95%乙醇定容。精密量取上述溶液,稀释质量浓度为1.0,0.9,0.8,0.7,0.6,0.5,0.4,0.3,0.2,0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2.1.2 抗氧化活性测定(普鲁士蓝法) 取母液稀释10倍,分别吸取稀释液0.00,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL置于具塞试管中,用蒸馏水补至1.00 mL,加入0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.6的磷酸盐缓冲液和1%的铁氰化钾溶液各2.50 mL,并混合均匀,混合液50℃恒温20 min后立即冷却,然后加入10%三氯乙酸溶液2.50 mL,混合后在3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。取上清液2.50 mL,加入蒸馏水2.50 mL及0.1%的三氯化铁0.50 mL。测定反应液在700 nm处的吸光度(A)。A大小表示还原力的强度。

准确吸取稀释10倍的VC和芦丁0.00,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL做阳性对照。以下操作同上。按公式(1)计算自由基清除率:

$$\text{清除率} = 1 - \frac{(A_s - A)}{A_0} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

A_s :加入待测溶液后的吸光度; A :待测溶液的本底吸光度; A_0 :空白对照液的吸光度。

2.2.2 Fenton反应法

2.2.2.1 样品及VC、芦丁溶液的配制 按**2.2.1.1**方法制备样品溶液,精密量取上述溶液,稀释质量浓度为2.0,1.8,1.6,1.4,1.2,1.0,0.8,0.6,0.4,0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2.2.2 溶液的配制 FeSO_4 溶液的配制:称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.556 g,用超纯水定容于100 mL量瓶中使用时稀释10倍。水杨酸-乙醇溶液的配制:称取水杨酸0.828 g,用无水乙醇定容于100 mL量瓶中使用时稀释10倍。

2.2.2.3 方法 取 FeSO_4 溶液2 mL,加入水杨酸-乙醇溶液2 mL,再加入不同浓度溶液2 mL,最后加入3% H_2O_2 2 mL启动反应。于37℃水浴中保温30 min,在510 nm处测吸光度,以70%乙醇做空白。考虑待测溶液本底吸光度的不同,取 FeSO_4 2 mL,水杨酸-乙醇2 mL,加入待测溶液2 mL和超纯水2 mL。于37℃水浴中保温30 min,在510 nm处测吸光度,作为待测溶液的奔底吸收。按公式(1)计算自由基清除率。

2.2.3 DPPH法

2.2.3.1 样品及VC、芦丁溶液的配制 按**2.2.1.1**方法制备样品溶液,精密量取上述溶液,稀

释质量浓度为 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2.3.2 DPPH 标准曲线的绘制 准确称取 DPPH 试剂 25.0 mg, 用 95% 乙醇溶解, 并定量转入 100 mL 的量瓶中, 用 95% 乙醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液, 置于冰箱中冷藏备用。分别取 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 mL 标准溶液, 用乙醇定容至 100 mL, 最终质量浓度分别为 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.030, 0.04, 0.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。测定上述标准溶液在 517 nm 波长处的 A, 制作标准曲线。Y = 0.015 08X - 0.004 14, $R^2 = 0.999 8$ 。

2.2.3.3 清除 DPPH 能力的测定 将配置好的 DPPH 溶液在 517 nm 处进行吸光度测量; 向 VC、芦丁和不同组配制好的溶液中加入 DPPH 2.5 mL ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 在室温下放入暗室反应 30 min, 用紫外分光光度计测得其在 $A_{517 \text{ nm}}$; 向不同溶剂提取物配制好的溶液中各加入 95% 的乙醇溶液 2.5 mL 混合均匀, 测得其在波长 517 nm 处 A。以 VC 和芦丁作为阳性对照 按公式(1)计算自由基清除率。

2.2.4 清除 50% 自由基时样品浓度 (IC_{50}) 的计算

根据 Fenton 反应法和 DPPH 法清除率与松生等不同溶剂提取物各组分添加量, 制作二者的关系曲线, 通过线性回归分析可以得到回归方程, 而根据回归方程式可以计算出上述两法·清除率为 50% 时各组分的添加量即 IC_{50} 值。通过图 2, 3, 选择乙酸乙酯部分、正丁醇部分、乙醇及 VC、芦丁做线性回归方程, 并计算其 IC_{50} 值。

3 结果

随着提取溶剂极性的增加(石油醚 < 二氯甲烷 < 乙酸乙酯 < 正丁醇 < 乙醇), 松生等抗氧化作用也相应增大; 针对每一部分的提取物, 松生等也是随着浓度的增加抗氧化作用也逐渐增加; 当乙酸乙酯部分、正丁醇部分、乙醇部分浓度达到 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抗氧化作用也均大于 60%。而且清除作用接近甚至高于其阳性对照芦丁的作用。由表 1 和图 1~3, 发现松生等抗氧化作用部分及还原作用主要集中于乙酸乙酯、正丁醇及乙醇提取部分, 其 IC_{50} 值也基本接近。其中用 DPPH 法测得的 IC_{50} 分别是乙酸乙酯部分为 $0.060 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 正丁醇部分为 $0.076 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 乙醇部分为 $0.083 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

普鲁士蓝法^[8,9]是以普鲁士蓝的生成量为指标, 利用铁氰化钾中的 Fe^{3+} , 当还原力强的物质与 Fe^{3+} 反应时, 会产生 Fe^{2+} 变成普鲁士蓝在 700 nm

表 1 松生等不同方法不同极性溶剂提取部分 $\text{IC}_{50} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	IC_{50}	
	Fenton 法	DPPH 法
松生等石油醚部分	-	-
松生等二氯甲烷部分	-	-
松生等乙酸乙酯部分	2.941 6	0.060 5
松生等正丁醇部分	1.058 3	0.076 3
松生等乙醇部分	1.054 7	0.083 3
对照 VC	0.260 1	0.005 4
对照 芦丁	0.337 1	0.006 8

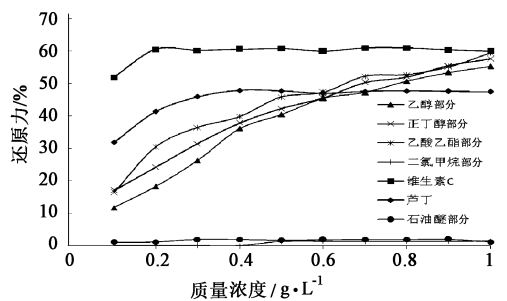


图 1 松生等不同极性溶剂提取部分还原力

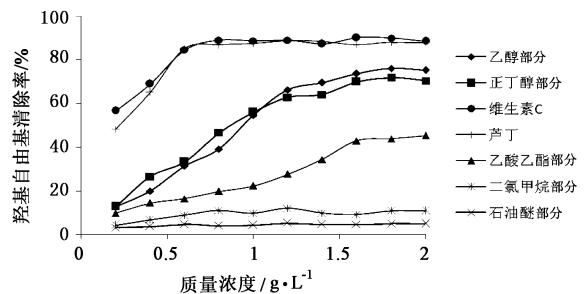


图 2 松生等不同极性溶剂提取部分对·OH 自由基的清除率

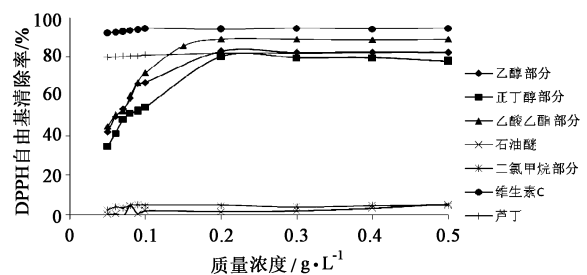


图 3 松生等不同极性溶剂提取部分 DPPH 自由基清除率

波长下检测普鲁士蓝的生成量, 其生成量的多少与松生等抗氧化作用成定量关系, 吸光度越高表示样品的还原力越强, 抗氧化效果越好。从图 1 实验结果可以看出随着溶剂极性的增加松生等还原力逐渐增强, 质量浓度为 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其还原能力几乎接近于 VC。

用 Fenton 反应法^[10]产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)。

H_2O_2/Fe^{2+} 体系可通过 Fenton 反应产生经自由基化学反应如下: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ 用 $\cdot OH$ 氧化水杨酸产生有色物质,该产物在 510 nm 处有强吸收峰,若体系中加入清除 $\cdot OH$ 的物质,则会减少有色物质的生成,吸收度降低。吸光度越低,清除 $\cdot OH$ 效果越好。图 2 表明随着溶剂极性的增加松生等对 $\cdot OH$ 的清除能力逐渐增强,质量浓度为 $1.0 g \cdot L^{-1}$ 时其对 $\cdot OH$ 的清除能力达到 60%。

DPPH 是一种很稳定的氮中心的自由基,他的稳定性主要来自共振稳定作用的 3 个苯环的空间障碍,使夹在中间的氮原子上不成对的电子不能发挥其应有的电子成对作用。DPPH 法^[11-12]于 1958 年被提出,广泛用于地量测定生物试样分类物质好和食品的抗氧化能力。此法是根据 DPPH 自由基有单电子,在 517 nm 处有一强吸收,其醇溶液呈紫色的特性当有自由基清除剂存在时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系,因而可用分光光度计进行快速的定量分析。

本文采用普鲁士蓝法、Fenton 法和 DPPH 法对松生等的不同极性溶剂提取组分体外还原能力和抗氧化活性进行了较为全面的研究,从实验结果可以看出,各组分均有不同程度的还原力和清除作用,且中大极性(乙酸乙酯、正丁醇、乙醇)的提取物还原和清除能力比较强,在浓度达到 $1.0 g \cdot L^{-1}$ 时,其还原能力几乎接近于 VC 且抗氧化作用也均大于 60%。可见松生等的还原力和抗氧化成分主要集中在中大极性的部分,这将为进一步研究该药材的活性物质提供了实验依据,同时,本文对松生等的各组分还原力及抗氧化作用进行了定量研究,确定了各组分清除 50% 自由基时的样品浓度,发现中大极性提取部分 IC_{50} 值很接近,进一步证明松生等还原力和抗氧化部位主要集中在中大极性溶液中,为该植物的物质分离及应用提供研究基础。

[参考文献]

- [1] 倪志成. 西藏经济植物[M]. 北京:北京科学出版社, 1990:409.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:405.
- [3] 潘勤,杨培全,陈桂红,等. 藏药“生等”的化学成分研究(I)[J]. 中草药, 1998, 29(2):76.
- [4] 姜继祖,杨培全,廖周坤,等. 藏药“生等”中墨沙酮成分的超临界 CO_2 萃取工艺研究[J]. 华西药学杂志,1997,12(1):35.
- [5] 彭军鹏,乔艳秋,张显志,等. 西藏猫乳活性成分研究[J]. 中国药物化学杂志,1996,6(2):114.
- [6] 潘勤,杨培全,陈桂红,等. 藏药“生等”的化学成分研究(第 2 报)[J]. 华西药学杂志, 1997, 12(3):153
- [7] Kriengsak T, Unaraj B, Kevin Crosby, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. J Food Compos Anal, 2006,19:669.
- [8] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts[J]. Food Chem, 2007, 104(1):21.
- [9] 王仪薇,梁日欣,杨滨,等. 茶叶、槐米、金荞麦、红花醇提取物的抗氧化活性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009, 15(2):58.
- [10] 贾之慎,邬建敏,唐孟成. 比色法测定 Fenton 反应产生的自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2):184.
- [11] 董秀英,吕青涛,张国英,等. DPPH 法测定九州虫草不同极性部位抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):70.
- [12] 杨鸿,吴彦,马琰岩,等. 具抗氧化活性的中药有效组分的配伍研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12):1826.

[责任编辑 聂淑琴]