

蛇床子不同溶剂提取物抗氧化活性研究

孙凤¹, 吴宇红¹, 刘亚亚², 王强^{2*}

(1. 新疆医科大学第六附属医院, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆大学理化测试中心, 乌鲁木齐 830046)

[摘要] 目的:研究蛇床子不同溶剂提取物的抗氧化活性。方法:采用索氏提取法得到蛇床子甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷和正己烷提取物,并测定了4种提取物总酚、总黄酮含量。通过测定提取物对二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)自由基的清除能力和还原能力来研究其抗氧化能力。结果:蛇床子不同溶剂提取物均具有良好的抗氧化活性,其中甲醇提取物抗氧化能力最强;抗氧化性能与提取物总酚和总黄酮含量存在着明显的量效关系。结论:蛇床子提取物具有作为天然抗氧化剂的开发潜能。

[关键词] 蛇床子; 溶剂提取; 抗氧化活性;

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0292-03

[doi] 10.11653/syjf2013190292

Studies on Antioxidant Activity of Different Solvent Extracts from Fruit of *Cnidium monnieri*

SUN Feng¹, WU Yu-hong¹, LIU Ya-ya², WANG Qiang^{2*}

(1. Department of Medicine, Sixth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China;
2. Center for Physical and Chemical Analysis, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activities of several extracts of *Cnidium monnieri*. **Method:** The methanol, ethyl acetate, methylene chloride and n-hexane extracts were obtained by Soxhlet extraction techniques. The antioxidant activities were studied using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay, nitrogen base-double-(3-ethyl benzene and dihydrogen thiazole moiety-6-sulfonic acid) ammonium salt (ABTS) assay and reducing power assay, and the total phenolic content and the total flavonoid were measured. **Result:** Different extracts of *C. monnieri* had better antioxidant activities, and the most outstanding one was found to be the methanol extract. The antioxidant activity of *C. monnieri* was concerned with the quantity of the total phenolic and the total flavonoid of extracts. **Conclusion:** The fruit of *C. monnieri* can be employed as natural antioxidants.

[Key words] *Cnidium monnieri*; solvent extracts; antioxidant activity

蛇床子性温,味辛苦,有小毒,可用于治疗阳痿,宫冷,寒痹腰痛,手、足癣感染等^[1-3]。药理研究表明蛇床子有抗诱变、抗肿瘤、抗心律失常等作

用^[4-5]。目前国内外对于蛇床子研究主要集中在香豆素类化合物的分离鉴定^[6],对该药材抗氧化活性研究报道较少。大量研究表明,当人体内活动产生自由基过量时,会引起衰老、肿瘤、炎症等多种病理生理现象,并与糖尿病、高血压、心脏病、癌症等疾病的发生发展相关^[7]。本研究通过分析蛇床子4种提取物对二苯代苦味酰基(DPPH),2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)自由基清除能力及还原能力来评价其抗氧化性能,为蛇床子药用机制研究及天然抗氧化剂开发提供科学依据。

1 材料

蛇床子购自新疆维吾尔自治区医药市场,经新疆药物

[收稿日期] 20130122(011)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJUEDU2011104)

[第一作者] 孙凤,主治医师,从事内分泌学、糖尿病营养学研究, Tel: 0991-8583278-8323, E-mail: xjuwq@sohu.com

[通讯作者] *王强,博士,高级工程师,从事天然药物化学、分析化学研究, Tel: 0991-8583278-8323, E-mail: xjuwq@sina.com

研究所杨伟俊博士鉴定为伞形科蛇床属植物蛇床的 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 成熟果实,标本存放于新疆药物研究所标本室。

UV-2102 PC 型紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司),FW80 型粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂),索氏提取装置(参照《中国药典》制造),LD4-2 型离心机(北京医用离心机厂)。

DPPH, ABTS 自由基均购买于 Sigma 公司。福林酚试剂参照文献自行制备^[8]; 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、抗坏血酸(Vc)、过硫酸钾、碳酸钠、铁氰化钾、没食子酸、芦丁等均为市售分析纯。

2 方法

2.1 不同溶剂提取 取 20 g 蛇床子干燥粉末放入索氏提取器中,加入 200 mL 甲醇,加热提取 4 h,将提取液减压浓缩回收溶剂,提取物真空干燥至恒重,得到甲醇提取物(CM_{MeOH})。同法,得到二氯甲烷提取物(CM_{DCM}),乙酸乙酯提取物(CM_{EA})和正己烷提取物(CM_{HE})备用,提取率依次为 19.43%, 25.67%, 22.06%, 15.45%。

2.2 DPPH 自由基的清除能力测定^[9] 将样品用无水甲醇配成一系列质量浓度,取 2 mL 不同质量浓度的样品(0.2 ~ 1.0 g·L⁻¹)加入 2 mL DPPH 甲醇溶液,混匀,室温下避光反应 30 min,在 517 nm 处测定吸光度(A)。DPPH 自由基清除率公式如下:

$$\text{清除率} = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{DPPH本底}}) \times 100\%$$

BHT 和 Vc 作为参照品。每一样品平行测 3 次,取平均值。

2.3 ABTS 自由基的清除能力测定^[10] 配制 ABTS 自由基工作液;将样品用甲醇配制成一系列质量浓度,移取 0.15 mL 不同质量浓度的样品,加入 2.85 mL ABTS 自由基工作液,混合,放置 10 min 后,在 734 nm 处测定 A。每一样品平行操作 3 次。计算清除率。计算公式与 DPPH 自由基清除率相同。BHT 和 Vc 作为参照品。

2.4 蛇床子提取物还原能力测定 移取不同质量浓度样品 2.5 mL,参照文献[11]方法于波长 700 nm 处测定 A。以蒸馏水代替样品作为空白对照。每一样品平行测 3 次,取平均值。

2.5 蛇床子提取物总酚含量测定 采用福林酚比色法测定总酚含量^[12]。准确称取一水合没食子酸(0.110 ± 0.001) g,用水溶解并定容至 100 mL,以此溶液配成质量浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg·L⁻¹ 的溶液。移取上述不同质量浓度溶液 1 mL,分别加水 5 mL、已稀释 2 倍的福林酚试液 1 mL, 7.5%

Na₂CO₃ 溶液 3 mL,显色。放置 2 h,在 765 nm 下测定 A。外标法的线性回归方程为 $Y = 0.0012X + 0.0417$ ($R^2 = 0.9991$)。吸取 1.0 mL 样品溶液,步骤同上,测定 A,再根据外标法计算出样品中总多酚含量。每一样品平行测 3 次,取平均值。

2.6 蛇床子提取物总黄酮含量测定 将芦丁对照品配制成质量浓度为 0.2 g·L⁻¹ 的标准溶液,准确移取该溶液 0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 于 10 mL 具塞试管中,参照文献[13]方法在 510 nm 下测定 A。以测定结果计算得回归方程 $Y = 0.009X + 0.0534$ ($R^2 = 0.9994$)。准确移取 2.0 mL 样品溶液,步骤同上,测定 A,根据外标法计算样品总黄酮含量。每一样品平行测 3 次,取平均值。

3 结果与讨论

3.1 蛇床子提取物抗氧化活性的测定

3.1.1 蛇床子提取物对 DPPH 自由基的清除作用 不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 见表 1。从表 1 看出,蛇床子各溶剂提取物对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,清除 DPPH 自由基能力的依次为 CM_{BHT} > CM_{Vc} > CM_{MeOH} > CM_{EA} > CM_{DCM} > CM_{HE}。极性溶剂甲醇提取物清除自由基的活性最强,可见蛇床子中清除 DPPH 自由基的抗氧化成分主要来自于极性物质。

3.1.2 蛇床子提取物对 ABTS 自由基的清除作用 表 1 为不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除作用,不同溶剂提取物自由基清除能力不同,CM_{MeOH} 表现出很强的 ABTS·⁺ 清除能力。蛇床子提取物清除 ABTS·⁺ 的能力为 CM_{MeOH} > CM_{EA} > CM_{HE} > CM_{DCM}。

表 1 蛇床子提取物清除 DPPH, ABTS 自由基能力(IC₅₀)

样品	DPPH	ABTS
CM _{MeOH}	0.604 7	7.699
CM _{EA}	5.706	13.4
CM _{DCM}	13.15	44.37
CM _{HE}	19.80	32.37
BHT	0.019 99	0.250 9
Vc	0.021 23	0.202 7

3.1.3 蛇床子提取物还原能力的测定 一般情况下,样品还原力与抗氧化活性有明显相关性^[14],还原能力越强,表明抗氧化能力越强。准确吸取不同体积样品提取液,按 1.4.4 方法测定其还原能力,结果见图 1。由图 1 所示,在测定浓度范围内,蛇床子 4 种溶剂提取物均显示出一定还原能力,且还原能力与提取物浓度呈明显量效关系,4 种不同溶剂提

取物还原能力依次为 $CM_{MeOH} > CM_{HE} > CM_{EA} > CM_{DCM}$ 。当甲醇提取物质量浓度为 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 A 可达 0.763 7。

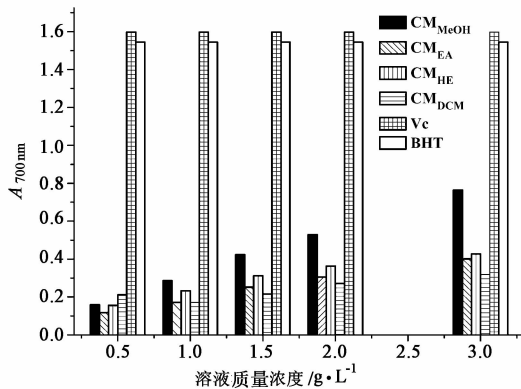


图 1 蛇床子提取物还原能力测定

3.2 蛇床子提取物总酚和总黄酮含量测定 从表 2 可知,蛇床子不同溶剂提取物总酚总黄酮含量有一定的差异。 CM_{MeOH} 中总酚、总黄酮含量明显高于其他 3 种提取物。由上述 3 个抗氧化实验得出, CM_{MeOH} 抗氧化性相对较好,同时 CM_{EA} 的抗氧化活性也要优于 CM_{DCM} 和 CM_{HE} ,因而在蛇床子的不同溶剂提取物中,酚类和黄酮类应当是其主要抗氧化活性物质。

表 2 蛇床子提取物总酚和总黄酮含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

项目	总酚含量	总黄酮含量
CM_{MeOH}	9.629	16.47
CM_{EA}	4.683	10.82
CM_{DCM}	2.791	10.77
CM_{HE}	3.763	3.315

天然植物中的抗氧化成分可能是非极性的,也可能是极性的,并且极性的程度也各不相同。因此,仅仅采用单一的溶剂提取很难对原料的抗氧化性作出全面、正确的评价。通过蛇床子不同溶剂提取物的抗氧化能力试验,发现同种溶剂提取物不同类型抗氧化能力存在一定差异,而 4 种提取物在同一个抗氧化评价指标上也有差距。其中, CM_{MeOH} 和 CM_{EA} 整体表现相对较好,这可能是由于蛇床子抗氧化物质能较多溶于极性溶剂所致。此外,尽管 BHT 及 VC 等人工合成抗氧化剂抗氧化活性较好,但其使用存在安全隐患。而天然抗氧化剂因安全性好在食品医药等方面应具有广阔的应用前景。

4 结论

结果表明,蛇床子不同极性溶剂提取物均具有良好的抗氧化性能,尤其是甲醇提取物,其还原能力和对自由基的清除效果明显。4 种提取物还原能力

及其对 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除能力有所差异,该差异与其总酚和总黄酮含量存在着较明显量效关系。蛇床子临床药效与其抗氧化活性存在一定联系,将蛇床子开发成为天然抗氧化剂应当具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Chen Q, Li P, Yuan F, et al. Identification and quantification of the volatile constituents in *Cnidium monnieri* using supercritical fluid extraction followed by GC-MS[J]. J Separation Sci, 2009,32(2):252.
- [2] Wang S J, Lin T Y, Lu C W, et al. Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals [J]. Neurochem Inter, 2008,53(6/8):416.
- [3] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997:345.
- [4] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:181.
- [5] 陈镜锋. 蛇床子的化学成分及药理作用研究[J]. 中华临床医学研究杂志,2007,13(9):1235.
- [6] 陈丹霞. 蛇床子药材质量评价的现代色谱方法学研究[D]. 上海:第二军医大学,2009.
- [7] 马养民,汪洋. 植物环烯醚萜类化合物生物活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):234.
- [8] S Jayaraman, T S Vasundhara, D B Parihar. Colorimetric determination of capsaicin in capsicum fruits with the Folin-Ciocalteu reagent [J]. Mikrochimica Acta, 1976,1:81.
- [9] 董秀英,吕青涛,张国英. 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):69.
- [10] 张伟,李昌勤,刘瑜新,等. 酸模叶蓼抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):228.
- [11] 邓超澄,霍丽妮,李培源,等. 广西阴香叶挥发油化学成分及其抗氧化性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):105.
- [12] Javanmardi J C, Stushnoff E, Locke, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions [J]. Food Chemistry, 2003,83(4):547.
- [13] 霍丽妮,李培源,邓超澄,等. 眼树莲不同极性溶剂提取物的体外抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):63.
- [14] Wu H C, Chen H M, Shiau C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003,36(9/10):949.

[责任编辑 邹晓翠]