

## 扁担藤不同极性成分抗氧化活性研究

潘乔丹\*, 熊圆圆, 陈文东, 杜清华, 蒙全玉  
(右江民族医学院, 广西百色 533000)

**[摘要]** **目的:**研究扁担藤不同极性成分体外抗氧化活性。**方法:**以抗坏血酸和茶多酚为阳性对照,采用铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)、清除羟自由基(OH·)和[2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二氨盐]自由基(ABTS<sup>+</sup>·)测定法,评价扁担藤总提取物、石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层5个不同极性成分在质量浓度为0.005~0.050 g·L<sup>-1</sup>范围内对铁离子的还原/抗氧化能力和清除OH·,ABTS<sup>+</sup>·能力。**结果:**扁担藤不同极性成分的Fe<sup>3+</sup>还原/抗氧化能力均弱于抗坏血酸,除水层外,均强于茶多酚;当浓度为0.050 g·L<sup>-1</sup>时,不同极性成分的铁离子还原/抗氧化能力为:抗坏血酸(FRAP值2 377.8) > 总提取物(FRAP值683.8) > 乙酸乙酯层(FRAP值419.8) > 石油醚层(FRAP值201.8) > 正丁醇层(FRAP值185.8) > 茶多酚(FRAP值73.8) > 水层(FRAP值63.8);乙酸乙酯层清除OH·的能力(IC<sub>50</sub> 0.028 g·L<sup>-1</sup>)均强于抗坏血酸(IC<sub>50</sub> 0.044 g·L<sup>-1</sup>)和茶多酚(IC<sub>50</sub> 0.032 g·L<sup>-1</sup>);各不同极性成分清除ABTS<sup>+</sup>·的能力均强于茶多酚(IC<sub>50</sub> 0.416 g·L<sup>-1</sup>),且乙酸乙酯层(IC<sub>50</sub> 0.008 g·L<sup>-1</sup>)强于抗坏血酸(IC<sub>50</sub> 0.011 g·L<sup>-1</sup>)。 **结论:**扁担藤具有较好的抗氧化能力,为开发功能性抗氧化剂提供科学依据。

**[关键词]** 扁担藤; 抗氧化活性; 铁离子还原/抗氧化能力法; 羟自由基(OH·); 2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二氨盐自由基测定法

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0232-04

## Antioxidant Activity of Different Polarity Chemical Constituents from *Tetrastigma planicaule*

PAN Qiao-dan\*, XIONG Yuan-yuan, CHEN Wen-dong, DU Qing-hua, MENG Quan-yu  
(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antioxidant activity of different polarity chemical constituents from *Tetrastigma planicaule*. **Method:** The capacity of ferric reducing antioxidant power (FRAP) and scavenging hydroxyl free radical (OH·) and [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical (ABTS<sup>+</sup>·) of the total extracts, petroleum ether fraction, ethylacetate fraction, n-butanol fraction and water fraction from *T. planicaule* were evaluated by FRAP assay, OH· scavenging assay, and ABTS<sup>+</sup>· scavenging assay at different concentration (0.005-0.050 g·L<sup>-1</sup>). Results were compared with that of positive control vitamin C (VC) and tea polyphenol. **Result:** First, ferric reducing antioxidant power of different polarity chemical constituents from *T. planicaule* were weaker than VC, but higher than tea polyphenol except water fraction. When the concentration of different polarity chemical constituents was 0.050 g·L<sup>-1</sup>, ferric reducing antioxidant power was as follows: VC (FRAP value 2 377.8) > total extracts (FRAP value 683.8) > ethyl acetate (FRAP value 419.8) > petroleum ether (FRAP value 201.8) > n-butanol (FRAP value 185.8) > tea polyphenol (FRAP value 73.8) > water (FRAP value 63.8). Secondly, the results demonstrated that OH· scavenging activity in ethylacetate fraction (IC<sub>50</sub> 0.028 g·L<sup>-1</sup>) was higher than VC (IC<sub>50</sub> 0.044 g·L<sup>-1</sup>) and tea polyphenol (IC<sub>50</sub> 0.032 g·L<sup>-1</sup>). Finally, different polarity chemical constituents showed higher ABTS<sup>+</sup>· scavenging activity than tea polyphenol (IC<sub>50</sub> 0.416 g·L<sup>-1</sup>), also ethylacetate fraction (IC<sub>50</sub> 0.008 g·L<sup>-1</sup>) was higher than VC (IC<sub>50</sub> 0.011 g

**[收稿日期]** 20120613(009)

**[基金项目]** 广西区教育厅科研项目(201106LX439);右江民族医学院普高学生科研项目(右医科学[2010]49号)

**[通讯作者]** \*潘乔丹,硕士学位,从事植物资源的开发利用研究,Tel:0776-2849498,E-mail:panqiao12@163.com

·L<sup>-1</sup>). **Conclusion:** *T. planicaule* has a strong antioxidative activity, which provides scientific basis for exploiting functional antioxidant.

[**Key words**] *Tetrastigma planicaule*; antioxidant activity; FRAP assay; OH·; ABTS assay

扁担藤 *Tetrastigma planicaule* (Hook.) Gagnep, 又称扁藤、大芦藤、铁带藤、过江扁龙、扁骨风、腰带藤、羊带风等,为葡萄科崖爬藤属大型木质藤本植物,分布于中国、老挝、越南、印度和斯里兰卡等地,我国主要分布于福建、广东、广西、贵州、西藏东南部。扁担藤是我国南方地区的瑶族常用药材,根、藤茎入药,主要用于治疗风湿性关节炎,风湿痹痛,腰肌劳损,肌肉及筋骨疼痛,腰腿痛,半身不遂,咳嗽,哮喘,荨麻疹,下肢溃疡等病症<sup>[1-2]</sup>。本研究采用 FRAP 法、水杨酸法和 ABTS 法,对扁担藤的抗氧化性能进行了考察。

## 1 材料

**1.1 仪器** DF-15 型台式连续投料粉碎机(温岭市林大机械有限公司),DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),HHS-21-4 型电热式恒温水浴锅(江苏金坛宏凯仪器厂),755B 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FA1104 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂)。

**1.2 药材** 扁担藤 *Tetrastigma planicaule* 2010 年 6 月采于广西靖西,由本院生物教研室黄元老老师鉴定,实验用其茎,按传统方法加工干燥后粉碎,备用。

**1.3 试剂** 三吡啶三吡嗪(tripyridyl-triazine, TPTZ, Aladdin),2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二氨盐(ABTS,生工生物公司),抗坏血酸(天津博迪化工股份有限公司),茶多酚(广州食品添加剂公司),其他化学试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 样品溶液的提取和制备** 将 0.2 kg 干燥的扁担藤粉碎,用 95% 乙醇浸泡过夜后,回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,减压浓缩干燥,得总提取物 EE(3.71 g);在分液漏斗中将扁担藤总提取物加水混悬后,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇溶剂进行萃取,蒸干,得石油醚层 PE(0.96 g)、乙酸乙酯层 EAE(0.67 g)、正丁醇层 BE(0.89 g)和水层 WE(0.37 g)的不同极性成分。取各不同极性成分样品 0.10 g,用无水乙醇稀释至 0.050 g·L<sup>-1</sup> 的溶液备用。并将各层提取物备用液用无水乙醇逐级稀释成

质量浓度为 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.040, 0.050 g·L<sup>-1</sup> 的受试溶液。

## 2.2 抗氧化活性测定

**2.2.1 总抗氧化能力的测定(FRAP 法)** 参照 Benzie<sup>[3]</sup> 和宫智勇<sup>[4]</sup> 的方法,在酸性条件下,抗氧化剂将 Fe<sup>3+</sup> TPTZ 还原成呈蓝色的 Fe<sup>2+</sup> TPTZ,其在 593 nm 处有强吸收。具体操作为:取 1.5 μL 不同浓度 FeSO<sub>4</sub> 溶液,加入 1.5 mL 的 FRAP 工作液,37 °C 水浴 1 h,以醋酸钠调零,在 593 nm 下测吸光度(A),绘制标准曲线。分别移取质量浓度为 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050 g·L<sup>-1</sup> 的各不同极性成分受试溶液 1.0 mL 于试管中,加入 1.0 mL FRAP 工作液,以溶剂代替样品加入 FRAP 工作液做空白,测吸光度 A,各组实验组均做 3 次平行,取均值。根据反应后的 A,在标准曲线上求得相应 FeSO<sub>4</sub> 的浓度(μmol·L<sup>-1</sup>),定义为 FRAP 值。FRAP 值越大,抗氧化活性越强。

**2.2.2 清除羟自由基(OH·)能力的测定(水杨酸法)** 利用 Fenton 反应法产生 OH·,OH·与水杨酸反应产生有色物质,该产物在 λ<sub>510</sub> 有强吸收峰。若体系中加入清除 OH·的物质,则会减少有色物质生成,吸光度降低<sup>[5-6]</sup>。具体操作为:分别移取质量浓度为 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 g·L<sup>-1</sup> 的各不同极性成分受试溶液 2.0 mL 于试管中,加入 1.0 × 10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> 1.0 mL, 1.0 × 10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup> 水杨酸-乙醇溶液 2.0 mL,最后加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.0 mL 启动反应,于室温下反应 1 h。以蒸馏水调零,测 λ<sub>510</sub> 样品的吸光度。考虑到试剂与提取物溶液的协同增色效应,以蒸馏水 2.0 mL 替代 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.0 mL,其他试剂与样品组相同。每份样品平行操作 3 次,取均值,计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_1')}{A_0} \times 100\%$$

式中:A<sub>0</sub>-以溶剂代替样品液的吸光度;A<sub>1</sub>-样品组的吸光度;A<sub>1</sub>'-蒸馏水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的空白对照组吸光度。

**2.2.3 清除 ABTS<sup>+</sup>·能力的测定(ABTS 法)** 参考 Re 等<sup>[7-8]</sup> 的方法,并作适当修改。配制 ABTS<sup>+</sup>·储备液:配制 2.45 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>,用 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 溶液溶解 ABTS,配成 7 mmol·L<sup>-1</sup> ABTS<sup>+</sup>·储备液,在室

温、避光条件下静置 12 ~ 16 h, 这种储备液可稳定 3 ~ 4 d。配制 ABTS<sup>+</sup>·测定液: 将 ABTS<sup>+</sup>·储备液以磷酸盐缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 稀释, 使其吸光度在 734 nm 波长处达到 0.700 ± 0.020。测定: 分别移取质量浓度为 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 g·L<sup>-1</sup> 的各不同极性成分受试溶液 2.0 mL 于试管中, 各试管中加入 4.0 mL ABTS<sup>+</sup>·测定液, 准确振荡 30 s, 测定反应一定时间后 734 nm 波长处的吸光度, 每份样品平行操作 3 次, 取均值, 计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: A<sub>0</sub>-ABTS<sup>+</sup>·测定液的吸光度; A<sub>1</sub>-样品组的吸光度。

**2.2.4 半清除率浓度计算** 根据回归方程计算清除率为 50% 时的浓度(IC<sub>50</sub> g·L<sup>-1</sup>)。

### 3 结果

**3.1 总抗氧化能力测定** 由图 1 可知, 在 593 nm 处 FeSO<sub>4</sub> 浓度与吸光度在一定范围内呈线性剂量关系, 线性回归方程为: Y = 0.000 5X - 0.009 9 (r = 0.998 9)。根据不同极性成分反应后 A, 在标准曲线上求得相应 FeSO<sub>4</sub> 的浓度(μmol·L<sup>-1</sup>), 定义为 FRAP 值。

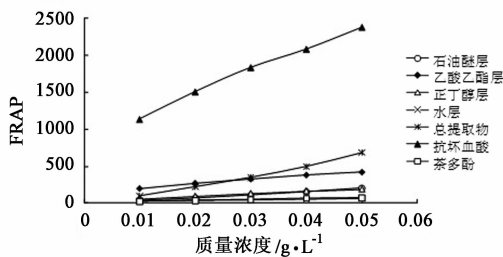
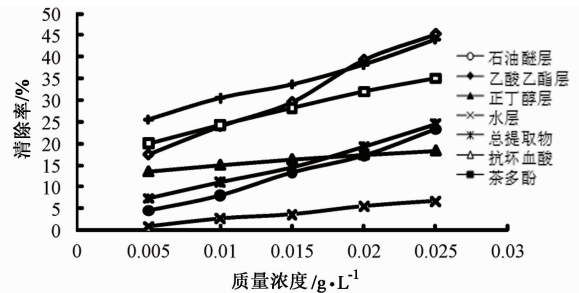


图 1 不同极性成分的 FRAP 值比较

从图 1 可以看出, 在实验浓度范围内, 扁担藤不同极性成分的 FRAP 值与浓度呈量效关系(r 均 >

0.99)。FRAP 值越大, 其抗氧化活性越强。浓度改变, 扁担藤不同极性成分强弱也相应地改变。浓度为 0.01 ~ 0.02 g·L<sup>-1</sup> 时, Fe<sup>3+</sup> 还原抗氧化能力强弱顺序为: 抗坏血酸 > 乙酸乙酯层 > 总提取物 > 正丁醇层 > 石油醚层 > 水层 > 茶多酚; 质量浓度为 0.03 ~ 0.05 g·L<sup>-1</sup> 时, Fe<sup>3+</sup> 还原抗氧化能力顺序为: 抗坏血酸最强, 总提取物、乙酸乙酯层、正丁醇层、石油醚层、茶多酚次之, 水层最弱; 当质量浓度为 0.05 g·L<sup>-1</sup> 时, Fe<sup>3+</sup> 还原抗氧化能力顺序为: 抗坏血酸 (FRAP 2 377.8) > 总提取物 (FRAP 683.8) > 乙酸乙酯层 (FRAP 419.8) > 石油醚层 (FRAP 201.8) > 正丁醇层 (FRAP 185.8) > 茶多酚 (FRAP 73.8) > 水层 (FRAP 63.8)。由此可见, 除水层外, 其余各不同极性成分的 Fe<sup>3+</sup> 还原抗氧化能力均大于茶多酚。

**3.2 清除 OH·作用** OH·可以与生物体内的多种分子作用, 是对生物体毒性很强的一种自由基。对 OH·清除率是反映活性物质抗氧化能力的重要指标<sup>[9]</sup>。水杨酸法清除自由基能力的测定结果及 IC<sub>50</sub> 见图 2, 表 1。



A. 1.4 μm-1.2 MPa; B. 2.8 μm-10 MPa; C. 5.2 μm-0.6 MPa

图 1 不同极性成分清除 OH·作用 (×10 000)

由图 2 可以看出, 扁担藤不同极性成分对 OH·都表现出一定程度的清除能力, 并在实验浓度范围内呈明显的量效关系, 且清除率均不超过 50%。与

表 1 不同极性成分的抗氧化活性

样品	水杨酸法			ABTS 法		
	线性回归方程	r	IC <sub>50</sub> /g·L <sup>-1</sup>	线性回归方程	r	IC <sub>50</sub> /g·L <sup>-1</sup>
石油醚层	Y = 928.8X - 0.666	0.995 9	0.055	Y = 624.8X - 2.244	0.998 3	0.084
乙酸乙酯层	Y = 1 415.4X + 9.831	0.996 1	0.028	Y = 3 404.8X + 21.624	0.963 1	0.008
正丁醇层	Y = 239X + 12.555	0.995 1	0.157	Y = 1 856.2X - 3.871	0.998 6	0.029
水层	Y = 284X - 0.372	0.995 6	0.177	Y = 630.4X + 14.232	0.995 0	0.057
总提取物	Y = 853.8X + 2.543	0.996 0	0.056	Y = 1 063X - 0.059	0.998 0	0.047
抗坏血酸	Y = 754X + 16.59	0.998 0	0.044	Y = 5 831X - 15.305	0.999 1	0.011
茶多酚	Y = 894X + 20.95	0.995 4	0.032	Y = 121X - 0.391	0.996 7	0.416

对照品抗坏血酸和茶多酚相比,在一定浓度范围内,乙酸乙酯层清除率都小于两对照品,随着实验浓度的增大,因乙酸乙酯层清除率的增大相较于两对照品明显,达一定浓度时清除率超过两种对照品。根据试样浓度与  $\text{OH}\cdot$  清除率的线性回归方程( $r$  值均  $>0.99$ ) 求出  $\text{IC}_{50}$  (表 1)。由  $\text{IC}_{50}$  及其与清除能力大小成负相关(即  $\text{IC}_{50}$  越小则清除能力越强)的关系,可知各不同极性成分对  $\text{OH}\cdot$  的清除能力顺序为:乙酸乙酯层  $>$  茶多酚  $>$  抗坏血酸  $>$  石油醚层  $>$  总提取物  $>$  正丁醇层  $>$  水层。可见,扁担藤乙酸乙酯层对  $\text{OH}\cdot$  的清除能力强于对照品抗坏血酸和茶多酚。

**3.3 清除  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  作用** ABTS 法清除自由基能力的测定结果及半数抑制率,分别见图 3,表 1。

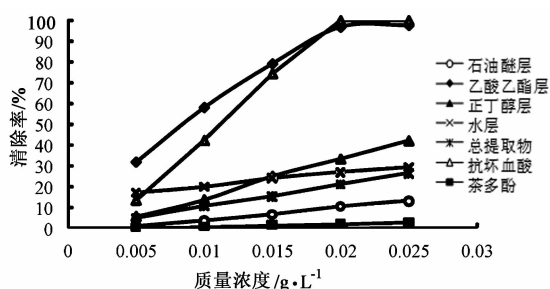


图 2 不同极性成分清除  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  自由基作用

扁担藤不同极性成分对  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  都表现出一定程度的清除能力,并在实验浓度范围内呈明显的量效关系。在质量浓度为  $0.005 \sim 0.015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,乙酸乙酯层对  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的清除率均超过抗坏血酸,随着浓度的增大,抗坏血酸对  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的清除率不断加大,而抗坏血酸质量浓度在  $0.020 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时对  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的清除率已达 100%,当浓度再增大时,其清除率保持不变。根据试样浓度与  $\text{OH}\cdot$  清除率的线性回归方程(除乙酸乙酯层外,其余  $r$  均  $>0.99$ ),求出  $\text{IC}_{50}$  (表 1)。由  $\text{IC}_{50}$  及其与清除能力大小成负相关的关系,可知各不同极性成分对  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的清除能力顺序为:乙酸乙酯层  $>$  抗坏血酸  $>$  正丁醇层  $>$  总提取物  $>$  水层  $>$  石油醚层  $>$  茶多酚。

#### 4 讨论

研究表明,自由基和人类多种疾病有着密切的关系。当机体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降时,这些自由基对 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子产生氧化损伤作用,引起机体组织器官发生各种病变。因此增强机体清除自由基的能力,可以预防和治疗与自由基相关的疾病<sup>[10-12]</sup>。

本文采用 FRAP 法、水杨酸法和 ABTS 法对扁担藤不同极性成分进行体外抗氧化活性研究,通过比较 FRAP 值和  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的  $\text{IC}_{50}$  值大小判断其  $\text{Fe}^{3+}$  还原抗氧化能力和对  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的清除能力,并与抗坏血酸和茶多酚两种常用的抗氧化剂相比较。结果表明,除水层外,其余各不同极性成分的  $\text{Fe}^{3+}$  还原抗氧化能力均大于茶多酚;乙酸乙酯层清除  $\text{OH}\cdot$  的能力均大于抗坏血酸和茶多酚;各不同极性成分清除  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  的能力均大于茶多酚,且乙酸乙酯层强于抗坏血酸。

#### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1986:1744.
- [2] 覃迅云,罗金裕,高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京:民族出版社,2002:141.
- [3] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power; the FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239(3): 70.
- [4] 宫智勇,方敏,王耀峰,等. 番茄乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2008(8): 31.
- [5] Zheng W, Wang S Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, blackberries, chokeberries and ingonberries [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(2): 502.
- [6] 周向军,高义霞,袁毅君,等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.
- [7] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biol Med, 1999, 26(9/10): 1231.
- [8] 霍丽妮,廖艳芳,陈睿,等. 狐狸尾不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 155.
- [9] 黄凌,黎继烈,杨杰,等. 宽叶缙草醚酯提取物体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2214.
- [10] 赵克然,杨毅军,曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:48.
- [11] 罗超,刘露明,邢惟青,等. 石参总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 198.
- [12] 韦霄,黄兴贤,蒋运生,等. 3种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 639.

[责任编辑 聂淑琴]