

## 灯盏细辛的抗氧化活性研究

党翠芝<sup>1</sup>, 黄小燕<sup>1\*</sup>, 杨庆雄<sup>2</sup>, 艾俊丽<sup>1</sup>, 田猛<sup>1</sup>

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州师范大学化学与材料科学学院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的:研究灯盏细辛6个化合物的抗氧化活性。方法:以灯盏细辛为原料,采用有机溶剂提取法和色谱柱法对灯盏细辛中化学成分进行提取与分离,利用核磁共振等波谱学方法进行结构鉴定,体外法检测6个化合物对1-二苯基-2-苦味酰肼自由基清除法(DPPH),2,2'-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基清除法(ABTS),O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基和·OH自由基的清除能力,并以维生素C(Vc)为阳性对照,结果:6个化合物对DPPH,ABTS,O<sub>2</sub><sup>-</sup>·,·OH自由基均具有清除作用,且与浓度呈良好的量效关系,6个化合物清除自由基能力与Vc相似。结论:灯盏细辛中的6个化合物均具有较强的抗氧化活性。

**[关键词]** 灯盏细辛; 自由基; 清除能力; 抗氧化活性

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0100-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1745.036.html>

**[网络出版时间]** 2012-07-04 17:45

## Antioxidant Activity of Constituents from *Erigeron breviscapus*

DANG Cui-zhi<sup>1</sup>, HANG Xiao-yan<sup>1\*</sup>, YANG Qing-xiong<sup>2</sup>, AI Jun-li<sup>1</sup>, TIAN Meng<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Guiyang 550001, China;

2. School of Chemistry and Material Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**[收稿日期]** 20120401(012)

**[基金项目]** 贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外G字[2010]7023);贵州师范大学生命科学学院

**[第一作者]** 党翠芝, 硕士, 从事中药资源活性分析研究, Tel: 13511940971, E-mail: dangcuizhi1986@163.com

**[通讯作者]** \*黄小燕, 硕士, 教授, 从事植物学的研究, Tel: 13984043718, E-mail: huangxy666@126.com.com

- [9] Bojana Boh, Marin Berovic, Jingsong Zhang, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds [J]. *Biotechnology Annual*, 2007 (13): 265.
- [10] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展[J]. *药学报*, 1990, 25(12): 940.
- [11] 叶波平, 王庆华, 周书进, 等. 灵芝蛋白质的分离及其免疫活性研究[J]. *药物生物技术*, 2002, 9(3): 150.
- [12] 陈勇, 曾萍, 温庆伟, 等. 灵芝配方颗粒中麦角甾醇的含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(12): 53.
- [13] Martha B A, Mainul H, Raunel T, et al. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass [J]. *J Microbiological Methods*, 2002 (50): 227.
- [14] Yuan Jian-Ping, Wang Jiang-Hai, Liu Xin, et al. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC [J]. *Food Chem*, 2007(105): 1755.
- [15] 胡斌杰, 景中建, 郝喜才. 灵芝不同部位多糖含量测定[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(6): 129.
- [16] 黄晓兰, 吴惠勤, 黄芳, 等. 破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的分析[J]. *中草药*, 2006, 37(6): 813.
- [17] 史俊青, 张丽萍, 杨春清, 等. 不同品种灵芝多糖含量差异研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13): 104.
- [18] 李保明, 刘超, 王洪庆, 等. 灵芝总三萜酸含量测定方法的研究[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(12): 1234.
- [19] 宋师花, 贾晓斌, 陈彦, 等. 超临界CO<sub>2</sub>萃取灵芝子实体中的三萜类成分[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(17): 2104.
- [20] 刘京晶, 黄文华, 吕明亮, 等. HPLC法测定不同品种及段木栽培灵芝子实体中麦角甾醇含量[J]. *中药材*, 2011, 34(2): 187.
- [21] 黄生权. 赤灵芝多糖的提取分离、结构分析与生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

[责任编辑 邹晓翠]

[ **Abstract** ] **Objective:** To study the antioxidant activity of 6 compounds isolated from *Erigeron breviscapus*. **Method:** Compounds were isolated and acquired from *E. breviscapus* through the methods of organic solvent extraction and chromatography, and identified by the spectrum of NMR (nuclear magnetic resonance). The scavenging activities of all these compounds against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) radicals, 2, 2'-amino-di (2-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt (ABTS) radicals,  $O_2^- \cdot$  and  $\cdot OH$  radicals were evaluated by *in vitro* method and compared with Vc as positive control. **Result:** All the six compounds have scavenging capability against DPPH radicals, ABTS radicals,  $O_2^- \cdot$  and  $\cdot OH$  radicals and have a good dose-responses relationship with the concentration. The differences between the free radical scavenging capacity of six compounds and Vc are were significant. **Conclusion:** Six pounds isolated from *E. breviscapus* have the stronger antioxidant activity.

[ **Key words** ] *Erigeron breviscapus*; free radicals; scavenging activity; antioxidant activity

灯盏花又名灯盏细辛,系菊科植物短亭飞蓬的干燥全草,性寒、味苦、微辛,具有散寒解表、祛风除湿、活络止痛之功效<sup>[1]</sup>,临床主要用于治疗脑血栓形成、脑栓塞等<sup>[2-3]</sup>,主要分布在云南、广西、贵州、湖南、西藏等地。近年来研究证实,灯盏花含有二甲啡酰奎宁酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、丁香酸及灯盏花素、芹菜素、高黄芩素黄酮<sup>[4]</sup>。酚酸与黄酮类化合物具有保护心脑血管、抗菌消炎、抗辐射和抗肿瘤等活性,而这些疾病的产生很大程度上与体内活性氧的代谢失调有关<sup>[5]</sup>。因此,笔者采用1-二苯基-2-苦味酰肼自由基清除法(DPPH)<sup>[6]</sup>,超氧阴离子法( $O_2^- \cdot$ )<sup>[7]</sup>,2, 2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)自由基清除法(ABTS)<sup>[8]</sup>和羟基自由基( $\cdot OH$ )法,体外评价从灯盏细辛中分离出的6种化合物清除自由基的能力,从单体化合物的角度探讨灯盏细辛的药用机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 灯盏细辛植物采自云南弥勒,由中国科学院昆明植物研究所杨崇仁研究员鉴定 *Erigeron breviscapus*(Vant.)Hand.-Mazz.。

**1.2 仪器** 400 MHz 核磁共振仪,硅胶(山东青岛海洋化工厂),薄层色谱硅胶板(山东青岛海洋化工厂),MCI-HP20(日本三菱),UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津有限公司),电子天平(美国丹佛)。

**1.3 试剂** DPPH(日本东京化成工业株式会社),ABTS、邻二氮菲均为Sigma公司产品,邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硫酸亚铁、抗坏血酸、溶剂均为国产分析纯试剂。

## 2 方法

**2.1 样品制备** 干燥灯盏细辛药材经粉碎后,用70%乙醇热回流提取3次,合并提取液,回收溶剂,

得灯盏细辛提取物。提取物经水乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯回收溶剂得浅棕色粉末,粉末经硅胶柱层析,氯仿-甲醇(1:10~1:1)洗脱,得到3个部分。此3个部分分别经葡聚糖凝胶SephadexLH-20,MCI-HP20和ODS等不同色谱材料的色谱反复分离,分离得6个化合物分别编号为I,II,III,IV,V,VI。经<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR数据分析,与文献数据对比,部分与已知对照品经HPLC分析比对,均为已知化合物。

## 2.2 抗氧化活性研究

**2.2.1 测定化合物对DPPH自由基的清除能力** 参考Larrauri和Yokozawa等<sup>[9-10]</sup>的方法,利用DPPH溶液的特征紫红色的吸收峰,以分光光度法测定加样品后的吸光度(A)。将样品及阳性对照品用95%乙醇配制成一系列质量浓度,取200 μL不同质量浓度的样品加入200 μL DPPH乙醇溶液(50 mg·L<sup>-1</sup>),混合40 min后测定518 nm处A。每份样品平行操作3次。计算自由基清除率(Y):

$$Y = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中A<sub>0</sub>为DPPH溶液与95%乙醇混合后的吸光度;A<sub>1</sub>为DPPH溶液与样品混合后的吸光度;A<sub>2</sub>为95%乙醇和200 μL待测样品溶液混合后的吸光度。

**2.2.2 测定化合物对ABTS自由基的清除能力** 参考文献[11-12],配制7 mmol·L<sup>-1</sup>ABTS自由基工作母液。将7 mmol·L<sup>-1</sup>ABTS和2.45 mmol·L<sup>-1</sup>的高硫酸钾混合,在室温、避光的条件下静置过夜,将生成ABTS自由基溶液用95%乙醇稀释,使其在30℃,734 nm波长下的A为(0.7±0.02),即得到ABTS自由基工作液。将样品及对阳性照品用95%乙醇配制成一系列质量浓度,取100 μL样品加入400 μL ABTS自由基工作液,混合,放置10 min后,

在 734 nm 处测定  $A$ 。每份样品平行操作 3 次, 计算自由基清除率( $Y$ ):

$$Y = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中  $A_0$  为 ABTS 溶液与 95% 乙醇混合后的吸光度;  $A_1$  为 ABTS 溶液与样品混合后的吸光度。

**2.2.3 测定化合物对·OH 自由基清除能力<sup>[13]</sup>** 取 0.75 mmol·L<sup>-1</sup> 邻二氮菲 0.05 mL 加 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (PBS 液) 0.2 mL 加 0.1 mL 待测液 (样品及对照品用 95% 乙醇配制成不同质量浓度) 于离心管中混匀后, 再加入 0.05 mL 0.75 mmol·L<sup>-1</sup> 硫酸亚铁液混匀, 最后取 0.1 mL 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液后混匀于 37 °C 温育 60 min, 95% 乙醇代替邻苯三酚为空白, 536 nm 处测定吸光度为  $A_0$ 。每份样品平行操作 3 次, 计算自由基清除率( $Y$ ):

$$Y = (A_0 - A_1) / (A_2 - A_1) \times 100\%$$

式中  $A_1$  为 95% 乙醇代替待测液的吸光度;  $A_2$

为 95% 乙醇代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 光度的吸光度。

**2.2.4 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基产生及清除<sup>[14]</sup>** 取 2.45 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 于离心管中, 于 25 °C 恒温 20 min, 分别加入 0.1 mL 不同浓度的样品 (样品及对照品用 95% 乙醇配制成不同浓度), 再加入 0.05 mL (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 邻苯三酚, 迅速摇匀后每隔 30 s, 用紫外-可见分光光度计于 325 nm 处测定相应吸光度值, 至 3 min, 以 10 mmol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液为参比液。每份样品平行操作 3 次, 取 3 次试验的平均值计算。

$$\text{清除率 } Y = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中  $A_0$  为加邻苯三酚但不加样品的吸光度;  $A_1$  为加邻苯三酚和样品的吸光度;  $A_2$  为不加邻苯三酚只加样品的吸光度。

### 3 结果与分析

**3.1 6 个化合物的结构鉴定** 见图 1。

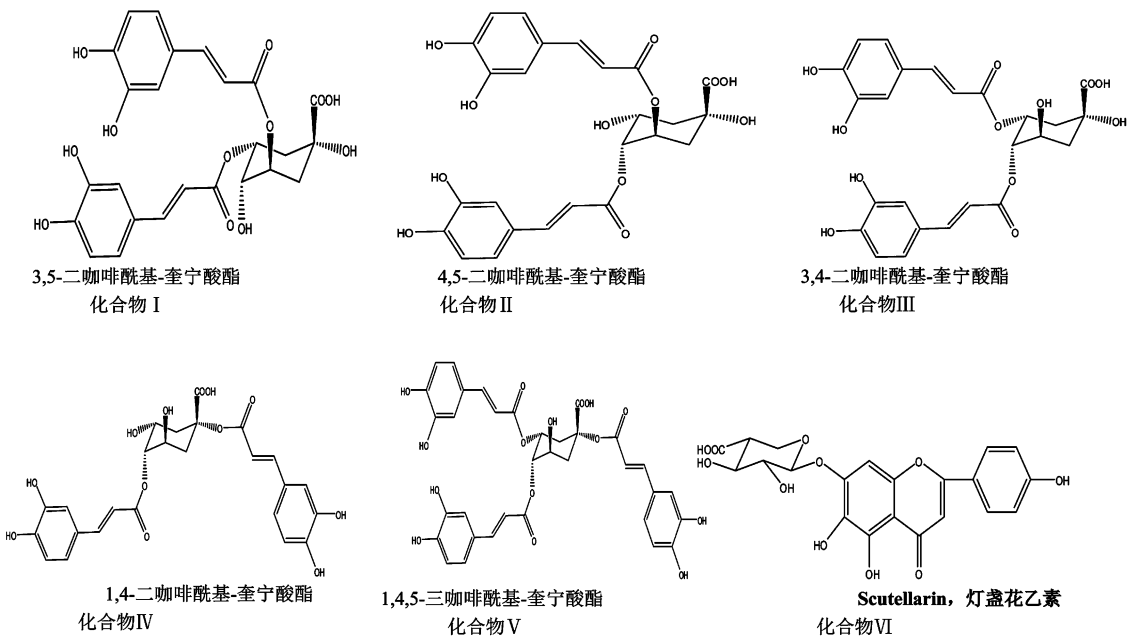


图 1 灯盏细辛 6 个化合物的结构鉴定

**3.2 DPPH 自由基的清除能力** 灯盏细辛提取的化合物 I ~ VI 化合物对 DPPH 自由基的清除能力见表 1。其中化合物 II 号 [IC<sub>50</sub> = (5.66 ± 0.15) mg·L<sup>-1</sup>] 的半数清除率浓度最小, 即对 DPPH 自由基的清除能力最强, Vc 是常用的抗氧化剂, 从表 1 可见, 灯盏细辛提取物 I ~ VI 对 DPPH 自由基的清除能力与 Vc [IC<sub>50</sub> = (7.51 ± 0.68) mg·L<sup>-1</sup>] 相当。

**3.3 ABTS 自由基的清除结果** 灯盏细辛提取物化合物 I ~ VI 化合物对 ABTS 自由基均具有较好的清除作用, 结果见表 1。其中化合物 V 的半数清除

率浓度最小 [IC<sub>50</sub> = (9.74 ± 0.47) mg·L<sup>-1</sup>], 即对 ABTS 自由基的清除能力最强。与阳性对照品 Vc 清除自由基能力相当, 清除 ABTS 自由基的能力最弱的为 VI [IC<sub>50</sub> = (29.36 ± 0.09) mg·L<sup>-1</sup>]。

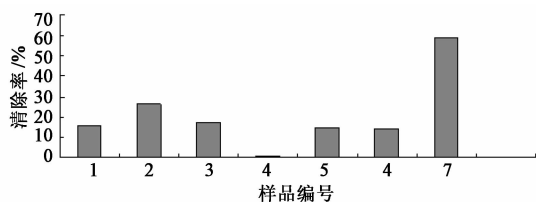
**3.4 ·OH 自由基的清除结果** Vc 和灯盏细辛提取样品溶液对·OH 自由基的清除效果见表 1, 比较可知 II 对羟基自由基的清除效果最强 [IC<sub>50</sub> = (5.11 ± 0.05) mg·L<sup>-1</sup>], 相对较弱的为 VI [IC<sub>50</sub> = (14.00 ± 0.18) mg·L<sup>-1</sup>], 从灯盏细辛提取出的 6 个化合物对·OH 自由基清除活性均比 Vc [IC<sub>50</sub> = (46.81 ±

表1 灯盏细辛6个样品与对照品清除自由基的半数抑制率( $\bar{x} \pm s$ )

化合物	IC <sub>50</sub> /mg·L <sup>-1</sup>		
	DPPH	ABTS	·OH
I	6.66 ± 0.02	11.36 ± 0.07	6.19 ± 0.88
II	5.66 ± 0.15	11.98 ± 0.45	5.11 ± 0.05
III	6.31 ± 0.08	12.34 ± 0.58	5.78 ± 0.32
IV	6.57 ± 0.75	11.60 ± 0.87	5.37 ± 0.22
V	5.82 ± 0.66	9.74 ± 0.47	6.56 ± 0.15
VI	17.11 ± 0.51	29.36 ± 0.09	14.00 ± 0.18
Vc	7.51 ± 0.68	10.45 ± 0.04	46.81 ± 0.32

0.32) mg·L<sup>-1</sup>]强。

**3.5 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基的清除结果** 由图2可知,灯盏细辛提取物抗氧化活性都不如Vc。6个化合物相比较II号样品的清除能力比其他几个略强。



1~6. 灯盏细辛6个化合物;7. Vc

图2 灯盏细辛6个样品与对照品清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基的能力

#### 4 讨论

6种化合物对DPPH自由基、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基、·OH自由基和ABTS自由基均有较强的清除能力,且在一定的质量浓度范围内,化合物对自由基的清除率存在显著的量效关系。II样品对DPPH自由基、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·自由基、·OH自由基的清除能力最强,这与其具有多个酚羟基结构有关。V号样品对ABTS自由基的清除能力略强,由于应用体外抗氧化体系所用自由基诱导剂的性质和剂量各异,检测结果出现一定的差异。灯盏细辛中的各种天然抗氧化成分往往具有协同效应,这一因素也会影响其抗氧化活性。

自由基生物学研究认为,许多疾病与自由基导致的生物大分子如蛋白质、脂质以及DNA损伤有关。摄取天然抗氧化剂可有效的减少与衰老相关的疾病如肿瘤、心血管疾病、糖尿病等很多疾病的发生率<sup>[15]</sup>。酚类化合物是灯盏细辛的主要抗氧化成分之一,中药灯盏细辛中大量存在的富含酚羟基的化合物通过清除过剩自由基而对多种疾病起到预防和治疗作用,并且含酚羟基化合物的抗氧化活性与其结构密切相关,活性大小主要取决于酚羟基的数目。因此,灯盏细辛是极有潜力的天然抗氧化剂资源,具有广泛的开发前景。

#### [参考文献]

- [1] 方睿,杜树山. 灯盏花素制剂研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):233.
- [2] 张晓莉,刘四海,周芳,等. 灯盏花的药理活性研究[J]. 四川生理科学杂志,2008,30(2):75.
- [3] 吴俊珠,严亚,高鹏飞. 灯盏花素吸收与促进吸收策略的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):219.
- [4] 周玲,谢丽艳,徐洁,等. HPLC同时测定灯盏细辛注射液中6种主要成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):78.
- [5] Yue J M, Lin Z W, Wang D Z. A sesquiterpene and other constituents from *Erigeron breviscapus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3):717.
- [6] 唐于平,姜玮,宋树霖,等. 活血化瘀方清除DPPH自由基活性量效关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):142.
- [7] 姚卫峰,陈汀,张丽,等. 女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):162.
- [8] 李培源,霍丽妮,苏炜,等. 总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS)法测定江南星蕨的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):138.
- [9] Larrauri J A, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels[J]. *J Agr Food Chem*, 1998, 46(7):26942.
- [10] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of teal [J]. *J Agr Food Chem*, 1998, 46(6):21432.
- [11] Re R, Pellegrini R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26(1):1231.
- [12] Li G, Min B S, Zheng C, et al. Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenla dulcis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 7(28):804.
- [13] 焦士蓉,王玲,林玲. 藜叶中黄酮类化合物体外抗氧化活性研究[J]. 西北大学学报:自然科学版,2007,26(4):36.
- [14] 何玲玲,王新,石中亮,等. 水提板栗壳色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 食品与机械,2006,22(6):56.
- [15] 刘晓丽,霍展祥,张金莲. 盐酸川芎嗪体外抗氧化作用的研究 [J]. 中国航天医药杂志,2003,5(2):37.

[责任编辑 邹晓翠]