

金铁锁体外抗氧化活性研究

袁琳¹, 马银海¹, 尹震花², 王微², 顾雪竹³, 康文艺^{2*}

1. 昆明学院 化学科学与技术系, 昆明 650214; 2. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004;
3. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究金铁锁体外抗氧化活性。方法: 采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除[2, 2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基及铁离子还原/抗氧化能力(FRAP)测定法, 对金铁锁体外抗氧化活性进行评价, 并阳性对照没食子酸丙酯(PG)、丁基羟基茴香醚(BHA)和二丁基羟基甲苯(BHT)比较。结果: 金铁锁 3 个提取物体外抗氧化活性均弱于阳性对照 PG, BHA, BHT。在 3 个提取物中, 金铁锁乙酸乙酯提取物清除 ABTS 自由基(IC₅₀ = 40.54 mg·L⁻¹)及还原 Fe³⁺ 的能力[TEAC = (696.9 ± 2.42) μmol·g⁻¹]较强; 正丁醇清除 ABTS 自由基(IC₅₀ = 83.38 mg·L⁻¹)及还原 Fe³⁺ 的能力[TEAC = (166.1 ± 1.06) μmol·g⁻¹]次之, 石油醚提取物最弱。结论: 金铁锁乙酸乙酯部位体外抗氧化活性较强。

[关键词] 金铁锁; 抗氧化活性; 二苯代苦味酰基; [2, 2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐]; 铁离子还原/抗氧化能力

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)06-0109-04

Antioxidant Activity of *Psammosilene Tunicoides* in vitro

YUAN Lin¹, MA Yin-hai¹, YIN Zhen-hua², WANG Wei², GU Xue-zhu³, KANG Wen-yi^{2*}

1. Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Kunming 650214, China;
2. Institute of Chinese Materia, Henan University, Kaifeng 475004, China;
3. Institute of Chinese Materia Medica, Traditional Chinese Medical Research Institute, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant activity *Psammosilene tunicoides* in vitro. **Method:** Antioxidant activities of *P. tunicoides* were evaluated by the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

[收稿日期] 20111122(011)

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(210203)

[第一作者] 袁琳, 博士, 副教授, 从事天然药物开发与研究, Tel: 0871-5098482, E-mail: sunrainyl@gmail.com

[通讯作者] * 康文艺, 教授, 从事中药活性成分及新药研究, Tel: 0378-3880680, E-mail: kangwenyi@hotmail.com

精中水溶性多糖的含量, 方法学考察显示其具有重复性好、操作简便、快速、准确等特点。结果表明将联合采用苯酚-浓硫酸法与 DNS 法结合, 可除去药材中单糖的影响, 从而客观地评价黄精多糖的含量, 将来可用于作为黄精药材及制定其炮制工艺的质量标准。

[参考文献]

- [1] 李迪明, 符波, 施杰. 黄精炮制前后黄精多糖药理作用的研究[J]. 新疆医学院学报, 1997, 20(3): 164.
[2] 王晓丹, 田芳, 史桂云, 等. 不同产地黄精中多糖含量

- 的比较[J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(9): 657.
[3] 衣小凤, 郭晏华. 黄精总多糖含量分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(9): 190.
[4] 杨云, 万焱, 许小华, 等. 黄精中还原糖含量与饮片加工方法和时间的相关性研究[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1631.
[5] 张莹, 钟凌云. 炮制对黄精化学成分和药理作用影响研究[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(4): 77.
[6] 李强, 唐微, 石园园, 等. 蒽酮-硫酸法和 3,5 二硝基水杨酸测定杜仲水提液多糖含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 370.

[责任编辑] 蔡仲德

scavenging, [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline) -6-sulphonic acid] diamonium salt (ABTS) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Results were compared with that of positive controls PG, BHA and BHT. **Result:** Antioxidant activity of three extracts from *P. tunicoides* was weaker than that of the positive control PG, BHA and BHA. In the three extracts, Antioxidant activities of ethyl acetate extract was good. ABTS radical scavenging ($IC_{50} = 40.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and ferric reducing antioxidant power [TEAC = $(696.9 \pm 2.42) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] of ethyl acetate extract were strong, followed by the ABTS radical scavenging ($IC_{50} = 83.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and ferric reducing antioxidant power [TEAC = $(166.1 \pm 1.06) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] of *n*-butanol extract, petroleum ether extract was the weakest. **Conclusion:** Ethyl acetate extract of *P. tunicoides* had strong antioxidant activity.

[**Key words**] *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP

金铁锁为石竹科金铁锁属植物,异名昆明沙参、独钉子、土人参、金丝矮陀陀,以根入药,治跌打损伤、胃疼;有毒,内服宜慎^[1]。国内外研究发现,金铁锁的主要化学成分是三萜、三萜皂苷、环肽以及内酰胺。此外,还含有氨基酸、挥发油和有机酸等,但是主要研究集中在三萜皂苷和环肽上,并从中分离鉴定出一系列新的三萜皂苷和环肽成分^[2-12]。药理研究发现其具有抗炎镇痛、抗类风湿、细胞免疫、抗真菌、止血、毒性、刺激性等作用^[13-18],未见对金铁锁抗氧化活性的报道。

本文首次采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)方法、清除[2, 2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基方法、铁离子还原/抗氧化力测定法(ferricreducing/antioxidant power assay, FRAP法)对金铁锁抗氧化活性进行了综合考察,为科学合理开发金铁锁资源,全面评价金铁锁的抗氧化作用提供了参考。

1 材料

1.1 试药 金铁锁于2010年7月购于云南白药,由昆明学院生命科学与技术系杨黎江副教授鉴别为石竹科金铁锁属植物金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu,标本存于昆明学院生命科学与技术系。

DPPH(日本东京化成工业株式会社); Fe^{3+} -三吡啶三噻嗪(2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ;比利时 Acros organics 公司);[2,2'-连氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS,美国 Fluka 公司);BHT(二丁基羟基甲苯,比利时 Acros organics 公司);PG(propyl gallate,没食子酸丙酯);BHA(Butylated hydroxyanisole,丁基羟基茴香醚)Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Aldrich);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 电子天平(美国 Mettler-Toledo 公司),旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼科仪器有限公司),CS-H1 型混合器(北京博励阳科技公司)。

2 实验方法

2.1 金铁锁的提取 金铁锁 10 kg,粉碎,用 80% 乙醇冷浸 4 次,依次 2,1,1,1 d,合并提取液,减压回收乙醇(温度控制在 60 °C 以下),浓缩至无醇味后,依次用石油醚,乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚部位(PTPE)12.9 g,乙酸乙酯部分(PTEA)90 g,正丁醇部分(PTBU)165 g。

2.2 抗氧化活性筛选方法

2.2.1 DPPH 方法 按照文献[20],于 515 nm 处测定吸光度。每份样品平行操作 3 次,取平均值。计算公式为清除率 = $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100\%$,式中 A_{Control} 为 3.5 mL DPPH 溶液与 0.1 mL 甲醇混合后,DPPH 在测定波长的吸光度; A_{Sample} 为 3.5 mL DPPH 溶液与 0.1 mL 样品混合,样品对 DPPH 作用后的吸光度(除去样品自身吸收)。

2.2.2 ABTS 方法 按照文献[21],在 734 nm 处测定吸光度。每份样品平行操作 3 次,取平均值。计算公式为清除率 = $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100\%$,式中 A_{Control} 为 2.85 mL ABTS + 溶液与 0.15 mL 甲醇混合后,ABTS 本身在测定波长的吸光度的吸光度, A_{Sample} 为 2.85 mL ABTS + 溶液与 0.15 mL 样品混合后,样品对 ABTS 作用后的吸光度(除去样品自身吸收)。

2.2.3 FRAP 方法 按照文献[22],将样品用甲醇配制成一系列质量浓度,取 0.2 mL 样品加入 3.8 mL 新鲜配制的 TPTZ 工作液,混匀后 37 °C 反应 30 min 后测定 593 nm 处吸光度。每份样品平行操作 3 次,取平均值,计算出清除率,结果以抗氧化当量

(即每克样品的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的微摩尔数, TEAC) 表示。

2.2.4 结果测定 依据上述公式计算得到的清除率,用 origin 6.0 软件处理,得到样品清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的半数抑制率 IC_{50} 值。

3 结果与讨论

3.1 对 DPPH 自由基的清除作用 结果见表 1。金铁锁石油醚提取物 (PTPE)、乙酸乙酯提取物 (PTEA) 和正丁醇提取物 (PTBU) 在初筛浓度为 $55.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的清除率分别为 9.23%, 23.74%, 12.00%, 均 < 50%, 不需要进行半倍稀释, 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值未测定, 对 DPPH 自由基的初筛清除率顺序为 PTEA > PTBU > PTPE。

表 1 金铁锁不同提取部位的抗氧化活性

金铁锁 提取物	DPPH 方法				FRAP 方法
	初筛清除 率/%	IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	初筛清除 率/%	IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TEAC / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
PTPE	9.23	-	27.26	-	133.85 ± 1.41
PTEA	23.74	-	79.11	40.54	696.9 ± 2.42
PTBU	12.00	-	55.96	83.38	166.1 ± 1.06
PG		0.89		0.81	$11\ 554.78 \pm 501.34$
BHT		18.71		7.72	$1\ 581.68 \pm 97.41$
BHA		3.2		1.95	$6\ 633.04 \pm 114.04$

注: BHA, BHT, PG 为阳性对照品; - 表示 IC_{50} 未测定。

3.2 对 ABTS 自由基的清除作用 结果见表 1 和图 1。表 1 显示, 金铁锁 3 个提取物 (PTPE, PTEA, PTBU) 初筛浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的清除率分别为 27.26%, 79.11%, 55.96%, 石油醚提取物 (PTPE) 清除 ABTS 自由基的初筛清除率 < 50%, 未能进入复筛, 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值未测定。金铁锁乙酸乙酯提取物 (PTEA) 和正丁醇提取物 (PTBU) 清除 ABTS 自由基的能力 (IC_{50} 分别为 40.54, 83.38 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 弱于阳性对照 PG, BHT, BHA (IC_{50} 分别为 0.81, 7.72, 1.95 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。表 1 表明, 3 种提取物 (PTPE, PTEA, PTBU) 和阳性对照 PG, BHA, BHT 对 ABTS 自由基清除能力顺序为 PG > BHA > BHT > PTEA > PTBU > PTPE。

图 1 显示, 在相同浓度下, 金铁锁乙酸乙酯提取物 (PTEA) 和正丁醇提取物 (PTBU) 清除 ABTS 自由基的能力均比阳性对照 PG, BHA, BHT 弱。在实验浓度范围内, 质量浓度为金铁锁提取物清除 ABTS 自由基的能力与其质量浓度呈正量效关系, 即随着提取物用量的增加, 对 ABTS 自由基的清除率也

增大。

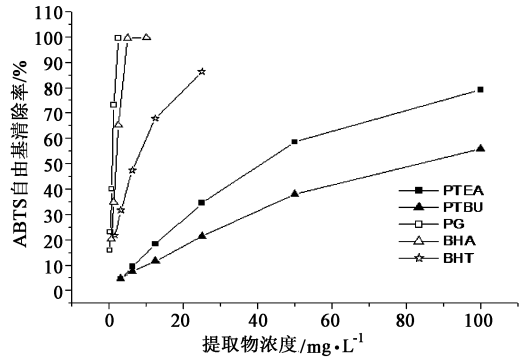


图 1 提取物浓度对 ABTS 自由基的清除作用

图 1 显示, 在相同浓度下, 3 个提取物对 ABTS 自由基的清除率均低于阳性对照 BHT。但是, 在实验的浓度范围内, 提取物浓度为 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 乙酸乙酯和正丁醇提取物对 ABTS 自由基的清除率都较低, 分别为 7.45% 和 7.39%。随着浓度的增加, 清除率也增大, 说明金铁锁乙酸乙酯和正丁醇提取物清除 ABTS 自由基的能力与提取物浓度呈正量效关系, 即随着提取物用量的增加, 对 ABTS 自由基的清除率也增大。提取物质量浓度在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下, 当提取物质量浓度高于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 当质量浓度增加到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 清除率随浓度变化增加较慢。

3.3 对 Fe^{3+} 的还原能力 结果见表 1。3 种提取物 (PTPE, PTEA, PTBU) 中, PTEA 还原 Fe^{3+} 的能力 [$\text{TEAC} = (696.9 \pm 2.42) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] 较高, 但是仍弱于阳性对照 PG, BHT, BHA 还原 Fe^{3+} 的能力 [$\text{TEAC} = (11\ 554.78 \pm 501.34)$, ($1\ 581.68 \pm 97.41$), ($6\ 633.04 \pm 114.04$) $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$], 与阳性对照 BHT 接近, 约为其还原 Fe^{3+} 能力的 0.44 倍。表 1 表明, 3 种提取物 (PTPE, PTEA, PTBU) 和阳性对照 PG, BHA, BHT 对 Fe^{3+} 还原能力的顺序为 PG > BHA > BHT > PTEA > PTBU > PTPE。

3 个方法对金铁锁的研究结果显示, 总的体外抗氧化能力顺序为 PTEA > PTBU > PTPE, 随着提取溶剂极性的增大, 金铁锁提取物的抗氧化活性逐渐增大, 即 LCME > LCEE > LCPE, 即乙酸乙酯提取物相对较高, 正丁醇次之。化学成分报道, 其主要化学成分是三萜、三萜皂苷、环肽以及内酰胺, 可能与金铁锁各个提取部位中所含主要抗氧化成分的种类及结构有关。DPPH 方法用来测定样品清除 DPPH 自由基的能力, 对酸性条件较敏感; ABTS 方法用来测定样品清除 ABTS 自由基的能力, 可以适用于酸性条件抗氧化活性的测定。尽管两者都是基于清除自由基来测定样品的抗氧化活性, 但是 ABTS 自由基

与自由基清除剂反应速度较 DPPH 方法快,原因是 DPPH 自由基相对稳定,主要与相对活泼的还原性物质反应;FRAP 方法使用于低 pH 的环境,测定样品将 Fe^{3+} -三吡啶三咪嗪 (tripyrindyl-triazine, TPTZ) 还原为二价铁的能力。可见,植物的抗氧化活性与提取溶剂的种类和极性有关,也与抗氧化活性测定体系有关,故在不同的抗氧化体系中,其抗氧化作用不同^[23-24]。因此,在测定样品的抗氧化活性时,需要采用多种方法来综合评价分析样品的抗氧化活性。

4 结论

本文利用 DPPH, ABTS, FRAP 3 种方法对金铁锁体外抗氧化活性进行了考察,金铁锁 3 个提取物清除 DPPH 自由基的能力均比较弱,金铁锁乙酸乙酯提取物清除 ABTS 自由基 ($IC_{50} = 40.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 及还原 Fe^{3+} 的能力 [TEAC = $(696.9 \pm 2.42) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] 较强;正丁醇提取物清除 ABTS 自由基 ($IC_{50} = 83.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 及还原 Fe^{3+} 的能力 [TEAC = $(166.1 \pm 1.06) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] 次之,石油醚提取物还原 Fe^{3+} 的能力 [TEAC = $(133.85 \pm 1.41) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] 最弱,3 个提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力以及对 Fe^{3+} 的还原能力均弱于阳性对照 PG, BHA, BHT, 但是,3 个提取物比较, PTEA > PTBU > PTPE, 即乙酸乙酯提取物总的抗氧化活性较好。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志. 第 26 卷[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 448.

[2] 钟惠民, 华燕, 倪伟, 等. 金铁锁的两个新三萜皂苷[J]. 云南植物研究, 2003, 25(3): 361.

[3] 浦湘渝, 杨崇仁, 周俊. 金铁锁的三萜化合物[J]. 云南植物研究, 1984, 6(4): 463.

[4] 钟惠民, 倪伟, 华燕, 等. 金铁锁的新三萜皂苷[J]. 云南植物研究, 2002, 24(6): 781.

[5] 浦湘渝, 周俊. 金铁锁的一个新三萜成分[J]. 云南植物研究, 1987, 9(3): 369.

[6] DENG Xue-Tao, LIU Xiao-Xiao, ZHU Di, et al. A new triterpenoid saponin from *Psammosilene tunicoides* [J]. Chinese J Nat Med, 2009, 7(2): 101.

[7] 刘潇潇, 王磊, 王强, 等. 金铁锁根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 921.

[8] 丁中涛, 汪有初, 周俊, 等. 金铁锁根中的环肽成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22(3): 331.

[9] 丁中涛, 周俊, 谭宁华. 金铁锁中的四个环二肽[J]. 中草药, 2000, 31(11): 803.

[10] 丁中涛, 保志娟, 杨雪琼, 等. 金铁锁根中的 3 个环二肽[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 337.

[11] 陈华国, 李明, 龚小见, 等. 金铁锁化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 204.

[12] 曹桂红, 杨占南, 周欣, 等. 气相色谱-质谱法测定金铁锁根挥发油化学成分[J]. 理化检验: 化学分册, 2009, 45(11): 1276.

[13] 王学勇, 许建阳, 邱德文, 等. 金铁锁总皂苷抗炎镇痛作用及作用机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(5): 56.

[14] 王学勇, 张元, 许建阳, 等. 金铁锁总皂苷抗类风湿性关节炎作用及其作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 419.

[15] 王美娥, 潘惠娟, 许建阳, 等. 金铁锁对实验性类风湿性关节炎大鼠脑髓及其脑儿茶酚胺类神经递质的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(10): 96.

[16] 许建阳, 王发强, 郑维发, 等. 金铁锁水煎浸膏对实验性类风湿关节炎镇痛作用的研究[J]. 武警医学, 2003, 14(10): 589.

[17] 郑维发, 石枫, 王莉. 金铁锁总甙对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 武警医学, 2003, 14(10): 598.

[18] Junmian Tian, Yunheng Shen, Xianwen Yang, et al. Antifungal cyclic peptides from *Psammosilene tunicoides* [J]. J Nat Prod, 2010, 73: 1987.

[19] 宋烈昌. 金铁锁总皂苷的药理研究[J]. 云南植物研究, 1981, 3(3): 287.

[20] Kang W Y, Li C F, Liu Y X. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze *in vitro* [J]. Med Chem Res, 2010, 19: 1222.

[21] Kang W Y, Wang J M. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of *Forsythia suspense* leaves [J]. Med Chem Res, 2010, 19: 617.

[22] 康文艺, 李彩芳, 张丽. 卷丝苣苔和勐醒芒毛苣苔抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(3): 470.

[23] Kang D G, Yun C K, Lee H S. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 87: 231.

[24] 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.

[责任编辑 蔡仲德]