

女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究

姚卫峰¹, 陈汀¹, 张丽^{1*}, 丁安伟^{1,2}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 研究女贞子乙醇提取物不同极性部位的体外抗氧化活性, 旨在为女贞子抗氧化相关有效成分的分离提供依据。方法: 在体外化学模拟的条件下, 采用 1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)自由基法、邻苯三酚法测定其对 DPPH 自由基和对超氧阴离子自由基的清除能力。结果: 女贞子醇提物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 个萃取部位抗氧化结果显示, 相同浓度下女贞子乙酸乙酯部位抗氧化效果最强, 其次是正丁醇部位、石油醚部位。结论: 测定了女贞子醇提物不同溶剂提取物的抗氧化活性, 初步确定女贞子中抗氧化相关活性成分主要存在于女贞子醇提物的乙酸乙酯部位。

[关键词] 女贞子; 醇提物; 抗氧化; 二苯代苦味酰基自由基法; 邻苯三酚法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0138-03

Study on Antioxidative Activities of Different Polarity Parts in Extracts with Ethanol from *Ligustrum lucidum* In vitro

YAO Wei-feng¹, CHEN Ting¹, ZHANG Li^{1*}, DING An-wei^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** Antioxidative activities of different polarity parts in extracts with ethanol from *Ligustrum lucidum* were studied *in vitro* to supply the separating base of antioxidative components. **Method:** The antioxidant properties of different parts in ethanol extracts of *L. lucidum* were evaluated by different antioxidant tests, including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, superoxide anion radical scavenging activity *in vitro* chemical simulated systems. **Result:** The antioxidant results of petroleum ether, ethyl acetate and 1-butanol parts in ethanol extract show that the antioxidant effect of ethyl acetate parts was the strongest. **Conclusion:** Antioxidative components could be justified existing in the ethyl acetate parts initially.

[Key words] *Ligustrum lucidum*; ethanol extract; antioxidative; DPPH; Pyrogallol

女贞子为木犀科常绿乔木植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 甘、苦、凉, 归肝、肾经, 具有补肝益肾、乌须明目的功效, 临床上多用于治疗

肝肾阴虚的目暗不明、视力减退、须发早白。女贞子主要含有三萜、黄酮、酚酸和裂环烯醚萜类等化学成分^[1]。女贞子具有抗炎、抑菌、抗癌、提高免疫力、抗衰老、抗疲劳、降血糖、降血脂等多种药理作用。有学者研究表明女贞子具有抗脂质过氧化能力和还原能力, 具有作为天然抗氧化剂开发的利用价值^[2]。因此, 本文采用体外化学模拟的方法来进一步研究女贞子醇提物的抗氧化活性, 为开发女贞子抗氧化药物和阐述女贞子抗氧化物质基础提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 酶标仪 A-5002(奥地利 TECAN 公司), FA1104N 精密天平(上海精密科学仪器有限公司),

[收稿日期] 20110505(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001599); 教育部博士点新教师基金项目(20103237120010); 江苏省中医药管理局研究项目(LB09031); 南京中医药大学青年自然基金项目(09XZR14)

[第一作者] 姚卫峰, 讲师, 中药代谢与质量控制, Tel: 025-85811053, E-mail: weifengyao@sohu.com

[通讯作者] *张丽, 副教授, Tel: 025-85811519, E-mail: zhangliguanxiang@163.com

高速万能粉碎机 Fw100(天津市泰斯特仪器有限公司),EPED-T型超纯水器(南京易普易达科技有限公司),微量移液枪、振荡器,日本岛津 UV-2401型紫外-可见分光光度计。

1.2 药物 女贞子药材自采于南京中医药大学仙林校区,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的成熟果实。

1.3 试剂 1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH,批号20090512)、邻苯三酚(批号20090515)购自上海强顺化学有限公司,均为分析纯。

2 方法

2.1 女贞子醇提物不同极性部位萃取物的制备

称取100 g女贞子粗粉3份,置于2 000 mL圆底烧瓶中,用95%乙醇回流提取3次,每次2 h,料液比1:8。合并3次滤液,浓缩至无醇味,将浓缩液4℃保存,备用。浓缩液分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取6次,单独合并各溶剂的萃取液,浓缩并挥干溶剂,无水乙醇溶解并定容至相当于含生药量2.0 g·L⁻¹,为供试液。

2.2 DPPH溶液的配制 准确称取0.010 6 g DPPH,用无水乙醇溶解并定容于100 mL容量瓶中,DPPH浓度为0.1 mol·L⁻¹,避光保存(0~4℃)。

2.3 清除DPPH自由基能力测定 抗氧化活性是参照文献^[3]稍加修改后用光谱仪检测。①取样品溶液100 μL与0.1 mol·L⁻¹ DPPH溶液100 μL,先后加入96孔板中,室温放置30 min,然后在517 nm处测吸收度($A_{\text{样}}$)。②取样品溶液100 μL与空白溶液100 μL(醇提液用95%乙醇作空白、水提液用蒸馏水作空白),先后加入96孔板中,室温放置30 min,然后在517 nm处测吸收度($A_{\text{对}}$)。③取0.1 mol·L⁻¹ DPPH溶液100 μL与空白溶液100 μL(醇提液用95%乙醇作空白、水提液用蒸馏水作空白),先后加入96孔板中,室温放置30 min,然后在517 nm处测吸收度($A_{\text{空}}$)。根据下列公式计算植物提取液对DPPH的抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{样}} - A_{\text{对}}) / A_{\text{空}}] \times 100\%$$

公式中引入 $A_{\text{对}}$ 是为了消除浸提液本身颜色对测定的干扰^[4]。抑制率越大,抗氧化活性越高。 IC_{50} 是指DPPH的抑制率为50%时的提取物溶液浓度^[5]。 IC_{50} 越小,抗氧化能力越强。每个样品重复6次,求得抑制率的平均值。

2.4 邻苯三酚自氧化法^[6-7] 采用改良的邻苯三酚

自氧化法^[8]。取4.5 mL(pH 8.2) 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液,加入0.5 mL蒸馏水,100 μL 5 mmol·L⁻¹邻苯三酚溶液,立刻计时并迅速摇匀,然后测定 $A_{325 \text{ nm}}$ 值,1 min后记录数据,并每隔30 s记录1次,直至4 min。对照管用10 μL(10 mmol·L⁻¹)盐酸代替邻苯三酚溶液。每个样品平行测定3次。

$$\text{邻苯三酚自氧化率} = (\text{第4 min的 } D_{325 \text{ nm}} \text{ 值} - \text{第1 min的 } D_{325 \text{ nm}} \text{ 值}) / 3$$

样品清除超氧阴离子自由基的测定:操作方法同上,加入邻苯三酚溶液前分别加入不同浓度的样品溶液。计算加样后邻苯三酚自氧化速率,得出对超氧阴离子自由基的抑制率。

$$\text{抑制率} = [(\text{邻苯三酚自氧化率} - \text{加样后的自氧化率}) / \text{邻苯三酚自氧化率}] \times 100\%$$

3 结果

3.1 醇提液各萃取液清除DPPH自由基能力 对女贞子醇提物石油醚、乙酸乙酯、正丁醇部位萃取物母液进行浓度梯度稀释,分别配置质量浓度为0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹的供试品溶液,测定抑制率,结果见表1。石油醚、乙酸乙酯、正丁醇部位萃取物DPPH自由基抑制率的回归方程分别为 $Y = 0.193 2X + 0.035 5$, $Y = 1.230 8X + 0.273 9$ 和 $Y = 1.114X + 0.142 6$ 。计算 IC_{50} 分别为石油醚部位2.404 g·L⁻¹,乙酸乙酯部位0.184 g·L⁻¹,正丁醇部位0.321 g·L⁻¹,表明女贞子乙酸乙酯部位清除DPPH自由基能力最强。

表1 女贞子醇提物各萃取液的DPPH自由基抑制率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度 /g·L ⁻¹	自由基抑制率/%		
	石油醚	乙酸乙酯	正丁醇
0.062 5	4.12 ± 1.86	33.02 ± 2.19	19.77 ± 8.66
0.125	4.73 ± 2.37	44.19 ± 3.27	28.96 ± 10.63
0.25	8.43 ± 2.61	59.67 ± 2.83	43.46 ± 6.34
0.5	14.67 ± 2.05	88.09 ± 1.53	69.26 ± 4.55
1.0	22.95 ± 1.94	90.50 ± 2.32	93.26 ± 1.27
2.0	41.87 ± 7.90	94.86 ± 1.58	93.40 ± 0.38

3.2 醇提液各萃取液清除超氧阴离子自由基能力

对女贞子醇提物石油醚、乙酸乙酯、正丁醇部位萃取物母液进行浓度梯度稀释,分别配置质量浓度为0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹的供试品溶液,测定抑制率,结果见表2。石油醚、乙酸乙酯、正丁醇部位萃取物清除超氧阴离子自由基能力的回归方程分别是 $Y = 4.810X + 6.743$, $Y = 3.350X + 39.08$ 和 $Y =$

3. $190X + 36.27$ 。可见女贞子乙酸乙酯和正丁醇部位清除超氧阴离子自由基作用较强,其中以乙酸乙酯部位清除能力最强。

表 2 女贞子醇提物各萃取液超氧阴离子
自由基抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度 /g·L ⁻¹	超氧阴离子自由基抑制率/%		
	石油醚	乙酸乙酯	正丁醇
0.125	5.91 ± 1.08	38.59 ± 1.14	35.44 ± 0.83
0.25	8.26 ± 2.02	40.17 ± 0.96	37.13 ± 2.29
0.5	10.24 ± 0.38	40.96 ± 1.27	38.86 ± 1.13
1.0	12.06 ± 1.35	43.43 ± 1.79	40.16 ± 0.95
2.0	15.89 ± 1.30	45.27 ± 1.34	42.12 ± 1.23

4 讨论

经本课题组前期实验并参考相关文献^[2],表明女贞子具有较强的清除 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的作用,且随提取液浓度的增加逐渐增强。本实验测定女贞子醇提物的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 个萃取部位抗氧化结果显示,相同浓度下女贞子乙酸乙酯部位抗氧化效果最强,其次是正丁醇部位。女贞子清除自由基作用可能是其中多种黄酮和酚酸协同作用的结果。目前,女贞子的抗氧化作用研究还不够深入,其抗氧化作用的机制和物质基础仍不明确。此外,女贞子用于药理学实验的是一些粗制品,使得要在分子水平上阐明其药理作用和作用机制受到了很大限制,还有待于我们的进一步深

入开展女贞子的分离纯化以及其抗氧化作用的物质基础研究。

[参考文献]

- [1] 黄晓君,殷志琦,叶文才,等. 女贞子的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7):862.
- [3] 刘新,夏雪奎,袁文鹏,等. 女贞子体外抗氧化活性研究[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(4):364.
- [4] Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenol on superoxide anion radical, and on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(8):2016.
- [5] 叶汉侠,王甫才. 18 种中草药抗氧化活性的比较研究[J]. 浙江万里学院学报, 2004, 17(5): 111.
- [6] Lin Liyun, Liu Hsiuman, Yu Yawen, et al. Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread [J]. Food Chemistry, 2009, 112:987.
- [7] 张宏,谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报, 2002, 33(6):677.
- [8] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2003:223.
- [9] 陈美珍,余杰,龙梓洁,等. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 219.

[责任编辑 聂淑琴]