

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110420. 0929. 003

金鸡菊提取物体外抗氧化活性

曹燕¹, 庞市宾², 徐磊², 范玉东¹, 明婷¹, 孙玉华^{2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的:探讨金鸡菊提取物体外抗氧化活性。方法:采用分光光度法,测定金鸡菊提取物对羟基(OH)自由基、超氧阴离子(O₂⁻)自由基及 1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(DPPH)的清除能力,通过多元线性回归分析,考察金鸡菊提取物含量及其体外抗氧化活性的相关性,并同维生素(VC)进行了比较。结果:金鸡菊提取物对·OH 自由基, O₂⁻·自由基, DPPH 自由基均有较好的清除作用,在供试质量浓度范围内(0.2~1.0 g·L⁻¹)对各自由基的清除效率与金鸡菊提取物浓度有一定量效关系,当质量浓度达 1.0 g·L⁻¹,其中 50% 乙醇洗脱物对 OH 自由基、O₂⁻·自由基和 DPPH 自由基的清除率可达 86.19%、97.90% 和 71.85%,且清除能力与 VC 相当。结论:金鸡菊提取物具有显著的体外抗氧化作用。

[关键词] 金鸡菊提取物;自由基;抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0144-04

Antioxidant Activities of *Coreopsis tinctoria* Extracts *in vitro*

CAO Yan¹, PANG Shi-bin², XU Lei², FAN Yu-dong¹, MING Ting¹, SUN Yu-hua^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumchi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant activity of *Coreopsis tinctoria* extracts *in vitro*. **Method:** The radical scavenging, hydroxyl radical, superoxide radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) radical by *C. tinctoria* extracts were detected and analyzed by using spectrophotometry and multiple linear regression analysis. The correlation between contents of *C. tinctoria* extracts and their antioxidant activity *in vitro* was surveyed and compared with Vitamin (VC). **Result:** The radical scavenging capacity of *C. tinctoria* extracts could be observed in hydroxyl radical, superoxide radical and DPPH radical showed performance. At the selected concentration from 0.2 g·L⁻¹ to 1.0 g·L⁻¹, the scavenging effects on free radicals had certain dose dependent relationship with *C. tinctoria* extracts concentration. When the concentration of 50% Alcoholic eluate from *C. tinctoria* reached 1.0 g·L⁻¹, the maximum scavenging rate on hydroxyl radical, superoxide radical and DPPH radical was 86.19%, 97.90%, 71.85% and its radical scavenging effects could be paralleled to VC. **Conclusion:** *C. tinctoria* extracts showed strong antioxidant activities.

[Key words] *Coreopsis tinctoria* extracts; free radical; antioxidant

自由基是生物体新陈代谢过程中产生的一类可以单独存在的具有高度氧化活性的带有一个或几个

[收稿日期] 20101111(006)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(XJYS0207-2008-01)

[第一作者] 曹燕,在读研究生,从事心血管药理研究, Tel:0991-2320296, E-mail: yancao2010@sina.com

[通讯作者] *孙玉华,研究员,从事心血管药理研究, Tel:0991-2812070, E-mail: sunyuh117@yahoo.com

[网络出版时间] 2011-04-20 09:29

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0929.003.html>

不配对电子的分子或原子,其化学性质相当活跃。研究表明^[1],心脑血管疾病、衰老及肿瘤疾病的发生和发展与体内的活性氧自由基有密切关系,而许多抗氧化成分可以清除这些自由基,能够预防上述疾病的发生发展。

金鸡菊又名雪菊,系菊科的干燥头状花序,单瓣、重瓣或半重瓣,舌状花黄色或金黄色,花期6~9月。大花金鸡菊属于北温带植物,原产于北美,佛罗里达州及墨西哥州,我国1936年作为观赏植物引种子至庐山、南岳等地栽培,目前各地除供观赏外,还用全草入药,而且从花中提取的食用色素,具有清热解毒和降压之功效^[2]。目前在新疆和田地区种植较为广泛,其维吾尔语名称为古里恰依(Gulqai),商品名“雪菊”。而尚未见到关于金鸡菊体外抗氧化的研究报告,本文对金鸡菊提取物的抗氧化活性进行了探讨,以期金鸡菊作为一种天然的抗氧化物得到推广和利用,提供理论依据。

1 材料

1.1 药材 金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nuff 头状花序 2008年8月采自新疆喀什地区皮山县,由新疆维吾尔自治区药物研究所民族药物研究室杨伟俊副研究员鉴定。

1.2 仪器 722-型分光光度计,上海第三分析仪器厂,BS323S 电子天平, Sartoris, HW-1000 超级恒温水浴,成都泰盟科技有限公司。

1.3 试剂 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH·), Sigma; 邻二氮菲,天津市化学试剂研究所,批号20090415; Tris, 美国陶氏; 焦性没食子酸,天津市盛森精细化工有限公司,批号20100320; 抗坏血酸(VC),天津永晟精细化工有限公司,批号20091016; 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 金鸡菊有效成分的提取 金鸡菊头状花絮500 g,粉碎过50目筛,分别用体积分数为95%的乙醇回流提取2次和50%的乙醇回流提取1次,料液比1:10,每次2 h,合并3次的提取液,蒸干,得金鸡菊总提取物,收率为46.8%。所得总提取物用D-101大孔吸附树脂进行梯度洗脱^[3],分别用水、10%、30%、50%、70%、95%乙醇洗脱,收集各洗脱液,经旋转蒸发仪浓缩,恒温干燥箱干燥,得到各洗脱物粉末,其收率分别为:水洗脱物,24.57%;10%醇洗脱物,6.52%;30%醇洗脱物,8.95%;50%醇洗脱物,1.37%;70%醇洗脱

物,0.28%;95%醇洗脱物,0.47%。

2.2 金鸡菊提取物对羟自由基(OH·)的清除作用 采用Fenton反应原理法^[4],取1 mL 0.5 mmol·L⁻¹邻二氮菲溶液于试管中,加入2 mL 0.2 mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液(pH 7.4),充分混匀,再加入1 mL新配制的0.5 mmol·L⁻¹硫酸亚铁溶液,混匀后加入1 mL新配制的0.1%双氧水,于37℃水浴反应60 min后,在510 nm处测吸光度(A),所测值为损伤管的A;未损伤管以1 mL蒸馏水代替损伤管中双氧水,操作方法同损伤管;样品管以1 mL样品代替损伤管中的蒸馏水,操作方法同损伤管。

$$\text{羟自由基清除率} = [(A_2 - A_1) / (A_0 - A_1)] \times 100\%$$

式中:A₀为未损伤管的吸光值;A₁为损伤管的吸光值;A₂为样品管的吸光值。

2.3 金鸡菊提取物对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除作用 采用邻苯三酚自氧化法^[5-7],取50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲溶液(pH 8.2)4.5 mL,置于25℃水浴中预热20 min,分别加入1 mL样品和0.4 mL 25 mmol·L⁻¹邻苯三酚溶液,混匀后于25℃水浴中反应5 min后,加入8 mol·L⁻¹ HCl 0.8 mL终止反应。自氧化管以1 mL蒸馏水代替样品管中样品,操作方法同样品管,在325 nm处测定吸光值,以等体积pH值8.2的Tris-HCl缓冲液作为空白。

$$\text{超氧阴离子的清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

式中:A₀为自氧化管的吸光值;A₁为样品管的吸光值。

2.4 金鸡菊提取物对DPPH自由基的清除作用^[7-8]

将金鸡菊各提取物和VC配成0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 g·L⁻¹的溶液备用。分别取各浓度的试样1 mL于试管中,编号后,每支试管各加入6.5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH·无水乙醇溶液4.0 mL均匀混合,在室温下避光静置30 min。以无水乙醇调零,于517 nm处测定其A。空白对照组采用无水乙醇替代DPPH溶液,其他试剂与样品组相同。各个实验组均做5次平行,取均值。DPPH自由基清除率按下式计算。

$$\text{DPPH自由基清除率} = [1 - (A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%$$

A₀ 4.0 mL 6.5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH 无水乙醇溶液 + 1 mL 样品溶剂; A₁ 4.0 mL 6.5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH·无水乙醇溶液 + 1 mL 样品; A₂ 4.0 mL 无水乙醇 + 1 mL 样品。

2.5 统计学方法 每次实验均设5个平行管,取平均值为1次实验数据,试验重复3次,采用SPSS 11.0

软件处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并计算出各个提取物的回归方程及半数抑制浓度。

3 结果

3.1 金鸡菊提取物对 OH 自由基的清除作用 金鸡菊总提物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 33.02X + 5.314$ ($R^2 = 0.9546$),10% 乙醇提取物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 68.485X - 10.099$ ($R^2 = 0.8868$),30% 乙醇提取物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 97.425X - 12.537$ ($R^2 = 0.9635$),50% 乙醇提取物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 78.17X + 5.1$ ($R^2 = 0.9594$),70% 乙醇提取物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 67.485X - 17.221$ ($R^2 = 0.9163$),95% 乙醇提取物对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 17.035X - 1.769$ ($R^2 = 0.9838$),阳性对照药对 OH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 69.495X + 29.725$ ($R^2 = 0.9889$),由回归方程可求出金鸡菊的总提物,10%,30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱物,阳性对照药对 OH 自由基清除率为 50% 时的提取物浓度 (IC_{50}) 分别为 1.35,0.88,0.64,0.57,0.10,3.04,0.29 $g \cdot L^{-1}$ 。由图 1 可以看出金鸡菊提取物对 OH 自由基有明显的清除作用,并且随着提取物浓度的增加,其中 30% 乙醇提取物和 50% 乙醇提取物清除 OH 自由基的能力与 VC 相当。

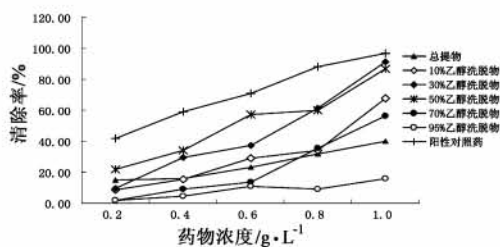


图 1 金鸡菊提取物对 OH 自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 金鸡菊提取物对 O_2^- 自由基的清除作用 以空白对照组作参比,测各浓度样品的吸光值,得出金鸡菊提取物对超氧阴离子自由基的清除效果(图 2)。金鸡菊总提物对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 10.57X - 0.664$ ($R^2 = 0.6928$),10% 乙醇提取物对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 27.655X - 4.627$ ($R^2 = 0.9192$),30% 乙醇提取物对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 65.975X - 11.325$ ($R^2 = 0.9776$),50% 乙醇提取物对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 100.89X - 15.243$ ($R^2 = 0.9148$),70% 乙醇提取物对 O_2^- 自由基的清除率

回归方程为 $Y = 14.27X - 1.886$ ($R^2 = 0.9936$),95% 乙醇提取物对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 14.76X + 8.662$ ($R^2 = 0.9936$),阳性对照药对 O_2^- 自由基的清除率回归方程为 $Y = 56.89X + 16.088$ ($R^2 = 0.8434$),由回归方程可求出金鸡菊的总提物,10%,30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱物,阳性对照药对 O_2^- 自由基的 IC_{50} 分别为 4.79,1.98,0.93,0.65,3.64,0.80,0.60 $g \cdot L^{-1}$ 。由图 2 可知,金鸡菊提取物浓度为 0.2 ~ 1.0 $g \cdot L^{-1}$ 时,随溶液浓度的增加对超氧阴离子自由基的清除率也随之增加;当浓度达 1.0 $g \cdot L^{-1}$ 时,其中 30% 乙醇提取物与 50% 乙醇提取物对超氧阴离子自由基的清除率分别为 55.65% 和 97.90%,50% 乙醇提取物对超氧阴离子自由基的清除率尤为显著,明显强于阳性对照药 Vc (在浓度 1.0 $g \cdot L^{-1}$ 时,清除率为 68.89%)。说明金鸡菊提取物在一定的浓度条件下对超氧阴离子自由基有较好的清除效果。

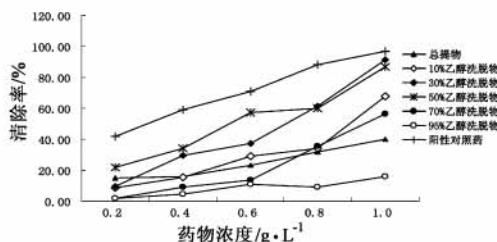


图 2 金鸡菊提取物对 O_2^- 自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.3 金鸡菊提取物对 DPPH 自由基的清除作用 金鸡菊总提物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 31.94X + 15.244$ ($R^2 = 0.8823$),10% 乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 20.645X + 7.871$ ($R^2 = 0.9205$),30% 乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 42.635X + 31.215$ ($R^2 = 0.9482$),50% 乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 40.7X + 33.59$ ($R^2 = 0.9683$),70% 乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 41.99X + 31.774$ ($R^2 = 0.9575$),95% 乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 19.94X + 9.954$ ($R^2 = 0.9415$),阳性对照药对 DPPH 自由基的清除率回归方程为 $Y = 46.475X + 30.441$ ($R^2 = 0.9641$),由回归方程可求出金鸡菊的总提物,10%,30%,50%,70%,95% 乙醇洗脱物,阳性对照药对 DPPH 自由基的 IC_{50} 分别为 1.09,2.04,0.44,0.40,0.43,2.00,0.42 $g \cdot L^{-1}$ 。从图 3 可以看出,30% 乙醇提取物、50% 乙醇提取物和 70% 乙醇

提取物在浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对自由基的清除率均超过了 70% 这表明金鸡菊提取物具有很强的清除 DPPH 自由基的能力且有明显的剂量依赖性,实验结果说明金鸡菊提取物是良好的质子供体,具有显著的抗氧化作用。

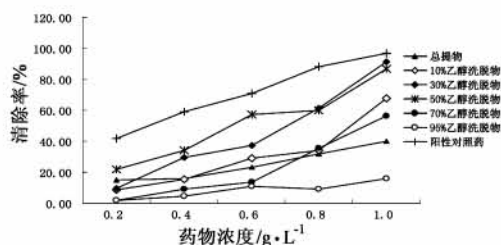


图3 金鸡菊提取物对 DPPH 自由基的清除作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

自由基的产生与机体许多功能障碍和疾病的发生有密切关系,尤其心脑血管疾病、糖尿病、中枢神经系统慢性退行性疾病等^[9],基于此,抗自由基的药物研究近年来备受人们重视。机体在代谢过程中产生的自由基在某些病理条件下因代谢产物过量,对机体生物大分子如核酸、蛋白质、脂质等造成氧化性损伤。其中 $\text{O}_2^- \cdot$ 产生最早,OH 自由基对细胞的危害最大,可直接作用于生物膜上的不饱和脂肪酸,使其发生脂质过氧化反应,损伤生物膜^[10]。

实验结果表明,金鸡菊提取物具有清除羟自由基的作用,并且随着提取物浓度的增加,对羟自由基的清除作用增强,呈明显的量效关系;通过邻苯三酚自氧化体系表明,金鸡菊提取物能够明显清除体系中的氧自由基,表现出极强的抗氧化活性。此外,金鸡菊提取物对 DPPH 自由基也表现出较强的抗氧化作用。通过对自由基的清除作用证实金鸡菊提取物是一种有效的自由基清除剂,在本试验质量浓度范围内,其中 30% 乙醇提取物和 50% 乙醇提取物对 DPPH 自由基和 OH 自由基的清除率与 VC 相当,50% 乙醇提取物对 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基的清除率明显强于 VC。表明金鸡菊提取物是有效的外源性天然有机抗氧化剂。研究还发现,相同浓度的金鸡菊提取物对

羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力有所不同,当 50% 乙醇提取物质量浓度达 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对羟自由基的清除率为 86.79%,对 DPPH 自由基的清除率为 71.85%,而此时对超氧阴离子自由基的清除率可达 97.90%,原因可能与金鸡菊提取物的结构有关。不同结构的物质对不同体系的抗氧化作用可能不同,对不同自由基和不同组织的作用存在一定的选择性。关于金鸡菊提取物的种类、结构及其与抗氧化能力之间的关系还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 方允中,郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京:科学出版社,2002:36.
- [2] 朱笃,陈飞彪. 金鸡菊总黄酮的提取及含量测定[J]. 食品科学,2005,26(9):314.
- [3] 朱笃,曾庆桂,江玉梅,等. 大孔树脂对金鸡菊黄酮吸附分离特性研究[J]. 食品科学,2006,27(10):420.
- [4] Li X L, Zhou A G, Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro [J]. Carbohydr Polym, 2006,66(1):34.
- [5] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):555.
- [6] 吴春,陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(5):553.
- [7] Concepcion S M, Jose A L. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents [J]. Food Res Int,1999,32(1):407.
- [8] S T Chow, W W Chao, Y C Chaung. Antioxidative activity and safety of 50% ethaolic red extract [J]. J Food Sci, 2003,68(1):21.
- [9] Fang Y Z, Yamg S. Free radicals, antioxidants, and nutrition [J]. Nut J,2002,18(10):872.
- [10] Benavente G O, Castillo J, Marin F R, et al. Uses and properties of citrusflavonoids [J]. J Agrice Food Chem, 1997,45(12):4505.

[责任编辑 聂淑琴]