

野坝子体外清除自由基活性研究

郭志琴¹, 吕海宁¹, 陈巧莲², 折改梅^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院中药化学系, 北京 100102; 2. 中国农业大学研究生院, 北京 100094)

[摘要] 目的: 对野坝子 *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. 乙醇提取物的不同极性萃取部位和 AB-8 大孔树脂柱色谱不同浓度甲醇洗脱部位清除自由基能力进行综合评价。方法: 分别以维生素 C 和维生素 E 为对照, 采用清除 2,2-二苯基苦味酰基苯肼基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 和 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, ABTS] 自由基的方法, 通过计算半数抑制浓度评价野坝子的乙醇提取物的不同极性萃取部位和 AB-8 大孔树脂柱色谱不同浓度甲醇洗脱部位的清除自由基能力。结果: 野坝子提取物不同极性萃取部位清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的能力分别为: 乙酸乙酯部位 > Vit C > 正丁醇部位 > 水部位 > 石油醚部位 > 氯仿部位、乙酸乙酯部位 > Vit E > 正丁醇部位 > 水部位 > 氯仿部位 > 石油醚部位。AB-8 大孔树脂柱色谱不同浓度甲醇洗脱部位清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力分别为 Vit C > 50% 甲醇部位 > 70% 甲醇部位 > 30% 甲醇部位 > 100% 甲醇部位, 50% 甲醇部位 > 70% 甲醇部位 > 30% 甲醇部位 > Vit E > 100% 甲醇部位。结论: 野坝子乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位和 30%、50% 和 70% 甲醇洗脱部位都具有很好的清除自由基活性, 是一种新型天然抗氧化物质来源。

[关键词] 野坝子; DPPH; ABTS; 清除自由基

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0180-04

DPPH and ABTS Radical Scavenging Capacity of *Elsholtzia rugulosa*

GUO Zhi-qin¹, LV Hai-ning¹, CHEN Qiao-lian², SHE Gai-mei^{1*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine Chemistry, Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100094, China)

[Abstract] The free radical scavenging capacity of different extracts and macroporous resin column chromatography gradient solutions from ethanol extract of *Elsholtzia rugulosa* were determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and improved 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) assay, with Vit C and Vit E as the control. The free radical scavenging capacity on DPPH and ABTS of different extracts of *E. rugulosa* followed by ethyl acetate > Vit C > *n*-butanol > aqueous solution > petroleum ether > chloroform and ethyl acetate > Vit E > *n*-butanol > aqueous solution > chloroform > petroleum ether, respectively. The free radical scavenging capacity on DPPH and ABTS of macroporous resin column chromatography gradient solutions were Vit C > 50% MeOH > 70% MeOH > 30% MeOH > 100% MeOH and 50% MeOH > 70% MeOH > 30% MeOH > Vit E > 100% MeOH. The ethyl acetate extracts and 30%, 50% and 70% MeOH solutions exhibited strong antioxidant activity. It indicated as a new source of natural antioxidants.

[Key words] *Elsholtzia rugulosa*; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt; free radical scavenging activity

[收稿日期] 20100602(009)

[第一作者] 郭志琴, 本科, 专业方向为中药制药, Tel: 010-84738453, E-mail: guo_zhiqin@126.com

[通讯作者] *折改梅, 讲师, 博士, 研究方向为中药和中药相关产品的物质基础和质量控制, Tel: 010-84738628, E-mail: shegaimei@126.com

野坝子是来源于唇形科 (Labiatae) 香薷属 *Elsholtzia* 植物野坝子 *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. 的干燥地上部分,其味辛,性凉,具有疏风解表,利湿等功效,在云南少数民族中广泛用于治疗四季感冒、流感、溃烂疮疡等疾病,具有清热解毒、消炎、抗衰老等作用^[1-2]。氧自由基损伤能够引起浮肿、高血压、动脉硬化、心肌梗死、帕金森症、老年痴呆等疾病^[3-5],且目前广泛采用的合成抗氧化剂多具有累计致癌作用^[6],因此寻求天然抗氧化剂是一研究热点^[7]。

野坝子中含有大量黄酮和萜醌等成分^[8-11],其挥发油具有显著的清除自由基活性^[12-13]。但迄今为止,未见野坝子其他部位抗氧化活性方面的报道。本文采用清除 2,2-二苯基苦味酰基苯肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 和 2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, ABTS] 自由基的方法,分别以维生素 C 和维生素 E 为对照^[14-15],评价野坝子乙醇提取物的不同极性萃取部位和 AB-8 大孔树脂柱层析不同浓度甲醇洗脱部位对自由基的清除能力,为深入开发野坝子抗氧化活性提供理论基础。

DPPH 和 ABTS 法是国外较普遍用于体外评价物质总抗氧化能力的方法,其中 ABTS 法本质上并不直接反映被测物质的活性,它只是利用 TEAC 值来表征供试样品和经氧化得到的 ABTS 反应的能力而非阻断其氧化过程,所以本试验中还结合了 DPPH 法,全面的评价了野坝子不同部位清除自由基能力^[16]。

1 材料

1.1 样品 野坝子采自云南西双版纳,经本文作者鉴定为野坝子 *E. rugulosa* 的干燥地上部分^[17]。将野坝子剪碎,用 70% 乙醇回流提取,部分提取物用水分散后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得石油醚,氯仿,乙酸乙酯、正丁醇和水 5 个极性部位,回收溶剂,干燥备用。部分提取物以少量水溶解,经过 AB-8 大孔树脂柱使用 30%, 50%, 70% 和 100% 甲醇洗脱,得到 4 个不同部位,回收溶剂,干燥备用。

1.2 试剂 DPPH 试剂(2,2-二苯基苦味酰基苯肼基)、ABTS 试剂[2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐]、维生素 C 与维生素 E (Sigma-Aldrich 公司);过硫酸钾(北京市红星化工厂);AB-8

大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);其他化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器 DNM-9602G 型酶标仪(北京艾普在线科技有限公司);DH-250 型电热恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司);电子天平(德国 Sartorius 公司);RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法

2.1 供试品液制备 供试液配制:称取适量供试样品,加无水乙醇溶解,配制成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 供试品溶液,根据预试验配制系列梯度浓度的供试品溶液。阳性对照维生素 C 和维生素 E 亦按照相同方法配制。

2.2 DPPH 自由基清除试验 本试验采用 WONG Y 等的方法^[18],以维生素 C 为阳性对照,利用供试品与 DPPH 的反应性,检测其清除自由基的能力。每个浓度梯度供试品液平行操作 3 次。计算供试样品对 DPPH 自由基的清除能力 SR(The percentage of scavenging radical capacity)。

$$SR = 1 - (A_i - A_j) / A_c \times 100\%$$

式中 A_c 为加入 DPPH 后空白对照的吸光值; A_i 为加入 DPPH 后样品液或阳性对照的吸光值; A_j 为未加入 DPPH 时样品液或阳性对照的吸光值。

2.3 ABTS 自由基清除试验 本试验依据 Re R 等的方法^[19],以维生素 E 为阳性对照,利用供试品与 ABTS 的反应性,检测其清除自由基的能力。每个浓度梯度供试品液平行操作 3 次。计算供试样品对 ABTS 自由基的清除能力 SR%。

$$SR = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

式中 A_c 为加入 ABTS 后空白对照的吸光值; A_s 为加入 ABTS 后样品液或阳性对照的吸光值。

3 结果与分析

3.1 野坝子各部位的提取率

3.1.1 野坝子不同极性萃取部位的提取率 总提取物、石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位提取率分别为 15.6%, 2.3%, 3.5%, 4.6%, 2.1%, 3.1%。

3.1.2 野坝子 AB-8 大孔树脂柱层析不同浓度甲醇洗脱部位的提取率 总提取物、30% 甲醇部位、50% 甲醇部位、70% 甲醇部位、100% 甲醇部位提取率分别为 15.6%, 2.4%, 5.3%, 4.1%, 3.8%。

3.2 野坝子清除自由基活性研究 利用清除 DPPH 和 ABTS 自由基的方法评价野坝子提取物不同极性萃取部位和 AB-8 大孔树脂柱层析不同浓度甲醇洗脱部位清除自由基的能力。常使用自由基清除率为 50% 时的样品浓度 (IC_{50}) 来比较清除自由基能力的大小, IC_{50} 越小, 表明其对自由基的清除能力越强。

3.2.1 不同极性萃取部位清除自由基活性的研究

3.2.1.1 不同极性萃取部位清除 DPPH 自由基活性研究 野坝子提取物的各个极性萃取部位对 DPPH 自由基都有较好的清除能力。其中, 野坝子提取物的乙酸乙酯萃取部位清除 DPPH 自由基的能力明显强于阳性对照品维生素 C。正丁醇、水、石油醚和氯仿萃取部位清除 DPPH 自由基能力则依次减弱。即野坝子提取物的不同极性萃取部位对 DPPH 自由基的清除能力依次为: 乙酸乙酯部位 ($6.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$) > Vit C ($9.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$) >> 正丁醇部位 ($31.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$) > 水部位 ($39.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$) > 石油醚部位 ($88.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$) > 氯仿部位 ($90.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} IC_{50}$)。

3.2.1.2 不同极性部位清除 ABTS 自由基活性研究 野坝子提取物的各个极性萃取部位对 ABTS 自由基都有很好的清除能力。其中, 乙酸乙酯萃取部位清除 ABTS 自由基的能力最为突出, 其清除 ABTS 自由基的能力远强于阳性对照品维生素 E, 与清除 DPPH 自由基活性试验结果一致。而正丁醇和水萃取部位清除 ABTS 自由基的清除 ABTS 自由基的能力与对照品维生素 E 相当, 且正丁醇部位稍强于水萃取部位。氯仿和石油醚萃取部位的清除 ABTS 自由基的能力依次减弱。即不同极性萃取部位对 ABTS 自由基的清除能力依次为: 乙酸乙酯部位 > Vit E > 正丁醇部位 > 水部位 > 氯仿部位 > 石油醚部位。

3.2.2 不同浓度甲醇洗脱部位清除自由基活性研究 大孔吸附树脂分离工艺操作简便, 成本较低, 树脂材料可反复使用, 适合于工业化大生产。为了寻求野坝子清除自由基的活性部位, 本试验对 AB-8 大孔树脂对野坝子提取物的不同醇洗脱部位进行活性研究, 为其抗氧化活性部位的工业化生产奠定基础。野坝子乙醇提取物的 AB-8 大孔树脂柱层析 30%, 50%, 70% 和 100% 甲醇洗脱部位采用多种薄层显色方法检识并结合前期化学成分研究^[5], 表明 30% 与 70% 甲醇洗脱部位富含黄酮类成分, 50% 与

100% 甲醇洗脱部位则富含黄酮与醌类成分。

3.2.2.1 不同浓度甲醇洗脱部位清除 DPPH 自由基活性研究 野坝子提取物的不同浓度甲醇洗脱部位对 DPPH 自由基的清除能力都很好。其中, 野坝子提取物的 50% 和 70% 甲醇洗脱部位清除 DPPH 自由基的能力较明显, 其清除 DPPH 自由基的能力与阳性对照品维生素 C 相当且稍大。而 30% 和 100% 甲醇洗脱部位的清除 DPPH 自由基的能力则依次减弱。即野坝子提取物的不同浓度甲醇洗脱部位对 DPPH 自由基的清除能力依次为: Vit C > 50% 甲醇部位 > 70% 甲醇部位 > 30% 甲醇部位 > 100% 甲醇部位。

50% 和 70% 甲醇洗脱部位对 DPPH 自由基都有很好的清除能力, 50% 甲醇洗脱部位的 IC_{50} 小于 70% 部位, 但当样品液浓度大于 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 即 SR 大于 70% 时, 70% 甲醇洗脱部位活性大于同浓度的 50% 甲醇洗脱部位。当样品质量浓度在 $7.8125 \sim 31.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对 DPPH 自由基的 SR 与浓度呈线性正相关, 50% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 0.5482X + 42.767, R^2 = 0.9497$, 70% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 0.5789X + 43.606, R^2 = 0.9967$ (Y, X 分别代表 SR 和样品液浓度)。当样品液质量浓度超过此范围后, SR 随样品质量浓度的增加而趋于水平。

3.2.2.2 不同浓度甲醇洗脱部位清除 ABTS 自由基活性研究 野坝子提取物的不同浓度甲醇洗脱部位对 ABTS 自由基都有极好的清除能力。其中, 野坝子提取物的 30%, 50%, 70% 甲醇洗脱部位清除 ABTS 自由基的能力最为明显, 3 者清除 ABTS 自由基的能力远强于阳性对照品维生素 E。而 100% 甲醇洗脱部位清除 ABTS 自由基的能力则与阳性对照维生素 E 相当。因此, 不同浓度甲醇洗脱部位清除 ABTS 自由基的能力依次为: 50% 甲醇部位 > 70% 甲醇部位 > 30% 甲醇部位 > Vit E > 100% 甲醇部位。

30%, 50%, 70% 和 100% 甲醇洗脱部位对 ABTS 自由基都有极好的清除能力, 30%, 50% 和 70% 甲醇洗脱部位的清除率在所测范围内的 SR% 整体大于同浓度的维生素 E。100% 甲醇洗脱部位的样品液浓度小于 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 即 SR 小于 55% 时, 其 SR 与维生素 E 相当且稍小, 当样品液浓度在 $20 \sim 70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 100% 甲醇洗脱部位活性小于维生素 E, 样品液浓度超过 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后 100% 甲醇洗脱部位活

性则明显大于维生素 E 并逐渐趋于水平。30% , 50% 和 70% 甲醇洗脱部位样品浓度在 $7.8125 \sim 15.625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,对 ABTS 自由基的 SR% 与浓度呈线性正相关,30% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 27.218 X + 0.1322, R^2 = 1$,50% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 22.279 X + 0.2447, R^2 = 1$,70% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 37.097 X + 0.0345, R^2 = 1$,100% 甲醇洗脱部位的量效关系式为 $Y = 14.713 X + 0.147, R^2 = 0.9423$ (Y, X 分别代表 SR 和样品液浓度)。当样品液浓度超过此范围后,SR 随样品浓度的增加而趋于水平。

4 结论

野坝子具有良好的清除自由基活性,特别是其乙酸乙酯萃取部位和 AB-8 大孔树脂柱层析 30% , 50% ,70% 和 100% 甲醇洗脱部位的清除能力最为显著。乙酸乙酯萃取部位显著的清除自由基活性,与其中主要的黄酮类成分^[8-11]以及乙酸乙酯部位的抗流感病毒作用相一致^[9]。野坝子是云南少数民族常用药,又是野生茶用植物、蜜源植物,通过对其生理活性的系统研究与评价,为研制出高效、低毒的抗氧化药品或保健食品提供了可靠的实验依据。同时也为茶用植物资源的合理开发利用与新兴的生物资源产业发展提供了科学基础。

[参考文献]

[1] 云南植物研究所. 云南植物志[M]. 1 卷. 北京: 科学出版社, 1977: 717.
[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 464.
[3] 凌关庭. 氧化疾病抗氧化(IV)[J]. 粮食与油脂, 2003, 12: 49.
[4] 王仪薇, 梁日欣, 杨滨, 等. 茶叶、槐米、金荞麦、红花醇提取物的抗氧化活性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 58.
[5] 杨艳, 梁日欣, 杨滨, 等. 黄芩等 5 种中药醇提取物的抗脂质过氧化作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 46.
[6] 詹沛鑫. 甘薯及马铃薯提取物的抗氧化活性研究[J].

食品与发酵工业, 1996, 2: 30.

[7] SHE Gaimei, XU Chao, LIU Bin, et al. Polyphenolic acids from mint (the Aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity [J]. Food Sci, 2010, 75: 359.
[8] 赵勇, 李庆春, 赵焱, 等. 野坝子的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1144.
[9] Liu Ailin, Liu Bo, Qin Hailin, et al. Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*[J]. Planta Medica, 2008, 74: 847.
[10] SHE Gaimei, GUO Zhiqin, LV Haining, et al. New flavonoid glycosides from *Elsholtzia rugulosa* [J]. Molecules, 2009, 14: 4190.
[11] LI Haizhou, Nakashima T, Tanaka T, et al. Two new maltol glycosides and cyanogenic glycosides from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl [J]. Natural Medicine, 2008, 62: 75.
[12] 李文军, 唐自明, 韦群辉, 等. 白族药野坝子的挥发性化学成分研究[J]. 云南中医学院学报, 1999, 22(3): 19.
[13] 毛绍春, 李竹英, 李聪. 野香苏籽油的提取方法及性质分析[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 8.
[14] 凌关庭. 氧化疾病抗氧化(XI)[J]. 粮食与油脂, 2004, 6: 50.
[15] 凌关庭. 氧化疾病抗氧化(XII)[J]. 粮食与油脂, 2004, 8: 54.
[16] 姜玉兰, 朴惠善, 李镛. 桑叶抗氧化活性成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 519.
[17] 韦群辉, 阮志国, 唐自明, 等. 白族药野坝子的生药学研究[J]. 云南中医学院学报, 2002, 25(1): 14.
[18] WONG Y, HE Zhengdan, HUANG Yu, et al. Antioxidant activities of phenylethanoid glycosides from *ligustrum Purpurascens*[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 3113.
[19] Re R, Pellegrini R, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26(1): 1231.

[责任编辑 邹晓翠]