

## 多叶棘豆清除自由基活性研究

折改梅, 孙芳芳, 吕海宁, 刘斌\*

(北京中医药大学中药学院中药化学系, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究多叶棘豆的清除自由基活性。方法: 分别以常用抗氧化剂 L-抗坏血酸和生育酚为对照, 采用清除 DPPH 和 ABTS 自由基的方法对多叶棘豆乙醇提取物不同极性部位, 以及 AB-8 大孔吸附树脂柱不同乙醇浓度洗脱部位进行清除自由基能力的评价。结果: 多叶棘豆提取物 AB-8 大孔吸附树脂柱的 50% 乙醇洗脱部位对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基均有较强的清除能力, 其清除 DPPH 自由基能力强于同浓度的 L-抗坏血酸。结论: AB-8 大孔吸附树脂柱层析技术对多叶棘豆的清除自由基活性物质有分离富集作用, 以 50% 乙醇洗脱部位活性最为突出。

[关键词] 多叶棘豆; 清除自由基活性; 抗氧化

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0091-04

## Radical Scavenging Activity of *Oxtropis myriophylla*

SHE Gai-mei, SUN Fang-fang, LV Hai-ning, LIU Bin\*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract] Objective:** To study DPPH and ABTS radical scavenging activities of *Oxtropis myriophylla*. **Method:** The anti-oxidant activity of *O. myriophylla* was measured by DPPH assay and ABTS assay. Furthermore, the AB-8 macroporous absorbent resin column chromatography with gradient elution (aqueous solution, 50% and 90% ethanol solution) were used. **Result:** 50% ethanol extract from *O. myriophylla* in the capability of scavenging DPPH and ABTS free radicals was much stronger than any other fractions, which is a trifle stronger than ascorbic acid. In addition, the active ingredient was screened effectively by the column chromatography method. **Conclusion:** 50% ethanol extract from *O. myriophylla* in the capability of scavenging DPPH and ABTS free radicals was much stronger than any other fractions, which is a trifle stronger than ascorbic acid. In addition, the active ingredient was screened effectively by the column chromatography method. **Conclusion:** The 50% ethanol extracts exhibited strong scavenging capacity of free radical.

**[Key words]** *Oxtropis myriophylla*; scavenging capacity of free radical; anti-oxidant

现代医学表明许多疾病的发生、发展都与人体所产生的过氧化物有关, 而这些过氧化物的形成, 是由于人体内部在代谢过程中产生的过氧自由基所造成的。人体自身虽然有完整的抗氧化体系进行自我

保护, 但当体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降时, 就会造成机体在分子水平、细胞水平及组织水平的不同程度损伤。摄入具有清除自由基能力的食物和药物(抗氧化剂)可以减缓自由基对机体的侵害, 预防各种炎症、变态性疾病、衰老等病变的发生<sup>[1-2]</sup>。由于人工合成抗氧化剂有累积致癌的报道, 研究者将目光转移到天然抗氧化剂的研究与开发。

多叶棘豆为豆科植物多叶棘豆 *Oxtropis myriophylla* 的干燥全草, 又名狐尾藻棘豆, 主产于内蒙古, 为蒙医常用药, 收载于《内蒙古药材标准》, 具

[收稿日期] 20100730(004)

[作者简介] 折改梅, 博士, 讲师, 研究方向: 中药和中药相关产品的物质基础和产品质量控制方法, Tel: 010-84738629, E-mail: shegaiimei@126.com

[通讯作者] \* 刘斌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药(复方)有效成分(组分), Tel: 010-84738628, E-mail: liubinyn67@163.com

有杀粘虫、清热、燥黄水、愈伤、生肌、合脉止血、消肿软便功效<sup>[3-4]</sup>。多叶棘豆中的总黄酮在 VB<sub>2</sub>-Met-NBT 体系中对氧自由基,在 VitC-copper-CytC 体系中对羟自由基,在 Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系中对脂质过氧化均有一定的清除和抑制作用<sup>[5]</sup>。但就该植物的总提取物以及不同极性部位的清除自由基活性评价未见报道。本研究分别以常用抗氧化剂 L-抗坏血酸和生育酚为对照,采用 DPPH(2,2-二苯基苦味酰基苯肼基)法和 ABTS[2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并咪啉-6-磺酸)二铵盐]法测定多叶棘豆乙醇提取物的不同极性部位的清除自由基活性;同时采用 AB-8 大孔吸附树脂柱层析技术筛选该植物的清除自由基的活性部位,为全面评价多叶棘豆的抗氧化作用提供科学依据,也为其抗氧化活性部位的进一步开发和工业化生产奠定基础。

### 1 仪器与试剂

RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHB- 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KQ-500DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DS 电热三用水浴锅(北京医疗设备厂); Sartorius BT25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); 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)。AB-8 大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂)。

多叶棘豆药材购自内蒙古,经作者鉴定为豆科多叶棘豆 *O. myriophylla* (Pall.) DC. 的干燥全草。

DPPH 试剂和 ABTS 试剂(Sigma-Aldrich 公司), L-抗坏血酸和生育酚(Sigma-Aldrich 公司), 过硫酸钾(北京市红星化工厂)。其他化学试剂均为分析纯。

### 2 方法

**2.1 样品制备** 多叶棘豆药材适量,加 70% 乙醇 12 倍量,回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并 2 次滤液,回收溶剂,残留物减压干燥,得多叶棘豆提取物,取适量作为样品。

多叶棘豆提取物约 6 g,加水分散,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,将得到的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水 5 个极性部位分别记为样品 1, 2, 3, 4, 5。

取多叶棘豆提取物约 6 g 加水分散,离心,水不溶物作为样品 6;上清液通过 AB-8 型大孔吸附树脂

柱分离,以水、50% 乙醇、90% 甲醇 3 个极性浓度进行梯度洗脱,将得到的 3 个不同极性洗脱部位记为样品 7, 8, 9。

称取上述各样品适量,用乙醇依次稀释成浓度为 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25, 0.015 625 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。阳性对照品溶液浓度与样品溶液浓度相同。

**2.2 ABTS 自由基清除方法** 按照文献[6]配制 ABTS 自由基工作液,以生育酚为阳性对照,计算样品对 ABTS 自由基的清除能力。每份样品平行操作 3 次,取平均值,按下式计算清除率和半数抑制率 IC<sub>50</sub>(自由基清除率为 50% 时的样品浓度)值。

$$\text{清除率} = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

其中, A<sub>c</sub> 为 ABTS 溶液吸光度, A<sub>s</sub> 为 ABTS 溶液中加入样品后吸光度。

**2.3 DPPH 自由基清除方法** 按照文献[7]配制 DPPH 自由基工作液,以 L-抗坏血酸为阳性对照,计算样品对 DPPH 自由基的清除能力。每份样品平行操作 3 次,取平均值,按下式计算清除率和半数抑制率。

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

其中, A 为加入 DPPH 试剂后空白对照吸光度, A<sub>0</sub> 为加入 DPPH 试剂后样品液吸光度, A<sub>1</sub> 为未加入 DPPH 试剂时样品液吸光度。

### 3 结果

**3.1 多叶棘豆各样品清除 DPPH 和 ABTS 自由基活性** 多叶棘豆各样品清除自由基数据见表 1~2。试验表明各样品对 ABTS 自由基均有一定的清除能力,乙醇总提取物清除 ABTS 自由基能力相对较弱,不同极性部位清除 ABTS 自由基的能力大小依次为样品 7 > 8 > 9 > 1 > 2 > 3 > 4 > 5 > 6。

表 1 样品 1~9 清除 ABTS 自由基能力 (IC<sub>50</sub>, mg·L<sup>-1</sup>)

样品	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	样品	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
生育酚 <sup>b</sup>	15.9		184.2
	286.0		367.1
	854.0		304.0
	283.5		86.7
	42.3		167.9
	281.2		

注:a. 自由基清除能力;b. 阳性对照(表 2 同)。

AB-8 大孔吸附树脂分离各部位清除 ABTS 自由基的能力大小依次为样品 7 > 8 > 9。即在 ABTS

表 2 样品 ~ 清除 DPPH 自由基能力 (IC<sub>50</sub>, mg·L<sup>-1</sup>)

样品	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	样品	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
L-抗坏血酸 <sup>b</sup>	95.9		2 000.0
	735.3		768.9
	1 351.4		310.9
	1 710.0		88.0
	140.6		937.5
V	279.4		

实验中, 和 样品的清除自由基能力优于其他样品, 略弱于生育酚。

总提取物清除 DPPH 自由基能力较弱, 不同极性部位各样品清除 DPPH 自由基能力大小依次为样品 > > > >, 样品 微弱于 L-抗坏血酸。

AB-8 大孔吸附树脂分离各部位清除 DPPH 自由基能力依次为样品 > > >。样品 明显强于其他样品, 其清除 DPPH 自由基能力更优于 L-抗坏血酸。

### 3.2 多叶棘豆各样品清除自由基活性量效关系

多叶棘豆各样品清除自由基能力与浓度的量效关系曲线见图 1~4。可见, 多叶棘豆提取物的各部位均具有一定的清除 ABTS 和 DPPH 自由基能力。其中样品 和 清除自由基能力尤为突出。且在 ABTS 和 DPPH 自由基清除实验中总体趋势基本一致。清除 DPPH 自由基实验中, 一定质量浓度范围内的样品 和 的清除自由基能力优于 L-抗坏血酸。

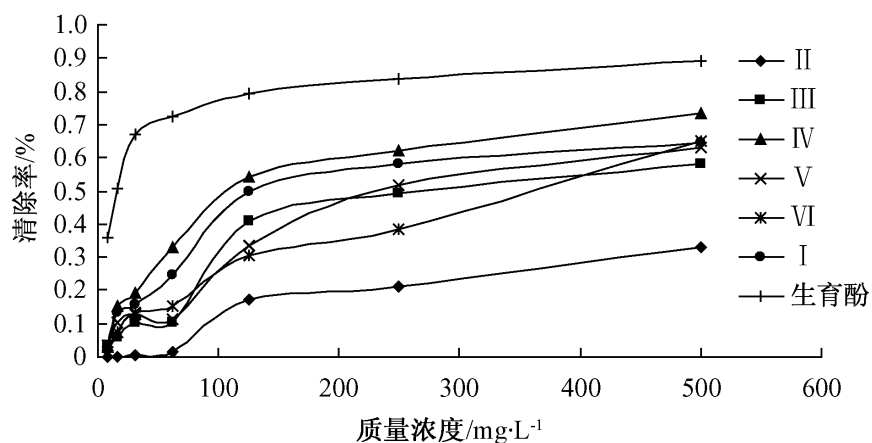


图 1 生育酚及样品 ~ 对 ABTS 自由基清除率

样品 在质量浓度 15.625 ~ 125 mg·L<sup>-1</sup> 对 ABTS 自由基清除率与浓度呈很好的线性关系, 量效关系式为  $Y = 3.2228X + 0.2229$ ,  $r = 0.9967$ ; 在质量浓度 31.25 ~ 125 mg·L<sup>-1</sup>, 对 DPPH 自由基清除率与浓度呈很好的线性关系, 量效关系式为  $Y = 2.9531X + 0.256$ ,  $r = 0.9883$ 。

### 3.3 柱色谱分离技术对多叶棘豆清除自由基活性

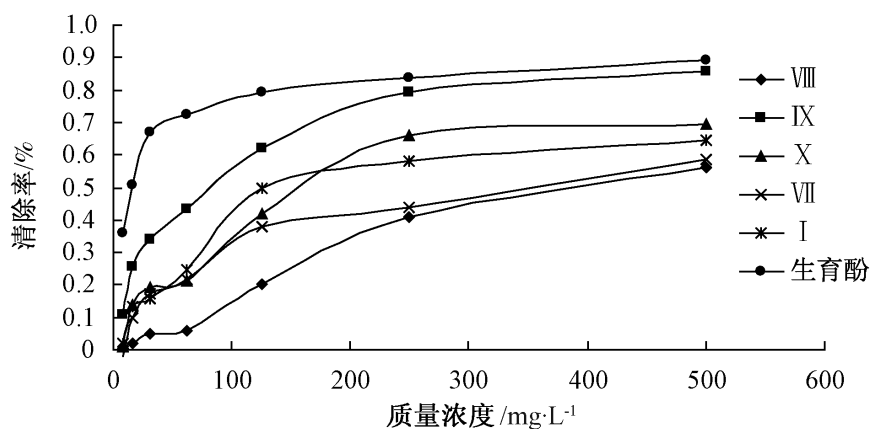


图 2 生育酚及样品 ~ 对 ABTS 自由基清除率

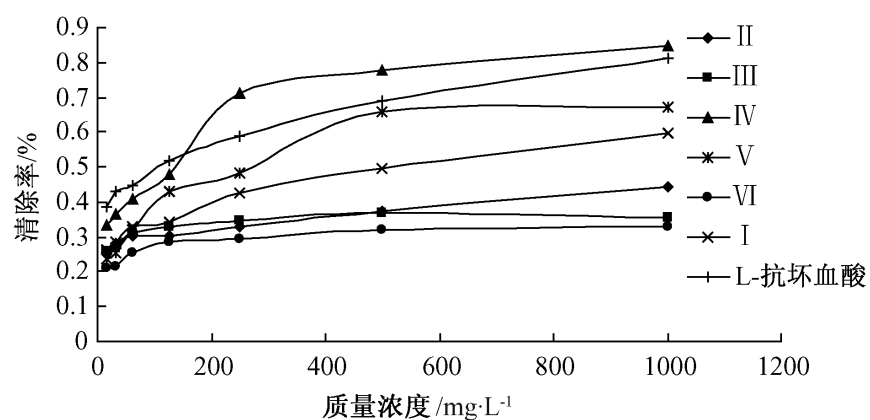


图 3 L-抗坏血酸及样品 ~ 对 DPPH 自由基清除率

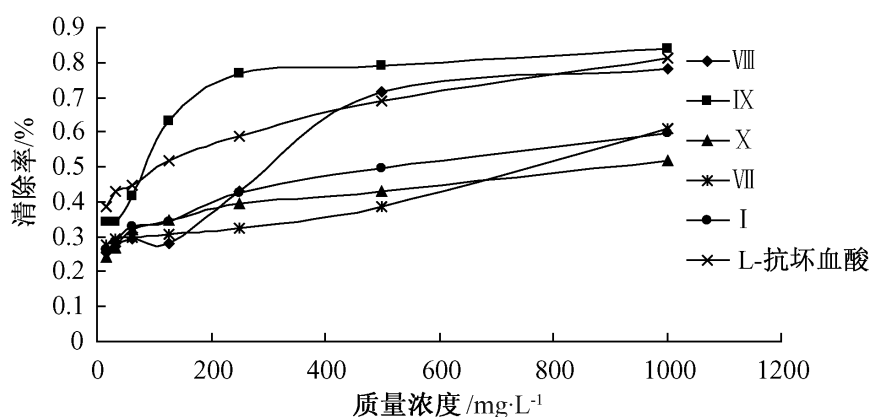


图 4 L-抗坏血酸及样品 ~ 对 DPPH 自由基清除率

成分分离效能分析 AB-8 型大孔吸附树脂为弱极性树脂, 应用广泛、价格低廉, 且具有分离效果好、富集能力高等突出优点。试验采用了 AB-8 型大孔吸附树脂对多叶棘豆中清除自由基活性成分进行分离和富集, 结果表明 AB-8 型大孔吸附树脂对清除 DPPH 自由基的活性成分分离效能显著。其中样品 (清除 DPPH 自由基自由能力最强) 与其他部位清除自由基能力差距显著。即 AB-8 型大孔吸附树脂对清除自由基活性部位进行了有效的筛选, 这将为进一步研究以及工业生产多叶棘豆抗氧化剂提供了基础。整体分离效能见图 5。

## 4 讨论

本研究采用 ABTS 和 DPPH 法对多叶棘豆乙醇提取物的不同极性部位及 AB-8 大孔吸附树脂柱层析不同浓度乙醇洗脱部位进行清除自由基能力的综合评价。其中 AB-8 大孔吸附树脂 50% 乙醇洗脱部位(样品 ) 的清除自由基能力最为突出, 强于同浓

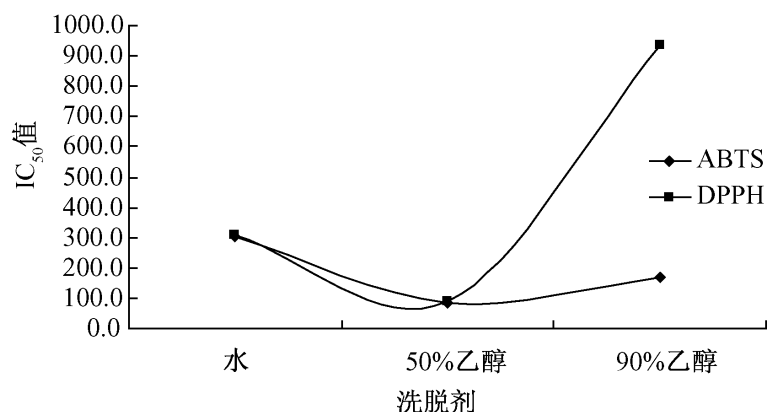


图 5 AB-8 大孔吸附树脂对多叶棘豆清除  
自由基活性成分分离效能

度的 L-抗坏血酸。同时,多叶棘豆乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位(样品 )清除自由基能力也与 L-抗坏血酸和生育酚处于同一水平,且在一定质量浓度范围内其清除 DPPH 自由基能力强于 L-抗坏血酸,这可能与其所含丰富的黄酮等多酚类物质有关。本研究结果表明多叶棘豆乙醇提取物具有较显著的清除自由基能力,有望研发为新型天然抗氧化剂。

特别是 AB-8 大孔吸附树脂色谱技术对多叶棘豆清除自由基活性成分高效能的分离富集为其进一步研究提供了依据,也为其它植物源清除自由基活性成分的工业化生产提供思路。

### [参考文献]

- [1] 庞战军,周玫,陈媛. 自由基医学研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:224.
- [2] 莫简. 医用自由基生物学导论[M]. 北京:人民卫生出版社,1989:62.
- [3] 内蒙古卫生厅. 内蒙古蒙药材标准[S]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1986:410.
- [4] 许良,苏日塔拉图,席海山,等. 野生多叶棘豆中芦丁的动态积累规律[J]. 中国野生植物资源,2006,25(3):53.
- [5] 赵宗孝,张昕原,巴根那,等. 蒙药材清除自由基作用的比较[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2004,19(1):69.
- [6] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biol Med, 1999, 26(1):1231.
- [7] Wong I Y, He Z D, Huang Y, et al. Antioxidant activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum Purpurascens* [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6):3113.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国中药杂志》2011 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创早最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、科研院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2010 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11 - 2272/R,国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.cjcmm.com.cn](http://www.cjcmm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010 - 64045830 转 602;主任电话 010 - 64058556;资源与栽培栏编辑:010 - 64048925;制剂栏编辑:010 - 64040392;化学栏编辑:010 - 64040113;药理栏编辑:010 - 84022522;临床栏编辑:010 - 64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010 - 64030625。