

别克参提取物抗氧化活性研究^Δ

陈春丽*, 田 兰, 勉强辉, 穆沙·艾力, 热娜·卡斯木[#](新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R285;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4425-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.03

摘要 目的:研究别克参提取物的体外抗氧化活性。方法:采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基与超氧阴离子(O₂⁻)自由基法,对别克参不同提取物的体外抗氧化活性进行评价。结果:别克参不同提取物清除DPPH·自由基、ABTS·自由基的能力强弱顺序为:乙酸乙酯提取物>石油醚提取物>正丁醇提取物>水提取物。别克参不同提取物对O₂⁻自由基有一定的清除能力,但不明显。结论:别克参不同提取物抗氧化活性差异可能与各部位中所含抗氧化成分的种类和结构有关。

关键词 别克参;极性部位;自由基;抗氧化活性

Study on Antioxidant Activity of *Erythronium sibiricum* Extract

CHEN Chun-li, TIAN Lan, MIAN Qiang-hui, Musa·Ali, Rena·Kasimu(Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate antioxidant activity of *Erythronium sibiricum* extracts *in vitro*. METHODS: The antioxidant activities of different *E. sibiricum* extracts were evaluated *in vitro* using scavenging DPPH· free radical, scavenging ABTS· free radical and scavenging superoxide anion radical. RESULTS: Different *E. sibiricum* extracts had obvious scavenging capacity to DPPH· free radical and ABTS· free radical in descending order: ethyl acetate extract>petroleum ether extract>*n*-butanol extract> water extract. Different *E. sibiricum* extracts showed scavenging capacity to O₂⁻ radical but was not very strong. CONCLUSIONS: Different extracts of *E. sibiricum* exhibit different antioxidant activities, which may be associated with the types and structures of antioxidant components.

KEY WORDS *Erythronium sibiricum*; Four polar fractions; Free radicals; Antioxidant activity

别克参为百合科(Liliaceae)猪牙花属植物(*Erythronium*)新疆猪牙花[*Erythronium sibiricum*(Fisch. et. Mey.) Kryn, 又名西伯利亚猪牙花、阿尔泰山猪牙花、鸡腿参]的干燥肉质鳞茎^[1-2]。是哈萨克族历史悠久的药用植物之一。其性微寒、味微苦,具有滋补、强身、壮体之功效,主治体虚多病、腰膝酸软无力等症。国外关于别克参的研究未见报道,国内针对别克参的研究亦较少,研究方向主要集中于讨论别克参的生长环境及分布、繁殖特征、形态特征、解剖结构特征、生态适应性等^[3-5]。本研究拟通过采用超声提取、有机溶剂萃取得到别克参不同提取物,分析各极性部位清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基、超氧阴离子(O₂⁻)自由基的能力,对别克参提取物体外抗氧化活性进行系统研究。

1 材料

1.1 仪器

CINTRA-404型紫外分光光度计(澳大利亚GBC公司); EYELA N-1100型旋转蒸发器(东京理化器械株式会社);

Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(No. XJGR12013077);新疆医科大学科研创新基金项目(No. XJC2011116)

* 讲师,博士研究生。研究方向:新疆特色药材研发。电话:0991-4365034。E-mail: ccl0326@sina.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:新疆特色药材研发。电话:0991-4362473。E-mail: renakasimu@vip.sina.com

BS-110S型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司); KQ-500DE型超声波提取仪(昆山市超声仪器有限公司)

1.2 药材

别克参购自新疆阿勒泰哈萨克医院,经新疆医科大学药学院热娜·卡斯木教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

维生素C(Vc,天津市天新精细化工开发中心);石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、无水乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);二苯代苦味酰基(DPPH)、2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6磺酸)二铵盐(ABTS,美国Sigma-Aldrich公司);邻苯三酚(天津市化学试剂六厂三分厂);Tris(天津市盛奥化学试剂有限公司);盐酸、K₂S₂O₈(北京化工厂)。

2 方法

2.1 别克参提取物4种极性部位的制备

将干燥后的别克参1 kg粉粉碎混匀后精确称量,按1:10(m/V)加入95%乙醇超声提取3次(温度:80℃,功率:100%,时间40 min,加回流冷凝装置),合并滤液减压蒸馏至浸膏状,冷冻干燥,得乙醇提取物。在所得提取物中加入蒸馏水得混悬液,置于分液漏斗中,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,分液,将所得石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相依次减压浓缩后冷冻干燥,得别克参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 别克参提取液的制备 取别克参提取物石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物适量,分别溶于适量无水乙醇、无水乙醇、75%乙醇、蒸馏水,得供试品溶液。

2.2.2 阳性对照Vc溶液的制备 取适量Vc溶于75%乙醇,得阳性对照品溶液。

2.2.3 DPPH溶液的制备 制备浓度为0.645 9 mmol/L的DPPH乙醇溶液作为贮备液。试验前,移取DPPH贮备液10 ml置于50 ml量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,最终浓度为0.129 2 mmol/L,贮藏,备用。

2.2.4 ABTS溶液的制备 移取176 μ l 140 mmol/L $K_2S_2O_8$ 溶液与10 ml 7 mmol/L的ABTS溶液混合,常温避光放置16 h以上作为贮备液。试验前,取ABTS贮备液1 ml,用蒸馏水或无水乙醇稀释至吸光度(A)值为(0.70 \pm 0.02),贮藏,备用。

2.3 清除自由基试验

2.3.1 清除DPPH·和ABTS·试验 参考文献^[6-10]并适当改进。2 ml自由基溶液和2 ml提取液混合,摇匀,37 $^{\circ}$ C避光保存一定时间后,于最大吸收波长处测吸光度,记为 A_t 。相同条件下,2 ml自由基溶液与2 ml相应溶剂混合, A 记为 A_0 。2 ml一定浓度提取液与2 ml溶剂混合, A 值记为 A_1 。均测3次,求平均值。

清除率(IP)的计算公式: $IP(\%) = 1 - (A_t - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。

2.3.2 清除 $O_2^{\cdot-}$ 试验 参考文献^[11]并适当改进。比色管中依次加入4.5 ml 100 mmol/L的Tris-HCl缓冲溶液(pH 8.2)、3.2 ml双蒸水、1 ml提取液和0.3 ml 3 mmol/L邻苯三酚,迅速混匀后在325 nm波长处每隔30 s测1次 A , A 随时间的变化率记为 K_1 。在相同条件下,其他加样量不变,将1 ml提取液换成1 ml双蒸水,其 A 随时间的变化率记为 K_0 。

对 $O_2^{\cdot-}$ 的IP计算公式: $IP(\%) = (K_0 - K_1)/K_0 \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 别克参提取物清除DPPH·能力测定

3.1.1 DPPH体系的吸收光谱 参考文献^[6]测定波长选择在500~600 nm之间。等体积DPPH溶液与无水乙醇混合 $\lambda_{max} = 516$ nm,等体积DPPH溶液与75%乙醇混合 $\lambda_{max} = 520$ nm,DPPH溶液与蒸馏水混合 $\lambda_{max} = 522$ nm。因此,别克参石油醚、乙酸乙酯提取物测定波长设定为516 nm,别克参正丁醇提取物测定波长为520 nm,别克参水提取物测定波长为522 nm。DPPH体系吸收光谱见图1。

3.1.2 反应时间对 A 值的影响 37 $^{\circ}$ C,等体积DPPH溶液与别克参提取物反应, A 值随时间延长而减小, A 值减小到一定程度后趋于基本不变,表明此时清除率最大,清除反应趋于平衡。因此,本试验中别克参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物反应时间定为90、20、100、40 min。DPPH体系 $A-t$ 曲线见图2。

3.1.3 别克参提取物清除DPPH·的清除曲线 半数抑制浓度(IC₅₀)由小到大顺序为:别克参乙酸乙酯提取物<别克参石油醚提取物<别克参正丁醇提取物<别克参水提取物。别克参提取物清除DPPH·的清除曲线见图3;别克参提取物 A 与 c 的关系见表1。

3.2 别克参提取物清除ABTS·能力测定

3.2.1 ABTS体系的吸收光谱 参考文献^[6]测定波长选择在700~800 nm之间。等体积ABTS溶液与无水乙醇混合 $\lambda_{max} = 752$ nm,ABTS溶液与75%乙醇混合 $\lambda_{max} = 738$ nm,ABTS溶液与蒸馏水混合 $\lambda_{max} = 728$ nm。因此,别克参石油醚、乙酸乙酯提

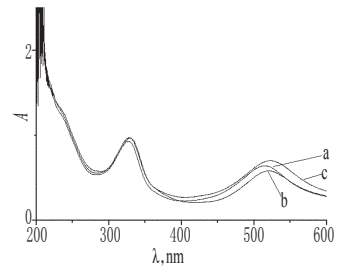


图1 DPPH体系的吸收光谱

a.DPPH溶液+无水乙醇;b.DPPH溶液+75%乙醇;c.DPPH溶液+蒸馏水

Fig 1 The absorption spectra of DPPH system

a.DPPH solution+alcohol;b.DPPH solution+75% alcohol;c.DPPH Solution+distilled water

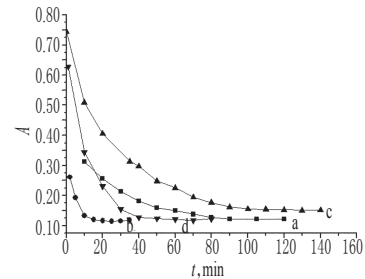


图2 DPPH体系 $A-t$ 曲线

a.石油醚提取物;b.乙酸乙酯提取物;c.正丁醇提取物;d.水提取物

Fig 2 Relationship between absorbance and time in DPPH system

a.pertroleum ether exact;b.etyl acetate exact;c.n-butanol exact;d.water exact

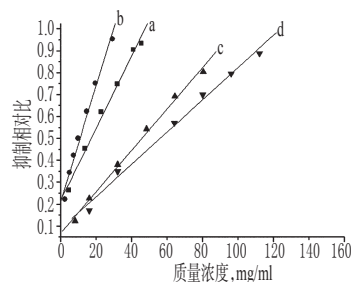


图3 别克参提取物清除DPPH·的清除曲线

a.石油醚提取物;b.乙酸乙酯提取物;c.正丁醇提取物;d.水提取物

Fig 3 Scavenging capacity of four polar fractions on DPPH

a.pertroleum ether exact;b.etyl acetate exact;c.n-butanol exact;d.water exact

物测定波长设定为752 nm,别克参正丁醇提取物测定波长为738 nm,别克参水提取物测定波长为728 nm。ABTS体系的吸收光谱见图4。

3.2.2 反应时间对 A 值的影响 37 $^{\circ}$ C,等体积ABTS溶液与一定浓度提取液反应,系统的 A 值随时间延长而减小,减小到一定程度后 A 值基本保持不变。别克参石油醚、乙酸乙酯提取物的溶液与ABTS溶液混合瞬间即使ABTS溶液褪色,表明清除速率极快。因此,本试验中别克参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物反应时间设定为5、2、10、12 min。ABTS体系 $A-t$ 曲线见图5。

3.2.3 别克参提取物清除ABTS·自由基的清除曲线 IC₅₀由小到大顺序为:别克参乙酸乙酯提取物<别克参石油醚提取物<别克参正丁醇提取物<别克参水提取物。别克参提取物

表1 别克参提取物A与c的关系

Tab 1 Relationship between absorbance and concentration of four polar fractions

自由基类型	物质	反应条件及测定波长	质量浓度范围,mg/ml	清除率曲线线性方程	n	r	IC ₅₀ ,mg/ml
DPPH·	Vc	37 °C, 30 min, 520 nm	0.001 0~0.005 0	y=191.72x+0.017 3	5	0.997 1	0.002 5
	别克参石油醚提取物	37 °C, 90 min, 516 nm	0.056 7~0.567 5	y=1.319 1x+0.218 5	6	0.995 5	0.213 4
	别克参乙酸酯提取物	37 °C, 20 min, 516 nm	0.030 5~0.366 0	y=2.116 8x+0.214 4	7	0.991 5	0.134 9
	别克参正丁醇提取物	37 °C, 100 min, 520 nm	0.100 5~1.005 0	y=0.755 3x+0.070 3	6	0.997 5	0.568 6
	别克参水提取物	37 °C, 40 min, 522 nm	0.200 0~1.400 0	y=0.589 5x+0.088 5	6	0.995 9	0.698 0
ABTS·	Vc	22 °C, 混合瞬间, 738 nm	0.000 5~0.003 8	y=211.13x+0.053 4	6	0.998 9	0.002 1
	别克参石油醚提取物	37 °C, 5 min, 752 nm	0.022 5~0.283 5	y=2.472 9x+0.164 6	6	0.991 4	0.135 6
	别克参乙酸酯提取物	37 °C, 2 min, 752 nm	0.012 2~0.134 2	y=6.068 9x+0.102 9	8	0.997 7	0.065 4
	别克参正丁醇提取物	37 °C, 10 min, 738 nm	0.200 1~1.000 5	y=0.640 0x+0.290 8	5	0.995 7	0.326 9
	别克参水提取物	37 °C, 12 min, 728 nm	0.200 0~1.000 0	y=0.654 7x+0.238 4	5	0.996 4	0.399 6

清除ABTS·的清除曲线见图6。

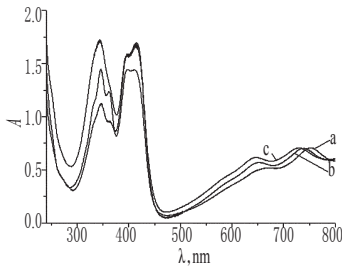


图4 ABTS体系的吸收光谱

a. DPPH 溶液+无水乙醇; b. DPPH 溶液+75% 乙醇; c. DPPH 溶液+蒸馏水

Fig 4 The absorption spectrum of ABTS system

a. DPPH solution+alcohol; b. DPPH solution+75% alcohol; c. DPPH Solution+distilled water

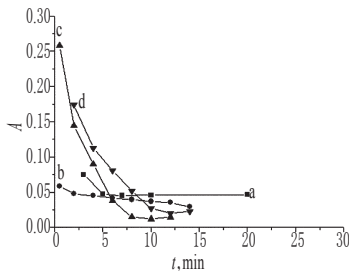


图5 ABTS体系A-t曲线

a. 石油醚提取物; b. 乙酸乙酯提取物; c. 正丁醇提取物; d. 水提取物

Fig 5 Relationship between absorbance and time in ABTS system

a. petroleum ether exact; b. ethyl acetate exact; c. n-butanol exact; d. water exact

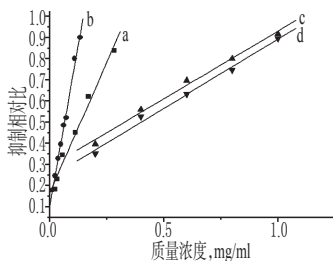


图6 别克参提取物清除ABTS·的清除曲线

a. 石油醚提取物; b. 乙酸乙酯提取物; c. 正丁醇提取物; d. 水提取物

Fig 6 Scavenging effects of four polar fractions on ABTS·

a. petroleum ether exact; b. ethyl acetate exact; c. n-butanol exact; d. water exact

3.3 别克参提取物清除O₂⁻自由基能力测定

当邻苯三酚系统中加入别克参提取液后,体系的A-t直线

斜率比不加提取液斜率有所降低,且提取液质量浓度越高,直线斜率越小,但降低程度均不是很明显,表明别克参提取物有一定的清除O₂⁻自由基的能力,但效果不是很好。邻苯三酚在别克参提取物中的A-t曲线见图7~图10;别克参提取物清除O₂⁻的能力见表2。

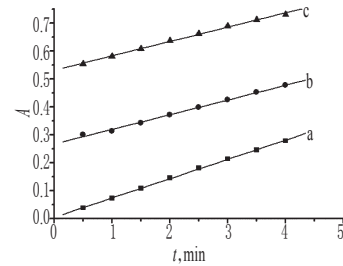


图7 A-t曲线(石油醚提取物)

a. 未加提取液; b. 0.125 8 mg/ml 石油醚提取物; c. 0.251 6 mg/ml 石油醚提取物

Fig 7 Absorbance-time curves (after adding petroleum ether extract)

a. no extract solution; b. 0.125 8 mg/ml petroleum ether extract; c. 0.251 6 mg/ml petroleum ether extract

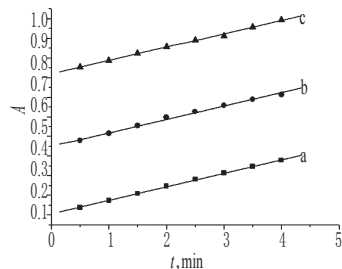


图8 A-t曲线(乙酸乙酯提取物)

a. 未加提取液; b. 0.084 7 mg/ml 乙酸乙酯提取物; c. 0.169 4 mg/ml 乙酸乙酯提取物

Fig 8 Absorbance-time curves (after adding ethyl acetate extract)

a. no extract solution; b. 0.084 7 mg/ml ethyl acetate extract; c. 0.169 4 mg/ml ethyl acetate extract

4 讨论

别克参作为新疆的一种特色药材,已在哈萨克族中具有广泛的民间用药基础,但历版《中国药典》及《哈萨克药志》均未收录,国内、外针对该药材的研究也较少,生物活性研究亦尚未涉及。自由基是一类含有未配对电子的基团、分子或原子,它们是由机体内正常细胞和病态细胞产生的,或者是由外

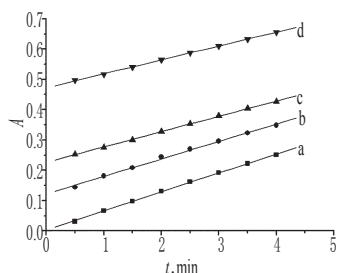


图9 A-t曲线(正丁醇提取物)

a.未加提取液;b.0.555 5 mg/ml正丁醇提取物;c.1.111 0 mg/ml正丁醇提取物;d.2.222 0 mg/ml正丁醇提取物

Fig 9 Absorbance-time curves (after adding n-butanol extract)

a.no extract solution;b.0.555 5 mg/ml n-butyl alcohol extract;c.1.111 0 mg/ml n-butyl alcohol extract;d.0.222 0 mg/ml n-butyl alcohol extract

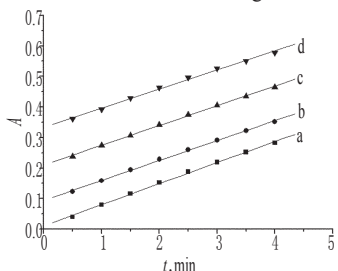


图10 A-t曲线(水提取物)

a.未加提取液;b.提取液浓度0.889 0 mg/ml水提取物;c.提取液浓度1.778 0 mg/ml;d.3.556 0 mg/ml水提取物

Fig 10 Absorbance-time curves (after adding water polar fraction)

a.no extract solution;b.0.889 0 mg/ml water extract;c.1.778 0 mg/ml water extract;d.3.556 0 mg/ml water extract

表2 别克参提取物清除O₂⁻的能力

Tab 2 Scavenging capacity of four polar fractions on O₂⁻ free radical

物质	质量浓度, mg/ml	线性方程	r	IP, %
石油醚提取物	0	y=0.069 0x+0.005 5	0.999 6	
	0.125 8	y=0.052 5x+0.267 5	0.998 0	23.90
	0.251 6	y=0.051 3x+0.531 8	0.999 0	25.70
乙酸乙酯提取物	0	y=0.069 0x+0.005 5	0.999 6	
	0.084 7	y=0.068 1x+0.350 2	0.996 5	1.30
	0.169 4	y=0.067 6x+0.719 7	0.998 8	2.03
正丁醇提取物	0	y=0.062 6x+0.005 5	0.999 5	
	0.555 5	y=0.057 6x+0.122 3	0.998 0	7.99
	1.111 0	y=0.050 5x+0.226 8	0.999 7	19.30
	2.222 0	y=0.045 8x+0.472 7	0.999 7	26.80
水提取物	0	y=0.069 0x+0.011 0	0.999 2	
	0.889 0	y=0.065 2x+0.094 4	0.999 4	5.51
	1.778 0	y=0.064 8x+0.209 8	0.999 3	6.09
	3.556 0	y=0.062 8x+0.333 5	0.998 1	8.98
	Vc	1.11 × 10 ⁻³	y=0.058 4x+0.032 5	0.999 7
	2.22 × 10 ⁻³	y=0.047 1x+0.017 0	0.997 5	26.50
	4.44 × 10 ⁻³	y=0.038 0x+0.022 8	0.995 6	40.70
	8.89 × 10 ⁻³	y=0.013 8x+0.028 1	0.984 4	78.50

部因素导致的^[12]。它们是人体生命过程中生物化学反应产生的中间产物,在低浓度下维持生物正常的生理活动,而体内自由基在过多或清除缓慢的情况下均会引起分子、细胞甚至器

官损伤,如蛋白质、多肽、DNA等导致病变,进一步导致动脉硬化、癌变等一系列疾病^[13]。自由基可通过补充抗氧化剂清除,而人工合成的抗氧化剂[如2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)等]被认为长期使用会引发肝损伤和癌症,具有毒副作用。因此,寻找天然、高效、低毒的抗氧化剂已成为食用及生物医学领域重要的研究方向。本研究从讨论别克参提取物体外抗氧化活性入手,初步探讨了该药材的生物活性,以期能为研究该药材其他方面的生物活性奠定基础。

本研究表明,别克参提取物均能明显清除 DPPH·、ABTS·。并且,别克参不同提取物清除 DPPH·、ABTS·能力大小具有相同的趋势,即别克参乙酸乙酯提取物>别克参石油醚提取物>别克参正丁醇提取物>别克参水提取物。同时,别克参提取物具有一定的清除 O₂⁻的能力。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,2010: 86.
- [2] 蒲瑜.阿尔泰山猪牙花[J].新疆林业,1986(4):6.
- [3] 古丽江·贾曼拜,何春霞,古丽西拉,等.新疆猪牙花的应用价值与影响开发利用的因素[J].新疆林业,2012(3):32.
- [4] 古丽江·贾曼拜,何春霞,古丽西拉,等.新疆猪牙花生物学特征研究[J].新疆林业,2012(2):17.
- [5] 马智,马森,赵红艳.类短命植物新疆猪牙花解剖结构及其生态适应性的研究[J].广西植物,2012,32(3):304.
- [6] Esmaeili MA, Sonboli A. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(3):846.
- [7] Akinmoladun AC, Obuotor EM, Farombi EQ, et al. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some nigerian indigenous medicinal plants[J]. *J Med Food*, 2010, 13(2):444.
- [8] Morakinyo AO, Oludare GO, Aderinto OT, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of aqueous and ethanol extracts of *Zingiber officinale*[J]. *Biol Med*, 2011, 3(5):25.
- [9] Ngawhirunpat T, Opanasopi P, Sukma M, et al. Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*) [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(1):55.
- [10] 陈超杰,李万芳,秦海林,等.苦菊乙酸乙酯提取物的体外抗氧化活性研究[J].中国药房,2011,22(15):1347.
- [11] 孙涛,金亚旭,陈万喜,等.水溶性 C₆₀-β丙氨酸衍生物清除超氧阴离子自由基 O₂⁻ 及对小鼠胸腺细胞生长影响的研究[J].高等学校化学学报,2002,23(8):1598.
- [12] Zou C, Du Y M, L I Y, et al. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 73(2):322.
- [13] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. *Science*, 1987, 235(4788):529.

(收稿日期:2013-07-26 修回日期:2013-10-10)