

# 荆条花不同提取物抗氧化活性的比较研究

于海平<sup>1\*</sup>,孔祥密<sup>2</sup>,施余杰<sup>2</sup>,康文艺<sup>2#</sup>(1.中国医药科技出版社,北京 100082;2.河南大学中药研究所,河南开封 475004)

中图分类号 R285;Q946 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3672-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.08

**摘要** 目的:研究荆条花不同提取物体外抗氧化活性并进行比较。方法:采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基与铁离子(Fe<sup>3+</sup>)还原(FRAP)等方法对荆条花不同提取物体外抗氧化活性进行评价,并与阳性对照二丁基羟基甲苯(BHT)比较。结果:荆条花不同提取物总的抗氧化活性比较结果为:荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏>荆条花正丁醇提取物>荆条花石油醚提取物。其中,荆条花乙酸乙酯提取物清除DPPH自由基(IC<sub>50</sub>=35.70 μg/ml)、清除ABTS自由基(IC<sub>50</sub>=7.40 μg/ml)与还原Fe<sup>3+</sup>(当量抗氧化能力为1 110.77 μmol/g)的能力最强,但弱于阳性对照药物BHT(上述三值分别为23.00 μg/ml、2.30 μg/ml、1 532.70 μmol/g)。结论:荆条花不同提取物抗氧化活性差异可能与其各个部位中所含抗氧化成分的种类和结构有关。

**关键词** 荆条花;抗氧化活性;二苯代苦味酰基;2,2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐;铁离子还原能力

## Comparison of Antioxidant Activity of Different Extract of *Vitex negundo* Flower

YU Hai-ping<sup>1</sup>, KONG Xiang-mi<sup>2</sup>, SHI Yu-jie<sup>2</sup>, KANG Wen-yi<sup>2</sup>(1.Chinese Medical Science Publishing House, Beijing 100082, China; 2.Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study and compare antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* flower in vitro. METHODS: DPPH radical scavenging, [2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] (ABTS) radical scavenging and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluate the antioxidant activity of different extract of *V. negundo* with BHT as positive control. RESULTS: The antioxidant activity of different extracts from *V. negundo* flower were in descending order, i.e. ethyl acetate extract>70% ethanol extract>n-butyl alcohol extract>petroleum ether extract. The ethyl acetate extract of *V. Negundo* flower had the best ability for DPPH radical scavenging (IC<sub>50</sub>=35.70 μg/ml), ABTS radical scavenging (IC<sub>50</sub>=7.40 μg/ml) and ferric reducing (TEAC=1 110.77 μmol/g), but it was still weaker than that of positive control BHT (IC<sub>50</sub> and TEAC were 23.00 μg/ml, 2.30 μg/ml and 1 532.70 μmol/g). CONCLUSIONS: The difference of antioxidant activity of different extracts may be associated with the type and structure of antioxidant components in each parts of *V. negundo* flower.

**KEY WORDS** *Vitex negundo* flower; Antioxidant activity; DPPH; 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS); Ferric reducing ability

四环素类和双磷酸盐类骨质疏松症药物与骨骼的非可逆性结合,在发挥抗骨质疏松作用的同时,也会蓄积在骨组织中,阻碍骨骼的自然更新,造成不良反应。本实验室在前期研究的基础上,通过游离大黄蒽醌类化合物对糖皮质激素诱导的大鼠骨质疏松模型的股骨全骨和股骨远端的BMD和BMC及它们随给药时间变化的研究,进一步证实游离大黄蒽醌类化合物在体内可以预防泼尼松所致的股骨BMD的丢失,同时显示大鼠股骨全骨的BMC没有出现随时间显著蓄积的趋势。研究中观察到大鼠股骨远端的BMC在一些给药时间段里有蓄积现象,由于大鼠股骨远端对药物反应敏感,药物可以直达该部位<sup>[1]</sup>,导致这种现象的主要原因可能有两方面:一是连续给药后游离大黄蒽醌在该部位的浓度达到稳态,二是游离大黄蒽醌的骨靶向或趋骨性所致。确切的原因尚需进一步研究。

## 参考文献

[1] Wang Y, Chen H, Wan ZM, et al. Synthesis of a new ser-

ies of bone affinity compounds[J]. *Chin Chem Lett*, 2006, 17(3):310.

[2] 张丽,崔颖,李灵芝.大黄蒽醌类化合物的羟磷灰石吸附性能研究[J].武警医学院学报,2008,17(12):1 048.

[3] 刘钰瑜,崔燎,吴铁,等.大黄素对体外大鼠骨髓基质细胞向脂肪细胞方向分化的影响[J].中国药理学通报,2005, 21(7):842.

[4] 刘钰瑜,崔燎,吴铁,等.大黄素和小剂量雌激素合用对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用[J].中国骨质疏松杂志, 2006,12(1):66.

[5] Huang SS, Yeh SF, Hong CY. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure-activity relationship[J]. *J Nat Prod*, 1995, 58 (9):1 365.

[6] 徐友锋,李灵芝,陈虹.大黄中提取游离蒽醌的工艺改进[J].武警医学院学报,2002,11(12):76.

[7] 李青南,吴铁,李朝阳,等.骨质疏松实验动物研究:骨组织形态计量学[M].成都:四川大学出版社,2001:44-45.

(收稿日期:2012-11-27 修回日期:2013-03-03)

\*副编审。研究方向:中医药理论。电话:010-62253302

#通信作者:教授。研究方向:中药活性成分及新药研发。电话:0378-3880680。E-mail:kangweny@hotmail.com

荆条 (*Vitex negundo* L.) 为马鞭草科牡荆属灌木<sup>[1]</sup>, 生于山坡、路旁或灌丛中<sup>[2]</sup>, 是我国北方主要的蜜源植物之一, 其蜜品质优良, 营养价值极高<sup>[3]</sup>。作为我国暖温带的优势物种, 荆条具有很强的水土保持能力<sup>[4]</sup>, 其叶片对不同的光环境有很好的适应机制<sup>[5]</sup>。目前的研究重点主要有荆条幼苗对干旱的响应<sup>[5]</sup>、荆条灌丛群落的水平<sup>[6-7]</sup>与种子萌发的特性<sup>[8-9]</sup>、荆条花的除草活性<sup>[10]</sup>。此外, 有文献报道, 荆条花乙醇提取物对植物病原真菌具有一定程度的抑制作用<sup>[11]</sup>; 荆条叶挥发油中含量最高的成分为β-丁香烯<sup>[12]</sup>。但是, 至今未见荆条花抗氧化等生物活性的报道。本研究采用清除二苯代苦味酰基(DPPH)自由基、清除2, 2'-氨基-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)自由基、铁离子(Fe<sup>3+</sup>)还原(FRAP)3种体外抗氧化活性分析方法, 首次对荆条花体外抗氧化活性进行了考察。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Electron 公司); UV-2000 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼科仪器有限公司); AL-IC 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); N-1100 型旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社); MS-H1 型混合器(北京博励阳生物医学技术发展有限公司)。

### 1.2 药材

荆条花, 于2010年7月采于湖北省大别山, 由河南大学中药研究所生药教研室李昌勤副教授鉴定为真品, 标本存于河南大学中药研究所。

### 1.3 试剂

DPPH(东京化成工业株式会社, 批号:FIM01, 规格:1 g); 6-三吡啶基三嗪(TPTZ, 批号:1306929, 规格:25 g)、二丁基羟基甲苯(BHT, 批号:A020158601, 规格:250 g)均购自比利时 Across Organics 公司; ABTS(德国 Fluka 公司, 批号:BCBG0034V, 规格:1 g); Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetram-ethylchroman-2-carboxylic acid, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号:10327AD, 规格:1 g); 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 荆条花浸膏的提取

取自然干燥的荆条花粉碎, 用70%乙醇加热回流2次, 每次1 h, 合并, 滤过, 浓缩得荆条花70%乙醇总浸膏(得率为15%)。提取物分散于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 得荆条花石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取物, 得率分别为0.22%、1.57%、4.16%。

### 2.2 荆条花提取物抗氧化活性研究方法

2.2.1 DPPH法 参照文献<sup>[13]</sup>, 将荆条花石油醚提取物、荆条花乙酸乙酯提取物、荆条花正丁醇提取物、荆条花70%乙醇总浸膏分别用甲醇制备成质量浓度为2.0 mg/ml的样品溶液。将10 μl 样品溶液和175 μl 200 μmol/L 的DPPH溶液先后加入到96微孔板中, 同时以10 μl 甲醇代替待测液作为溶剂对照。阴暗处反应20 min后, 用酶标仪在515 nm 波长处测定吸光度(A), 按照公式计算初筛清除率。如清除率高于50%, 在初质量浓度的基础上, 将样品稀释成1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml 系列质量浓度的溶液, 再次测定A值。阳性对照为

BHT。每份样品平行操作3次, 取平均值。按照以下公式计算清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100\%$$

式中,  $A_{\text{control}}$  为 DPPH 本身在测定波长处的 A 值;  $A_{\text{sample}}$  为样品溶液对 DPPH 自由基作用后的 A 值(除去样品自身吸收)。根据计算所得的清除率, 运用 Origin 6.0 软件处理, 得到样品清除 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

2.2.2 ABTS法 参照文献<sup>[14]</sup>, 将粉末状 ABTS 用蒸馏水溶解, 制备成浓度为7 mmol/L 的溶液, 再与浓度为2.45 mmol/L 的 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 溶液混合, 使用前在暗处放置12 h 以上, 使用时用甲醇稀释使其在734 nm 波长处 A 为0.78~0.82, 备用。将荆条花石油醚提取物、荆条花乙酸乙酯提取物、荆条花正丁醇提取物、荆条花70%乙醇总浸膏分别用甲醇制备成质量浓度为2.0 mg/ml 的样品溶液。取10 μl 样品溶液加入200 μl ABTS 溶液混合, 用酶标仪在405 nm 波长处测定 A 值, 按照公式计算初筛清除率。如果清除率>50%, 在初质量浓度的基础上, 将样品稀释为1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml 系列质量浓度的溶液, 再次测定 A 值。阳性对照为 BHT。每份样品平行操作3次, 取平均值。按照以下公式计算清除率:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100\%$$

式中,  $A_{\text{control}}$  为 ABTS 本身在测定波长处的 A 值,  $A_{\text{sample}}$  为样品对 ABTS 自由基作用后的 A 值(除去样品自身吸收)。根据计算所得的清除率, 运用 Origin 6.0 软件处理, 得到样品清除 ABTS 自由基的 IC<sub>50</sub>。

2.2.3 FRAP法 参照文献<sup>[15]</sup>, 用甲醇制备成系列质量浓度的样品溶液。取10 μl 样品溶液加入到96微孔板中, 加入200 μl 新鲜制备的 TPTZ 工作液, 混合, 37 °C 反应30 min 后, 用酶标仪在595 nm 波长处测定 A 值。阳性对照为 BHT。每份样品平行操作3次, 取平均值。若所测定样品溶液 A 值超过线性范围, 则需要进一步稀释样品溶液, 结果以 Trolox 当量表示, 以代表还原 Fe<sup>3+</sup> 的能力。

## 3 结果

### 3.1 荆条花提取物对 DPPH 自由基的清除作用

荆条花石油醚提取物和荆条花正丁醇提取物清除 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 未测出。荆条花乙酸乙酯提取物清除 DPPH 自由基的能力较强(IC<sub>50</sub>=35.70 μg/ml), 但仍弱于阳性对照 BHT (IC<sub>50</sub>=23.00 μg/ml)。荆条花不同提取物和 BHT 对 DPPH 自由基的清除能力强弱依次为 BHT>荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏。荆条花不同提取物对 DPPH 自由基的清除作用见表1。

表1 荆条花不同提取物的抗氧化活性

Tab1 Antioxidant activity of different extracts from *V. negundo* flower

样品	DPPH		ABTS		FRAP
	清除率, %	IC <sub>50</sub> , μg/ml	清除率, %	IC <sub>50</sub> , μg/ml	TEAC, μmol/g
荆条花石油醚提取物	1.04	-	22.70	-	-
荆条花乙酸乙酯提取物	88.96	35.70	97.29	7.40	1 110.77
荆条花正丁醇提取物	49.52	-	98.50	15.40	403.46
荆条花70%乙醇总浸膏	75.10	63.00	98.38	11.70	882.37
BHT	58.35	23.00	100.40	2.30	1 532.70

### 3.2 荆条花提取物对ABTS自由基的清除作用

在试验质量浓度范围内,质量浓度在5.95  $\mu\text{g/ml}$ 时,荆条花乙酸乙酯提取物、荆条花70%乙醇总浸膏和荆条花正丁醇提取物对ABTS自由基的清除率都较低,分别为42.52%、25.67%和23.16%,BHT对ABTS自由基的清除率为85.45%。当质量浓度达到23.81  $\mu\text{g/ml}$ 时,荆条花乙酸乙酯提取物、荆条花70%乙醇总浸膏和BHT对ABTS自由基的清除率分别增大到97.29%、98.38%和100.40%,说明荆条花提取物对ABTS自由基的清除率与质量浓度呈正相关。当质量浓度在23.81  $\mu\text{g/ml}$ 以下时,荆条花乙酸乙酯提取物和荆条花70%乙醇总浸膏对ABTS自由基的清除率随着质量浓度线性增高;当质量浓度在23.81  $\mu\text{g/ml}$ 以上时,荆条花乙酸乙酯提取物和荆条花70%乙醇总浸膏对ABTS的清除率趋于饱和,质量浓度再增加,清除率几乎不变。当荆条花正丁醇提取物质量浓度在47.62  $\mu\text{g/ml}$ 以下时,清除率几乎是随质量浓度增大而线性增高,但当质量浓度在47.62  $\mu\text{g/ml}$ 以上时,清除率几乎不变,说明抗氧化作用已接近饱和,再增加提取物的用量,清除率变化不大。

荆条花乙酸乙酯部位清除ABTS自由基的能力最强( $\text{IC}_{50}=7.40 \mu\text{g/ml}$ ),仍低于阳性对照BHT( $\text{IC}_{50}=2.30 \mu\text{g/ml}$ )。荆条花不同提取物和BHT对ABTS自由基的清除能力强弱依次为BHT>荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏>荆条花正丁醇提取物。荆条花不同提取物对ABTS自由基的清除作用见表1、图1。

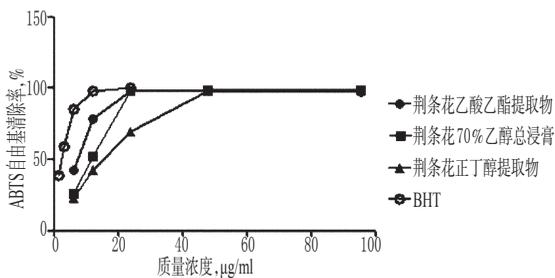


图1 抗氧化物质量浓度对ABTS自由基清除率的影响

Fig 1 Effect of mass concentration of antioxidant on ABTS free radical

### 3.3 荆条花提取物还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力

4个提取物中,荆条花乙酸乙酯提取物还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力最强[当量抗氧化能力( $\text{TEAC}$ )= $1110.77 \mu\text{mol/g}$ ],但仍弱于阳性对照BHT( $\text{TEAC}$ = $1532.70 \mu\text{mol/g}$ )。荆条花不同提取物和BHT还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力强弱依次为:BHT>荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏>荆条花正丁醇提取物。荆条花石油醚提取物几乎无还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力。荆条花不同提取物还原 $\text{Fe}^{3+}$ 的能力见表1。

## 4 讨论

本研究利用DPPH、ABTS和FRAP三种方法对荆条花体外抗氧化活性进行了考察,发现荆条花具有较好的抗氧化活性;荆条花不同提取物清除自由基的能力随质量浓度的增加

而增大,且在一定范围内,其抗氧化作用与质量浓度呈正相关,且4个提取物中,荆条花乙酸乙酯提取物清除DPPH自由基( $\text{IC}_{50}=35.70 \mu\text{g/ml}$ )、清除ABTS自由基( $\text{IC}_{50}=7.40 \mu\text{g/ml}$ )与还原 $\text{Fe}^{3+}$ ( $\text{TEAC}=1110.77 \mu\text{mol/g}$ )的能力最强。其不同提取物总的抗氧化活性比较结果为:荆条花乙酸乙酯提取物>荆条花70%乙醇总浸膏>荆条花正丁醇提取物>荆条花石油醚提取物,即荆条花乙酸乙酯提取物总的抗氧化活性较好。其抗氧化能力次序可能与荆条花各个提取部位中所含的抗氧化成分的种类及结构有关。

## 参考文献

- [1] 陈汉斌,郑亦津,李法曾.山东植物志:下册[M].青岛:青岛出版社,1994:1011-1012.
- [2] 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,2004:5988.
- [3] 徐传球.荆条蜜源及其泌蜜规律[J].蜜蜂杂志,2012(7):32.
- [4] 杜宁,张秀茹,王伟,等.荆条叶性状对野外不同光环境的表型可塑性[J].生态学报,2011,31(20):6049.
- [5] Du N, Guo WH, Zhang XR, et al. Morphological and physiological responses of *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd. to drought stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010, 32(5):839.
- [6] 张金屯.模糊聚类在荆条灌丛(*Scrub. Vitex negundo* var. *heterophylla*)分类中的应用[J].植物生态学与地植物学丛刊,1985,9(4):306.
- [7] 刘任涛,毕润成,闫桂琴,等.山西霍山荆条群落的生态特征及其空间分布的研究[J].山西师范大学学报:自然科学版,2006,20(2):68.
- [8] 孙秀琴,田树霞.荆条种子萌发生理条件的研究[J].林业科学研究,1988,1(6):688.
- [9] 王晓蓓,韩烈保,刘春霞.优良水土保持灌木:野生荆条种子发芽实验研究[J].辽宁林业科技,2007(4):30.
- [10] 徐路明,郝明亮,范鹏,等.荆条等8种植物提取物除草活性初探[J].农药,2011,50(8):614.
- [11] 郝明亮,罗兰.9种植物提取物对植物病原真菌的生物活性筛选[J].现代农药,2010,9(4):42.
- [12] 王发松,任三香,杨得坡,等.荆条叶挥发油的气相色谱-质谱分析[J].质谱学报,2004,25(1):62.
- [13] 李昌勤,卢引,尹震花,等.6种南瓜栽培品种体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2012,33(15):90.
- [14] 吴彩霞,刘瑜新,常星,等.头状蓼提取物体外抗氧化活性研究[J].中国药房,2009,20(24):1846.
- [15] 赵文恩,李茜倩.FRAP法测定大枣皮红色素的总抗氧化能力[J].郑州大学学报:工学版,2011,32(3):29.

(收稿日期:2013-01-07 修回日期:2013-04-08)