

疏毛绣线菊的抗氧化活性研究

孔祥密, 王金梅, 魏金凤, 施余杰, 康文艺*

河南大学中药研究所, 开封 475004

摘要: 采用清除二苯代苦味酰基 (DPPH) 自由基、清除 [2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐] (ABTS) 自由基和铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP) 测定法对疏毛绣线菊总抗氧化活性行评价, 将测定结果与阳性对照药物二丁基羟基甲苯 (BHT) 进行比较。研究发现疏毛绣线菊正丁醇部位具有较强的清除 DPPH 自由基 ($IC_{50} = 42.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) 和还原 Fe^{3+} 的能力 ($TEAC = 1052.46 \mu\text{mol}/\text{g}$), 乙酸乙酯部位清除 ABTS 自由基能力 ($IC_{50} = 6.4 \mu\text{g}/\text{mL}$) 较好, 但均弱于阳性对照药物 BHT (IC_{50} 和 TEAC 值分别为 $23 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1532.7 \mu\text{mol}/\text{g}$)。实验证明疏毛绣线菊正丁醇部位体外抗氧化活性较强。

关键词: 疏毛绣线菊; 抗氧化活性; DPPH; ABTS; FRAP

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Antioxidant Activity of Extracts from *Spiraea hirsuta* (Hemsl.) Schneid

KONG Xiang-mi, WANG Jin-mei, WEI Jin-feng, SHI Yu-jie, KANG Wen-yi*

Institute of chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: 1,1-diphenyl-2-picryl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, [2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt (ABTS) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluate the extracts of *Spiraea hirsuta* (Hemsl.) Schneid with BHT as positive control. The results showed that the *n*-butanol extract of *S. hirsuta* showed higher scavenging activity against DPPH radical ($IC_{50} = 42.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) and ferric reducing antioxidant power ($TEAC = 1052.46 \mu\text{mol}/\text{g}$). The ethyl acetate extract had better ABTS radical scavenging activity ($IC_{50} = 6.4 \mu\text{g}/\text{mL}$), but weaker than that of BHT (IC_{50} and TEAC were $23, 2.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $1532.7 \mu\text{mol}/\text{g}$, respectively). The *n*-butanol extract showed the highest antioxidant activity *in vitro*.

Key words: *Spiraea hirsuta* (Hemsl.) Schneid; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP

疏毛绣线菊 [*Spiraea hirsuta* (Hemsl.) Schneid] 为蔷薇科绣线菊属植物, 产于甘肃、陕西、河北、河南和山西等地。味辛, 性寒, 归肺、脾、心经, 具有活血散瘀, 祛风止痛的功效^[1]。临床上常用于治疗风湿性关节炎, 腹痛腹泻, 咽喉肿痛^[2]及跌打损伤^[3]。国内外对疏毛绣线菊化学成分和药理活性的报道较少, 未见对疏毛绣线菊抗氧化活性的报道。

本文首次采用清除二苯代苦味酰基 (DPPH) 方法、清除 [2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐] (ABTS) 自由基方法、铁离子还原/抗氧化力测定法 (ferric reducing / antioxidant power assay, FRAP 法) 对疏毛绣线菊抗氧化活性进行了综

合考察, 为科学合理开发疏毛绣线菊资源, 全面评价疏毛绣线菊的抗氧化作用提供了参考。

1 实验仪器与材料

1.1 主要仪器

UV-2000 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼科仪器有限公司); Multiskan MK3 酶标仪 (美国 thermo Electron 公司); 电子天平 (美国 Mettler-Toledo 公司); 旋转蒸发仪 (东京理化); MS-H1 型混合器 (北京博励阳科技公司) 等。

1.2 主要试剂

二苯代苦味酰基自由基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, 日本东京化成工业株式会社); BHT (二丁基羟基甲苯, 比利时 Acros organic 公司); Fe^{3+} -三吡啶三啞嗪 (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ; 比利时 Across organics 公司); Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic

收稿日期: 2013-01-21 接受日期: 2013-05-28

基金项目: 河南省科技厅重点攻关项目 (102102310019, 122102310272), 河南省青年骨干教师计划项目 (2012-704)

* 通讯作者 Tel: 86-378-3880680, Email: kangwenyi@hotmail.com

acid, Aldrich); 其他试剂均为分析纯;

1.3 来源

疏毛绣线菊于 2012 年 7 月采集于河南省开封市河南大学金明校区由河南大学中药研究所生药教研室李昌勤教授鉴定, 标本存于河南大学中药研究所。

2 实验部分

2.1 疏毛绣线菊的提取

自然干燥的疏毛绣线菊, 粉碎, 用 70% 乙醇加热回流 2 次, 每次 1 h, 合并、过滤、浓缩得疏毛绣线菊 70% 总浸膏, 提取物分散于水中, 依次用石油醚, 乙酸乙酯, 正丁醇进行萃取得浸膏。

2.2 抗氧化活性筛选

2.2.1 DPPH 方法

参考文献^[4], 将 10 μL 样品溶液和 175 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液先后加入到 96 微孔板中, 阴暗处反应 20 min 后, 用酶标仪在 515 nm 处测定 OD 值。每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 并计算出 IC_{50} 和清除率。按照公式计算清除率:

$$\text{DPPH radical scavenging rate}(\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

上式中, A_{control} 为 DPPH 本身在测定波长的吸收度, A_{sample} 为样品对 DPPH 作用后的吸收度数值(除

去样品自身吸收)。

2.2.2 ABTS 方法

参考文献^[5], 配制 ABTS 自由基工作液。将样品用甲醇配制成一系列浓度, 样品的初始浓度为 2.0 mg/mL。取 10 μL 样品加入 200 μL ABTS 自由基工作液混匀测定吸光度。每份样品平行 3 次, 取平均值, 并计算出对 ABTS 自由基的清除能力。按照以下公式计算清除率:

$$\text{ABTS radical scavenging rate}(\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

式中 A_{control} 为 ABTS 本身在测定波长的吸收度, A_{sample} 为样品对 ABTS 自由基作用后的吸收度数值(除去样品自身吸收)。

2.2.3 FRAP 方法

参考文献^[6], 将样品用甲醇配制成一系列浓度, 取 10 μL 样品加入到 96 微孔板中, 加入 200 μL 新鲜配制的 TPTZ 工作液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后, 用酶标仪在 595nm 测定吸光度。每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 计算出对 FRAP 的清除能力, 结果以 c (Trolox) 表示。若所测定样品吸光度值超过线性范围, 则需要进一步稀释样品。

3 结果与分析

3.1 对 DPPH 自由基的清除作用

表 1 疏毛绣线菊不同提取部位的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of different extracts from *Spiraea hirsuta* (Hemsl.) Schneid

组别 Group	DPPH		ABTS		FRAP
	清除率 Clearance	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	清除率 Clearance	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TEAC ($\mu\text{mol/g}$)
疏毛绣线菊石油醚部位 Petroleum ether extract of <i>S. hirsuta</i>	22.36	-	79.17	40	143.33
疏毛绣线菊乙酸乙酯部位 Ethyl acetate extract of <i>S. hirsuta</i>	85.82	52.8	98.45	6.4	753.55
疏毛绣线菊正丁醇部位 <i>N</i> -butanol extract of <i>S. hirsuta</i>	85.86	42.2	100.24	8.4	1052.46
疏毛绣线菊 70% 乙醇总浸膏 70% Ethanol total extract of <i>S. hirsuta</i>	74.25	58.1	99.92	10.7	558.41
BHT	58.35	23	100.4	2.3	1532.7

注: BHT 为阳性对照药物。

Note: BHT was used as positive control.

表 1 可以看出, 疏毛绣线菊石油醚部位清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值未列出, 没有清除 DPPH 自由基的作用。疏毛绣线菊正丁醇部位清除 DPPH 自由基的能力 ($\text{IC}_{50} = 42.2 \mu\text{g/mL}$) 较强, 但仍弱于阳性对照品 BHT ($\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{g/mL}$), 约为 BHT 作用的 1/

1.84。疏毛绣线菊不同提取部位及 BHT 清除 DPPH 自由基的顺序为: BHT > 疏毛绣线菊正丁醇 > 疏毛绣线菊乙酸乙酯 > 疏毛绣线菊 70% 乙醇总浸膏。

3.2 对 ABTS 自由基的清除作用

结果见表 1 和图 1。

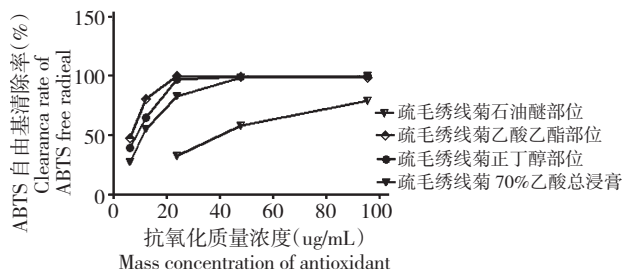


图1 抗氧化质量浓度对 ABTS 自由基的影响

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

表1显示,疏毛绣线菊四种提取部位(疏毛绣线菊石油醚部位、疏毛绣线菊乙酸乙酯部位、疏毛绣线菊正丁醇部位和疏毛绣线菊70%乙醇总浸膏)清除ABTS自由基的能力(IC_{50} 分别为40、6.4、8.4和10.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均低于阳性对照BHT(IC_{50} 为2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表1表明,疏毛绣线菊四种提取物和阳性对照BHT清除ABTS自由基顺序为BHT > 疏毛绣线菊乙酸乙酯部位 > 疏毛绣线菊正丁醇部位 > 疏毛绣线菊70%乙醇总浸膏 > 疏毛绣线菊石油醚部位。

图1显示,在试验的浓度范围内,当其浓度为0.125 mg/mL时,疏毛绣线菊乙酸乙酯、正丁醇和70%乙醇总浸膏对ABTS自由基的清除率分别为47.4%、39.66%和27.8%。随着质量浓度的增加,提取物对ABTS自由基的清除率增大。当质量浓度增加到0.5 mg/mL时,疏毛绣线菊乙酸乙酯、正丁醇对ABTS自由基的清除率分别为99.95%和96.9%,质量浓度继续增加,清除率变化不大。当质量浓度达到1 mg/mL时,疏毛绣线菊70%乙醇总浸膏清除率为99.09%,几乎达到饱和,质量浓度再增加,清除率不变。可以看出疏毛绣线菊提取物对ABTS自由基的清除率与质量浓度成正量效关系。

3.3 还原 Fe^{3+} 的能力

4种提取物中,疏毛绣线菊正丁醇提取物还原 Fe^{3+} 的能力较强($\text{TEAC} = 1052.46 \mu\text{mol}/\text{g}$),略低于阳性对照BHT($\text{TEAC} = 1532.7 \mu\text{mol}/\text{g}$)。疏毛

绣线菊石油醚部位、乙酸乙酯部位和70%乙醇总浸膏还原 Fe^{3+} 的能力分别为正丁醇提取物的1/0.14、1/0.72和1/0.53。结果表明,疏毛绣线菊提取物和BHT对 Fe^{3+} 的能力顺序为:BHT > 疏毛绣线菊正丁醇部位 > 疏毛绣线菊乙酸乙酯部位 > 疏毛绣线菊70%乙醇总浸膏 > 疏毛绣线菊石油醚部位。

4 结论

本文首次采用DPPH、ABTS和FRAP三种方法对疏毛绣线菊提取物进行体外总抗氧化活性考察,通过与阳性对照比较,发现疏毛绣线菊有一定的体外抗氧化活性。不同提取溶剂的抗氧化活性不同,不同提取物清除自由基的能力均随浓度增大而增大。疏毛绣线菊正丁醇提取物清除DPPH自由基、还原 Fe^{3+} 的能力最强,疏毛绣线菊乙酸乙酯清除ABTS自由基能力最强,均弱于阳性对照BHT,疏毛绣线菊正丁醇总的抗氧化活性较好。

参考文献

- Liu JL(刘建林), Meng XX(孟秀祥), Feng JC(冯金朝), et al. The Seed Plants in Panxi Area of Sichuan Province(四川攀西种子植物). Beijing: Tsing Hua Press, 2007. 2, 155.
- Hunan Drug Compiling Group(湖南药物志编写组). Hunan drug Volunteers(湖南药物志). Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1985. 7, 4797.
- Fang ZX(方志先), Liao CL(廖朝林). Hubei Enshi Medicinal Plants(湖北恩施药用植物志). Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2006. 491.
- Li YY(李园园), Wang JX(王俊霞), Cao NF(曹乃峰), et al. Antioxidant Activity of *Sedum aizoon* from Henan. *J Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 337-340.
- Kang WY, Wang JM. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of *Forsythia suspense* leaves. *J Med Chem Res*, 2010, 19: 617.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" The FRAP assay. *J Anal Biochem*, 1996, 239: 70-76.