

新疆两色金鸡菊提取物体外清除自由基活性研究

乔克宁^a, 王 露^a, 冶晓童^a, 冯玉洁^a, 任盟乔^a, 姚新成^{a,b}

(石河子大学 a. 药学院; b. 新疆特种植物药资源重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘 要:以乙醇为溶剂,采用超声波辅助提取新疆两色金鸡菊。提取物经不同极性溶剂进行萃取,获得不同极性溶剂提取物。同时考察这些提取物在体外清除 DPPH、ABTS⁺、羟自由基([•]OH)和超氧自由基([•]O₂⁻)的能力。结果显示,新疆两色金鸡菊氯仿提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物清除 DPPH 的能力(SC₅₀)依次是($7.6 \times 10^3 \pm 4.02$) μg/mL、($1.75 \times 10^2 \pm 3.64$) μg/mL、($1.34 \times 10^2 \pm 2.75$) μg/mL 和 ($2.28 \times 10^2 \pm 4.64$) μg/mL;清除 ABTS⁺ 自由基的能力(SC₅₀)依次是($4.53 \times 10^3 \pm 6.37$) μg/mL、($1.26 \times 10^2 \pm 2.97$) μg/mL、(90.72 ± 3.16) μg/mL 和 ($1.28 \times 10^2 \pm 5.78$) μg/mL;清除 [•]OH 自由基的能力(SC₅₀)依次是($3.86 \times 10^3 \pm 5.79$) μg/mL、(14.49 ± 0.576) μg/mL、(13.80 ± 0.672) μg/mL 和 (22.41 ± 1.13) μg/mL。在不同自由基清除体系中,与阳性对照维生素 C 和叔丁基对羟基茴香醚相比,新疆两色金鸡菊不同极性溶剂提取物表现出强弱不同的自由基清除能力。

关键词:两色金鸡菊;溶剂提取物;自由基清除能力

中图分类号:R9

文献标志码:A

两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.) 为菊科金鸡菊属、蛇目菊种一年生草本植物。在新疆,两色金鸡菊的干燥头状花序又被称为“雪菊”、“昆仑雪菊”、“昆仑血菊”、“天山雪菊”。该植物主要生长在新疆和田昆仑山区、天山山区海拔 1500~3000 m 的高寒山地。当地维吾尔族居民称其为古丽恰尔(Gulqai),常采集其新鲜头状花序浸泡当茶饮,是维吾尔族民间世代传承下来的一种养生、保健的天然植物。新疆维吾尔医院也将其作为一种维吾尔药材使用,具有清热解毒、活血化瘀、和胃健脾之功效^[1]。用其头状花泡茶饮,可治疗燥热烦渴、高血压、心慌、胃肠不适、食欲不振等病症。研究表明,两色金鸡菊富含黄酮类、多酚类、多糖、皂苷类、氨基酸、挥发油、多种微量矿物质元素等化学成分,具有较高的食用价值^[2]。现代药效学研究表明,新疆两色金鸡菊茶具有优异的降血压、降血糖和调解血脂等保健功能^[3,4]。本研究通过对新疆两色金鸡菊不同极性溶剂提取物清除自由基活性的考察,探索其多样的生物活性,为综合利用新疆两色金鸡菊植物资源、开发具有新疆区域特色的营养保健食品提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器

UV-2041PC 紫外分光光度仪(日本岛津);BP211D 十万分之一电子分析天平(北京 Sartorius);SHZ-D (Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);TP300 超声波提取器(北京天鹏电子新技术有限公司);旋转蒸发仪 RE-2000(上海亚荣生化仪器厂);Quorum K750X 冷冻干燥仪(英国);5~1000 μL 量程手动移液器(苏州百得仪器有限公司)。

1.2 试剂和试药

2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, ABTS)

收稿日期:2015-08-20;修回日期:2015-10-15.

基金项目:新疆生产建设兵团重点领域科技攻关项目(2014BA031);石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201328);石河子大学大学生研究训练计划(SRP201510759068)

作者简介(通信作者):姚新成(1973-),男,江苏睢宁人,石河子大学副教授,博士,从事中药与天然产物活性研究方向,
E-mail: yxc@whu.edu.cn.

和 2,2'-二苯基-1-苦味酰基苯肼(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)购自 Sigma 公司; EDTA-2Na (Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt); 维生素 C(Ascorbic acid); 叔丁基对羟基茴香醚(Butylated hydroxyanisole, BHA); 乙醇等各种化学试剂均为分析纯(购于国药集团化学试剂有限公司); 水为去离子纯净水。

1.3 材料

两色金鸡菊购于新疆和田地区策勒县努尔乡昆仑山区高海拔种植区(2013 年 11 月), 经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为菊科金鸡菊属一年生草本植物蛇目菊的干燥头状花序。

1.4 不同极性溶剂提取物的制备

干燥的两色金鸡菊研碎, 过 20 目筛。采用经响应面法优化超声波提取工艺条件: 液料比 21:1, 乙醇浓度为 50%~70%, 超声波提取 20 min(功率为 250 W), 提取 3 次。提取物经减压浓缩回收溶剂, 得浸膏。浸膏分散于水中(按重量体积比 1:5), 分别依次以水的等体积石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取。各极性溶剂萃取物经减压浓缩, 得石油醚提取物、氯仿提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物。另称取两色金鸡菊适量, 以去离子水为溶剂, 液料比 21:1 进行超声波提取。提取物减压浓缩得水提取物。除石油醚提取物外, 其他提取物低温冷冻干燥, 供实验用。

1.5 不同极性溶剂提取物清除自由基能力分析

1.5.1 清除 DPPH 自由基活性

用无水乙醇溶解各提取物, 配制成不同质量浓度的样品溶液。取不同质量浓度(5, 10, 20, 40, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$)的样品溶液 0.40 mL, 加入 3.6 mL DPPH(0.2 mmol/L), 强烈摇晃后在黑暗中静置 30 min, 然后在 $\lambda=517\text{ nm}$ 处测定吸光度^[5]。以维生素 C、叔丁基对羟基茴香醚为阳性参照物, 每份样品平行操作 3 次。

样品对 DPPH 的清除能力(Radical scavenging activity, RSA)用公式表示为: $\text{RSA} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$ 。其中, A_0 表示 DPPH 与溶剂混合液的吸光度; A_1 表示 DPPH 与样品反应后的吸光度, 并确定 SC_{50} 值(清除率达到 50% 时所需样品浓度)。

1.5.2 清除 ABTS⁺ 自由基活性

将 7.9 mg ABTS 和 1.37 mg 过硫酸钾混合水溶液定容至 2.08 mL。在室温、避光条件下静置 16 h, 形成 ABTS⁺ 自由基储备液。使用前用无水乙醇稀释成工作液。取不同质量浓度(5, 10, 20, 40, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$)的样品溶液 0.3 mL, 加入 2.7 mL ABTS⁺ 工作液为样品组; 另取 0.3 mL 无水乙醇加 2.7 mL ABTS⁺ 工作液, 混合, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后, 作为空白对照, 于 $\lambda=734\text{ nm}$ 波长处测定吸光度 A 值^[6]。以维生素 C、叔丁基对羟基茴香醚为阳性参照物, 每份样品平行操作 3 次。计算公式同 DPPH。

1.5.3 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)活性

取不同质量浓度(5, 10, 20, 40, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$)的样品溶液 1.0 mL, 加入 0.5 mL 硫酸亚铁溶液(8 mmol/L)和 0.8 mL 双氧水(6 mmol/L, 30%), 再加入 0.5 mL 的蒸馏水, 最后加入 0.2 mL 的水杨酸钠溶液(20 mmol/L)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 后, 在 $\lambda=532\text{ nm}$ 处测定吸光度^[7]。以蒸馏水代替样品作为空白, 以维生素 C、叔丁基对羟基茴香醚作为阳性对照。每份样品平行操作 3 次。计算公式同 DPPH。

1.5.4 清除超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)活性

取 pH8.2 的 50 mmol/L Tris 盐酸缓冲液 4.5 mL 于试管中, 置 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 20 min 后, 加入一定浓度供试液 0.5 mL, 再加入 45 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液 10 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应, 以加入邻苯三酚的瞬间开始计时, 每隔 30 s 于 $\lambda=325\text{ nm}$ 波长处测定吸光度值, 共测 6 min^[8]。以蒸馏水代替样品作为空白对照。每份样品平行操作 3 次。

计算方法: 邻苯三酚自氧化速率常数(K_b)由吸光度值(A)与反应时间之间的线性回归方程系数来获得。较低的 K_b 值表明样品具有较高的清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的能力。

1.6 提取物清除各种自由基的能力(SC_{50})

SC_{50} (50% concentration of scavenging activity) 计算: 以样品 $\ln C$ 为横坐标, 自由基清除率为纵坐标, 进行 $\ln C \sim$ 自由基清除率最小二乘法回归, 获得回归方程。根据回归方程计算出各样品 50% 清除率时所需的样品质量浓度。

1.7 统计分析

所有实验平行重复 3 次,清除自由基能力数值表示为均值(means)±标准偏差(SD). 采用 SPSS10.0 分析软件进行统计学处理. 测定结果间均数比较采用 one-way ANOVA 分析,统计结果间 $P<0.05$ 认为具有显著性差异.

2 结果与分析

2.1 清除 DPPH 自由基活性

图 1 结果可以看出,在低质量浓度 5 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,氯仿提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物清除 DPPH 自由基的能力明显高于阳性对照维生素 C 和叔丁基对羟基茴香醚;当质量浓度 $>40 \mu\text{g/mL}$ 时,乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物具有明显的清除 DPPH 自由基的能力,但低于阳性对照维生素 C 和叔丁基对羟基茴香醚;在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,氯仿提取物和水提取物均表现出较弱的清除 DPPH 自由基能力.

2.2 清除 ABTS⁺ 自由基活性

图 2 结果可以看出,在低质量浓度 5 mg/mL 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,氯仿提取物表现出较强的清除 ABTS⁺ 自由基的能力,且明显高于阳性对照维生素 C 和叔丁基对羟基茴香醚;当质量浓度 $>20 \mu\text{g/mL}$ 时,乙酸乙酯、正丁醇和水提取物具有明显清除 ABTS⁺ 自由基的能力;清除能力高于或等同于阳性对照叔丁基对羟基茴香醚,但明显低于阳性对照维生素 C.

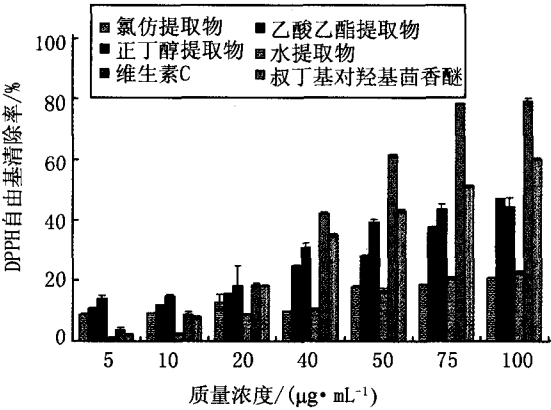


图1 不同极性溶剂提取物清除DPPH自由基的能力

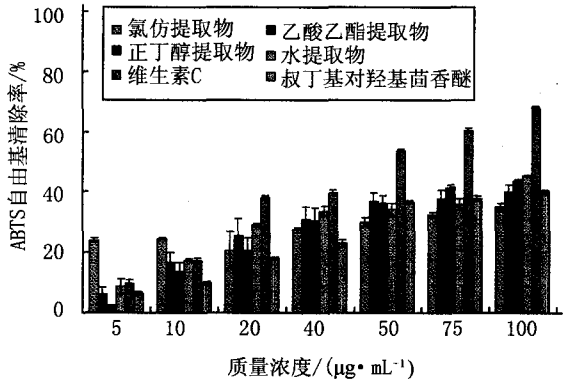


图2 不同极性溶剂提取物清除ABTS⁺自由基的能力

2.3 清除羟自由基(*OH)活性

图 3 结果可以看出,除氯仿提取物外,在质量浓度 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,乙酸乙酯、正丁醇和水提取物均表现出较强清除 *OH 自由基的能力,各提取物清除能力高于或等同于阳性对照叔丁基对羟基茴香醚,但明显低于对照维生素 C.

2.4 清除超氧阴离子(*O₂⁻)活性

图 4 结果可以看出,在抑制邻苯三酚自氧化产生 *O₂⁻ 自由基的反应体系中,各提取物均表现出具有一定程度的抑制 *O₂⁻ 自由基的产生(优于空白对照组);其中水提取物表现出较强清除 *O₂⁻ 自由基的能力.

表 1 两色金鸡菊提取物抑制邻苯三酚自氧化能力

样品	空白对照	氯仿提取物	乙酸乙酯提取物	正丁醇提取物	水提取物	维生素 C	叔丁基对羟基茴香醚
K_b 值	0.3531 ± 0.026^a	0.2344 ± 0.021^b	0.2401 ± 0.019^b	0.2782 ± 0.009^c	0.0025 ± 0.002^a	0.0016 ± 0.001^a	0.0078 ± 0.002^a

注:不同测定值上方不同字母(a-c)表示组间均数间有显著性差异($P<0.05$).

上表结果可以看出,在清除 *O₂⁻ 自由基的产生方面,各提取物均能一定程度的抑制 *O₂⁻ 一自由基的产生(抑制邻苯三酚自氧化速率常数 K_b 值均小于空白对照组,且有显著性差别);其中氯仿提取物和乙酸乙酯提取物的 K_b 值无显著性差别($P>0.05$);水提取物具有较强清除 *O₂⁻ 自由基的能力,其 K_b 值与阳性对照维生素 C 和叔丁基对羟基茴香醚值间无显著性差别($P>0.05$).

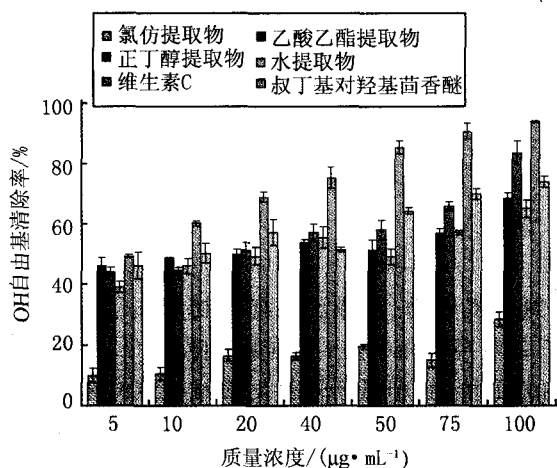
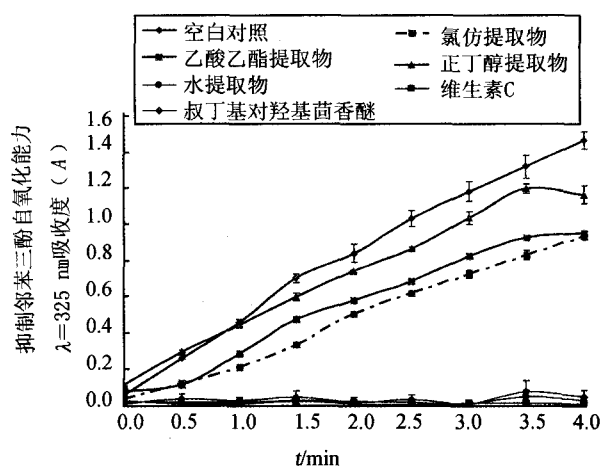
图3 不同极性溶剂提取物清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力

图4 不同极性溶剂提取物抑制邻苯三酚自氧化能力

2.5 不同极性溶剂提取物清除各种自由基的能力(SC_{50})的比较分析

由上述实验结果,根据 SC_{50} 的计算方法,统计求出各提取物在不同反应体系中对各种自由基清除能力.结果见表 2.

表 2 两色金鸡菊不同极性溶剂提取物对不同自由基的清除能力($\text{SC}_{50}:\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

样品	DPPH 自由基 清除能力(SC_{50})	ABTS $^{\cdot-}$ 自由基 清除能力(SC_{50})	$\cdot\text{OH}$ 自由基 清除能力(SC_{50})
氯仿提取物	$7.6\times 10^3\pm 4.016^f$	$4.53\times 10^3\pm 6.372^d$	$3.86\times 10^3\pm 5.791^d$
乙酸乙酯提取物	$1.75\times 10^2\pm 3.644^d$	$1.26\times 10^2\pm 2.973^c$	14.49 ± 0.576^b
正丁醇提取物	$1.34\times 10^2\pm 2.753^c$	90.72 ± 3.158^b	13.80 ± 0.672^b
水提取物	$2.28\times 10^2\pm 4.637^e$	$1.28\times 10^2\pm 5.782^c$	22.41 ± 1.126^c
维生素 C	41.31 ± 1.741^a	46.32 ± 2.247^a	6.580 ± 0.025^a
叔丁基对羟基茴香醚	66.52 ± 2.012^b	139.8 ± 3.061^c	9.954 ± 0.056^a

注:同一列不同测定值上方不同字母(a-f)表示组间均值间有显著性差异($P<0.05$).

上表结果可以看出,在清除 DPPH 自由基能力方面,各提取物对 DPPH 自由基的清除能力显著不同($P<0.05$),其清除能力由大到小依次为:维生素 C,叔丁基对羟基茴香醚,正丁醇提取物,乙酸乙酯提取物,水提取物,氯仿提取物.在清除 ABTS $^{\cdot-}$ 自由基能力方面,BE 表现出较强的清除能力,各提取物清除能力大小依次为:维生素 C,正丁醇提取物,乙酸乙酯、水提取物、叔丁基对羟基茴香醚,氯仿提取物.在清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力方面,正丁醇和乙酸乙酯提取物表现出较强的清除能力,各提取物清除能力由大到小依次为:维生素 C、叔丁基对羟基茴香醚,正丁醇和乙酸乙酯提取物,水提取物.

3 讨 论

新疆两色金鸡菊中富含大量的查尔酮类(马里甘、奥卡宁、金鸡菊苷)、二氢黄酮类(黄诺马苷)、黄酮醇类(芦丁、槲皮素、山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖苷)等多种黄酮类成分;同时含有咖啡酸、绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸等苯丙素类成分^[9-10].这些具有多羟基类的化合物是产生清除自由基的重要物质基础,也是新疆两色金鸡菊产生系列生物活性的物质成分^[11].

曹燕等先用乙醇回流提取两色金鸡菊,提取物经 D-101 大孔吸附树脂吸附后,分别用水、10%、30%、50%、70%和 95%的乙醇进行洗脱,收集洗脱液,经干燥后得各种洗脱物.其中 50%乙醇洗脱物对各种自由基具有较好的清除作用.^[12]韩国 Woo 等研究了韩国产金鸡菊提取物的抗氧化活性,结果显示金鸡菊的乙酸乙酯提取物具有较强的清除 DPPH 和 ABTS $^+$ 的能力.^[13]

本实验采用不同极性溶剂提取物分别测试清除 DPPH, ABTS $^+$, $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基的能力.结果表明,各提取物在不同自由基产生的体系中表现出不同的自由基清除能力.水提取物表现出较强清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 自由基的能力;而正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物表现出较强清除 DPPH, ABTS $^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力.该

结果也说明提取物清除某种自由基的能力一方面与提取物中的化学物质成分有关,另一方面也与实验过程中选择的化学反应体系有关.因此,在考察样品清除自由基的能力时,要多建立几种实验模型,综合分析比较才能得到正确的结论.

参 考 文 献

- [1] 新疆植物志编辑委员会.新疆植物志(第5卷)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:93.
- [2] 姚新成,田丽萍,秦冬梅,等.两色金鸡菊化学成分及生物活性研究进展[J].西北药学杂志,2014,29(6):655-658.
- [3] 毛新民,韩雪,卢伟,等.两色金鸡菊对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响[J].中药药理与临床,2014,30(2):78-82.
- [4] 卢伟,兰怡,李琳琳,等.两色金鸡菊醇提物对自发性高血压大鼠血压和血浆ET, Ang II, CGRP的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2014,20(5):149-153.
- [5] Marwah R G, Fatope M O, Al-Mahrooqi R, et al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman[J]. Food Chemistry,2007,101:465-470.
- [6] Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, et al. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54:1151-1157.
- [7] 李婷婷,易超凡.不同来源菊花总黄酮含量及其抗氧化活性研究[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(5):72-74.
- [8] 尼砸木·艾海提,买热艳木·艾尔肯,祖丽比亚·司马义,等.新疆不同地区产蜂胶抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2013,25: 113-116.
- [9] 赵军,孙玉华,徐芳,等.昆仑雪菊黄酮类成分研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(1):50-52.
- [10] 崔庆玲,倪慧,潘英妮,等.维药两色金鸡菊花化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2015,32(1):14-17.
- [11] 梁乐,李琳琳,古扎力努尔·艾尔肯,等.薄层生物自显影技术筛选两色金鸡菊中的活性成分[J].药物分析杂志,2015,35(3):425-429.
- [12] 曹燕,庞市宾,徐磊,等.金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):144-147.
- [13] Woo J H., Jeong H S, Chang Y D, et al. Antioxidant activities of fractions obtained from flowers of *Coreopsis tinctoria* Nutt[J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology,2010,28(1):115-119.

In vitro Free Radicals Scavenging Activities of Extracts from *Coreopsis tinctoria* Flowering Tops in Xinjiang

QIAO Kening^a, WANG Lu^a, YE Xiaotong^a, FENG Yujie^a, REN Menqiao^a, YAO Xincheng^{a,b}

(a. School of Pharmacy; b. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine
Resources, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The *Coreopsis tinctoria* flowering tops (CTF) in Xinjiang was extracted with ethanol by ultrasonic-assisted extraction. The crude alcoholic extract was concentrated and suspended in distilled water, and defatted with petroleum ether. The aqueous layer was successively extracted with chloroform, ethyl acetate, and n-butanol. Forethmore, the radicals scavenging activities of the CTF extracts were investigated through DPPH, ABTS, $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ assays. The results showed that the chloroform extract (CE), ethyl acetate extract (EAE) and n-butanol extract (BE) for DPPH radical scavenging activities (SC_{50}) of $7.6 \times 10^3 \pm 4.02$, $1.75 \times 10^2 \pm 3.64$, $1.34 \times 10^2 \pm 2.75$, $2.28 \times 10^2 \pm 4.64$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. The CE, EAE and BE for ABTS⁺ radical scavenging activities (SC_{50}) of $4.53 \times 10^3 \pm 6.37$, $1.26 \times 10^2 \pm 2.97$, 90.72 ± 3.16 , $1.28 \times 10^2 \pm 5.78$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. The CE, EAE and BE for $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activities (SC_{50}) of $3.86 \times 10^3 \pm 5.79$, 14.49 ± 0.576 , (13.80 ± 0.672) and (22.41 ± 1.13) $\mu\text{g/mL}$, respectively. The extracts of CTF showed different radical-scavenging capacity, which compared with vitamin C and butylated hydroxyanisole (BHA) in different radical scavenging system.

Keywords: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; various solvent extracts; free radical-scavenging activity