

新疆鼠尾草总酚酸的体外抗氧化活性

王晓梅<sup>1</sup>, 王小青<sup>1</sup>, 王新玲<sup>1</sup>, 胡君萍<sup>1</sup>, 热娜·卡斯木<sup>1\*</sup>, 樊珍珍<sup>1</sup>, 王慧<sup>1</sup>  
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:研究新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物的体外抗氧化活性。方法:以 40% 乙醇提取和大孔吸附树脂纯化分别制备得到新疆鼠尾草总酚酸的提取物和纯化物,以维生素 C(VC)为对照,通过体外化学模拟方法测定新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物的还原能力、对·DPPH 自由基、羟基自由基(·OH)和超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)的清除能力,研究新疆鼠尾草总酚酸的抗氧化活性。结果:新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物清除·DPPH 自由基的作用 50% 清除浓度(IC<sub>50</sub>, 分别为 0.029, 0.039 g·L<sup>-1</sup>)弱于 VC(IC<sub>50</sub>0.018 g·L<sup>-1</sup>);对羟基自由基(·OH)的清除作用(IC<sub>50</sub> 分别为 0.212, 0.165 g·L<sup>-1</sup>)强于 VC(IC<sub>50</sub>0.356 g·L<sup>-1</sup>);对超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)的清除能力(IC<sub>50</sub> 分别为 3.735, 1.913 g·L<sup>-1</sup>)弱于 VC(IC<sub>50</sub>0.390 g·L<sup>-1</sup>),其纯化物还具有一定的还原能力。结论:新疆鼠尾草总酚酸具有较强的抗氧化作用。

[关键词] 新疆鼠尾草; 总酚酸; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0162-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090162

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000057.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:37

Antioxidant Activities of Total Salvianolic Acid from *Salvia deserta* in vitro

WANG Xiao-mei<sup>1</sup>, WANG Xiao-qing<sup>1</sup>, WANG Xin-lin<sup>1</sup>, HU Jun-ping<sup>1</sup>,  
RENA · kasimu<sup>1\*</sup>, FAN Zhen-zhen<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>  
(Pharmacy College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the antioxidant activity of the total salvianolic acid from *Salvia deserta* Schang. **Method:** The extraction and purification of the salvianolic acid were prepared by using 40% ethanol extracted and macroporous adsorption resin purified respectively. The antioxidant activities of the extraction and purification of the total salvianolic acid were determined by ·DPPH, ·OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>· scavenging experiments and Fe<sup>3+</sup> reduction capacity experiments *in vitro*. Results were compared with that of positive control vitamin C (VC). **Result:** The ·DPPH scavenging assay of the extraction and purification of the total salvianolic acid (IC<sub>50</sub> 0.029, 0.039 g·L<sup>-1</sup>) were weaker than VC (IC<sub>50</sub> 0.018 g·L<sup>-1</sup>). The ·OH scavenging assay (IC<sub>50</sub> 0.212, 0.165 g·L<sup>-1</sup>) were higher than VC (IC<sub>50</sub> 0.356 g·L<sup>-1</sup>). The O<sub>2</sub><sup>-</sup>· scavenging assay (IC<sub>50</sub> 3.735, 1.913 g·L<sup>-1</sup>) were weaker than VC (IC<sub>50</sub> 0.390 g·L<sup>-1</sup>). The purification also has a certain reduction capacity. **Conclusion:** The total salvianolic acid from *S. deserta* possessed high antioxidant activity.

[Key words] *Salvia deserta*; the total salvianolic acid; antioxidant activity

新疆鼠尾草为唇形科植物,因分布在新疆戈壁根或根茎),是我国鼠尾草属植物中独特的品种,在荒原而得名,亦称新疆丹参(*Salvia deserta* Shang 的我国新疆天山山脉和中亚诸国有广泛的分布<sup>[1]</sup>。

[收稿日期] 20131025(019)  
[基金项目] 国家科技部“十一五”支撑计划项目(2007BAI30B02-2)  
[第一作者] 王晓梅,在读博士,从事天然药物活性成分的研究, Tel:13999884368, E-mail:forever\_wxm@163.com  
[通讯作者] \* 热娜·卡斯木,教授,博士生导师, E-mail:renakasimu@vip.sina.com

新疆鼠尾草为多年生草本植物。虽该属植物大多以根入药,而新疆鼠尾草在民间以全草用药,用于清热解毒、止咳祛痰、消肿利尿。文献报道,新疆鼠尾草中的化学成分主要是:酚酸类、二萜醌类、黄酮类、三萜类<sup>[2-4]</sup>等。其中酚酸类成分是人们一直关注的天然自由基清除剂,它们结构中大多具有数目不等的酚羟基,具有较强的氧化作用,因此在医药、食品领域具有广阔的应用前景<sup>[5-7]</sup>。在前期研究中,笔者采用正交实验及大孔吸附树脂纯化法优化了新疆鼠尾草总酚酸的最佳提取和纯化工艺,制备得到总酚酸的提取物和纯化物<sup>[8-9]</sup>。因此为全面考察新疆鼠尾草的体外抗氧化活性,本文采用体外化学模拟的方法研究新疆鼠尾草总酚酸提取物及大孔吸附树脂纯化物的抗氧化活性,为进一步开发新疆鼠尾草药材提供一定的理论依据。

## 1 材料

**1.1 药材** 新疆鼠尾草药材(*Salvia deserta* Schang)于2010年采收于新疆乌鲁木齐仓房沟,品种由新疆医科大学药学院热娜·卡斯木教授鉴定。

**1.2 试药** DPPH(Sigma,批号20070811),抗坏血酸(VC,南京化学试剂有限公司,批号20080317),甲醇(天津市致远化学试剂有限公司,批号20100706),铁氰化钾(郑州市德众化学试剂厂,批号20080507),邻苯三酚(郑州市德众化学试剂厂,批号20060221),过氧化氢(郑州市德众化学试剂厂,批号20090714),硫酸亚铁(郑州市德众化学试剂厂,批号20040420),邻菲罗啉(郑州市德众化学试剂厂,批号20030629)。上述试剂均为分析纯。

**1.3 仪器** T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),AB104-N型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),TDL-5A型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 样品的制备

**2.1.1 新疆鼠尾草总酚酸提取物的制备<sup>[8]</sup>** 称取一定量的新疆鼠尾草药材,以25倍量的40%乙醇回流提取3次,每次1 h,合并提取液,浓缩得40%乙醇提取物。测定时,取0.5 g提取物浸膏加甲醇定容置25 mL量瓶中,得5 g·L<sup>-1</sup>样品溶液。

**2.1.2 新疆鼠尾草总酚酸纯化物的制备<sup>[9]</sup>** 将40%乙醇提取物按文献方法,制备得到总酚酸大孔树脂纯化物浸膏。测定时,取0.05 g纯化物浸膏加甲醇定容置10 mL量瓶中,得5 g·L<sup>-1</sup>样品溶液。

**2.1.3 VC储备液的制备** 精密称取5.08 mg的VC对照品,置于10 mL的量瓶,并用甲醇定容至刻度。

**系列浓度的制备** 分别吸取0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,0.9 mL的VC储备液至10 mL量瓶,分别配成0.005,0.010,0.015,0.020,0.030,0.040,0.045 g·L<sup>-1</sup>的系列浓度。

### 2.2 对·DPPH的清除作用<sup>[10-11]</sup>

**2.2.1 DPPH溶液的配制** 称取4.06 mg的DPPH到100 mL的量瓶中,用甲醇溶解并定容,配成0.004%的溶液,避光保存(0~4℃)。

**2.2.2 清除DPPH自由基能力的测定** 用UV法在200~800 nm处扫描,得到DPPH原液的最大吸收波长在517 nm。分别吸取0.004% DPPH甲醇溶液4 mL各加VC系列溶液1 mL,30℃水浴30 min,在517 nm处测定吸光度( $A_i$ );以1 mL甲醇代替1 mL样品溶液则测得吸光度( $A_0$ );以4 mL甲醇代替4 mL DPPH则测得吸光度值( $A_j$ ),每组测定3次。按照公式计算清除率,然后按照上述方法测定样品。清除率公式如下:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

**2.3 对羟基自由基(·OH)的清除作用<sup>[12]</sup>** 取1 mL浓度为0.75 mmol·L<sup>-1</sup>的邻二氮菲无水乙醇(邻菲罗啉)溶液于试管中,依次加入2 mL浓度为0.2 mol·L<sup>-1</sup>的pH 7.40的磷酸盐缓冲溶液和1 mL蒸馏水,充分混匀后,加入1 mL浓度为0.75 mmol·L<sup>-1</sup>的硫酸亚铁溶液(FeSO<sub>4</sub>)混匀,再加入1 mL 0.01%的双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),于37℃水浴60 min,在510 nm处测其吸光值,所测得的数据为损伤管的吸光值 $A_{\text{损}}$ ;以1 mL样品液代替1 mL蒸馏水则测得样品的吸光值 $A_{\text{样}}$ ;用1 mL蒸馏水代替1 mL双氧水测得的吸光值为 $A_{\text{未}}$ ,重复3次,计算清除率,清除率公式如下:

$$\text{清除率} = (A_{\text{样}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未}} - A_{\text{损}}) \times 100\%$$

**2.4 清除超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·,邻苯三酚法)<sup>[13]</sup>** 取9 mL 0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH 8.2)与1 mL供试品溶液混合,25℃恒温水浴15 min。取3 mL混合液,加入0.1 mL 45 mmol·L<sup>-1</sup>邻苯三酚,摇匀,在第4分钟加入10 mol·L<sup>-1</sup>盐酸1滴终止反应,于325 nm处测定样品吸光值 $A_1$ ,同时分别测定不加邻苯三酚的样品液和磷酸盐混合液的吸光值 $A_2$ 和以1 mL溶剂代替供试品液的磷酸盐和邻苯三酚混合液的 $A_3$ ,重复3次,O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除率按以下公式计算:

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$$

**2.5 还原能力的测定<sup>[14]</sup>** 取 2.5 mL 样品于试管中,依次加入 2.5 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 6.6) 和 2.5 mL 1% 六氰合铁酸钾溶液 [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>],于 50 ℃ 水浴中保温 20 min 后快速冷却,再加入 2.5 mL 10% 醋酸溶液,以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 的转速离心 10 min,取上清液 2.5 mL,依次加入 2.5 mL 蒸馏水,0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液 (FeCl<sub>3</sub>),充分混匀,静置 10 min 后,在 700 nm 下测定其 A (以蒸馏水作参比溶液),A 越高还原力越强。

3 结果

**3.1 新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物清除·DPPH的能力** 在·DPPH 的反应体系中,各样品对·DPPH 的清除能力如图1所示。可以看出,新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 在实验浓度范围内对·DPPH 的清除能力呈良好的量效关系,即随着浓度的增加,清除率也逐渐增加,而新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物对·DPPH 的清除能力 (IC<sub>50</sub> 分别为 0.029,0.039 g·L<sup>-1</sup>) 均弱于 VC (IC<sub>50</sub> 0.018 g·L<sup>-1</sup>),但都表现出一定的清除作用,总酚酸提取物对 DPPH 自由基的清除能力强于总酚酸的纯化物。

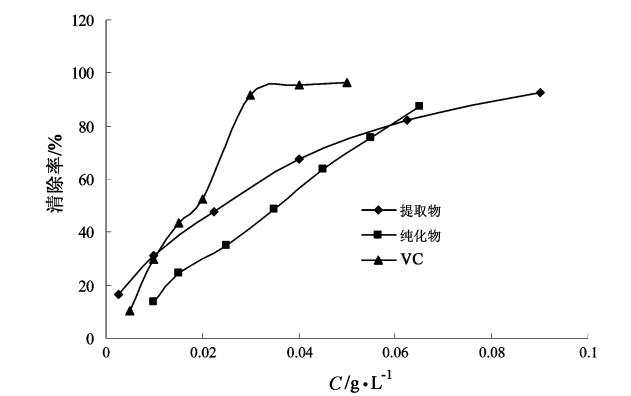


图 1 总酚酸提取物和纯化物对·DPPH 的清除能力

**3.2 新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物清除·OH的能力** 新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 对羟基自由基·OH 的清除作用见图2。可以看出,新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 在实验浓度范围内对·OH 的清除能力呈良好的量效关系,即随着浓度的增加,清除率也逐渐增加,而新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物对·OH 的清除能力 (IC<sub>50</sub> 分别为 0.212,0.165 g·L<sup>-1</sup>) 均强于 VC (IC<sub>50</sub> 0.356 g·L<sup>-1</sup>),尤其是纯化物,其清除作用较强。

**3.3 新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物清除超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)的能力** 新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 对超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 的清除作用见图

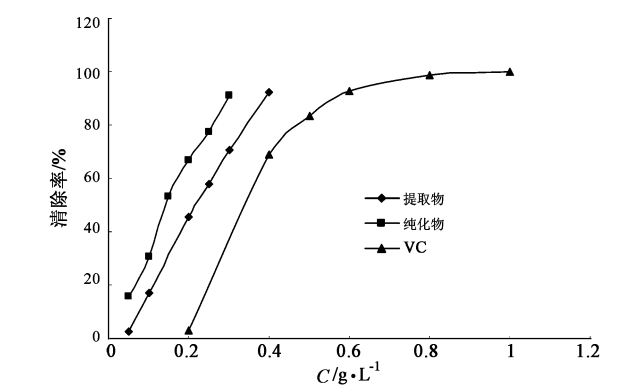


图 2 总酚酸提取物和纯化物对·OH 的清除能力

3。可以看出,新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 在实验浓度范围内对超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 的清除能力呈良好的量效关系,即随着浓度的增加,清除率也逐渐增加,而新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物对超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 的清除能力 (IC<sub>50</sub> 分别为 3.735, 1.913 g·L<sup>-1</sup>) 均弱于 VC (IC<sub>50</sub> 0.390 g·L<sup>-1</sup>),但比较提取物和纯化物可以看出,纯化物的清除作用较强,说明当总酚酸纯化后,其对超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 的清除能力增强。

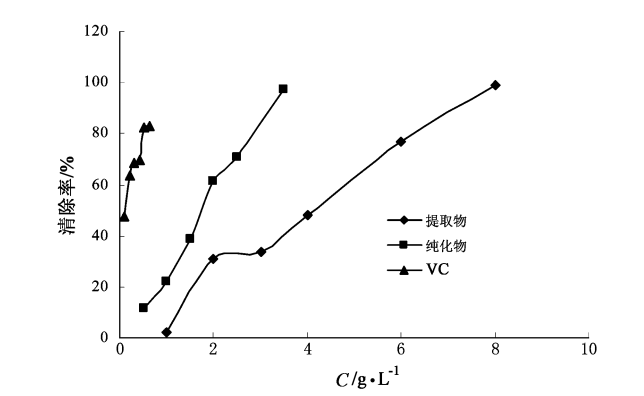


图 3 总酚酸提取物和纯化物对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 的清除能力

**3.4 新疆鼠尾草总酚酸提取物和纯化物还原能力的测定** 新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物和 VC 的还原能力见图 4。可以看出,新疆鼠尾草总酚酸纯化物和 VC 在试验浓度范围的还原能力呈良好的量-效关系,即随着浓度的增加,还原能力也逐渐增加,但其作用弱于 VC,而新疆鼠尾草总酚酸提取物的还原能力比较弱,说明当总酚酸纯化后,其还原能力增强。

4 结论

自由基产生过多或者清除过慢,就会开始攻击生命大分子物质及细胞器,在分子水平、细胞水平乃至组织器官水平上造成种种损坏,加速衰老并可诱发多

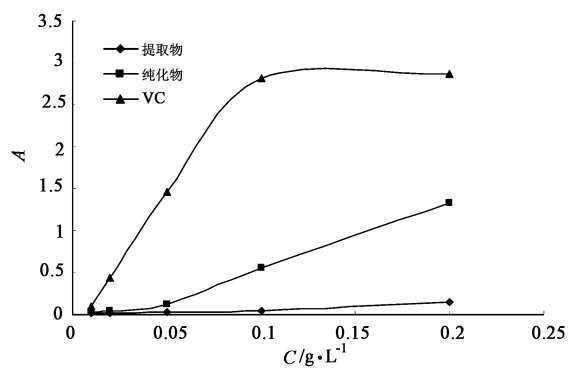


图 4 总酚酸提取物和纯化物的还原能力

种疾病<sup>[15]</sup>。 $\cdot\text{DPPH}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 即为常见的几种自由基。 $\cdot\text{DPPH}$ 是一种很稳定的以氮为中心的自由基,常用来评估抗氧化物的供氢能力; $\cdot\text{OH}$ 是目前所知活性氧自由基中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基,减少此自由基,可以预防心血管疾病及癌症的发生; $\text{O}_2^{\cdot-}$ 为人体产生的活性氧自由基,能引发体内脂质过氧化,加快机体的衰老过程。要降低自由基对机体的损伤,除了依靠体内清除系统外,寻找与开发外源性自由基清除剂十分必要。酚酸类化合物结构上含有多个游离酚羟基,具有很强的提供氢质子的能力,从而阻断自由基链式反应,并能通过清除体系中产生的自由基消除对 DNA 的破坏作用。而笔者通过体外实验发现,新疆鼠尾草总酚酸提取物、纯化物均具有较强清除 $\cdot\text{DPPH}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 等自由基的能力,而且纯化之后还具有一定的还原能力,说明新疆鼠尾草总酚酸具有较强的抗氧化作用,尤其是纯化物的作用明显强于提取物,从而可以推断当新疆鼠尾草的酚酸类成分含量增高,则其抗氧化活性也就较强。目前,新疆鼠尾草总酚酸的抗氧化作用的研究还不够深入,其抗氧化作用的机制还不明确,因此还有待于进一步深入的研究。

[参考文献]

[ 1 ] Konta F, Shimizu T. Flowering plants and ferns of the

Tianshan mountains in China [ M ]. Osaka: Tombow Publisher, 1996:110, 195.

[ 2 ] 王新玲,热娜·卡斯木,等. 新疆鼠尾草花化学成分的研究[J]. 新疆医科大学学报,2003,26(6):583.

[ 3 ] 马燕,热娜·卡斯木. 新疆鼠尾草茎化学成分的研究[J]. 新疆医科大学学报,2004,27(6):577.

[ 4 ] 热娜·卡斯木,哈木拉提·吾甫尔,堵年生,等. 新疆鼠尾草根水溶性成分的研究[J]. 新疆医科大学学报,2002,25(3):233.

[ 5 ] 刘跟生,徐贵发. 丹酚酸的抗氧化作用[J]. 食品与药品,2007,9(1A):69.

[ 6 ] 柳艳,李磊,刘瑶,等. 丹酚酸抗氧化活性及其对 DNA 损伤保护作用[J]. 中国公共卫生,2007,23(4):448.

[ 7 ] 向诚,朱路平,庄文婷,等. 云南鼠尾草茎叶中化学成分及其抗血管生成活性研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):835.

[ 8 ] 王晓梅,马俊鹏,胡君萍,等. 新疆鼠尾草中总酚酸类成分的提取工艺研究[J]. 新疆医科大学学报,2012,35(4):476.

[ 9 ] 王晓梅,热娜·卡斯木,胡君萍,等. 大孔吸附树脂纯化新疆鼠尾草总酚酸的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1270.

[10] 陈瀚,李进,李祥,等. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):184.

[11] 潘乔丹,熊圆圆,陈文东,等. 扁担藤不同极性成分抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):232.

[12] 周清,江浩,高云涛,等. 冬瓜籽水提取物抗氧化作用研究[J]. 微量元素与健康研究,2010,27(5):22.

[13] 徐建国,胡青平. 决明子水提物体外清除自由基活性的研究[J]. 食品科学,2006,27(6):73.

[14] 豆海港,陈文学,仇厚援,等. 花椒提取物抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(7):14.

[15] Yen G C, Duh Chuang D Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone [ J ]. Food Chemistry, 2002, 70(4):437.

[责任编辑 聂淑琴]