

兖州卷柏生物碱的抗氧化活性研究

邱丹缨^{1*}, 温扬敏¹, 苏齐², 谢永华¹, 余琼琼¹, 林文东¹

¹泉州医学高等专科学校基础医学部; ²福建省泉州市医药研究所, 泉州 362000

摘要:从兖州卷柏中提取生物碱类化合物,用沉淀法和分光光度法对生物碱进行鉴定,并检测兖州卷柏生物碱对 DPPH 自由基清除活性以及对大鼠肝脏匀浆丙二醛(MDA)含量、总抗氧化(T-AOC)和一氧化氮合酶(NOS)活性的影响。结果表明,从兖州卷柏中分离出的生物碱类化合物具有较强体外抗氧化活性。兖州卷柏生物碱具有清除 DPPH 自由基活性、提高大鼠肝脏匀浆的 T-AOC 活性、降低 NOS 活性以及清除 MDA 含量的功能。

关键词:兖州卷柏;生物碱;抗氧化;自由基

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.014

Extraction and Antioxidant Activity of Alkaloid from *Selaginella involvens*

QIU Dan-ying^{1*}, WEN Yang-min¹, SU Qi², XIE Yong-hua¹, YU Qiong-qiong¹, LIN Wen-dong¹

¹Quanzhou medical college; ²Quanzhou Medical and Pharmaceutical Institute, Fujian Quanzhou 362000, China

Abstract: In this study, the alkaloid components were extracted from *Selaginella involvens*, and identified by spectrophotometry and precipitation methods. The scavenging effect of *S. involvens* alkaloid on DPPH free radical was observed. The effects of *S. involvens* alkaloid on activities of total antioxidant activity (T-AOC), nitric oxide synthase (NOS) and content of malondialdehyde (MDA) in liver homogenate of rat were evaluated. The results revealed that *S. involvens* alkaloid had relative strong antioxidant capacity. *S. involvens* alkaloid scavenged DPPH free radical in a dose-dependent manner. In addition, *S. involvens* alkaloid increased the abilities of T-AOC and inhibited NOS as well as the content of MDA in liver homogenate of rat.

Key words: *Selaginella involvens*; alkaloid; antioxidant; free radical

兖州卷柏(*Selaginella involvens*, Spring)异名金不换、金扁柏、金扁桃、石卷柏、地柏枝,为卷柏科植物兖州卷柏的全草,是多年生草本植物^[1]。兖州卷柏具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、镇痛、降血糖、增强人体免疫功能等作用。特别是兖州卷柏在民间作为中草药治疗肝炎等被广泛应用,并具有显著疗效。卷柏科植物中含有多种黄酮类、生物碱类、酚类、有机酸类及糖类化合物。目前对兖州卷柏黄酮类化合物分离、纯化和药理作用研究有较多报道^[2,3]。本文研究兖州卷柏生物碱类化合物的体外抗氧化活性,为兖州卷柏药用价值的开发利用提供实验依据。

1 材料与试剂

兖州卷柏采自福建宁化县治平乡泥坑村,由泉州市医药研究所苏齐主任医师鉴定。丙二醛

(MDA)含量测定试剂盒、总抗氧化(T-AOC)活性测定试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒以及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。盐酸小檗碱标准品购自上海源叶生物科技有限公司。氯仿、碘、碘化钾、二氯化汞、碘化铊钾、硅钨酸均为国产分析纯。

大鼠肝脏匀浆液制备:普通级 SD 大鼠购自福建医科大学实验动物中心。大鼠处死取肝脏,洗净血污,剪碎。加入固液比(g/mL)为 1:1 生理盐水匀浆。于 4 °C 条件下,6000 g 离心 10 min,取上清液备用。

2 实验方法

2.1 兖州卷柏生物碱提取

取兖州卷柏全草除杂,水洗后晒干。放入粉碎机粉碎 3 min 成粉末。称取 10 g 兖州卷柏粉末,放入 500 mL 锥形瓶,加入固液比为 1:40 (g/mL)的 70% 乙醇溶液。将烧杯放置于超声波清洗剂,于温度 60 °C、功率 400 W 条件下超声处理 60 min 后过

收稿日期:2013-07-23 接受日期:2013-12-12

基金项目:泉州市科技重点项目(2012Z76);福建省卫生厅青年基金(2013-2-132)

* 通讯作者 E-mail:8192985@qq.com

滤,取上清液,用氨水溶液调至 pH = 10。取分液漏斗依次加入体积比为 1:1 的上清液和氯仿萃取,反复萃取至无生物碱反应为止,减压蒸馏,回收氯仿得到生物碱粉末^[4]。

2.2 生物碱的定性检测

称取生物碱粉末 10 mg,加入酸性乙醇溶液(12 mol/L HCl 和 95% 乙醇按体积比 1:50 混合)10 mL。吸取以上生物碱溶液 1 mL 分别加入 4 支试管,每支试管再分别滴加碘-碘化钾试剂(Wagner 试剂)、碘化汞钾试剂(Mayer 试剂)、碘化铋钾试剂(Dragendorff 试剂)、硅钨酸试剂(Bertrand 试剂),观察沉淀产生情况。沉淀的多少以“+++”、“++”、“+”表示,无沉淀产生则以“-”表示。

2.3 生物碱的定量测定

2.3.1 标准曲线测定

精确配制浓度为 0.40、0.20、0.10、0.05、0.025 mg/mL 的盐酸小檗碱标准溶液。分别取不同浓度的盐酸小檗碱标准溶液 1 mL 置于分液漏斗中,接着加入 2.5 mL 乙酸钠缓冲液,再加入 2.0 mL 溴甲酚绿指示液,震荡 5 min,静置分层 20 min。另外,取 1 mL 双蒸水,用同样方法制备空白对照组。取氯仿层,以空白对照组调零,在 415 nm 处测定吸光度^[5]。以盐酸小檗碱浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得到标准曲线 $Y = 4.865X + 0.140$ ($R^2 = 0.996$)。

2.3.2 样品生物碱定量测定

取兖州卷柏提取液 1 mL,置于分液漏斗中,接着加入 2.5 mL 乙酸钠缓冲液,再加入 2.0 mL 溴甲酚绿指示液,震荡 5 min,静置分层 20 min。另外,取 1 mL 双蒸水,用同样方法制备空白对照组。取氯仿层,以空白对照组调零,在 415 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算生物碱质量。生物碱提取率(%)

= 生物碱质量/兖州卷柏质量 × 100%。

2.4 生物碱抗氧化活性测定

2.4.1 兖州卷柏生物碱对 DPPH 清除活性研究

将 1.5 mL 的样品与等量的 DPPH (2×10^{-4} mol/L,乙醇溶解)溶液均匀的混合,室温下避光静置 30 min 在 517 nm 下测定其吸光度 A_i 。同时用同法测定 1.5 mL DPPH (2×10^{-4} mol/L) 溶液与等量的无水乙醇混合后的吸光度 A_e ,以及 1.5 mL 样品与等量无水乙醇混合后的吸光度 A_j 。样品 DPPH 的清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_e] \times 100\%$ ^[6]。

2.4.2 兖州卷柏生物碱对大鼠肝细胞匀浆 T-AOC、NOS 和 MDA 的影响研究

取 5 mL 离心管,加入大鼠肝脏匀浆液 2 mL,再分别加入浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/mL 的兖州卷柏生物碱溶液。盖上盖子,37 °C 水浴 2 h 后,严格按照试剂盒说明书测定 T-AOC、NOS 活性、MDA 含量。同时,取 5 mL 离心管,加入大鼠肝脏匀浆液 2 mL,再分别加入浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/mL 的 Vc 为对照组,严格按照试剂盒说明书测定 T-AOC 活性、NOS 活性和 MDA 含量。

3 结果与分析

3.1 兖州卷柏生物碱的定性定量分析结果

3.1.1 定性沉淀反应

兖州卷柏中提取的样品分别与生物碱沉淀试剂 Wagner 试剂、Mayer 试剂、Dragendorff 试剂、Bertrand 试剂的反应结果见表 1。从表 1 可以看出,提取样品与 4 种沉淀试剂反应均能产生沉淀,说明从兖州卷柏中提取的样品含有生物碱类化合物。

表 1 兖州卷柏生物碱沉淀反应

Table 1 Precipitation reaction of *S. involvens* alkaloid

沉淀剂 Precipitant	碘-碘化钾试剂 Wagner	碘化汞钾试剂 Mayer	碘化铋钾试剂 Dragendorff	硅钨酸试剂 Bertrand
沉淀量 Amount of precipitate	+	+++	++	+
沉淀颜色 Color of precipitate	白色 White	红棕色 Reddish brown	棕色 Brown	白色 White

3.1.2 含量测定结果

10 g 兖州卷柏,用 400 mL 酸性乙醇溶液(12 mol/L HCl 和 95% 乙醇按体积比 1:50 混合)提取。取其中 1 mL 提取液按生物碱测定方法,在 415 nm 处吸光度为 1.589。根据标准曲线 $Y = 4.865X + 0.140$

($R^2 = 0.996$) 得到生物碱含量为 0.289 mg。50 g 兖州卷柏总提取生物碱量为 119.2 mg,生物碱提取率 1.19%。

3.2 兖州卷柏生物碱对 DPPH 自由基清除率的影响

兖州卷柏生物碱对 DPPH 自由基清除率影响见

图 1。从图 1 可以看出,在不同浓度时,兖州卷柏生物碱对 DPPH 自由基的清除率均小于 Vc。随着生物碱浓度增加,对 DPPH 自由基的清除率增加,当生物碱浓度为 4 mg/L 时,对 DPPH 自由基清除率最大为 38.70%。其曲线方程为: $Y = 19.276X + 16.63$ ($R^2 = 0.9874$)。

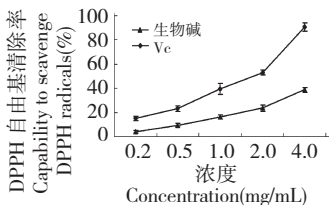


图 1 兖州卷柏生物碱对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig. 1 Scavenging rate of *S. involvens* alkaloid on DPPH free radical

3.3 兖州卷柏生物碱对 T-AOC 活性影响

不同浓度的兖州卷柏生物碱总抗氧化活性见图 2。从图 2 可以看出,兖州卷柏生物碱的总抗氧化活性随浓度升高而增加。兖州卷柏生物碱总抗氧化活性与生物碱浓度有明显的量效关系。当浓度为 0.05 mg/L 时,兖州卷柏生物碱总抗氧化活性高于 Vc,而随着浓度增加,Vc 总抗氧化活性明显高于生物碱。

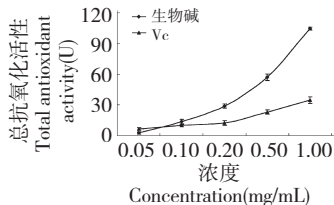


图 2 兖州卷柏生物碱对 T-AOC 活性的影响

Fig. 2 Effect of *S. involvens* alkaloid on T-AOC

3.4 兖州卷柏生物碱对 NOS 活性影响

NO 是由一氧化氮合酶 (NOS) 催化精氨酸经过复杂的反应产生的一种自由基气体,对免疫反应、胚胎发育、心血管系统以及神经信号传导等过程起着

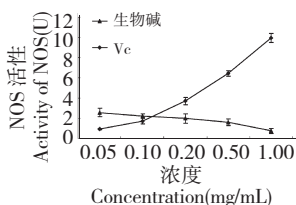


图 3 兖州卷柏生物碱对 NOS 活性的影响

Fig. 3 Effect of *S. involvens* alkaloid on NOS

重要的调节作用。兖州卷柏生物碱对总一氧化氮合酶 (TNOS) 活性影响见图 3。从图 3 可以看出,随着 Vc 浓度增加,TNOS 活性增加。兖州卷柏生物碱对 TNOS 活性的影响与刚好 Vc 相反,随着浓度增加,TNOS 活性降低。表明兖州卷柏生物碱具有抑制 TNOS 活性功能,抑制 NO 的产生。

3.5 兖州卷柏生物碱对 MDA 的影响

生物体内,自由基作用于脂质发生过氧化反应终产物为丙二醛,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。兖州卷柏生物碱对 MDA 的影响见图 4。从图 4 可以看出,随着兖州卷柏生物碱浓度增加,对 MDA 的抑制活性显著增加。但与对照组 Vc 比较,兖州卷柏生物碱不同浓度对 MDA 的抑制活性均较小。

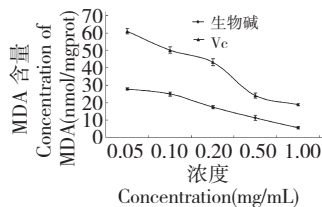


图 4 兖州卷柏生物碱对 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effect of *S. involvens* alkaloid on MDA

4 讨论

细胞代谢过程中不断产生的自由基,若积累过多而不能及时清除,会影响其正常功能,加速机体的衰老进程并诱发各种疾病^[7]。谢永华等^[8]研究兖州卷柏水提物的总抗氧化活性,结果表明,兖州卷柏水提物的总抗氧化活性大小与浓度具有明显的函数关系。随着浓度增加,总抗氧化能升高。其结论与本实验结果一致,本实验结果表明,兖州卷柏生物碱总抗氧化活性随浓度升高而增加。

许多疾病的产生与体内稳定的 NO 水平发生变化有关,从而使得 NOS 成为引人注目的药物开发目标。随着人们对 NOS 抑制剂相关的结构特征了解的深入,寻找天然 NOS 抑制剂或通过电子等排和拼和原理以及计算机辅助药物设计等手段,必将设计并合成出更多、更合理的新化合物,对人类健康做出重要贡献。Joo SS 等^[9]研究表明,兖州卷柏提取物 (SIE) 对痤疮细胞具有抑制 NO 的产生和清除作用,并能抑制 iNOS/IL-1 β 的表达。本实验结果也表明,兖州卷柏生物碱具有抑制 NO 的产生作用,且抑制强度随浓度增加而增大。说明兖州卷柏具有较强的

抑制 NO 产生功能。

DPPH 是一种很稳定的以氮为中心的自由基,广泛用于定量测定生物样品的抗氧化能力。本实验研究表明,兗州卷柏生物碱具有清除 DPPH 自由基活性。其结论与徐智等^[10]对垫状卷柏双黄酮清除 DPPH 自由基研究结果相似。

Gayathri 等^[11]对三种卷柏(*S. involvens*、*S. delicatula* 和 *S. wightii*) 提取物对小鼠脂质过氧化反应的作用,表明三种卷柏水提取物都具有一定的抗氧化活性,其中兗州卷柏的抗脂质过氧化活性尤为显著,且没有表现出任何对小鼠毒性。本实验结果表明,兗州卷柏生物碱能抑制 MDA 的产生,抑制效果与浓度成正比例关系,与以上结论一致。

参考文献

- 1 Jiangsu College of New Medicine Science(江苏新医学院编). Thesaurus of Chinese Traditional Medicine(中药大辞典). Shanghai:Shanghai Science & Technology Press,1985. 1472.
- 2 Wen YM(温扬敏). Advance of *Selaginella involvens*. *Herald Med* (医药导报),2012,31:341-342.
- 3 Lu MX(鲁曼霞),Huang KL(黄可龙),Shi SY(施树云), et al. Study on the Chemical constituents of *Selaginella involvens* Spring and Antibacterial activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2009,21:973-975.
- 4 Qiu DY(邱丹纓),Wen YM(温扬敏),Xie YH(谢永华), et al. Effect of ultrasonic-assisted extraction and anti-prolifer-

ation activities on hepatocellular carcinoma cell H22 of alkaloid from *Selaginella involvens*. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2013,34:265-268.

- 5 Liu SX(刘树兴),Zhao F(赵芳). The determination of alkaloids from lotus and study on anti-microbial activities. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2008,29:124-127.
- 6 Ye H,Wang KQ,Zhou CH,et al. Purification,antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem*,2008,111:428-432.
- 7 Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res*,1992,275:257-266.
- 8 Xie YH(谢永华),Wen YM(温扬敏),Luo CL(罗彩林), et al. Extraction of active substances from *Selaginellae involvens* spring and inhibitory effects on human esophageal carcinoma cells. *Herald Med* (医药导报),2012,31:1132-1135.
- 9 Joo SS,Jang SK,Kim SG,et al. Anti-acne activity of *Selaginella involvens* extract and its non-antibiotic antimicrobial potential on *Propionibacterium acnes*. *Phytother Res*,2008,22:335-339.
- 10 Xu Z(徐智),Jia SJ(贾素洁),Tan GS(谭桂山), et al. Study on pharmacological activity of biflavones from *Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim. *China J Mod Med* (中国现代医学杂志),2004,14:88-89.
- 11 Gayathri V,Asha V,Subramoniam A. Preliminary studies on the immunomodulatory and antioxidant properties of *Selaginella* species. *Indian J Pharmacol*,2005,37:381-385.

(上接第 392 页)

- 30 Bianco MA,Savolainen H. Phenolic acids as indicators of wood tannins. *Sci Total Environ*,1997,2013:79-82.
- 31 Upadhyay R,Rao LJM. An outlook on chlorogenic acids-occurrence,chemistry,technology,and biological activities. *Crit Rev Food Sci Nutr*,2013,53:968-984.
- 32 Jung HJ,Park HJ,Kim RG,et al. *In vitro* anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriiodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus*. *Planta Med*,2003,69:610-616.
- 33 Zhao DL,Shen D,Chi YT,et al. Liriiodendrin protects SH-SY5Y cells from dopamine-induced cytotoxicity. *J Chin*

Pharm Sci,2007,16:294-299.

- 34 Chen S. Research progress on the pharmacokinetics of chlorogenic acid. *Chin Tradit Patent Med*,2010,32:645-648.
- 35 Kumar S,Saravanakumar M,Raja B. Antihypertensive, antioxidant and free radical scavenging potential of syringic and vanillic acid in L-NAME induced hypertension in-vivo and in-vitro study. *J Pharm Res*,2012,5:2942-2948.
- 36 Palafox-Carlos H,Gil-Chavez J,Sotelo-Mundo RR,et al. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp:chlorogenic,gallie,protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*,2012,17:12657-12664.