

文章编号:1001-6880(2016)12-1924-05

# 麻花艽不同部位抗氧化活性研究

秦 龙<sup>1</sup>,王艺璇<sup>2</sup>,黄 燕<sup>1</sup>,王晓飞<sup>1</sup>,焦海胜<sup>1\*</sup><sup>1</sup>兰州大学第二医院药学中心,兰州 730030; <sup>2</sup>中山大学药学院,广州 510006

**摘要:**本文分别采用 DPPH 法和铜离子还原能力法(CUPRAC)测定麻花艽花、茎叶和根的抗氧化活性,并比较其不同部位的抗氧化活性。抗氧化活性分析结果表明麻花艽花、茎叶、根的 DPPH 自由基清除能力均低于没食子酸,其清除 DPPH 自由基的半数有效量( $IC_{50}$ )分别为 260, 341.3 和 2920.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 麻花艽花、茎叶和根的  $\text{Cu}^{2+}$  的还原能力 Trolox 当量(TEAC 值)分别为 0.127, 0.108 和 0.019  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明,麻花艽花、茎叶和根均具有抗氧化活性,其抗氧化能力的强弱顺序为花 > 茎叶 > 根。

**关键词:**麻花艽; 抗氧化活性; DPPH; CUPRAC

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.013

## Antioxidant Activities of Different Tissues of *Gentiana straminea* Maxim

QIN Long<sup>1</sup>, WANG Yi-xuan<sup>2</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, WANG Xiao-fei<sup>1</sup>, JIAO Hai-sheng<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China; <sup>2</sup>College

of Pharmacy, Sun yat-sen university, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** In this study, DPPH and CUPRAC were used to determine the antioxidant activities of flower, cauline leaf and root of *Gentiana straminea* Maxim. In addition, the antioxidant activities of different organs were compared. The antioxidant activity analysis results indicated that the DPPH radical scavenging activities of flower, cauline leaf and root were lower than that of gallic acid. The  $IC_{50}$  values of leaves, branch and fruit were 260, 341.3 and 2920.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. TEAC values of CUPRAC of flower, cauline leaf and root were 0.127, 0.108 and 0.019  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The flower, cauline leaf with root of *G. straminea* had some antioxidant activity. The antioxidant activities of different organs decreased in the order of flower > cauline leaf > root.

**Key words:** *Gentiana straminea* Maxim; antioxidant activity; DPPH; CUPRAC

麻花艽(*Gentiana straminea* Maxim.)为龙胆科(Gentianaceae)龙胆属植物,为药用秦艽的药材植物来源之一,具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热等功效,用于治疗风湿痹痛,骨节酸痛,湿热黄疸,小儿疳积发热等症。藏医称“解吉嘎保”,是我国重要的常用中藏药材之一<sup>[1,2]</sup>。麻花艽主要化学成分为环烯醚萜苷类,主要有落干酸、龙胆苦苷等。现代药理学研究表明,落干酸具有一定的抗炎作用,龙胆苦苷具有促进胃液分泌、抗原虫和抗炎等作用<sup>[3,4]</sup>。自由基是生物体氧化过程中产生的中间代谢产物,在体内生成和清除通常处于平衡状态,但当机体内自由基过剩时,会直接或间接地造成细胞活力下降、机体衰老、色素形成、血管病变、细胞癌变等,而减少机体

氧化损伤的最有效方法是补充抗氧化剂<sup>[5,6]</sup>。麻花艽药用部位为干燥根,其余部分则舍弃不用,造成了资源浪费,为了进一步开发麻花艽的种质资源,本文分别采用 DPPH 法<sup>[7,8]</sup>和铜离子还原能力法(CUPRAC)<sup>[9,10]</sup>测定麻花艽花、茎叶、和根的抗氧化活性,并比较其不同组织部位的抗氧化活性。

## 1 仪器与试剂

UV-2450 型紫外分光光度仪(日本岛津), ME215S 型吉尼斯系列电子分析天平(德国赛多利斯仪器有限公司), JJ500 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂), MH-1000 型电热套(北京科伟永鑫实验仪器设备厂)。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, Sigma, 批号 D9132), 2,9-二甲基-1,10-菲啰啉(新亚铜灵, 上海笛柏化学品技术有限公司, 批号 484-11-7), 水溶性维生素 E(Trolox, MP Biomedicals, 批号 M5491), 没

收稿日期:2016-03-04 接受日期:2016-09-22

基金项目:兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2013-216); 兰州大学第二医院院内中医药科研项目(YJzy2013-4)

\* 通讯作者 Tel:86-931-8942571; Email:ldeyjhs@sohu.com

食子酸(分析纯,上海中泰化学试剂公司,批号20130913), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,天津市百世化工有限公司,批号20130224),醋酸铵(分析纯,天津市百世化工有限公司,批号20130221),无水乙醇(分析纯,天津市河东区红岩试剂厂,批号20141110)。

麻花艽采摘自甘肃省天祝县夏玛林场,经兰州大学生命科学学院冯虎元教授鉴定为龙胆科、龙胆属植物麻花艽。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取麻花艽花、茎叶和根常温阴干,粉碎,分别称取麻花艽花、茎叶和根粉末各三份,每份5 g,加入75%乙醇60 mL加热回流提取3次,每次1.5 h,提取液过滤合并,用75%的乙醇定容至250 mL,摇匀,

作为供试品储备溶液,置于4 °C的冰箱中。

### 2.2 DPPH法测定供试品溶液抗氧化活性

#### 2.2.1 DPPH溶液及对照品溶液的制备

精密称取DPPH 8.28 mg,加75%乙醇溶解并定容至250 mL,摇匀,4 °C避光保存;精密称取没食子酸11.62 mg,加75%乙醇溶解并定容至100 mL,摇匀,精密量取上述溶液8 mL,加75%乙醇定容至25 mL,作为对照品溶液,置于4 °C冰箱中,备用。

#### 2.2.2 反应时间优化

分别精密量取麻花艽花、茎叶、根供试品溶液和没食子酸对照品溶液50、70、300和50 μL,置于10 mL试管中,按表1依次加入75%乙醇和DPPH溶液4 mL,混合均匀后避光存放,于517 nm处每隔3 min测定其吸光度值,结果见图1。

表1 样品溶液和75%乙醇的加入量

Table 1 The adding amounts of sample solution and 75% ethanol

	样品溶液 Sample solution (μL)	75%乙醇 75% Ethanol (μL)
花 Flower	50	950
茎叶 Cauline leaf	70	930
根 Root	300	700
没食子酸 Gallic acid	50	950

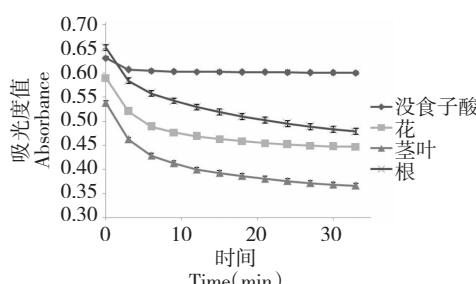


图1 供试品、对照品溶液与DPPH混合后不同时间点的吸光度

Fig. 1 Absorbance at different times after mixing the test and the reference solutions with DPPH

由图1可知,供试品溶液和对照品溶液与DPPH混合后,吸光度值随着时间推移变小,前6 min变化明显,之后变化渐渐缓慢,20 min后基本平稳。为了节约时间及便于比较,选择20 min为供试品溶液和对照品溶液与DPPH的适宜反应时间。

### 2.2.3 麻花艽不同组织部位DPPH清除能力的测定

入样品和75%乙醇,混合均匀后,常温避光反应20 min,于517 nm处测定其吸光度值,平行测定三次。DPPH清除率按式(1)计算。

$$\text{DPPH清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} * 100\% \quad (1)$$

其中, $A_{\text{空白}}$ 为4 mL DPPH溶液与1 mL 75%乙醇溶液混合后的吸光度值, $A_{\text{样品}}$ 为4 mL DPPH溶液依次加入样品和75%乙醇反应20 min后的吸光度值。按式(1)计算其DPPH清除率,以浓度和DPPH清除率作图,其结果见图2,求得清除50% DPPH所需的浓度,即半数抑制浓度 $IC_{50}$ 值。

由图2可知,麻花艽花、茎叶、根及没食子酸溶液的浓度分别在浓度范围0~400、0~480、0~4000及0~1.48 μg/mL之间与DPPH清除率线性相关,以浓度为横坐标(X),以DPPH清除率为纵坐标(Y)所得回归方程分别为: $y_1 = 183.5x_1 + 2.288$ ;  $y_2 = 142.6x_2 + 1.33$ ;  $y_3 = 15.87x_3 + 3.650$ ;  $y_4 = 49.02x_4 - 0.686$ ,相关系数分别为0.9930、0.9973、0.9918及0.9968。根据线性方程麻花艽花、茎叶、根及没食子酸的 $IC_{50}$ 值分别为260、341.3、2920.6

精密量取DPPH溶液4 mL,分别按表2依次加

表 2 样品溶液和 75% 乙醇的加入量

Table 2 The adding amounts of the sample solution and 75% ethanol

	样品溶液 Sample solution (μL)	75% 乙醇 75% Ethanol (μL)		样品溶液 Sample solution (μL)	75% 乙醇 75% Ethanol (μL)
花 Flower	0	1000	茎叶 Cauline leaf	0	1000
	20	980		30	970
	40	960		60	940
	60	940		80	920
	65	935		85	915
	70	930		90	910
	80	920		100	900
	90	910		110	890
	100	900		120	880
根 Root	0	1000	没食子酸 Gallic acid	0	1000
	100	900		30	970
	300	700		60	940
	500	500		90	910
	600	400		120	880
	700	300		140	860
	800	200		160	840
	900	100		180	820
	1000	0		200	800

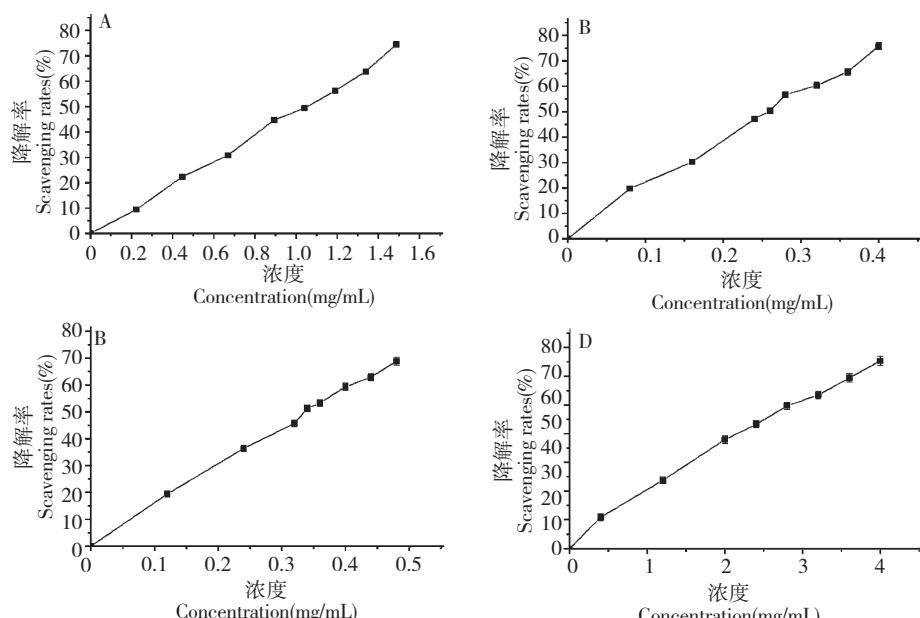


图 2 没食子酸(A)、麻花艽花(B)、麻花艽茎叶(C)及麻花艽根(D)的 DPPH 清除率

Fig. 2 DPPH scavenging rates of gallic acid (A), *G. straminea* flower (B), caulin leaf (C) and root (D)

及 5.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 其清除 DPPH 的能力强弱顺序为没食子酸 > 花 > 茎叶 > 根。

### 2.3 样品抗氧化活性的 CUPRAC 法测定

#### 2.3.1 检测试剂及对照品溶液的制备

称取  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  42.95 mg 于 250 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 摆匀; 称取醋酸铵 7.708 g 于 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 摆匀; 称取新亚铜灵 165.2 mg 于 100 mL 的棕色容量瓶中, 加 75% 乙醇溶解并定容至刻度, 摆匀。将配制好的溶液放置于 4 °C 的冰箱中, 备用。

精密称取 Trolox 10.13 mg 于 25 mL 的容量瓶中, 加 75% 乙醇溶解并定容至刻度, 摆匀, 作为对照品溶液。置于 4 °C 的冰箱中, 备用。

#### 2.3.2 反应时间优化

分别精密量取麻花艽花、茎叶、根样品溶液和 Trolox 对照品溶液 50、50、100  $\mu\text{L}$  和 40  $\mu\text{L}$ , 置于 10 mL 试管中, 精密量取新亚铜灵溶液 1 mL、 $\text{CuCl}_2$  溶液 1 mL 及醋酸铵溶液 1 mL, 按表 3 依次加入样品溶液和 75% 乙醇, 混合均匀后, 于 450 nm 处每隔 5 min 测定其吸光度值, 结果如图 3 所示。

表 3 样品溶液和 75% 乙醇的加入量

Table 3 The adding amounts of the sample solution and 75% ethanol

	样品溶液 Sample solution ( $\mu\text{L}$ )	75% 乙醇 75% Ethanol ( $\mu\text{L}$ )
花 Flower	40	960
茎叶 Cauline leaf	50	950
根 Root	300	700
Trolox	40	960

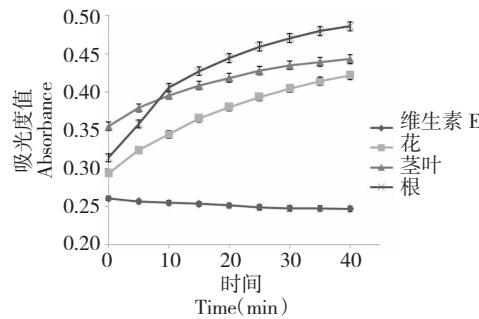


图 3 供试品、对照品溶液与检测试剂混合后不同时间点的吸光度

Fig. 3 Absorbance at different times after mixing samples and the reference solutions with detection reagent

由图 3 可知, 供试品溶液与检测试剂混合后, 吸光度值随着时间推移增加, 而 Trolox 对照品溶液与检测试剂混合后, 吸光度值随着时间推移减少。前 15 min 变化明显, 之后变化渐渐缓慢, 35 min 后基本平稳。为了节约时间及便于比较, 选择 35 min 为供试品溶液和对照品溶液与检测试剂的适宜反应时间。

#### 2.3.3 标准曲线的绘制

精密量取新亚铜灵溶液 1 mL、 $\text{CuCl}_2$  溶液 1 mL 及醋酸铵溶液 1 mL, 分别加入 Trolox 对照品溶液 40、55、70、85、100、115  $\mu\text{L}$ , 混合均匀, 75% 乙醇补足

4 mL, 常温避光 35 min 后, 于 450 nm 处测定其吸光度值, 以吸光度值为纵坐标(A), 浓度(X)为横坐标绘制标准曲线, 得到回归方程为:  $A = 15.5555x + 0.0200, r = 0.9970$ 。结果表明, Trolox 对照品溶液的浓度在 16.21 ~ 46.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内与吸光度具有良好的线性相关。

#### 2.3.4 麻花艽不同组织部位还原能力

分别精密量取麻花艽花、茎叶及根供试品溶液 40、50、300  $\mu\text{L}$ , 按照 2.3.3 项下的测定方法测定其吸光度值, 将测量的吸光度值, 代入标准曲线求得 x, 则供试品的  $\text{Cu}^{2+}$  的还原能力 Trolox 当量(TEAC 值)为  $x/C_{\text{样品}}$ (即 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品溶液相当的 Trolox 溶液), 其中  $C_{\text{样品}}$  表示样品溶液的浓度。结果表明, 麻花艽花、茎叶和根的  $\text{Cu}^{2+}$  的还原能力 Trolox 当量(TEAC 值)分别为 0.127、0.108 和 0.019  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其  $\text{Cu}^{2+}$  的还原能力强弱顺序为花 > 茎叶 > 根。

## 3 讨论与结论

抗氧化活性测定方法有多种, 但没有标准的测定方法, 用不同方法测得的抗氧化活性的数据之间不能有效的进行统计比较。此外, 麻花艽花、茎叶和根的化学成分复杂, 主要有落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷等环烯醚萜苷类化合物及黄酮类化合物异荭草素等, 需要采用多种测定方法反映其

抗氧化活性,用不同的抗氧化指标综合评价麻花艽花、茎叶和根的抗氧化能力,有利于全面比较麻花艽花、茎叶和根之间的差异。虽然 DPPH 法和 CUPRAC 法不能完全模拟生物体内的变化,但是由于检测试剂 DPPH 自由基稳定易得,而 CUPRAC 法其检测环境接近于生理环境,故本文采用 DPPH 法和 CUPRAC 法对麻花艽花、茎叶和根的抗氧化活性进行检测,虽然抗氧化活性的结果不同,但通过比较可以发现其抗氧化能力的强弱顺序为花 > 茎叶 > 根。本文是初次报道了麻花艽的抗氧化活性,为麻花艽种质资源的进一步开发研究提供了理论支持。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I ,270-271.
- 2 Zhao ZL, Gaawe D, Wang ZT. Identification of medicinal plants used as Tibetan Traditional Medicine Jie-Ji. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132:122-126.
- 3 Sun J (孙菁), Chen GC (陈桂琛), Li YL (李玉林), et al. Determination and seasonal variation of four iridoid glycosides in *Gentiana straminea* cultivate. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18:1017-1019.
- 4 Recio MC, Giner RM, Manez S, et al. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med*, 1994, 60:232-234.
- 5 Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 2003, 133:933S-940S.
- 6 Valko M, Eibfritz LD, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1):44-84.
- 7 Da Porto C, Calligaris S, Celotti E, et al. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:4241-4245.
- 8 Lu YH (卢怡雯), Li XF (李晓芬), Xiang PZ (项朋志), et al. Study on UV-Vis absorption spectrometric investigation of the gallic acid against DPPH free radicals. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2014, 35:124-126.
- 9 Apark R, Gü? lü K, Ozyürek M, et al. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and Vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocuproine:CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 2004, 52:7970-7981.
- 10 Li H (李辉), Wang XF (王晓飞), Jiao HS (焦海胜). Application of main and modified CUPRAC methods in the study of antioxidant capacity of multicomponent. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:742-746.

(上接第 1885 页)

- 5 Demain AL, George S, Kole DF, et al. Tetanus toxin production in soy-based medium: nutional studies and scale up into smallfermentors. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 43:360-363.
- 6 Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol*, 2006, 59:118-124.
- 7 Mills S, Ross RP, Hill C, et al. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int Dairy J*, 2011, 21:377-401.
- 8 Ju NH (居乃琥). *Handbook of Enzyme Engineering*. Beijing: China Light Industry Press, 2011-08-01.
- 9 Singh A, Ramaswamy HS. Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. *Int J Food Sci Technol*, 2014, 49:269-279.
- 10 Zamora A, Juan B, Trujillo AJ, et al. Compositional and biochemical changes during cold storage of starter-free fresh cheeses made from ultra-high-pressure homogenised milk. *Food Chem*, 2015, 176:433-440.
- 11 Joshi I, Sudhakar S, Nazeer RA, et al. Anti-inflammatory properties of bioactive peptide derived from gastropod influenced by enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 11:1-13
- 12 Liu MC, Yang SJ, Hong D, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Chem Central J*, 2016, Accepted.
- 13 Mao XY, Zhou HH, Li Xi, et al. Huperzine A alleviates oxidative glutamate toxicity in hippocampal HT22 cells via activating BDNF/TrkB-Dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36:915-925.
- 14 Kajiyama N, Isobe S, Uemura K, et al. Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. *Int J Food Sci Technol*, 1995, 2:147-158.