

栀子中抗氧化的活性成分研究

陈丽萍¹, 王先敏^{1,2}, 李茂星^{1,2,3*}, 毛婷^{1,3}, 杨云裳²

(1. 兰州军区兰州总医院药剂科 全军高原环境损伤防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州理工大学石油化工学院, 甘肃 兰州 730050; 3. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 研究栀子不同提取部位的体外抗氧化活性。方法 通过 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、羟基自由基清除法、脂质过氧化抑制能力、总还原能力、总抗氧化能力等 6 种方法来研究栀子主要提取部位的自由基清除能力及抗氧化活性, 同时与 VitC 进行对照。结果 栀子中不同部位的抗氧化活性具有较大的差异。其中 栀子黄色素部分的抗氧化活性最强, 在一定浓度下能够有效地清除 DPPH、ABTS、羟基等自由基, 对 DPPH、ABTS、羟基等自由基的半数清除浓度分别为 0.188、0.510、0.198 mg·mL⁻¹。结论 栀子黄色素具有较强的体外清除自由基能力及显著的抗氧化活性, 是一种具有较高研究价值和开发潜力的天然抗氧化药物。

关键词: 栀子; 提取物; 栀子黄色素; 栀子苷; VitC; 自由基; 还原能力; 抗氧化能力

中图分类号: R96

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2018)02-0179-04

DOI: 10.13375/j.cnki.wjps.2018.02.019

Antioxidant activity of the different extracts isolated from *Gardenia jasminoides*

CHEN Liping¹, WANG Xianmin^{1,2}, LI Maoxing^{1,2,3}, MAO Ting^{1,3}, YANG Yunshang¹

(1. Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage PLA Department of Pharmacy Lanzhou General Hospital of PLA Lanzhou Gansu 730050 P. R. China; 2. College of Petrochemical Technology Lanzhou University of Technology Lanzhou Gansu 730050 P. R. China; 3. Pharmacy College Lanzhou University Lanzhou Gansu 730000 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To study the antioxidant activity from the different extracts of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro*. **METHODS**

Taking Vitamin C as the reference, antioxidant activity of main active fraction of *G. jasminoides* were tested by six methods, including the *in vitro* scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·), 2,2-nitrogen based bis-(3-ethyl benzene and thiazole-6-sulfonic acid) diamine salt cation radical (ABTS⁺·), hydroxyl radical (·OH), and the determination of reducing power, inhibition of lipid peroxidation and total antioxidant capacity. **RESULTS** There was a significant difference of the antioxidant activity between different extracts of *G. jasminoides*. Gardenia yellow pigment (GYP) exhibited the more effective antioxidant activity. GYP could effectively scavenge DPPH·, ABTS⁺·, ·OH under a certain concentration and the IC₅₀ were 0.188 mg·mL⁻¹, 0.510 mg·mL⁻¹ and 0.198 mg·mL⁻¹ respectively. **CONCLUSION** GYP has strong ability of radical scavenging and antioxidant activity *in vitro*. These findings suggest that GYP may be taken as a natural antioxidant drug as a potential high value research object.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; Extracts; Gardenia yellow pigment; Geniposide; Vitamin C; Radical; Reducing power; Antioxidant activity

CLC number: R96

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2018)02-0179-04

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 为临床常用中药^[1]。其性寒味苦, 无毒, 入心、肝、肺、三焦经, 具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效。栀子具有保肝、利胆、镇痛、抗炎、抗菌、抗肿瘤、降血糖血脂等多种药理活性^[2]。西红花苷作为栀子的主要成分, 同时也是藏药西红花的主要活性物质, 具有抗氧化、抗动脉粥样硬化及调节血脂的作用^[3-4]; 是自然界惟一的一种

天然类胡萝卜素色素, 由西红花酸与二分子龙胆二糖结合而成, 包括西红花苷-I 与西红花苷-II, 具有较高的经济价值, 被广泛应用于食品、医药和化妆品领域中^[5]。生物细胞的氧化损伤已经成为进一步诱发疾病和引起机体衰老的重要因素。抗氧化剂可有效地清除体内过剩的自由基, 保护细胞和线粒体的正常结构和功能, 在预防和治疗由氧化损伤诱发的疾病和抗衰老方面有广泛的应用前景。藏红花

作者简介: 陈丽萍(1976—), 女, 主管药师, 硕士, 从事天然药物化学活性成分的研究工作。Email: 1198145764@qq.com

* 通信作者(Correspondent author), Email: limaox2005@aliyun.com

中的西红花苷和西红花酸具有清除自由基的能力和显著的抗氧化作用^[6]。由于西红花的产量极低,市场价格偏高,影响了其作为抗氧化、抗疲劳药物的广泛应用,而栀子和西红花具有相同的抗氧化活性成分西红花苷,现通过体外抗氧化试验来研究栀子各提取部位的抗氧化活性,以期对栀子作为抗氧化剂进行深入研究^[7]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SpectraMax® i3 型全自动荧光酶标仪(美国 Molecular Devices); WD-9403F 型紫外-可见分光光度计(美国惠普); LyoQuest-55 plus 型冷冻干燥机(西班牙 Telster)。栀子(兰州黄河中药材市场,经甘肃中医药大学杨锡仓主任中药师鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)、TRIS、抗坏血酸(VitC)、焦性没食子酸、1,10-菲啰啉(Solarbio 公司); 乙二胺四乙酸(EDTA, Aladdin 公司); 其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 栀子各提取部位的制备及鉴定 称取适量栀子,粉碎成粗粉,加蒸馏水煎煮提取(10 BV × 1 h × 2),过滤,合并滤液,得栀子提取液母液,经喷雾干燥机干燥后得到栀子粗提物粉末。将栀子母液上样于聚酰胺色谱柱中,先用蒸馏水洗脱聚酰胺柱至流出液无色后,继续以 15% 乙醇洗脱除杂,再以 75% 乙醇为洗脱剂,控制洗脱速度,流出液定量分开收集并实时对其中成分进行紫外检测,收集洗脱液,得吸收波长为 440 nm 的栀子黄色素化合物。合并聚酰胺柱上样流出液及水洗脱液,上样于大孔树脂柱上,先以蒸馏水洗脱大孔树脂柱至流出液无色,得到大极性多糖类成分,再以 30% 乙醇为洗脱剂,流出液定量分开收集,并实时对其中成分进行紫外检测,最终得吸收波长为 239 nm 的栀子苷化合物。采用 Waters C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm),流动相为甲醇(A)-蒸馏水(B),栀子苷用甲醇-水(25:75)等度洗脱(平衡时间为 10 min),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 10 μL; 栀子黄色素用甲醇-水(50:50)等度洗脱(平衡时间为 10 min),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 10 μL。在此条件下,对照品和供试品溶液的 HPLC 图谱见图 1。

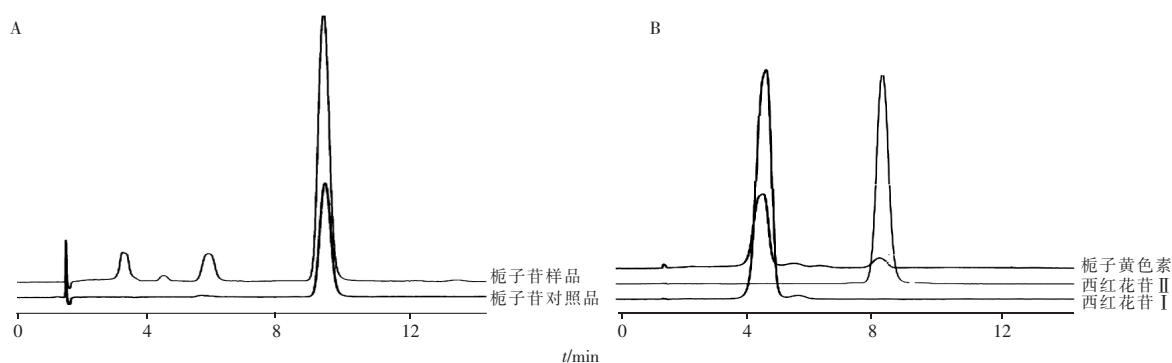


图1 栀子苷样品及栀子苷对照品(A)和栀子黄色素及西红花苷对照品(B)溶液的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of the sample and geniposide control solution(A) and gardenia yellow pigment and crocin - I ,crocin - II solution(B)

1.2.2 栀子不同提取部位的体外抗氧化活性试验^[8-13] 取不同质量浓度(0.030.5 mg·mL⁻¹)的样品和 VitC 溶液 125 μL,分别加入 125 μL 0.1 mmol·L⁻¹ DPPH 的 95% 乙醇溶液中,于暗处、室温下反应 30 min,以 95% 乙醇做空白对照,测量在 517 nm 处的吸光度(A_i);同时,测定 125 μL DPPH 的 95% 乙醇溶液与 125 μL 95% 乙醇混合后在 517 nm 处的吸光度(A₀)及 125 μL 95% 乙醇与 125 μL 样品溶液在 517 nm 处的吸光度(A_j)。计算清除

率(%) = [1 - (A_i - A_j) / A₀] × 100% (1),并计算其半数清除浓度(IC₅₀)。将等体积 7 mmol·L⁻¹ ABTS 溶液与 2.45 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾混合,置暗处反应 1216 h,制备 ABTS 自由基溶液。用 95% 乙醇稀释该溶液至其在 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.02。将 100 μL 不同质量浓度(0.082.0 mg·mL⁻¹)样品和 VitC 溶液加入 3.9 mL ABTS 自由基溶液中,于室温下放置 10 min,测量在 734 nm 处的吸光度(A_i);同时,测定 3.9 mL ABTS 自由基溶液与 100

μL 95%乙醇混合后在 734 nm 处的吸光度(A_0)及 3.9 mL 95%乙醇与 100 μL 样品溶液在 734 nm 处的吸光度(A_j)。按式(1)计算其清除率,并计算其 IC_{50} 。分别取 1.0 mL 0.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻二氮菲、2.0 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液、1.0 mL 0.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液、1.0 mL 不同质量浓度的样品溶液和 1.0 mL 0.01% H_2O_2 (新鲜配制)混合后,在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 60 min,于 520 nm 处测定吸光度(A_s)。空白组以 1.0 mL 蒸馏水代替样品测定吸光度(A_0)。对照组以 1.0 mL 蒸馏水代替 H_2O_2 和样品测定吸光度(A_c)。用 4.0 mL 蒸馏水和 2.0 mL 磷酸盐缓冲溶液调零。计算清除率(%) = $(A_s - A_0) / (A_c - A_0) \times 100\%$ (2),并计算其 IC_{50} 。将 300 mg 卵磷脂溶解于 30 mL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH7.4 磷酸盐缓冲溶液中,于冰浴下震荡,制得卵磷脂溶液。取 0.2 mL 卵磷脂溶液,加入 1.0 mL pH 7.4 磷酸缓冲溶液、0.50 mL 不同浓度(0.082.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品溶液、1.0 mL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA - Fe(II) 中,混匀后于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 45 min,再加入 2.0 mL 28% 三氯乙酸、1.0 mL 1% 硫代巴比妥酸,混匀后置 100 $^\circ\text{C}$ 沸水浴中加热 10 min,冷却后在 523 nm 处测定吸光度($A_{\#}$)。用磷酸盐缓冲液调零,空白管中用磷酸盐缓冲液代替样品,测定吸光度(A_0)。计算抑制率(%) = $(A_0 - A_{\#}) / A_0 \times 100\%$ (3),并与 VitC 进行比较。将 1.0 mL 不同质量浓度的样品溶液(0.2510.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入 2.5 mL pH6.6 磷酸盐缓冲液、2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液中,得混合溶液,置 50 $^\circ\text{C}$ 水浴中保温 20 min,再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液,将所得混合溶液于 $3 \times 10^3 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倾取上清液,精密吸取 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液中,在 700 nm 处测定吸光度 A ,并与 VitC 进行比较。将 0.1 mL 不同质量浓度的样品溶液(0.082.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入 1.0 mL 试剂溶液(试剂溶液中包括 0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸、28 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠、4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钼酸铵)中,混合液置 95 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 90 min,放冷至室温,以蒸馏水为空白,于 695 nm 处测定吸光度 A ,并与 VitC 进行比较。

1.2.3 栀子不同提取部位的体外抗氧化作用 由图 2A 可知:栀子的不同提取部位对 DPPH 自由基的清除能力存在明显差异,VitC、栀子黄色素和栀子粗提物具有明显的清除自由基的能力。其中,VitC 和栀子黄色素对 DPPH 自由基的清除作用显著,且

随着浓度的增加,栀子黄色素对 DPPH 自由基的清除作用增强,在 0.030.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时呈明显的量效关系,计算得到栀子黄色素对 DPPH 自由基的 IC_{50} = 0.188 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。栀子苷和多糖对 DPPH 自由基的清除能力相当,活性较小。由图 2B 可知:栀子的不同提取部位对 ABTS 自由基的清除能力存在明显差异,VitC、栀子黄色素和栀子粗提物具有明显的清除自由基的能力。其中,VitC 和栀子黄色素对 ABTS 自由基的清除作用显著,VitC 的清除能力显著高于栀子各提取物。且随着浓度的增加,VitC、栀子黄色素和栀子粗提物对 ABTS 自由基的清除作用增强,在 0.082.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时呈明显的量效关系,计算得到 VitC、栀子黄色素对 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 分别为 0.078、0.510 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。栀子苷和多糖部分对 ABTS⁺ 自由基的清除能力均较弱,随着浓度的增加也无显著变化。由图 2C 可知:栀子的不同提取部位均表现出对羟基自由基的不同程度的清除能力,VitC、栀子黄色素和栀子粗提物具有明显的清除羟基自由基的能力。其中,栀子黄色素和栀子粗提物对羟基自由基有明显的清除作用,VitC 的清除能力显著高于栀子各提取物。随着浓度的增加,栀子黄色素和栀子粗提物对羟基自由基的清除作用增强,在 0.090.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时呈明显的量效关系,计算得到栀子黄色素和栀子粗提物对羟基自由基的 IC_{50} 分别为 0.198、0.327 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。栀子苷和多糖部分对羟基自由基的清除能力均较弱,且随着浓度的增加也无显著变化。由图 3A 可知:栀子的不同提取部位均表现出不同程度的抗脂质过氧化的能力,在相同的 0.082.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,栀子黄色素的抗脂质过氧化能力最强,且明显高于栀子粗提物;随浓度增大,其抗脂质过氧化能力也逐渐增强。栀子苷和多糖类成分的脂质抗氧化能力最弱,明显低于栀子黄色素和栀子粗提物,浓度增大时,二者的抗脂质过氧化能力随浓度增加也无明显变化。各物质的还原能力反映了其抗氧化活性。铁氰化钾被抗氧化物质还原成亚铁氰化钾,亚铁氰化钾与三价铁离子生成的物质在 700 nm 处有最大吸收峰。吸光度越大物质的还原能力越强。从图 3B 可知:在 0.2510.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,栀子各提取部位随浓度的增大吸光度提高,其中,栀子黄色素和栀子粗提物的吸光度值随浓度的增大而明显增大,栀子黄色素尤为显著,与 VitC 的作用趋势相近。从图 3C 可知:栀子各提取部位和 VitC 在相同浓度范围内(0.082.0 $\text{mg}\cdot$

mL^{-1}) 在 695 nm 处测定总抗氧化能力, 所得吸光度随浓度增大而升高。其中, 栀子黄色素的作用趋

势比较明显。栀子苷和多糖类成分的吸光度几乎不随浓度增加而改变。

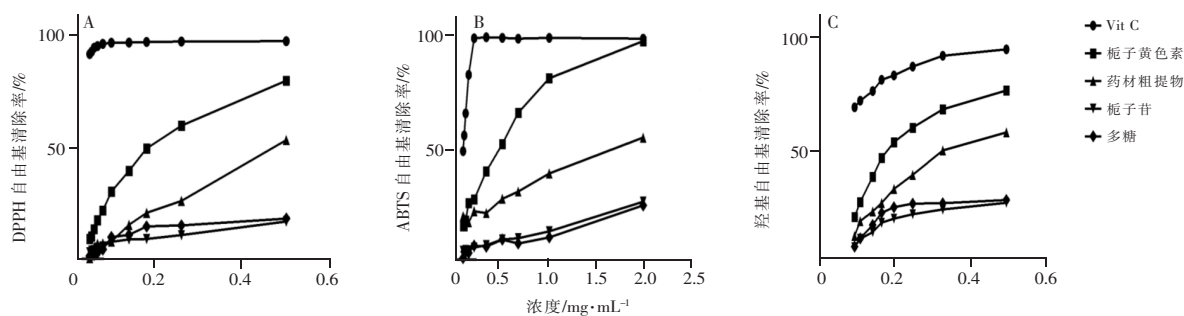


图 2 栀子苷不同部位提取物对 DPPH 自由基 (A) ABTS 自由基 (B) 和羟基自由基 (C) 的清除能力

Figure 2 DPPH radical, ABTS radical and hydroxyl radical scavenging ability of the different extracts of *G. jasminoides*

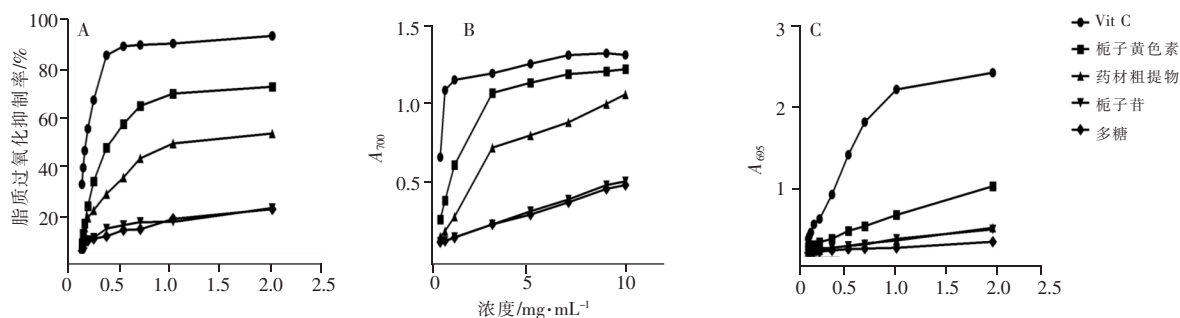


图 3 栀子苷不同部位提取物的抗脂质过氧化能力 (A)、还原能力 (B) 和总抗氧化能力 (C)

Figure 3 Inhibition of lipid peroxidation (A), reducing ability (B) and antioxidant activity (C) of the different extracts of *G. jasminoides*

2 讨论

文中对栀子各提取物的体外抗氧化能力的研究表明: 栀子各提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基及脂质过氧化抑制能力、总还原能力、总抗氧化能力均表现出一定的抗氧化能力, 且相关性基本一致。其中, 栀子黄色素对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟基自由基的 IC_{50} 分别为 0.188、0.510、0.198 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并且具有一定的脂质过氧化抑制能力、总还原能力和总抗氧化能力。在一定浓度范围内, 随着栀子黄色素浓度的增加, 其抗氧化活性增强, 因此, 栀子黄色素可以有效地清除自由基, 具有良好的抗氧化能力。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
 [2] 费曜, 段恒, 王刚, 等. 不同产地栀子种质资源和药材品质的比较[J]. 华西药学期刊, 2016, 31(1): 48-51.
 [3] 苏文钊, 陈阳, 蔡仕宁, 等. 栀子中西红花苷和 gardecin 的抗氧化活性研究[J]. 华西药学期刊, 2016, 31(1): 21-24.
 [4] 何书英, 钱之玉. 西红花苷对低密度脂蛋白所致鹅鸸内皮细胞损伤的保护作用[J]. 华西药学期刊, 2006, 21(1): 28-30.

[5] 杨瑞云, 陈全斌, 赵志明, 等. 高价栀子黄色素提取工艺及其性质研究[J]. 西北师范大学学报, 2002, 38(3): 55-57.
 [6] Xu JK, Yao XS, Hiroshi K. Oxygen radical absorbance capacity assay and its application [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22(8): 1015-1021.
 [7] 饶君凤, 王根法, 吕伟德. 浙江省西红花“二段法”优质高产栽培技术研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5214-5215.
 [8] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. Nature, 1958, 26: 1199-1200.
 [9] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Rice - Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay[J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26: 1231-1237.
 [10] Xiang Y, Xu X, Li J. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium[J]. Food Chem, 2012, 134(4): 1899-1905.
 [11] 柳全文, 徐慧, 李桂华, 等. 多管藻中新溴代酚的鉴定及其自由基清除活性[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 127-129.
 [12] Gulcin I, Sat I G, Beydemir S, et al. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.) [J]. Food Chem, 2004, 87(3): 393-400.
 [13] Sun LJ, Zhang JB, Lu XY, et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(10): 2689-2696.

收稿日期: 2016-10-08