

文章编号:1674-2869(2010)12-0001-05

中药茜草根乙酸乙酯萃取物的分离及抗氧化活性研究

杨红红^{1,2}, 符悦冠², 肖 峰¹, 熊金艳¹, 吕 中¹, 陈 嵘^{1*}

(1. 武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074;

2. 中国热带农业科学研究院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘 要:研究了中药茜草根中分离出具有较高抗氧化活性的组分. 主要采用吸附柱层析法, 经不同的洗脱体系, 从茜草根乙酸乙酯萃取物(I)中分离得到较纯组分(VAGJT); 运用硅胶薄层色谱(TLC)及高效液相色谱(HPLC)对该组分的化学成分进行分析; 并采用铁离子还原(FRAP)法, 硫代巴比妥酸(TBA)法和二苯代苦味酰基自由基(DPPH)法对 VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物(I)的抗氧化活性进行测定. 结果表明: 组分 VAGJT 的 TLC 结果显示只有一个斑点, HPLC 结果有三个强峰且保留时间相差较小; VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物(I)的抗脂质过氧化能力均高于抗坏血酸(Vc), 且 VAGJT 清除自由基能力及铁还原能力均高于茜草根乙酸乙酯萃取物(I).

关键词:茜草根; 乙酸乙酯萃取物; 分离; 洗脱体系; 抗氧化活性

中图分类号: TQ041⁺.7/.8

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2010.12.001

0 引 言

自由基及其诱导的氧化反应可损害机体的组织和细胞, 导致生物衰老和某些疾病如癌症、糖尿病、心血管疾病, 而抗氧化活性物质可以减少和清除自由基, 具有延缓人体衰老、防治疾病的作用^[1-3]. 研究发现, 中草药对人体的多种疾病具有很好的治疗、预防等药理作用及保健功能, 而其独特疗效与其抗氧化能力有密切的关系^[4-5]. 因此天然抗氧化物质的研究备受广大学者的关注^[6-7].

中药茜草为茜草科植物茜草(*Rubia Cordifolia* L.)的干燥根及茎, 又名活血草^[8]. 在我国大部分地区均有分布, 其中以陕西渭南、河北邢台、河南洛阳等产地为最佳^[9]. 茜草根长期以来作为天然染料和药用植物使用, 其生物活性主要有抗氧化、止血、抗肿瘤、抗菌、抗癌、增强免疫、护肝、抑制人体表皮细胞增殖等^[10-15]. 中药茜草根化学成分复杂, 到目前为止, 对茜草根抗氧化活性的研究多集中在总提取物, 而对于其分离纯化后较纯组分的生物活性的研究鲜有报道. 本研究选取中药茜草根乙酸乙酯萃取物为研究对象, 采用吸

附柱层析法分离, 通过改变洗脱条件, 分离得到中药茜草根乙酸乙酯萃取物中较纯的组分, 并测定其抗氧化活性, 为中药茜草根乙酸乙酯萃取物中抗氧化活性部位的进一步筛选奠定了基础.

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

中药茜草根乙酸乙酯萃取物(深褐色膏状)由香港中文大学中医学院提供; 2,4,6-(2-吡啶)-1,3,5-三 嗪 (2,4,6-tripyridyl-s-triazin, TPTZ, Fluka); 二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·, Sigma); 硫代巴比妥酸(上海纯晶); 无水乙醇(优级纯); 蛋黄卵磷脂、硫酸亚铁、氯化高铁、抗坏血酸(Vc)、醋酸钠、冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); Komarowsky 试剂(1-3 mL 50% (v/v) 硫酸液与 10 mL 2% (w/v) 对羟基苯甲醛混合); FRAP 工作液(25 mL 300 mmol/L 醋酸盐缓冲液, 2.5 mL 10 mmol/L TPTZ, 2.5 mL 20 mmol/L FeCl₃ 混合); TBA 溶液(3 g TBA, 120 g TCA 和 10.4 mL HClO₄ 溶于 800 mL 蒸馏水); 石油醚、环己烷、二

收稿日期: 2010-09-13

基金项目:农业部热带农林有害生物入侵监测与控制重点开放实验室开放课题基金专项资助项目(MACKL1006); 武汉市科技局对外科技合作与交流计划(200970634272); 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室开放研究基金(GCP200906); 武汉工程大学大学生校长基金

作者简介:杨红红(1988-), 女, 湖北宜都人, 硕士研究生. 研究方向: 天然产物化学.

指导老师:陈 嵘, 教授, 博士, 硕士研究生导师. 研究方向: 天然产物化学、功能材料化学. * 通信联系人

氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇(天津市东丽区天大化学试剂厂,分析纯);丙酮(分析纯);722E 可见分光光度计(天津市普瑞斯仪器有限公司);ZF-20D 暗箱式紫外分析仪、旋转蒸发器 RE-200A(巩义市予华仪器有限责任公司);低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);HC201 恒温槽(重庆银河试验仪器有限公司);TG16-I 台式高速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

1.2 中药茜草根乙酸乙酯萃取物 I 的分离

本实验运用吸附柱色谱,以粗孔层析硅胶(zcx-II, 75~150 μm)为吸附剂,采用干法装柱,梯度洗脱。通过薄层色谱法确定吸附柱层析的洗脱体系,分离和纯化茜草根乙酸乙酯萃取物 I,其分离流程如图 1 所示。

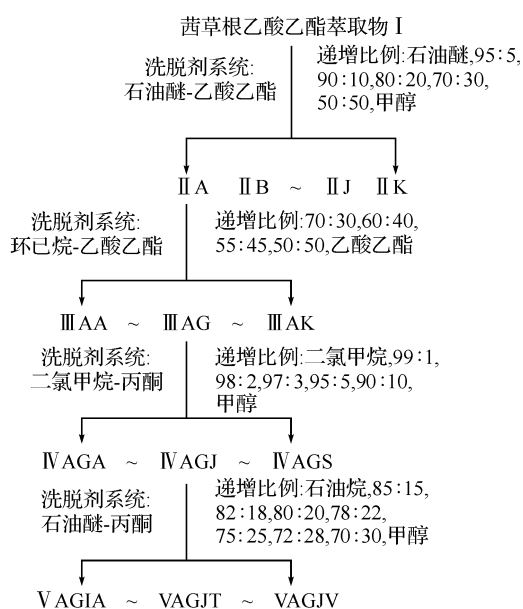


图 1 茜草根乙酸乙酯萃取物 I 分离流程图

Fig. 1 Separation flow chart of the ethyl acetate extraction of *Rubia cordifolia* L

1.3 洗脱体系的确定

根据吸附与解吸的平衡的原理,采用薄层色谱法确定吸附柱层析法的洗脱体系以达到最佳分离效果。以组分 IV AGJT 分离得到较纯组分 VAGJT 为例。组分 IV AGJT 为中药茜草根乙酸乙酯萃取物 I 经三次柱层析分离得到的组分,三次洗脱条件依次为:石油醚-乙酸乙酯配比(70:30),环己烷-乙酸乙酯配比(60:40),二氯甲烷-丙酮配比(97:3)。

1.3.1 确定最佳洗脱剂系统配比溶剂 常用有机溶剂石油醚、环己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇极性依次递增,根据较小极性溶剂与较大极性溶剂配比原则,确定九种展开剂:二氯甲烷-乙酸乙酯(95:5)、二氯甲烷-丙酮(96:4)、二氯甲烷-

甲醇(99:1)、环己烷-乙酸乙酯(60:40)、环己烷-丙酮(70:30)、环己烷-甲醇(80:20)、石油醚-乙酸乙酯(40:60)、石油醚-丙酮(50:50)、石油醚-甲醇(60:40),依次标记为 1~9。将组分 IV AGJ 点样于九块薄层色谱板,均呈带状,分别轻放入展开剂 1~9 中展开。待展开完成后将色谱板取出,晾干,在紫外灯下观察;再喷以 Komarowsky 显色剂于 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘干显色,观察分离效果。

1.3.2 确定洗脱剂系统极性递增配比 根据 1.3.1 实验结果选取石油醚-丙酮展开体系配制展开剂石油醚、石油醚-丙酮(90:10、80:20、70:30、60:40),依次标记为 10~14,点板,展开,显色,观察分离效果。将薄层层析中使第一个斑点 $R_f=0.2$ 左右时的配比极性确定为起点,使最后斑点 $R_f=0.2$ 左右时的配比极性确定为终点。再根据上述实验结果配制展开剂石油醚-丙酮(90:10、85:15、82:18、80:20、78:22、75:25、72:28、70:30),依次标记为 15~22,点板,展开,显色,观察分离效果。

1.4 抗氧化活性测定

1.4.1 样品溶液的制备 将茜草根乙酸乙酯萃取物 I 及组分 VAGJT 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,用无水乙醇配制 5 mg/mL 的溶液备用。

1.4.2 总抗氧化活性的测定 采用铁还原/抗氧化能力(Ferric reducing/antioxidant power, FRAP)分析法评估样品的总抗氧化活性。其基本原理是:在较低 pH 环境下,抗氧化物质将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与三吡啶三吡嗪(2,4,6-tripyridyl-s-trizi, TPTZ)结合生成的蓝色络合物于 593 nm 处有最大光吸收。反应体系包括 3 mL FRAP 工作液,100 μL 样品溶液,混匀反应 5 min,于 593 nm 处测定吸光度,以 FRAP 工作液调零。平行测定两次,取平均值。绘制 FeSO_4 标准曲线,由样品吸光值确定其相应的 FeSO_4 的浓度($\mu\text{mol/L}$),即为 FRAP 值。FRAP 值越大,表明被抗氧化物质还原得到的 Fe^{2+} 越多,即抗氧化活性越强^[16]。

1.4.3 抗脂质过氧化活性的测定 采用硫代巴比妥酸(2-Thiobarbituric Acid, TBA)法测定样品抗脂质过氧化活性,由于 Fe^{2+} /抗坏血酸诱导的脂质过氧化产物丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)反应生成一种粉红色化合物,并于 532 nm 处有最大光吸收。反应体系包括 20 μL FeSO_4 (0.075 mol/L)、20 μL 抗坏血酸溶液(0.1 mol/L)、50 μL 蛋黄卵磷脂溶液(0.03 g/mL)、不同体积样品溶液,用磷酸缓冲溶液(pH=7.4)定容至 4 mL,充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

中 1 h, 分别加入 0.2 mL EDTA (0.1 mol/L) 和 1.5 mL TBA 溶液, 充分混匀, 沸水浴 15 min 后取出迅速冷却, 3 000 r/min 离心 10 min, 于 532 nm 处测定其吸光度, 以 PBS 溶液作空白试剂。平行测定三次, 取平均值。根据吸光值按公式(1)计算抑制率(%). 再由样品的不同浓度和其对应的抑制率计算其 50% 抑制浓度, 即 IC_{50} 值。 IC_{50} 值越低, 其抗脂质过氧化活性越强。

$$\text{抑制率}(\%) = (A_c - A_i) / A_c \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_c 为未加入样品溶液反应体系的吸光度;

A_i 为不同浓度样品溶液反应体系的吸光度。

1.4.4 清除自由基能力的测定 DPPH· (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 是一种稳定的自由基, 在 517 nm 处有强吸收。当有自由基消除剂存在时, DPPH· 的单电子被配对而使颜色变浅, 在最大吸收波长处的吸光度变小, 而且这种颜色变浅的程度与配对电子数成化学计量关系。反应体系包括 400 μ L 0.4 mg/mL DPPH 溶液, 不同体积样品溶液, 用无水乙醇定容至 4 mL。混合均匀, 黑暗下室温避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定其吸光度, 以无水乙醇溶液作空白试剂。平行测定三次, 取平均值。由(1)式计算抑制率(%), 再计算 IC_{50} 值, IC_{50} 值越低, 其清除自由基能力越强。

2 结果与讨论

2.1 薄层色谱分析洗脱体系的选择

在柱层析分离过程中洗脱体系的选择直接影响样品分离的效率。用硅胶薄层色谱分析可直接判断洗脱体系的选择是否合适。本文以组分 IV AGJ 为例, 其柱层析分离的洗脱体系选择实验结果如图 2 所示:

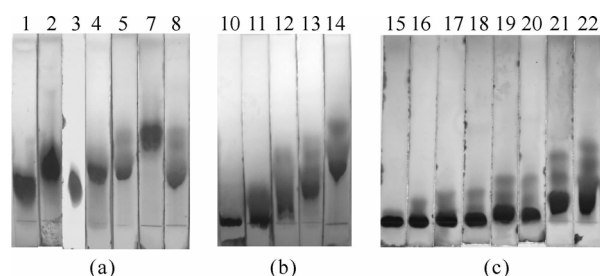


图 2 确定洗脱系统的 TLC 显色图谱。(a) 确定最佳洗脱系统配比溶剂; (b) 确定洗脱系统极性起点与终点; (c) 确定洗脱系统极性递增比例

Fig. 2 TLC photographs to determine the wash-solvent system; (a) determination of the optimal solvent volume ratio; (b) determination of the jumping-off point and end-point of polarity; (c) determination of the polarity increment of the wash-solvent system

2.1.1 最佳洗脱系统配比溶剂的选择 在最佳洗脱系统配比溶剂确定实验中, 依次配比了九组展开剂, 观察发现 6 号和 9 号展开剂不互溶, 不适合作为洗脱系统。如图 2(a) 所示, 1、2、3、4 和 7 号均只能看到混杂的红色斑点, 而 5 号和 8 号可以明显观察到蓝色及红色斑点分离, 可知含有丙酮溶剂的展开剂分离效果较好。5 号与 8 号相比较, 8 号蓝色斑点段可以观察到两个分离的斑点。结果表明: 8 号展开剂为组分 IV AGJ 柱层析洗脱的最佳洗脱系统, 即石油醚-丙酮展开体系。

2.1.2 洗脱系统溶剂递增比例的确定 由图 2(b) 中 10~14 号显色结果可确定组分 IV AGJ 洗脱剂的极性起点为石油醚-丙酮(90:10), 终点为石油醚-丙酮(70:30)。在此基础上进一步改变展开剂配比。根据图 2(c) 显色结果确定其柱层析洗脱剂极性递增比例为: 石油醚、石油醚-丙酮(85:15、82:18、80:20、78:22、75:25、72:28、70:30)、甲醇, 且其显色结果表明该洗脱体系能较好分离组分 V AGJT。采用同样的方法确定了前三次柱层析分离的洗脱体系, 依次为: 石油醚、石油醚-乙酸乙酯(95:5、90:10、80:20、70:30、50:50)、甲醇; 环己烷-乙酸乙酯(70:30、60:40、55:45、50:50)、乙酸乙酯; 二氯甲烷、二氯甲烷-丙酮(99:1、98:2、97:3、95:5、90:10)、甲醇。

2.2 VAGJT 成分分析

取组分 VAGJT 点样于硅胶薄层色谱板 (UV₂₅₄), 以环己烷-丙酮(70:30)为展开剂, 展开, 晾干, 显色。高效液相色谱用十八烷基键合硅胶为填充剂; 以水-乙腈为流动相梯度洗脱; 流速 1 mL/min, 0-40-60 min, 乙腈比例 0-100%-100%; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm。结果如图 3 所示。TLC 显色结果为一樱红色斑点。HPLC 图谱显示有三个强信号峰, 即该样品有三种主要成分, 且其保留时间相差小, 说明组分 VAGJT 不是单一成分。

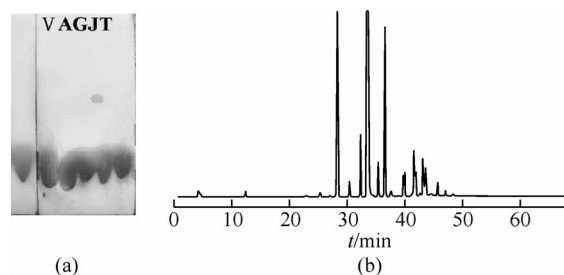


图 3 VAGJT 样品薄层色谱(a)及高效液相(b)图谱

Fig. 3 The TLC and HPLC of VAGJT

2.3 抗氧化活性

2.3.1 总抗氧化活性 首先测定 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 标准曲线, 其结果如图 4 所示。回归线性方

程为: $Y = 0.019X + 0.073$, $R = 0.997\ 0$, $SD = 0.019\ 89$, $P < 0.001$.

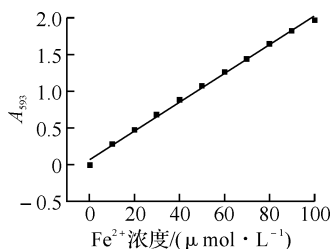


图 4 Fe^{2+} 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of Fe^{2+}

由标准曲线得到与样品相对应的 FRAP 值 ($\mu\text{molFe}^{2+}/\text{L}$), FRAP 值越大, 表明其总抗氧化能力越强. 组分 VAGJT、茜草根乙酸乙酯萃取物 I 及阳性对照 Vc 的 A_{593} 分别为 1.019, 0.628, 1.937, 则对应的 FRAP 值 Fe^{2+} 浓度分别为 $49.79\ \mu\text{mol}/\text{L}$, $29.21\ \mu\text{mol}/\text{L}$, $98.11\ \mu\text{mol}/\text{L}$. 结果表明组分 VAGJT 的总抗氧化能力优于茜草根乙酸乙酯萃取物 I.

2.3.2 抗脂质过氧化活性 TBA 法测定组分 VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物 I 抗脂质过氧化活性结果见表 1.

表 1 TBA 法测定组分 VAGJT 及 I 抗脂质过氧化活性(抑制率/%)

Table 1 Inhibition rate of VAGJT and I by TBA assay

| 浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | VAGJT | I | Vc |
|---|------------------|------------------|------------------|
| 1.56 | 6.71 ± 2.89 | 28.02 ± 3.32 | 7.78 ± 3.15 |
| 3.13 | 16.06 ± 1.74 | 43.02 ± 2.96 | 14.99 ± 0.24 |
| 6.25 | 34.35 ± 1.21 | 56.39 ± 2.21 | 19.84 ± 2.21 |
| 12.5 | 58.86 ± 2.47 | 61.86 ± 2.83 | 25.67 ± 2.43 |
| 25 | 75.41 ± 0.81 | 69.77 ± 0.66 | 40.94 ± 2.36 |
| IC_{50} | 10.34 ± 0.78 | 5.58 ± 0.94 | 46.02 ± 1.38 |

根据结果可知组分 VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物 I 抗脂质过氧化的 IC_{50} 值均小于 Vc, 表明组分 VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物 I 的抗脂质过氧化活性均强于 Vc.

2.3.3 清除自由基能力 用 DPPH 法测定组分 VAGJT 及茜草根乙酸乙酯萃取物 I 清除自由基能力结果见表 2.

结果显示组分 VAGJT 的 IC_{50} 值低于茜草根乙酸乙酯萃取物 I 且均大于 Vc, 说明组分 VAGJT 清除自由基能力优于茜草根乙酸乙酯萃取物 I, 且均不及 Vc.

表 2 DPPH 法测定组分 VAGJT 及 I 清除自由基能力(抑制率/%)

Table 2 Inhibition rate of VAGJT and I by DPPH assay

| 浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | VAGJT | I | Vc |
|---|------------------|------------------|------------------|
| 1.56 | 11.67 ± 4.05 | 3.91 ± 0.16 | 34.37 ± 1.53 |
| 3.13 | 24.43 ± 2.81 | 10.67 ± 0.76 | 72.97 ± 0.62 |
| 6.25 | 41.44 ± 2.91 | 21.74 ± 1.09 | 94.28 ± 0.12 |
| 12.5 | 58.30 ± 2.06 | 43.64 ± 0.89 | 95.99 ± 0.10 |
| 25 | 69.42 ± 1.72 | 69.49 ± 0.33 | 96.33 ± 0.07 |
| IC_{50} | 9.85 ± 1.15 | 14.55 ± 0.37 | 1.66 ± 0.06 |

综上可知, 经四次柱层析分离得到的组分 VAGJT 可能含有三种主要成分, 其抗氧化活性较优于茜草根乙酸乙酯总提取物, 可能为其活性抗氧化成分, 这一研究结果可为后续抗氧化成分的分离提供有力的实验数据.

3 结 语

中药茜草根乙酸乙酯萃取物具有较好的抗氧化活性, 其抗脂质过氧化活性尤为突出; 从茜草根萃取物中分离得到的组分 VAGJT 也具有较弱的抗氧化能力, 尤其在铁还原能力及清除自由基能力方面活性较优, 但其抗脂质过氧化能力不及总提取物. 这一结果表明可根据此活性追踪进一步研究中药茜草根萃取物中最优抗氧化活性的成分.

参考文献:

- [1] 成喜雨, 崔馨, 刘春朝, 等. 中草药抗氧化活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 514-518.
- [2] 陈会良, 顾有方, 王月雷. 中草药化学成分与抗氧化活性的研究进展[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(1): 63-64.
- [3] 杨利军, 田迪英. 11 种中草药抗氧化活性与黄酮含量相关性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 119-123.
- [4] 李磊, 王岳飞, 梁燕, 等. 天然抗氧化物质的保健功能及抗氧化活性研究进展[J]. 茶叶, 2008, 34(2): 70-74.
- [5] Mosammat N K, Tomoko Y, Sachiko H, et al. Radical-scavenging activities of fish and fishery products[J]. Food Sci Technol Res, 1999, 5(2): 193-199.
- [6] 李胜元, 谷向春. 抗坏血酸对玫瑰香干白葡萄酒的抗氧化作用[J]. 酿酒科技, 2006, 6: 65-66.

- [7] Halliwell B, Gutteridge J M, Cross C E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now[J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(6): 598 - 620.
- [8] 药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [9] 方晓艳, 孙艳红, 杨林莎. 茜草的研究进展[J]. 河南中医药学刊, 2002, 17(5): 78 - 80.
- [10] 苏秀玲, 周运鹏. 茜草的药理作用及研究与应用[J]. 中医药研究, 1991, 3: 54 - 56.
- [11] 赵协慧, 袁明, 马玉花. 藏药茜草胶囊镇痛抗炎药效学研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 381 - 382.
- [12] 王作信, 梁剑平, 王学红, 等. 茜草提取物对奶牛乳房炎主要病原菌的抑菌试验[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 597 - 598.
- [13] 谢红, 张涛. 茜草的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26: 134 - 135.
- [14] Tse W P, Cheng C H K, Che C T, et al. Induction of apoptosis underlies the Radix Rubiae-mediated anti-proliferative action on human epidermal keratinocytes: Implications for psoriasis treatment[J]. Inter J Mol Med, 2007, 20(5): 663 - 672.
- [15] 张振涛, 吴泉, 吴仁奇, 等. 茜草多糖的抗氧化作用[J]. 内蒙古医学院学报, 1998, 20(1): 31 - 33.
- [16] Jelena K, Silvana P, Marjan N. Antioxidant Activity of Four Endemic Stachys Taxa[J]. Bio Pharm Bull, 2006, 29(4): 725 - 729.

Separation and antioxidant activities of ethyl acetate extraction from *Rubia Cordifolia L*

YANG Hong-hong^{1,2}, FU Yue-guan², XIAO Feng¹, XIONG Jin-yan¹, LU Zhong¹, CHEN Rong^{1*}

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education,

Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: The purpose of this project is the separation of components with high antioxidant activity from *Rubia cordifolia L*. A component (VAGJT) was separated from the ethyl acetate extraction of *Rubia cordifolia L*. by absorption column chromatography with different wash-solvent systems. The chemical composition and contents of VAGJT were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity of VAGJT and the ethyl acetate extraction of *Rubia cordifolia L*. (I) were also evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), 2-thiobarbituric acid (TBA) and 1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assays. Only one spot was presented in TLC analysis of VAGJT, and three strong peaks were displayed in HPLC. The results showed that the anti-lipid peroxidation activity of VAGJT and the ethyl acetate extraction of *Rubia cordifolia L*. (I) were higher than that of ascorbic acid (Vc), and the anti-free radi