

藤梨根甲醇提取物的抗氧化活性及物质基础初步研究

滕 坤¹, 张海丰¹, 臧 皓², 沈 鹏², 孙佳明^{3*}

1. 宁波卫生职业技术学院医学技术学院, 浙江 宁波 315100

2. 通化师范学院医药学院, 吉林 通化 134002

3. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117

摘要: 目的 研究藤梨根甲醇提取物的抗氧化活性, 并初步分析其活性化学成分。方法 以清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2,2-联氮-二-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 自由基能力为指标, 测定藤梨根甲醇提取物的体外抗氧化活性; 采用高效液相色谱-质谱联用技术对藤梨根甲醇提取物化学成分进行分析。结果 藤梨根甲醇提取物对 DPPH、ABTS 自由基具有良好的清除作用, 半数有效浓度 (EC₅₀) 分别为 (26.275±1.464) mg/mL 和 (29.826±1.309) mg/mL; 通过紫外光谱和质谱分析, 初步鉴定了 19 个化学成分。结论 藤梨根甲醇提取物具有很好的体外抗氧化活性, 其主要活性成分为多羟基和不饱和双键的成分。

关键词: 藤梨根; 抗氧化; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼; 2,2-联氮-二-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4384-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.018

Antioxidant activities *in vitro* and components analysis of methanol extract of *Actinidia arguta* by HPLC-DAD-ESI-MS/MS

TENG Kun¹, ZHANG Hai-feng¹, ZANG Hao², SHEN Peng², SUN Jia-ming³

1. College of Medical Technology, Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, China

2. College of Pharmaceutical, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China

3. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To investigate and analyze antioxidant activities *in vitro* and the active ingredients of the methanol extract of *Actinidia arguta*. **Methods** In this study, antioxidant activities of extract of *A. arguta* were carried out by using DPPH and ABTS radical scavenging assays *in vitro*. Qualitative analysis of major active components was performed by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Results** Extract of *A. arguta* had good scavenging effect on DPPH and ABTS free radical *in vitro*, and the EC₅₀ values of scavenging effect of extract of *A. arguta* on DPPH and ABTS free radical were (26.275±1.464) and (29.826±1.309) mg/mL, respectively. On the basis of UV and mass spectral analysis, a total of 19 chemical compositions were preliminarily identified. **Conclusion** extract of *A. arguta* has good antioxidant activity *in vitro*, and polyhydroxyl and unsaturated double bonds are the main active constituents.

Key words: *Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.; antioxidant; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; DPPH; ABTS

癌症、衰老或其他疾病大都与过量自由基的产生有密切关联, 开发具有抗氧化活性的药物可以有效克服其所带来的危害^[1-2]。目前, 部分癌症的治疗药物以及抗衰老的研究已经取得了一定的进展, 但疗效存在局限且在很大程度上毒副作用不可忽视。因此, 近年来从中药中寻找治疗癌症和延缓衰

老的药物研究比较活跃, 而兼具抗肿瘤、抗氧化功效的药物是研发的热点。

研究表明, 藤梨根甲醇提取物具有一定的抗肿瘤作用^[3-5], 但未见对藤梨根甲醇提取物的抗氧化活性及其活性成分进行深入分析的研究。为进一步研究藤梨根甲醇提取物的体外抗氧化活性的物质基础, 本研

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100254); 吉林省教育厅项目: 基于细胞药代动力学的藤梨根抗肿瘤黄酮类成分研究 (吉教科合字 [2015] 第 439 号)

作者简介: 张海丰 (1976—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为药物代谢与新药基础研究。E-mail: dragon1976999@163.com

*通信作者 孙佳明 (1976—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础方面的研究。E-mail: sun_jiaming2000@163.com

究以清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2-联氮-二-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐 (ABTS) 自由基能力为指标, 研究其体外抗氧化活性, 应用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 分析藤梨根甲醇提取物成分, 初步明确藤梨根甲醇提取物的体外抗氧化的有效成分, 为其进一步研究与开发提供参考。

1 材料

1.1 试药

藤梨根采自通化市周边, 经通化师范学院滕坤教授鉴定为猕猴桃科软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq. 的干燥根, 样品洗净, 水分沥干, 置于干燥箱中, 40 °C 干燥至恒定质量, 制成粗粉, 过 20 目筛, 备用; DPPH、ABTS 和维生素 C (VC), Sigma 公司生产, 购于南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器

液质联用仪 [Agilent 1100 series LC-MSD, 包括 Agilent SL 型多级离子阱质谱仪、低压四元梯度泵、二极管阵列检测器 (DAD)、自动进样系统、柱温箱、Chemstation 化学工作站等]; GL-20G-H 低温超速离心机、BP211D 十万分之一电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司); 酶标仪 (Bio-Rad 公司); 752N 紫外可见分光光度计、XW-80A 型漩涡振荡仪 (上海精密科学仪器有限公司); 旋转式恒温振荡器 (苏州培英实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 藤梨根甲醇提取物的制备

取藤梨根干燥粉末 20 g, 置于圆底烧瓶中, 加入甲醇超声提取 2 次, 每次 30 min, 料液比 1:20。滤过, 合并提取液, 减压浓缩, 回收甲醇, 干燥, 得到藤梨根甲醇提取物 2.012 g (提取率 9.98%), 备用。

2.2 藤梨根甲醇提取物体外抗氧化活性评价

2.2.1 DPPH 自由基清除实验 参考文献方法^[6-8]对 DPPH 法进行适当的微调, DPPH 用 75%乙醇配制成 100 μmol/L 溶液。用 75%乙醇稀释藤梨根甲醇提取物, 配制成不同质量浓度的样品溶液, 依次在 10 mL 具塞比色管中加入 2 mL 样品溶液和 2 mL DPPH 溶液, 充分混匀, 室温环境避光放置 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值。对照组以 2 mL 75%乙醇代替 DPPH 溶液, 与 2 mL 样品液混合均匀, 在 517 nm 波长处测定 *A* 值, 记为 *A*₁。空白组则以 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 75%乙醇混合后在 517 nm 波长处测定 *A* 值, 记为 *A*₀。采用

VC 作为阳性对照药。计算药物对 DPPH 自由基的清除率。重复实验 3 次。

$$\text{DPPH 清除率} = 1 - (A - A_1) / A_0$$

2.2.2 ABTS 自由基阳离子清除实验 参考文献方法^[9-11], 在 96 孔板中分别加入不同质量浓度的 DMSO 溶解的藤梨根甲醇提取物溶液 5 μL, 然后依次加入 45 μL 无水乙醇和 150 μL 的 ABTS 工作液, 振摇 6 s, 混匀, 在 30 °C 下反应 6 min, 734 nm 处测定样品 *A* 值 (*A*_i), 再以无水乙醇代替样品, 测得空白 *A* 值 (*A*₀), 以无水乙醇代替 ABTS, 测得样品的本底 *A* 值 (*A*_j), 每个样品 5 个复孔, 重复测定 3 次, 取平均值, 以 VC 作为阳性对照药物, 计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 清除率} = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0$$

2.3 藤梨根甲醇提取物化学成分分析^[12-15]

2.3.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) - 0.1%甲酸水溶液 (B), 二元线性梯度洗脱: 0~15 min, 10%~12% A; 15~20 min, 12%~20% A; 20~50 min, 20% A; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正离子检测; 扫描范围 *m/z* 50~1 400; 目标相对分子质量 400; 干燥气温度 350 °C; 干燥气体积流量 9.0 L/min; 雾化气压强 0.24 MPa (35.0 psi); 毛细管电压 4 kV。

2.3.3 样品测定 取藤梨根甲醇提取物样品 1.0 mg 溶解于 1.0 mL 甲醇, 过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC-ESI-MS/MS 分析。

2.4 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 数理统计软件进行单因素方差分析及组间两两比较分析。

3 结果

3.1 藤梨根甲醇提取物体外抗氧化活性

3.1.1 DPPH 清除作用 由图 1 可知, 藤梨根甲醇提取物和 VC 清除 DPPH 自由基能力与二者的质量浓度呈现一定的量效关系, 与相同质量浓度的 VC 相比较, 藤梨根甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力略弱。在二者质量浓度达到 30 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基的清除率均基本达到最大值, 即使质量浓度继续增加时, 清除率没有显著变化。VC 和藤梨根甲醇提取物清除 DPPH 自由基的半数有效浓度 (EC₅₀) 值分别为 (19.812±1.038) mg/mL 和 (26.275±1.464) mg/mL。

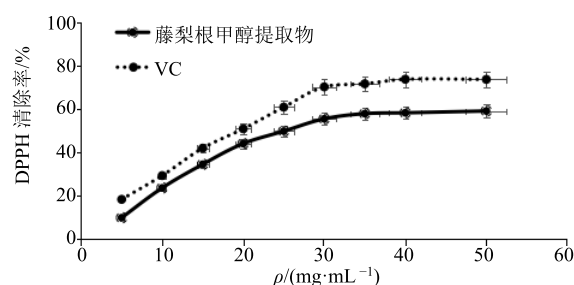


图 1 藤梨根甲醇提取物体外对 DPPH 的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 DPPH radical scavenging activity of methanol extract of *A. arguta* in vitro ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.2 ABTS 清除作用 由图 2 可知, 在质量浓度达到 30 mg/mL 时, 藤梨根甲醇提取物对 ABTS 自由基的清除能力达到最大值, 即使质量浓度增加, 其清除率没有显著变化。与相同质量浓度的阳性对照 VC 相比, 藤梨根甲醇提取物对 ABTS 的清除率略低, 与藤梨根甲醇提取物对 DPPH 的清除率结果相类似。VC 和藤梨根甲醇提取物清除 ABTS 自由基的 EC_{50} 值分别为 (24.313 ± 1.174) mg/mL 和

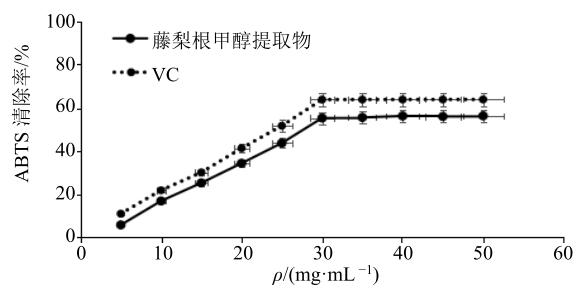


图 2 藤梨根甲醇提取物体外对 ABTS 的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 ABTS radical scavenging activity of methanol extract of *A. arguta* in vitro ($\bar{x} \pm s, n=3$)

(29.826 ± 1.309) mg/mL。

3.2 藤梨根甲醇提取物化学成分分析结果

藤梨根甲醇提取物经 HPLC-ESI-MS/MS 分析, 得到液相色谱图 (图 3) 与质谱总离子流图 (图 4)。经过 HPLC-ESI-MS/MS 分析, 共检测到 27 个色谱峰, 根据色谱峰的保留时间、最大吸收波长、一级质谱和二级质谱数据与参考文献数据^[16-20]对照, 初步确定了藤梨根甲醇提取物中的 19 个成分, 结果见表 1。

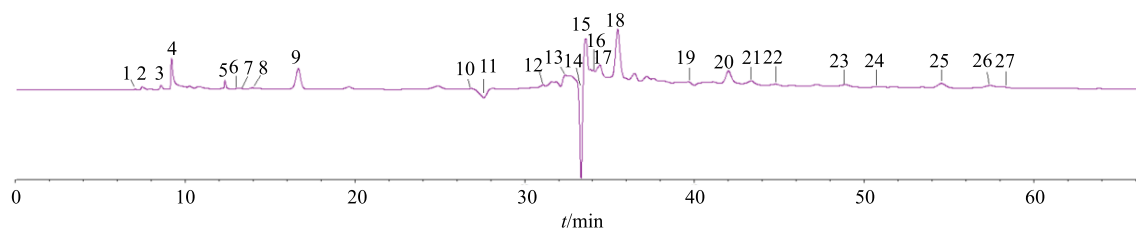


图 3 藤梨根甲醇提取物化学成分的液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of compounds of methanol extract of *A. arguta*

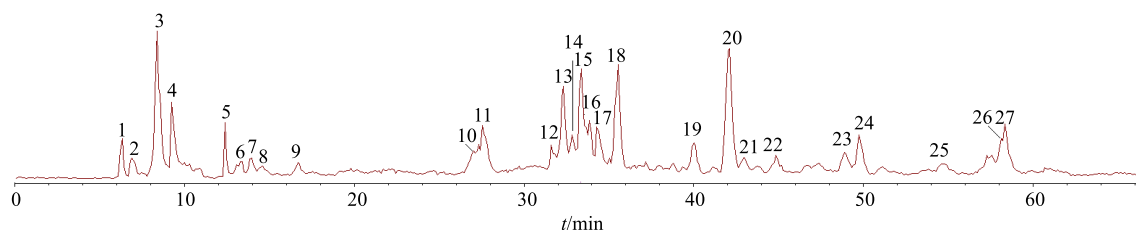


图 4 藤梨根甲醇提取物化学成分的正离子模式下的总离子流图

Fig. 4 TIC chromatogram of compounds in methanol extract of *A. arguta* in positive ion mode

4 讨论

在体外的抗氧化实验中, 藤梨根甲醇提取物表现出了良好的清除 DPPH、ABTS 自由基的作用, EC_{50} 值与 VC 阳性对照比较接近; 体外的实验结果说明藤梨根甲醇提取物可明显抑制氧化应激而具有抗氧化作用, 且有一定的量效关系。

经过对藤梨根甲醇提取物的液质联用分析研究, 从藤梨根甲醇提取物中共分析了 27 个化合物, 鉴定出 19 个化学成分, 其中峰面积较大的成分为猕猴桃酚 B、麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、儿茶素和 2 α ,3 β ,23-三羟基-12 α -氯代-齐墩果酸-13 β ,28-内酯, 上述主要化合物在一些有关藤梨根的文献中有过报

表 1 藤梨根甲醇提取物化学成分 HPLC-DAD-ESI-MS² 分析结果Table 1 HPLC-DAD-ESI-MS² data of compounds of methanol extract of *A. arguta* in positive ion mode

峰号	<i>t_R</i> /min	$\lambda_{\max}$ /nm	准分子离子峰		二级质谱碎片信息 (<i>m/z</i>)	化合物鉴定
			[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺		
1	7.0	275	279		205, 149, 107	猕猴桃酚 A ^[21]
2	7.4	262	175		157	γ -奎尼酸内酯 ^[22]
3	8.3	—		365	203, 185	蔗糖 ^[23]
4	9.2	280	293		275, 257	猕猴桃酚 B ^[21]
5	12.3	232, 275	399		381	未知物
6	12.9	232, 280		325	293, 185	异它乔糖苷 ^[24]
7	13.2	220, 282		325	293, 251, 185	2-甲氧基对苯二酚-4- β -D-吡喃葡萄糖苷 ^[24]
8	13.8	222	471		457, 339, 317	2 α ,3 β -二羟基乌苏烷-12-烯-28,30-内酯 ^[24]
9	16.6	254, 290	353		329	未知物
10	26.9	—		259	219, 185, 165	正丁基果糖苷 ^[23]
11	27.2	285, 334	363		273, 201	未知物
12	31.5	280, 312	381		219	5-羟基-6-甲氧基-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖氧基香豆素 ^[24]
13	32.2	280	257		239, 221, 183, 165, 133	棕榈酸 ^[24]
14	33.0	280, 320		291	273, 261, 165, 139	芒柄花素 ^[25]
15	33.6	—	393		231	麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 ^[26]
16	33.8	280		331	313, 287, 255, 189, 151	松脂醇 ^[27]
17	34.3	280		331	313, 287, 255, 189, 151	表松脂醇 ^[27]
18	35.4	232, 280	291		273, 139, 123	儿茶素 ^[21]
19	39.6	280		435	357, 231	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 ^[24]
20	41.9	280		545	515, 407, 383, 309	2 α ,3 β ,23-三羟基-12 α -氯代-齐墩果酸-13 β ,28-内酯 ^[28]
21	43.3	280	361		343, 285, 189	未知物
22	44.8	282	219		189	未知物
23	48.8	282	401		353, 203	未知物
24	50.7	235, 280	339		321, 275, 227, 209	5-对香豆酰奎宁酸 ^[29]
25	54.5	250		391	359	二十四烷酸 ^[25]
26	58.3	228, 280	395		367, 335, 273	未知物
27	59.2	280	397		379, 331	未知物

道。Jang 等^[30]从藤梨根的醋酸乙酯提取物中分离得到儿茶素,并在体外评价其对晚期糖基化终末产物形成的抑制活性。任晓婷等^[31]对 10 个不同品种猕猴桃果实的总酚含量和清除自由基能力进行了比较,发现猕猴桃果实的抗氧化活性与酚类化合物密切相关。这些鉴定出来的主要化合物虽然不属于同一骨架,但基本都是萜烯类和其他多酚类化合物,其化学结构中均具有多羟基或不饱和双键。Wang 等^[32]发现多羟基苯丙醇苷的抗氧化作用与羟基的数量和位置及其共轭作用有关。何良波等^[33]发现,6-*O*-酰基阿魏酸、 β -D-葡萄糖、酚羟基较多的苯乙醇苷类化合物阿魏酸具有更好的抗氧化活性,而其他 3 种苯丙醇苷类化合物的抗氧化活性则相对较好。在化合物的结构特征中,由于存在不饱和双键和双键或孤对电子组成的共轭体系,这些化合物在

抗氧化活性方面更加有效。

国内外抗衰老中药的研究发现,通过多目标消除自由基、抗脂质过氧化等途径,具有多羟基或不饱和双键的成分可用于抗衰老治疗^[34]。本研究结果表明,藤梨根甲醇提取物中含有多羟基和不饱和双键的化学成分是其体外抗氧化活性的物质基础,但其体内抗氧化机制及相关化合物的活性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Mzid M, Ben K S, Ben S M, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens* [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 775-781.
- [2] Pliszka B, Huszcza-Ciolkowska G, Wierzbicka E. Effects of solvents and extraction methods on the content and antiradical activity of polyphenols from fruits *Actinidia arguta*, *Crataegus monogyna*, *Gaultheria procumbens* and *Schisandra chinensis* [J]. *Acta Scient Polon Technol*

- Alim, 2016, 15(1): 57-63.
- [3] 王 岚, 康 琛, 杨伟鹏, 等. 藤梨根甲醇提取物和总黄酮苷抗肿瘤作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2184-2186.
- [4] 国宏莉, 姚俊霞, 张 丽, 等. 藤梨根甲醇提取物在人食管癌细胞生长中的作用 [J]. 中药材, 2008, 31(7): 1030-1032.
- [5] Lee A Y, Kang M J, Choe E, *et al.* Hypoglycemic and antioxidant effects of Daraesoon (*Actinidia arguta* shoot) in animal models of diabetes mellitus [J]. *Nutr Res Pract*, 2015, 9(3): 262-267.
- [6] Ye R, Fan Y H, Ma C M. Identification and enrichment of α -glucosidase-inhibiting dihydrostilbene and flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(2): 510-515.
- [7] Liang Y, Ding Y, Zhang L J, *et al.* Antioxidant activities of nine selected culinary spices from China [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2015, 22(1): 50-57.
- [8] Zhang S L, Deng P, Xu Y C, *et al.* Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors [J]. *J Integr Agric*, 2016, 15(9): 2175-2181.
- [9] Odonbayar B, Murata T, Batkhui J, *et al.* Antioxidant flavonols and phenolic compounds from *Atraphaxis frutescens* and their inhibitory activities against insect phenoloxidase and mushroom tyrosinase [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(12): 3065-3071.
- [10] Thozama K M. Phytochemical and antioxidant composition of selected local wild plants in south Africa: Consideration of alternative nutrients for health promotion [A] // 5th International Conference on Biomedical Engineering and Technology [C]. Singapore: IACSIT Press, 2015.
- [11] 胡绪乔, 原 菲, 严春艳. 银杏多糖的分离鉴定和体外抗氧化活性测试 [J]. 中药材, 2011, 34(12): 1950-1953.
- [12] 周 燕, 王明奎, 廖 循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析 [J]. 分析化学, 2004, 32(2): 1741-178.
- [13] 孙佳明, 宗 颖, 雷岱虹, 等. 甘草乙醇萃取物的体外抑制 α -葡萄糖苷酶、抗氧化活性及HPLC-MS 分析 [J]. 中成药, 2013, 35(9): 1943-1946.
- [14] 张 娟, 刘 芬, 李 宁, 等. UPLC-TOF-MS 法鉴定胀果甘草药渣中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 558-561.
- [15] 黄晶晶, 李 倩, 高小康, 等. 高效液相色谱-电喷雾-飞行时间串联质谱分析泽兰水提取物 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2218-2222.
- [16] 赫 军, 马秉智, 赵 铁, 等. 藤梨根的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(3): 184-186.
- [17] 何国浓, 胡秀敏, 王 辉, 等. 藤梨根化学成分的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 498-500.
- [18] 何国浓, 王邦才, 王 辉, 等. 藤梨根化学成分的研究 II [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2353-2355.
- [19] 赫 军, 马秉智, 王晓雪, 等. 藤梨根的化学成分研究 (II) [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(22): 1960-1963.
- [20] 赫 军, 李 栋, 马秉智, 等. 藤梨根化学成分和抗肿瘤药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 213-218.
- [21] Chang J, Case R. Cytotoxic phenolic constituents from the root of *Actinidia chinensis* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(10): 955-959.
- [22] 陈晓晓, 杨尚军, 白少岩. 中华猕猴桃根化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 841-843.
- [23] 陈晓晓, 杨尚军, 白少岩. 中华猕猴桃根化学成分的研究 [J]. 食品与药品, 2011, 13(5): 180-183.
- [24] 周雪峰. 冷水七、中华猕猴桃根的物质基础研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [25] 陈晓晓. 中华猕猴桃根化学成分研究 [D]. 济南: 山东省医学科学院药物研究所, 2011.
- [26] 崔 莹, 张雪梅, 陈纪军, 等. 中华猕猴桃根的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1663-1665.
- [27] Joon I W, Hyung I M, Ok P Z. Phytochemical constituents of *Actinidia arguta* [J]. *Korean J Pharmacogn*, 2000, 31(3): 357-363.
- [28] 徐一新. 中药藤梨根和猫人参活性成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [29] 宋 洋, 冯雪松. 无梗五加根化学成分成分的UPLC-MS/MS 分析及与细柱五加、刺五加的比较 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 958-965.
- [30] Jang D S, Lee G Y, Lee Y M, *et al.* Flavan-3-ols having a gamma-lactam from the roots of *Actinidia arguta* inhibit the formation of advanced glycation end products *in vitro* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(4): 397-400.
- [31] 任晓婷, 张生万, 李美萍, 等. 不同品种猕猴桃总酚含量与清除自由基能力相关性研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2016, 36(5): 341-344.
- [32] Wang P, Zheng R, Gao J. Reaction of hydroxyl radical with phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species: A pulse radiolysis study [J]. *Sci China C Life Sci*, 1996, 39(2): 154-158.
- [33] 何良波, 孙凤娟, 姜丽娜, 等. 4 种单糖苯丙素苷类化合物的体外抗氧化作用及抑菌活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 615-616.
- [34] 蒋晓文, 白俊鹏, 田 星, 等. 牛蒡根中黄酮苷类化学成分及其抗氧化活性构效关系的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 726-731.