

## 蜘蛛香药材提取物抗氧化活性的研究

王菲菲<sup>1</sup>, 吴寿海<sup>2</sup>, 张聿梅<sup>1\*</sup>, 马双成<sup>1\*</sup>, 戴忠<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

**摘要:** 对蜘蛛香药材抗氧化活性进行研究, 分析主要化学成分抗氧化活性与结构的相互关系。采用 2,2-二苯基-1-苦肟基 (DPPH<sup>•</sup>) 自由基清除能力测定实验, 对蜘蛛香药材 0~100% 甲醇水提取溶液的抗氧化活性进行分析, 并采用极性和非极性液相色谱分离条件对提取溶液中的主要化学成分进行分析并测定相应自由基清除能力。在极性液相色谱分离条件下, 可检测出绿原酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、橙皮苷和咖啡酸等 5 种成分; 在非极性液相色谱分离条件下, 乙酰缬草三酯、1 $\beta$ -乙酰缬草三酯和缬草三酯 3 种环烯醚萜类成分可被检出。其中绿原酸、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 3 种成分 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力较强。结果表明, 含咖啡酰基的绿原酸类成分具较强抗氧化活性, 且活性与咖啡酰基结构中的邻羟基苯酚基团相关。本研究为蜘蛛香药材抗氧化活性的研究提供了相应的方法和理论参考。

**关键词:** 蜘蛛香; DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力; 结构与活性相互关系

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0439-05

## Application of radical method to evaluation of antioxidant activity of *Vleriana jatamansi* Jones

WANG Fei-fei<sup>1</sup>, WU Shou-hai<sup>2</sup>, ZHANG Yu-mei<sup>1\*</sup>, MA Shuang-cheng<sup>1\*</sup>, DAI Zhong<sup>1</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** The antioxidant activities of *Vleriana jatamansi* Jones were investigated and the relationship between the antioxidant effect and the chemical structure was explored. The free radical scavenging test, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), was used to evaluate the antioxidant activities of the extracts of *Vleriana jatamansi* Jones with 0–100% menthol as extraction solvents. The polar and nonpolar HPLC conditions were conducted to isolate the main chemical compositions. The DPPH<sup>•</sup> tests were used in analysis of the free radical scavenging activities. Under polar HPLC separation conditions, 5 kinds of compounds were detected: chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, hesperidin, and caffeic acid; under nonpolar HPLC separation conditions, acevaltrate, 1 $\beta$ -acevaltrate and valtrate were founded. Chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid presented high DPPH<sup>•</sup> free radical scavenging activities. The results of antioxidant activity suggested that the coffee acyl from chlorogenic acid-like compounds had a high DPPH<sup>•</sup> free radical scavenging ability. Our investigation indicated that structure of the ortho hydroxyl phenol of chlorogenic acid-like compounds play a significant role in antioxidant activities. In addition, this work can also provide method and theory reference for improving the antioxidant activities of *Vleriana jatamansi* Jones.

**Key words:** *Vleriana jatamansi* Jones; DPPH<sup>•</sup> free radical scavenging activity; relationships between structures and activity

收稿日期: 2017-09-20; 修回日期: 2017-11-27.

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目 (建立取自帕金森患者体细胞诱导 iPSC 体外神经分化体系, 项目号: A2016437).

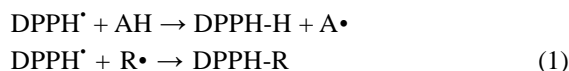
\*通讯作者 Tel: 86-10-67095994, E-mail: zhangyumei@nifdc.org.cn;

Tel: 86-10-67095272, E-mail: masc@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0933

蜘蛛香为败酱科植物蜘蛛香 (*Vleriana jatamansi* Jones) 的干燥根和根茎, 具有理气止痛、消食止泻、祛风除湿、镇惊安神的功效; 用于治疗腕腹胀痛、食积不化、腹泻痢疾、风湿痹痛、腰膝酸软、失眠等<sup>[1]</sup>。蜘蛛香药材含有挥发油、环烯醚萜、黄酮、生物碱、氨基酸等化学成分。目前研究认为, 蜘蛛香药材有较好的镇定、安眠等作用, 对于治疗肿瘤、HIV 和帕金森病均有一定疗效, 其相关保健品及制剂是欧洲销售额最高的天然药物之一<sup>[2-4]</sup>。蜘蛛香具有较强的抗氧化活性, 并且特异性地作用于  $\gamma$ -氨基丁酸 A (GABA<sub>A</sub>) 受体调节神经递质释放, 保持 GABA 结构稳定, 并可通过抗氧化作用抑制肝癌细胞生长<sup>[5-7]</sup>。

本文采用不同浓度的甲醇对蜘蛛香药材进行提取, 采用 2, 2-二苯基-1-苦肟 (DPPH<sup>•</sup>) 自由基清除能力实验对提取物的抗氧化活性进行分析。通过检测 DPPH<sup>•</sup> 在 515 nm 下吸收度降低的典型波形图, 对蜘蛛香甲醇提取物抗氧化活性进行评估, 原理如公式 (1) 所示, 其中 AH 为抗氧化剂和 R<sup>•</sup> 为自由基<sup>[8]</sup>。



根据抗氧化能力差异, 对提取物中含有的极性和非极性成分进行分析及含量测定, 优化蜘蛛香药材提取条件, 并分析相关成分与提取物抗氧化能力之间的关系。采用 DPPH<sup>•</sup> 反应动力学曲线, 对蜘蛛香药材中的主要活性成分 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力进行比较; 分析活性成分结构与自由基清除能力之间的相互关系, 为蜘蛛香药材抗氧化活性等功效研究提供方法和理论参考。

## 材料与amp;方法

**药材和试剂** 蜘蛛香对照药材 (121179-201002)、绿原酸 (110753-201718)、橙皮苷 (110721-201617)、1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (111717-201402)、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸 (111782-201706)、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸 (111894-201102)、芹菜素 (111901-201001)、异槲皮苷 (111809-201403)、槲皮素 (100081-201408)、缬草三酯 (111840-201302)、乙酰缬草三酯 (111981-201401) 以及 1 $\beta$ -乙酰缬草三酯等对照品均由中国食品药品检定研究院提供。2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (butylated hydroxytoluene, BHT) 购于美国 Sigma 公司, 色谱级乙腈购于德国默克公司。色谱级甲酸和甲醇购于美国 Fisher 公司。去离子水 (18.2 M $\Omega$ ) 经 Millipore Milli-Q 系统 (美国 Millipore Co.) 超纯水器净化。其他所用试剂均为分析纯。

**仪器** Agilent 1200 高分离度快速液相色谱仪-6410B 三重四极杆质谱系统 (美国 Agilent 公司), Waters e2695 高效液相色谱仪-2998 PDA 检测器 (美国 Waters 公司)。

**蜘蛛香甲醇提取物的制备** 蜘蛛香药材 300.0 mg, 加入不同浓度的甲醇水溶液 (0%、25%、50%、70%、80%、90% 和 100%) 2 mL, 充分振摇 10 min, 吸取上清液 1.5 mL 于 1.5 EP 管, 3000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 用时制备。

**DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力测定** 将待测溶液 0.5 mL 加入 DPPH<sup>•</sup> 甲醇溶液 3.5 mL, 配成终浓度为 6 $\times$ 10<sup>-5</sup> mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 DPPH<sup>•</sup> 甲醇溶液。以甲醇溶液为空白, 在 515 nm 波长进行测定, 每隔 2 s 记录吸收度值下降情况直到出现平台。

$$A_{515} = 12.509 \times C_{\text{DPPH}^{\bullet}} - 2.58 \times 10^{-3}$$

采用有效浓度 (efficient concentration, EC) 表示样品含量和抗氧化能力的关系, 采用抗自由基的能力 (antiradical power, ARP) 表示抗氧化能力, 其中抗氧化活性用 EC<sub>50</sub> 表示, ARP = 1/EC<sub>50</sub><sup>[8,9]</sup>。本文参考相关文献, 并根据本实验的研究对象为提取物的特点, 将以上分析方法进行改进, 采用  $t_{\text{EC}_{50}}$  表示 DPPH<sup>•</sup> 浓度下降到 50% 所需要的时间, 采用 ARP<sub>total</sub> 表示在到达稳定期时 (或在反应检测停止点时) DPPH<sup>•</sup> 浓度下降值的倒数, 即 ARP<sub>total</sub> 为 1/EC<sub>(%)</sub>。其中  $t_{\text{EC}_{50}}$  越小, 表示样品半数 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除效率越高; ARP<sub>total</sub> 越大, 表示样品在检测反应时间内 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力越强。

**对照品配制** 精密称取绿原酸、橙皮苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、缬草三酯、乙酰缬草三酯和 1 $\beta$ -乙酰缬草三酯化学对照品, 配制浓度依次约为 0、2、4、6、8 和 10 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液。

**色谱条件** Waters Sunfire C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 极性流动相条件为乙腈 (A)-0.1% 甲酸/水 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 2% A; 5~20 min, 2%~30% A; 20~30 min, 30%~70% A; 30~30.5 min, 70%~2% A; 30.5~35 min, 2% A。非极性流动相条件为乙腈-0.1% 甲酸/水 (85:15)。

**方法学考察** 精密称取绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。取该对照品溶液适量, 分别稀释成 5.0、2.5、1.3、0.8、0.4、0.2 和 0.1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 分别进样 10  $\mu$ L。以对照品溶液进样量 ( $\mu$ g) 为横坐标 (X), 峰面

积分值为纵坐标 (Y), 计算回归方程:

$$Y=2.31 \times 10^6 X+2.67 \times 10^6, r^2=0.9986 \text{ (绿原酸)}$$

$Y=4.13 \times 10^6 X+3.99 \times 10^5, r^2=0.9991$  (3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸)

$Y=3.80 \times 10^6 X+1.61 \times 10^5, r^2=0.9991$  (4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸)

**质谱条件** 采用电喷雾电离 (ESI) 离子源, 在负离子模式下采集数据, 经实验优化设定质谱参数如下: Capillary 4000 V, Gas Flow 6 L·min<sup>-1</sup>, Nebulizer 15 psi (1 psi≈6.9 kPa), Gas Temp 300 °C, Fragmentor 135, 扫描范围 *m/z*: 100~1000。

## 结果

### 1 抗氧化活性测定

对不同浓度甲醇提取的蜘蛛香提取物进行测定, 比较每份提取物的  $t_{EC_{50}}$ , 评估该提取物 50% 清除 DPPH<sup>·</sup> 自由基能力的强弱。在 515 nm 波长下, 记录 700 s 内波形图下降情况, 计算不同浓度甲醇提取物抗氧化能力, 如表 1 所示。结果表明, 在 25%~80% 甲醇提取条件下, 蜘蛛香提取物均表现出较高的抗自由基能力, 其中 25% 甲醇提取物的抗自由基能力最强。在 25%~50% 条件下, 绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸含量较高。

### 2 蜘蛛香药材中主要活性成分定性定量分析

#### 2.1 极性化合物分析

采用极性流动相系统进行分离。本文采用对照品比对、质谱分析及相关文献<sup>[2, 10]</sup>, 对 HPLC 色谱中的主要色谱峰进行分析, 确认了 5 个主要成分, 分别是绿原酸、橙皮苷、咖啡酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸。由图 1 可见, 绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸 3 个色谱峰含量较高。未检出 1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸对应色谱峰。

#### 2.1.1 绿原酸等 3 种活性成分的定量分析

样品在

110~0.1 μg 内线性关系良好。检出限 (LOD) 均小于 10.0 ng·mL<sup>-1</sup>, 定量限 (LOQ) 均小于 30.0 ng·mL<sup>-1</sup>。理论塔板数均大于 1×10<sup>4</sup>, 实验准确性和重复性良好。溶液稳定性实验: 对照品溶液在 4 °C 下避光放置, 分别于 0、4、8、12、16、20 和 24 h 进样测定, 记录色谱图, 以峰面积计算含量的 RSD 在 [1.21%, 1.81%] 内, 表明对照品溶液在 4 °C 下避光放置 24 h 基本稳定; 加样回收率在 [85.1%, 102.3%] 内。在不同浓度甲醇提取物中, 每克蜘蛛香样品中 3 种主要成分的含量见表 1。

**2.1.2 橙皮苷和咖啡酸定性分析** 由于橙皮苷和咖啡酸含量较少, 进行了定性分析, 橙皮苷 LOD 为 9.2 ng·mL<sup>-1</sup>, LOQ 为 27.6 ng·mL<sup>-1</sup>。咖啡酸 LOD 为 2.6 ng·mL<sup>-1</sup>, LOQ 为 7.8 ng·mL<sup>-1</sup>。在不同浓度提取液中, 100% 甲醇提取液咖啡酸含量较高, 但也仅略高于 LOD 为 14.2 ng·mL<sup>-1</sup>。

#### 2.2 非极性化合物分析

采用非极性流动相对非极性化合物进行分离, 所得主要色谱峰 UV 最大吸收均为 254 nm, 与环烯醚萜酯类成分最大吸收峰值基本一致。在 50%~100% 甲醇溶液的提取条件下, 检出环烯醚萜类成分, 经对照品比对、质谱分析确认为缬草三酯、乙酰缬草三酯和 1β-乙酰缬草三酯, 含量较极性化合物低。缬草三酯、乙酰缬草三酯和 1β-乙酰缬草三酯的 LOD 和 LOQ 值在 0.1~0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 之间。精密度实验测定结果 RSD 为 1.70%~2.2%, 回收率在 95.0%~102.4% 之间, 线性分别为  $r^2=0.9990$ ,  $r^2=0.9981$  和  $r^2=0.9993$ 。

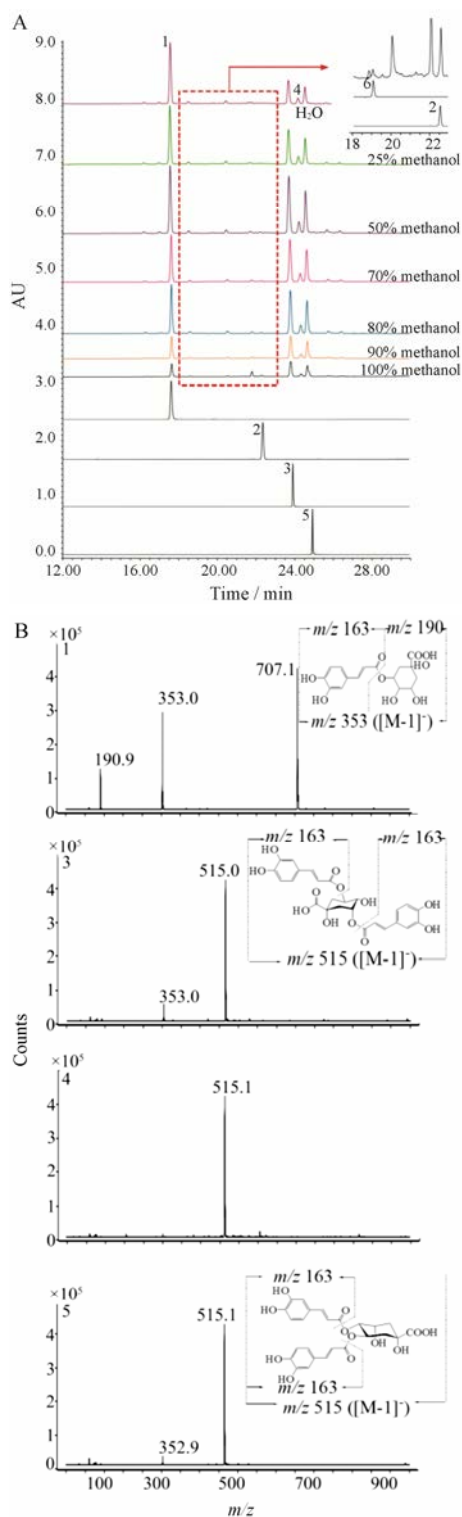
### 3 蜘蛛香药材中主要成分 DPPH<sup>·</sup> 自由基清除能力分析

#### 3.1 绿原酸等 DPPH<sup>·</sup> 自由基清除能力测定

将不同浓度的绿原酸对照品按“DPPH<sup>·</sup> 自由基清除能力测定”方法进行测定, 计算  $t_{EC_{50}}$  值和抗氧化能力 (ARP), 结果见表 2, 表明绿原酸浓度越高抗氧化能力越强。以对照品溶液进样量的 -ln 值为横坐标 (X),

**Table 1** Classification of antiradical efficiencies according to kinetic behavior. ARP: Antiradical power

Concentration of methanol extraction	$t_{EC_{50}}/s$	ARP	Content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
			Chlorogenic acid	3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid	4,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid
0%	16	5.32	2.63	0.71	0.72
25%	4	13.47	2.46	1.11	1.27
50%	18	11.48	3.27	1.94	2.14
70%	20	9.63	1.60	1.35	1.57
80%	20	12.00	1.73	1.42	1.68
90%	198	2.09	0.34	0.68	0.81
100%	NA	1.44	0.21	0.43	0.55



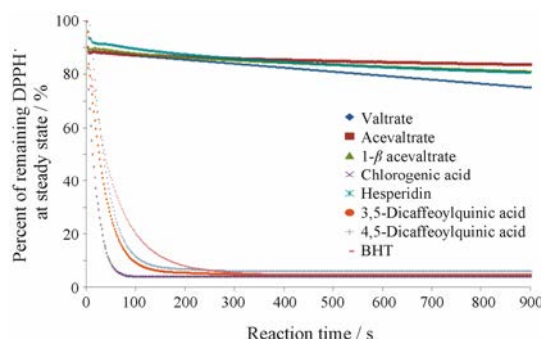
**Figure 1** High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of *Vleriana jatamansi* Jones in different methanol solution under polar condition. A: HPLC chromatogram; B: Two stage mass spectrometry (MS/MS) spectrum (1: Chlorogenic acid; 2: Hesperidin; 3: 3,5-*O*-Dicafeoylquinic acid; 4: Unknown; 5: 4,5-*O*-Dicafeoylquinic acid; 6: Caffeic acid)

$t_{EC50}$  值为纵坐标 (Y), 计算回归方程:  $Y = 15.823e^{0.9767x}$ ,  $r^2 = 0.9791$ 。以 BHT 为阳性对照, 可见在相同浓度下,

绿原酸的 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力优于阳性对照 BHT。3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力见图 2。

**Table 2** Analysis of antiradical efficiencies of chlorogenic acid. BHT: Butylated hydroxytoluene

Compd.	Concentration/mg · mL <sup>-1</sup>	$t_{EC50}$ /s	ARP
Chlorogenic acid	11.48	14	24.25
	5.74	23	26.14
	2.87	33	24.13
	1.43	40	26.47
	0.72	47	29.60
	0.36	60	25.98
BHT	10.00	36	21.04
		92	26.40
		134	—



**Figure 2** Analysis of the six observed compounds of reaction kinetics

### 3.2 橙皮苷 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力测定

将橙皮苷 12.50 mg 用甲醇溶解于 50 mL 量瓶中配制为对照品溶液。按“DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力测定”方法进行测定。结果见图 2, 橙皮苷清除 DPPH<sup>•</sup> 自由基能力为 EC~80% ( $t = 900$  s)。

### 3.3 环烯醚萜类化合物 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力测定

对乙酰缬草三酯和 1β-乙酰缬草三酯进行 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力实验, 结果表明该类成分 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力为 EC~80% ( $t = 900$  s), 如图 2 所示。

## 讨论

本文采用极性流动相和非极性流动相 HPLC 分离方法对蜘蛛香药材提取物的主要成分进行分析, 结果发现: 在极性流动相 HPLC 分离条件下, 绿原酸、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸和 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸为 3 种主要活性成分, 其结构均含有咖啡酰基, 其中邻羟基苯酚结构是主要的供 H 基团, 可与 DPPH<sup>•</sup> 自由基结合, 表现出较强的 DPPH<sup>•</sup> 自由基清除能力。

另据文献<sup>[11]</sup>报道, 蜘蛛香药材中含有芹菜素、异槲皮苷和槲皮素等成分, 但在本文 HPLC 条件下未检测到相应成分。在非极性流动相 HPLC 分离条件下, 环烯醚萜酯类化合物是主要成分。环烯醚萜类化合物是蜘蛛香的特征性成分, 也是主要活性成分, 在体内清除氧自由基能力较强, 有明显抑制肿瘤细胞生长的效果。环烯醚萜酯中的三元氧环是其在体内发挥生物学作用的重要结构基团<sup>[12]</sup>。本文认为, 环烯醚萜酯的抗氧化作用较绿原酸类化合物反应缓和, 在体内作用中, 三元氧环通过开环产生供 H 基团, 表现出一定的抗氧化能力。其作用机制与药物氯吡格雷和普拉格雷的作用机制较为相似, 通过将氯吡格雷活泼的甲基转化为三元环结构的普拉格雷, 从而有效地提升原研药物的药效<sup>[13]</sup>。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 368.
- [2] Shi JL. Study on the Medicinal Plant Resources of Valeriana in China (国产缬草属药用植物资源的研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2004.
- [3] Tamura S, Shimizu N, Fujiwara K, et al. Bioisostere of valtrate, anti-HIV principle by inhibition for nuclear export of Rev [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 2159–2162.
- [4] Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, et al. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis* [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 77: 399–404.
- [5] McIntire SL, Jorgensen E, Kaplan J, et al. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1993, 364: 337–341.
- [6] Kakehashi A, Kato A, Ishii N, et al. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling [J]. PLoS One, 2014, 9: e113610.
- [7] Young SZ, Bordey A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches [J]. Physiology, 2009, 24: 171–185.
- [8] Brandwilliams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Lebenson Wiss Technol, 1995, 28: 25–30.
- [9] Whittaker A, Vazzana C, Vecchio V, et al. Evaluation of direct and indirect effects of flavonoids, mineral elements and dry weight on antiradical scavenging activity in leaf material of field-grown *Trifolium pratense* cultivars using path analysis [J]. Field Crops Res, 2009, 113: 1–11.
- [10] Fu L, Chu QC, Huang BK, et al. Determination of polyphenolic constituents in *Valeriana jatamansi* Jones by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2005, 33: 161–164.
- [11] Okon IS, Zou MH. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: implications for therapy [J]. Pharmacol Res, 2015, 100: 170–174.
- [12] Lin S, Fu P, Chen T, et al. Minor valepotriates from *Valeriana jatamansi* and their cytotoxicity against metastatic prostate cancer cells [J]. Planta Med, 2015, 81: 56–61.
- [13] Serebruany V. Prasugrel versus clopidogrel [J]. New Engl J Med, 2008, 358: 1299–1301.