

银杏叶、黄芪总黄酮的协同抗氧化作用考察

林敏*, 陈梅, 安红钢, 吴冬青, 宋海

(河西学院甘肃省高校河西走廊特色资源利用省级重点实验室, 甘肃 张掖 734000)

[摘要] **目的:**考察银杏叶、黄芪醇提物中总黄酮的相互抗氧化作用。**方法:**采用UV测定总黄酮含量,检测波长507 nm。以清除率和半数抑制率质量浓度(IC_{50})为指标,通过DPPH自由基清除试验与等辐射分析法探讨银杏叶、黄芪醇提物单独和复配(质量浓度比分别为1:1.08,1:3.22,1:9.70)后总黄酮的抗氧化作用。**结果:**银杏叶、黄芪醇提物中总黄酮的 IC_{50} 分别为3.45,12.01 $mg \cdot L^{-1}$,表明二者对DPPH自由基具有明显的清除作用。等辐射分析中银杏叶、黄芪醇提物复配后的效应点均在相加线及95%可信限的下方,复配组($\bar{x} \pm s, n=4$)的理论值 $IC_{50\text{ add}}$ 分别为(5.49 \pm 0.05), (7.53 \pm 0.04), (9.82 \pm 0.07) $mg \cdot L^{-1}$,试验值 $IC_{50\text{ mix}}$ 分别为(4.95 \pm 0.09), (6.56 \pm 0.15), (8.61 \pm 0.15) $mg \cdot L^{-1}$,相互作用指数分别为0.90, 0.86, 0.88。**结论:**银杏叶总黄酮清除DPPH自由基能力较黄芪总黄酮强,银杏叶、黄芪醇提物间存在协同抗氧化效应。

[关键词] 银杏叶; 黄芪; 总黄酮; 抗氧化活性; 等辐射分析法; 协同作用; 相互作用指数; 清除率

[中图分类号] R284.1; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0038-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140038

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1346.025.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:46

Investigation of Synergistic Antioxidant Effects of Total Flavonoids from Ginkgo Folium and Astragali Radix

LIN Min*, CHEN Mei, AN Hong-gang, WU Dong-qing, SONG Hai

(Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Hexi University, Zhangye 734000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate mutual antioxidant effect of total flavonoids from alcohol extract of Ginkgo Folium and Astragali Radix. **Method:** UV was adopted to determine the content of total flavonoids with detection wavelength of 507 nm. Taking clearance and IC_{50} as indexes, synergistic antioxidant effect of total flavonoids from alcohol extract of Ginkgo Folium and Astragali Radix was investigated by DPPH radical scavenging assay coupled with isobologram method, concentration ratio of total flavonoids were 1:1.08, 1:3.22 and 1:9.70. **Result:** IC_{50} of total flavonoids from alcohol extract of Ginkgo Folium and Astragali Radix were 3.45, 12.01 $mg \cdot L^{-1}$, respectively, which suggested that these alcohol extract had significant DPPH radical scavenging effect. Effect-response points of Ginkgo Folium combined with Astragali Radix were observed below the addition line with 95% confidence interval in isobolographic plots. $IC_{50\text{ add}}$ of complex group ($\bar{x} \pm s, n=4$) were (5.49 \pm 0.05), (7.53 \pm 0.04), (9.82 \pm 0.07) $mg \cdot L^{-1}$, $IC_{50\text{ mix}}$ ($\bar{x} \pm s, n=4$) were (4.95 \pm 0.09), (6.56 \pm 0.15), (8.61 \pm 0.15) $mg \cdot L^{-1}$, interaction index were 0.90, 0.86 and 0.88, respectively. **Conclusion:** DPPH radical scavenging activity of total flavonoids from Ginkgo Folium was stronger than that from Astragali Radix, there was a synergistic antioxidant effect between alcohol extract of Ginkgo Folium and Astragali Radix.

[Key words] Ginkgo Folium; Astragali Radix; total flavonoids; antioxidation; isobologram; synergistic effect; interaction index; clearance

[收稿日期] 20131023(002)

[基金项目] 甘肃省教育厅研究生导师项目(1009-09);甘肃省高校河西走廊特色资源利用省级重点实验室科研项目(XZ1203)

[通讯作者] *林敏,副教授,从事天然产物有效成分提取与分析研究, Tel:13993664672, E-mail:linmin0936@163.com

现代医学研究显示银杏叶具有改善心脑血管循环、解痉、抗炎抗休克、抗菌抗病毒和抗癌等生物活性^[1-2]。黄芪为中药补气药中之佳品,功效补气固表、利水抗疮,可作为一种调动机体免疫系统、抗感染、抗肿瘤和抗自身免疫病的广谱免疫兴奋剂^[3-5]。研究表明黄芪银杏复方提取物具有明显的增强机体体液免疫和细胞免疫功能的作用^[6]。等辐射分析法亦称等高线图解分析法,选择2种能产生类似效应的药物,在等辐射图中分析二者间的相互作用^[7],被作为评价药物相互作用的“黄金标准”^[8-10],能简单有效地评价抗氧化剂间的相互作用。故本实验拟采用等辐射分析法考察黄芪及银杏总黄酮的协同抗氧化作用,为抗氧化剂的配比选择提供参考^[11]。

1 材料

FW177型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),WFJ-2100型分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司],GB-204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],LGJ-18型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

银杏叶(采自河西学院校园)、黄芪(购自张掖德生堂药房)经河西学院农业与生命科学学院李彩霞高级实验师鉴定分别为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶,豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,阴干粉碎过60目筛冷藏备用;二苯代苦味胍基(DPPH,美国Sigma公司),芦丁(中国食品药品检定研究院,批号100080-200707),试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 银杏叶、黄芪总黄酮的提取 利用石油醚去除银杏叶中叶绿素及脂肪,加25倍量70%乙醇于70℃水浴提取2h^[12],过滤,滤渣重复浸提3次,合并滤液,60℃旋转蒸发近干,冷冻干燥备用。称取黄芪粉末28.00g,加25倍量90%乙醇于75℃水浴提取2.5h^[13],过滤,滤渣重复浸提3次,合并滤液,60℃旋转蒸发近干,冷冻干燥备用。

2.2 总黄酮的含量测定 精密吸取0.160g·L⁻¹芦丁对照品溶液0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5mL,分别置于10mL量瓶中,加水补至4mL,加入5%亚硝酸钠0.4mL,摇匀,放置6min,加入10%硝酸铝0.4mL,摇匀,放置6min,加入5%氢氧化钠溶液4.0mL,加水定容至刻度,放置10min,以试剂空白作参比,于507nm处测定吸光度(A),以

质量浓度(C)为纵坐标,A为横坐标,得回归方程 $C = 0.0639A + 0.0034$ ($R^2 = 0.9982$)。准确称取经冷冻干燥后的银杏叶、黄芪总黄酮提取物0.5,1.0g,分别加70%乙醇溶解并定容至100mL,得供试品溶液。分别精密量取银杏叶、黄芪供试品溶液1.0,2.0mL按上述方法测定A,根据回归方程计算总黄酮含量。

2.3 DPPH 自由基的清除率测定 吸取适量银杏叶、黄芪总黄酮提取物溶液,分别置于具塞试管中,各加入0.1g·L⁻¹DPPH自由基乙醇溶液1.0mL,加无水乙醇定容至5.0mL,摇匀,室温避光反应30min,于517nm处测定A,空白组以等体积无水乙醇代替DPPH自由基溶液,对照组以等体积水代替样品溶液,计算DPPH自由基的清除率,见表1。结果发现银杏叶、黄芪总黄酮提取物均具有清除DPPH自由基的能力,且随用量的增加清除率增加;银杏叶总黄酮约达10mg·L⁻¹时清除率90%,趋于稳定,与黄芪总黄酮30mg·L⁻¹时效果相当。采用函数Forecast计算银杏叶、黄芪的半数抑制率(IC₅₀)理论值分别为3.45,12.01mg·L⁻¹,说明银杏叶总黄酮清除DPPH自由基能力较黄芪总黄酮强。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中A₀为对照组吸光度,A₁为样品组吸光度,A₂为空白组吸光度。

表1 银杏叶、黄芪总黄酮清除DPPH自由基能力考察

银杏叶总黄酮 /mg·L ⁻¹	清除率 /%	黄芪总黄酮 /mg·L ⁻¹	清除率 /%
0.5358	10.24	1.7384	14.39
1.6074	28.91	5.2152	32.66
3.2148	51.22	8.6920	44.85
4.8222	69.22	12.1688	55.54
6.4296	82.25	15.6456	65.33
8.0370	88.76	19.1224	73.05
9.6444	89.62	22.5992	79.47
10.7160	90.00	26.0760	84.96
		29.5528	89.55

2.4 协同抗氧化作用考察 以银杏叶、黄芪总黄酮提取物单独作用IC₅₀的比值(IC₅₀银杏叶/IC₅₀黄芪 = 1:3.17)为参考^[8],选择银杏叶、黄芪总黄酮提取物的质量浓度比分别为1:1.08,1:3.22,1:9.7,按2.3项下方法考察复合抗氧化剂对DPPH自由基的清除作用,计算清除率及复合组的IC₅₀,结果见表2。

表 2 银杏叶、黄芪复配后对 DPPH 自由基的清除能力考察

固定比例	银杏叶总黄酮 /mg·L ⁻¹	黄芪总黄酮 /mg·L ⁻¹	清除率 ($\bar{x} \pm s, n=4$)/%
1:1.08	0.40	0.43	10.63 ± 2.22
	0.80	0.87	21.80 ± 2.20
	1.21	1.30	29.37 ± 1.35
	1.61	1.74	38.02 ± 1.38
	2.01	2.17	44.50 ± 0.80
	2.41	2.61	50.09 ± 0.89
	2.81	3.04	55.32 ± 0.55
1:3.22	0.27	0.87	15.30 ± 1.43
	0.54	1.74	24.52 ± 1.11
	0.80	2.61	33.57 ± 0.21
	1.07	3.48	39.30 ± 2.26
	1.34	4.35	45.91 ± 0.70
	1.61	5.22	50.96 ± 1.51
	1.88	6.08	56.17 ± 0.70
1:9.70	0.13	1.30	13.29 ± 2.02
	0.27	2.61	22.02 ± 1.64
	0.40	3.91	30.95 ± 1.27
	0.54	5.22	38.49 ± 1.15
	0.67	6.52	44.44 ± 0.09
	0.80	7.82	49.60 ± 1.49
	0.94	9.12	54.37 ± 0.68

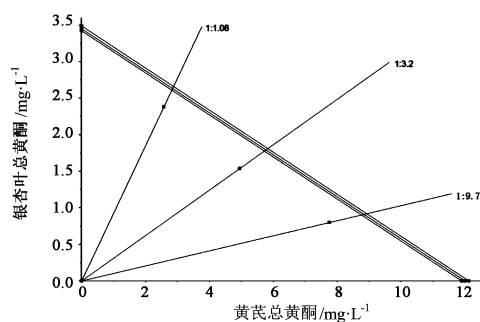
将 2.3 项下银杏叶总黄酮的 IC₅₀ 和 95% 可信限标绘在纵坐标上, 黄芪总黄酮的 IC₅₀ 和 95% 可信限标绘在横坐标上, 将 2 个 IC₅₀ 相连后构成相加线, 将两可信限分别相连后作出相加线 95% 可信限。如果银杏叶、黄芪总黄酮复合物效应(复配点 IC₅₀) 落在相加效应线上或可信限内, 则表示两药作用为相加; 如落在相加效应线的可信限左侧, 则代表协同作用; 如落于右侧, 则为拮抗作用^[8]。由图 1 可知, 复配组的效应点均落在相加线和 95% 可信限的下方(左侧), 表明银杏叶黄酮与黄芪黄酮复配后具有协同抗氧化作用。

2.5 统计学分析 采用 *t* 检验对 IC_{50add} 和 IC_{50mix} 进行统计比较, 若 IC_{50mix} < IC_{50add}, 表示协同作用^[9], 计算相互作用指数(γ), 以评价协同或拮抗作用程度。

$$IC_{50add} = IC_{50A} / (P_1 + RP_2)$$

$$\gamma = IC_{50Amix} / IC_{50A} + IC_{50Bmix} / IC_{50B}$$

式中 *R* 为 A, B 两种抗氧化剂单独应用时的效价比, 即 $R = IC_{50A} / IC_{50B}$; *P*₁ 为抗氧化剂 A 在复配组中占比, *P*₂ 为抗氧化剂 B 在复配组中占比; IC_{50Amix},



中间为相加线, 上、下为 95% 可信线,
相加线上的交点代表理论值 IC_{50add},
实心点(●)代表试验值 IC_{50mix}

图 1 银杏叶总黄酮和黄芪总黄酮复配的等辐射分析

IC_{50Bmix} 分别为复配组中 A, B 抗氧化剂的 IC₅₀; IC_{50A}, IC_{50B} 分别为 A, B 抗氧化剂单独作用时 IC₅₀。若 $\gamma = 1$, 表示相互作用为相加; 若 $\gamma < 1$, 表示相互作用为协同作用, γ 越小说明协同作用越强; 若 $\gamma > 1$, 表示相互作用为拮抗作用^[13]。计算($\bar{x} \pm s, n=4$)复配组 IC_{50add} 分别为(5.49 ± 0.05), (7.53 ± 0.04), (9.82 ± 0.07) mg·L⁻¹, IC_{50mix} 分别为(4.95 ± 0.09), (6.56 ± 0.15), (8.61 ± 0.15) mg·L⁻¹, γ 分别为 0.90, 0.86, 0.88。结果显示各种组合的 IC_{50mix} 均小于 IC_{50add}, 经过 *t* 检验证明两者间具有显著性差异, 且相互作用指数 γ 均 < 1, 表明银杏叶总黄酮与黄芪总黄酮间为协同作用, 协同作用的顺序为 1:3.22 > 1:9.70 > 1:1.08。

3 讨论

采用将 DPPH 自由基清除试验与等辐射分析法相结合的方式比较银杏叶总黄酮与黄芪总黄酮添加比例对二者相互作用的影响, 结果显示二者复配后存在协同作用, 且按不同比例进行复配得到的协同抗氧化作用程度存在差异, 为银杏叶、黄芪复合药对的抗氧化性使用提供参考。本文仅考察了 3 个不同比例, 存在一定的试验误差, 复合药对的最佳配比选择还需大量试验数据确定, 以优化银杏叶和黄芪的复配方案, 减少单药用量, 更好地指导生产实践。

[参考文献]

[1] 何健. 银杏叶的研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(15):1434.
[2] 刘桂霞, 孙玉玮, 金兆祥. 银杏叶的研究进展[J]. 国外医药:植物药分册, 1994, 9(1):10.
[3] 毛小娟, 王军志, 王凤连. 红芪多糖和黄芪多糖对小鼠体液免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1988, 4(3):158.

白头翁总皂苷提取物的基本理化性质考察

管咏梅, 孙振, 张文秀, 吴德智*, 马正, 刘红宁, 朱卫丰

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 检测白头翁总皂苷提取物的表观溶解度、表观油水分配系数及其在体外胃肠液中的稳定性。方法: 以白头翁皂苷类成分(B_3 , B_D , B_7)为指标, 采用饱和法测定表观溶解度, 摇瓶法测定油水分配系数, 考察白头翁总皂苷提取物在体外胃肠液中的稳定性。采用 ELSD-HPLC 测定指标成分含量, 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~28 min, 25%~10% B)。结果: 3种白头翁皂苷类成分中 B_7 的溶解能力最强。白头翁总皂苷提取物在不同 pH 缓冲液中油水分配系数均很小。指标成分在胃蛋白酶、胰蛋白酶环境较稳定, RSD 均 < 5%。结论: 白头翁总皂苷提取物在弱碱性环境中溶解能力最强。白头翁皂苷类成分的亲脂性较弱, 较难通过肠壁的脂质膜与水性层吸收进入体内。白头翁总皂苷在体外胃肠液环境中较稳定。

[关键词] 白头翁总皂苷; 表观溶解度; 表观油水分配系数; 稳定性; 白头翁皂苷 B_3 ; 白头翁皂苷 B_D ; 白头翁皂苷 B_7

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0041-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140041

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1345.024.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:45

[收稿日期] 20131017(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-001); 江西省重大科技专项(2010AZD00301); 江西省落地计划项目(赣财教[2011]243); 江西省卫生厅中医药科研课题(2009A062, 2012A152); 江西省青年科学基金项目(20132BAB215029); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ14621); 江西省研究生创新专项(YC2013-S235)

[第一作者] 管咏梅, 博士, 从事中药新制剂与新技术研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: guanym2008@163.com

[通讯作者] * 吴德智, 博士, 讲师, 从事中药新制剂与新技术的研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: 18970080479@163.com

- [4] 李登国, 柳风祥. 黄芪免疫调节作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2010(2): 71.
- [5] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203.
- [6] 潘智鸣, 张修武, 陆洁, 等. 银杏、黄芪及其复方制剂增强机体特异免疫功能的比较研究[J]. 衡阳医学院学报: 医学版, 1997, 34(1): 19.
- [7] 陈鸿, 潘宁玲, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2004, 25(5): 267.
- [8] Ningappa M B, Ramadas D, Leela S. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts [J]. Food Chem, 2008, 106(2): 720.
- [9] Yang J, Liu R H. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3- β -D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(18): 8581.
- [10] Qiu H X, Liu J, Kong H, et al. Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions between ketoprofen and paracetamol [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 557 (2/3): 141.
- [11] Borowicz K K, Luszczki J J, Czuczwar S J, et al. Interactions between two enantiomers of losigamone and conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model—an isobolographic analysis [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 567(1/2): 110.
- [12] 贾长英, 唐丽华, 张晓娟, 等. 银杏叶黄酮的乙醇提取工艺优化及动力学研究 [J]. 农业机械, 2012, 12(36): 90.
- [13] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52.

[责任编辑 刘德文]