

5 种中药乙醇提取物的体外抗氧化活性研究

陈永钧, 龙晓英*, 安修, 陈淑琳
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究马尾松等 5 种中药的乙醇提取物的体外抗氧化活性。**方法:**采用乙醇超声提取法获得各中药提取物,并以抗坏血酸(VitC)为阳性对照来考察其对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH \cdot)的清除效果。**结果:**甘草、丹参、马尾松、当归、罗汉松对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率分别为(浓度相当于原药材 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$): 15.86%, 11.68%, 11.31%, 7.88%, 5.94%; 在清除 DPPH \cdot 的实验中各中药的 IC_{50} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别为: 丹参 1.6, 马尾松 1.87, 罗汉松 3.11, 甘草 13.91, 当归 22.32; 而在清除 $\cdot OH$ 的实验中各中药的 IC_{50} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 则为: 丹参 1.6, 罗汉松 2.02, 马尾松 2.1, 甘草 2.77, 当归 4.03; 而三大体系阳性对照的 IC_{50} 分别为 0.047, 0.93, 0.21 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**结论:**5 种中药乙醇超声提取物均具有一定的抗氧化活性,其中丹参、马尾松效果较好;但与阳性对照 Vit C 相比仍有一定差距。

[关键词] 马尾松; 丹参; 抗氧化; 自由基; 体外

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0218-04

[doi] 10.11653/syfy2013220218

Antioxidant Activities of Ethanol Extracts from Five Kinds of Chinese Herbal Medicine

CHEN Yong-jun, LONG Xiao-ying*, AN Xiu, CHEN Shu-lin

(School of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preliminary antioxidant activities of ethanol extracts from several Chinese herbal medicine. **Method:** The *in vitro* scavenging activities of ethanol extracts by ultrasound on superoxide radical, hydroxyl radical and DPPH \cdot were investigated with vitamin C (VC) as the positive control in this study. **Result:** The extracts of *Glycyrrhiza uralensis*, *Salvia miltiorrhiza*, *Pinus massoniana*, *Angelica sinensis*, *Podocarpus macrophyllus* had scavenging activities on superoxide radical (equivalent of raw material $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the eliminate rate was 15.86%, 11.68%, 11.31%, 7.88%, 5.94%, respectively), DPPH \cdot (IC_{50} value was 13.91, 1.6, 1.87, 22.32, 3.11 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively), $\cdot OH$ (IC_{50} value was 2.77, 1.6, 2.1, 4.03, 2.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively). The VC IC_{50} value of the three experiments was 0.047, 0.93, 0.21 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion:** Five kinds of ethanol ultrasonic extract from Chinese herbal medicine have antioxidant activity, especially *S. miltiorrhiza* and *P. massoniana*, which has the value of exploiting and utilizing.

[Key words] *Pinus massoniana*; *Salvia miltiorrhiza*; antioxidant activity; radical; *in vitro*

近年来诸多研究表明,自由基与衰老、心脑血管疾病、炎症以及癌症等人类许多疾病有密切联系^[1]。抗氧化剂是一种可以消除自由基抑制过氧化反应的活性物质,在一定程度上可以预防和治疗与之相关的疾病。某些天然的抗氧化剂(如,维生素 E、维生素 C、 β -胡萝卜素等)以及合成的抗氧化剂[如,2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT),丁基羟基茴香醚(BHA),叔丁基对苯二酚(TBHQ)等]已经得

[收稿日期] 20130716(019)

[基金项目] 广东省科技厅重点项目(2011A030100010)

[第一作者] 陈永钧,硕士生,从事中药药物制剂新技术与新剂型研究, Tel: 13751757142, E-mail: cyjonmyway@qq.com

[通讯作者] * 龙晓英,教授,硕士生导师,从事药物制剂新技术与新剂型及中药新药研究, Tel: 020-39352559, E-mail: longxy3156@163.com

到一定程度的应用,并取得了较好的效果。但在实践及一些研究中也发现其存在一些问题,如:性质不稳定、具有一定毒性等。所以寻找更多更好的新的天然抗氧化剂已成为人们关注的一个热点。近年来,从中药中寻找天然抗氧化剂已成为一种趋势。因此,研究中药单味或复方提取物的抗氧化活性,对中药的应用和开发具有一定的实际意义。我国是中医药大国,具有丰富的中草药资源。一些研究已经表明,中药在抗氧化、抗衰老方面具有较好效果,如黄酮类^[2]、多酚类等。所有这一切为在中草药中发现筛选天然抗氧化剂提供了必要条件,同时也表明了它的可行性和有效性。

采用3种不同的体外体系来探讨5味中药乙醇提取物对超氧阴离子(O_2^-),羟自由基($\cdot OH$),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH \cdot)的作用各有针对性。 O_2^- , $\cdot OH$ 为人体内具有的常见氧自由基,研究药物对它们的抑制或清除作用,具有一定的针对性和现实意义;DPPH \cdot 虽不为人体所具有,但其常被国内外研究作为抗氧化剂的常用筛选工具,其能初步筛选出大多数抗氧化的活性结构。通过以上3种体系的建立,以期能快速、客观的初筛出具有抗氧化活性的中药。

1 材料

1.1 仪器 UV-2450PC 紫外分光光度仪(日本岛津公司)、UVProbe2.34 操作软件、FA2004B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)、数显恒温水浴锅(富华仪器有限公司)、TDL80-2B 离心机(上海安亭科学仪器厂)、pHS-3CpH 计(上海鹏顺科学仪器)。

1.2 试剂 三羟甲基氨基甲烷(天津大茂,批号 20110829)、DPPH(上海阿拉丁,批号 D1227007)、乙二胺四乙酸(天津大茂,批号 20111016)、连苯三酚(天津大茂,批号 20110717)、水杨酸(天津福晨,批号 20120422)、维生素 C(VC,广州化学试剂厂,批号 20111001-1)、七水合硫酸亚铁(天津大茂,批号 20121008)、双氧水(广州化学试剂厂,批号 20120702-1)等均为分析纯,实验用水为三蒸水。

1.3 药材 中药甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、丹参(*Pinus massoniana* Lamb)、当归(*Angelica sinensis*)购自广东和祥制药有限公司(批号 120902)。马尾松(*Salvia miltiorrhiza*)采自广东药学院中山校区、罗汉松(*Podocarpus macrophyllus*)采自广西,由广东药学院中药学院中药资源鉴定教研室李书渊教授鉴定。

2 方法

2.1 中药成分的提取 将药材用粉碎机粉碎,过

10 目筛,称取 10 g 用 70% 乙醇 100 mL 浸泡 1 h,然后超声 0.5 h,过滤。取滤液 10 mL 于蒸发皿,在 60 °C 烘箱中烘至浸膏状,然后用 10 mL 蒸馏水溶解,在离心机中以 3 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min,即得 7 种中药的乙醇提取物(相当于原药材 100 $g \cdot L^{-1}$),取上清液备用。

2.2 对超氧阴离子的抑制作用 参考陈玫[3-4]等的方法,加入 4.2 mL Tris-HCl(pH 8.2)于 10 mL EP 管中,再加入不同浓度样品溶液 0.1 mL,最后加入 0.1 mL 邻苯三酚溶液(6 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 10 $mmol \cdot L^{-1}$ HCl 溶液)混和均匀,反应 1 min 后采用时间程序在 320 nm 处连续测量 120 s,以 dAs/dt 表示加入样品后连苯三酚的自氧化速率;而对照组自氧化速率的测定则以蒸馏水代替样品溶液,其他不变,并以 dA/dt 代表对照组连苯三酚的自氧化速率。然后按下式计算抑制率。具体操作如表 1。

$$\text{抑制率} = (dA/dt - dAs/dt) / (dA/dt) \times 100\%$$

表 1 邻苯三酚自氧化法加样表

试剂	空白管/mL	自氧化管/mL	样品管/mL
Tris-HCl	4.2	4.2	4.2
蒸馏水	0.2	0.1	-
邻苯三酚	-	0.1	0.1
中药提取物	-	-	0.1
总体积	4.4	4.4	4.4

2.3 DPPH 自由基清除能力的测定 参考文献[5-6]的方法,取 5 mL 0.03 $g \cdot L^{-1}$ 的 DPPH 溶液到 10 mL EP 管中,再加入 0.1 mL 不同浓度样品溶液混匀,待反应稳定后以 95% 乙醇溶液为参比在 518 nm 处测定其吸光度,记为 A_t ;对照组以 0.1 mL 95% 乙醇代替样品溶液,其他不变,吸光度记为 A_0 ,并按以下公式计算清除率(E)。

$$E = 1 - A_t/A_0 \times 100\%$$

2.4 对羟自由基的清除作用 参考文献[7-8]的方法,采用 Fenton 体系。 Fe^{2+} 催化 H_2O_2 产生 $\cdot OH$,加入水杨酸捕捉 $\cdot OH$ 并产生有色产物,其在 530 nm 处有最大吸收。反应包括 1.25 $g \cdot L^{-1}$ $FeSO_4 \cdot H_2O$ 溶液,0.622 $g \cdot L^{-1}$ 水杨酸-乙醇溶液以及不同浓度的样品溶液各 1 mL,最后加入 4.4 $mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 启动反应,于 37 °C 水浴锅中反应 0.5 h 后在 510 nm 处测定吸光值记为 A_x ;模型对照组(A_0)用水代替样品溶液;考虑到样品溶液本身的吸光度,用水代替 4.4 $mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 作为无自由基反应的空白对照组(A_{x0})。测定结果以清除率 E 表示,并按 $E = [A_0 -$

$(A_x - A_{x_0}) / A_0 \times 100\%$ 计算。

2.5 中药抗氧化性能综合评价 对以上三大体系的数据结果进行以下处理:将各体系的评估结果按优劣进行排序,排名最优的药物所对应的抑制率或 IC_{50} 的数值以 E_{x1} 表示,以此类推, E_{x5} (本实验仅 5 味药受试) 表示在此体系中效果最差中药的抑制率或 IC_{50} 的数值;若每味中药在不同体系下的积分以 a_x 表示,则有: $a_x = |E_{xn} - E_{x5}|$; A 代表每味中药在 3 大体系中的总积分,则 $A = a_1 + a_2 + a_3$, A 值越大,体外抗氧化活性越好。

3 结果

3.1 对邻苯三酚自氧化的抑制作用 如表 2 所示,在连苯三酚自氧化体系中马尾松、罗汉松、甘草、丹参、当归的乙醇提取物都具有一定的清除超氧阴离子的作用。其中甘草、马尾松、丹参的提取物抗氧化效果相对较强,在样品浓度条件(相当于原药材 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 下分别为 15.86%, 11.29%, 11.68%;但与阳性对照 VC 相比有较大差距,VC 的 IC_{50} 为 $0.047 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,在极低浓度下就能达到较好的清除超氧阴离子的效果。

表 2 5 种中药材乙醇提取物 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对连苯三酚自氧化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	抑制率/%	组别	抑制率/%
罗汉松	5.94 ± 0.31	丹参	11.68 ± 0.77
马尾松	11.31 ± 0.94	当归	7.88 ± 0.76
甘草	15.86 ± 3.94	VC*	50 ± 0.22

注: * VC 此处浓度为 $0.047 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 DPPH· 的清除作用 几种中药提取物对 DPPH· 的清除作用见表 3。由表 3 可以看出,以 IC_{50} 为标准,7 个不同中药乙醇提取物对自由基的清除能力由高到低为:丹参 > 马尾松 > 罗汉松 > 甘草 > 当归。丹参、马尾松的清除 DPPH· 的能力相对较强, IC_{50} 分别为 $1.60, 1.87 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与阳性对照 VC (IC_{50} 为 $0.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对比有一定差距,但不悬殊。

表 3 5 种中药材乙醇提取物对 DPPH· 的清除作用

醇提取物	量效曲线	R^2	$IC_{50} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
罗汉松	$Y = 15.474X + 1.7986$	0.9975	3.11
马尾松	$Y = 24.072X + 4.8795$	0.9969	1.87
甘草	$Y = 2.8807X + 9.9177$	0.9961	13.91
丹参	$Y = 30.241X + 1.6576$	0.9989	1.60
当归	$Y = 2.0025X + 5.313$	0.9905	22.32
VC	$Y = 64.449X - 10.151$	0.9901	0.93

3.3 对·OH 的清除作用 实验发现,各中药提取

物在一定浓度范围内,量效曲线拟合呈二次曲线(如表 4 所示)。几种中药提取物均体现出了对·OH 一定的清除作用。其中丹参对·OH 的清除作用相对较强, IC_{50} 为 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,罗汉松、马尾松次之。阳性对照 VC 在 $0.1 \sim 0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内具有较好的线性关系,其 IC_{50} 为 $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,仍然体现出了优于各中药提取物清除·OH 的能力。

表 4 5 种中药材乙醇提取物对羟自由基的清除作用

醇提取物	量效曲线	R^2	$IC_{50} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
罗汉松	$Y = -0.0303X^2 + 0.3539X - 0.0908$	0.9905	2.02
马尾松	$Y = -0.0131X^2 + 0.2011X - 0.1365$	0.9926	2.10
甘草	$Y = -0.0104X^2 + 0.2694X - 0.1454$	0.9995	2.77
丹参	$Y = -0.0836X^2 + 0.5264X - 0.1282$	0.9973	1.60
当归	$Y = -0.0074X^2 + 0.1851X - 0.1087$	0.9981	4.03
VC	$Y = 2.173X + 0.0384$	0.9936	0.21

3.4 中药抗氧化性能综合评价 此处对各中药提取物在各个不同体系中的抗氧化能力的优劣给予换算打分并排名,并将在各体系下所获得的积分的总和来作为各中药提取物在此 3 个体系下所表现出的综合抗氧化能力的评判标准。注重了中药提取物在单个体系中的表现,同时也兼顾了中药提取物在 3 个体系中的综合表现。由表 5 可以看出,综合抗氧化能力强弱为:丹参 > 马尾松 > 罗汉松 > 甘草 > 当归。但从分值中发现丹参与马尾松的综合抗氧化性能接近,罗汉松与甘草的综合抗氧化性能相近;当归获得了较低的分值,提示综合抗氧化能力较弱。

表 5 5 种中药材乙醇提取物抗氧化性能综合分值

醇提取物	体系分值(a_x)			总分值(A)
	邻苯三酚体系(a_1)	DPPH 体系(a_2)	Fenton 体系(a_3)	
丹参	5.74	20.72	2.43	28.89
马尾松	5.37	20.45	1.93	27.75
罗汉松	0.00	19.21	2.01	21.22
甘草	9.92	8.41	1.26	19.59
当归	1.94	0.00	0.00	1.94

4 讨论

本研究以体外纯化学体系来评价筛选抗氧化剂,具有快捷、方便、灵敏度高等优点,是体外初筛抗氧化剂的主要手段之一。

在邻苯三酚体系下,研究发现各中药粗提物本身的颜色对体系具有较大的影响。这也导致了因浓

度越高颜色越深而无法对各中药提取物展开不同浓度的检测。同时还发现,各中药提取物在此体系下并未体现出较强的抗氧化活性并与阳性对照存在较大差距。对于以上现象可能与以下因素有关:邻苯三酚自氧化是一种灵敏度较高的反应体系,一般其线性时间维持在3~4 min左右^[9],故对受试样品的纯度、成分等有较高的要求。而中药粗提物本身存在成分复杂且抗氧化活性成分含量不一等问题,这些可能是导致其在此体系下体现出较弱抗氧化活性的原因。

在对·OH的清除实验中发现,除阳性对照VC回归分析呈线性相关外,其他各中药提取物均呈二次曲线。究其原因,我们仍认为这可能与粗提物成分复杂有关,同时也与此体系的反应机制有关。有报道指出^[10],此体系反应所得的中间产物不稳定,随着时间的推移颜色会降低,并且未被消耗完的·OH有与中间产物进一步反应的趋势,导致体系颜色降低。这也许可以解释中药粗提物回归分析呈二次曲线。而阳性对照VC因成分明确,效果突出,反应稳定时间一般在几分钟之内,相较于中药粗提物具有较短的反应稳定时间,中间产物未来的及作进一步变化,故体现出了较好的线性关系。

最终笔者对各中药在此3个体系下的综合抗氧化性能做了一个积分排名。结果显示各中药均体现出一定的抗氧化活性,特别是含黄酮类丰富的中药,如丹参、马尾松。而当归效果最差,从成分来看其主要含藁苯内酯和香豆素^[11]等,提示其所含成分抗氧化效果可能不及前者。而丹参、马尾松由于显示较好的综合抗氧化性能,接下来笔者将加强对它们在不同水平的研究,以进一步探究其抗氧化活性。故此实验基本达到粗筛目的。

中药成分复杂,以体外纯化学体系进行抗氧化剂的筛选较难全面反映问题,而从单一纯化学体系入手就更加不完善。在兼顾结果的客观性与快捷性的

情况下,可从体外有针对性的建立多个纯化学体系来进行抗氧化剂快速客观的筛选具有一定的实际意义。

[参考文献]

- [1] 王铭,赵慧,王秀伶,等. 牛瘤胃耐氧细菌菌株 Aeroto-Niu-016 对中药甘草主要活性成分甘草素的开环转化[J]. 药学学报, 2012,47(5):664.
- [2] 钟建青,李波,贾琦,等. 天然黄酮类化合物及其衍生物的构效关系研究进展[J]. 药学学报, 2011,46(6):622.
- [3] 陈玫,张海德,陈敏,等. 几种中药不同溶剂组分的抗氧化活性研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2006,45(6):131.
- [4] 袁倬斌,高若梅. 邻苯三酚自氧化反应的动力学研究[J]. 高等学校化学学报,1997,18(9):104.
- [5] 刘帅涛,陶慧林,李锦艳. 4种黄酮小分子对 DPPH 自由基的清除作用及构效关系研究[J]. 分析测试学报, 2012,31(1):71.
- [6] 郭雪峰,岳永德,汤锋,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008,28(7):1578.
- [7] 张穗芳,曾述之,熊继敏,等. 风化煤黄腐酸物质对氧自由基作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 1994,29(11):660.
- [8] 唐孟成,贾之慎,邬建敏. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996,23(2):184.
- [9] 张宏,谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版, 2002,33(6):677.
- [10] 冯慧萍,李亦聪. 羟自由基与水杨酸反应机理的初探[J]. 光谱实验室, 2009, 26(4):931.
- [11] 黄伟晖,宋纯清. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001,26(3):3.

[责任编辑 聂淑琴]