

## 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性

陈瀚, 李进, 李祥\*, 陈建伟, 薛平

(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

**[摘要]** 目的: 考察板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性。方法: 用大孔树脂和阴、阳离子交换树脂制备板蓝根3个有效部位: 总木脂素、总有机酸、总生物碱部位。结合酶标仪, 通过清除1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基和 $Fe^{3+}$ 还原能力(FRAP)测定板蓝根提取物的体外抗氧化作用。结果: 板蓝根颗粒组及各个提取物组均有不同程度的体外抗氧化效果。其中以总木脂素抗氧化效果最佳(DPPH  $IC_{50}$  160.6  $mg \cdot L^{-1}$ ; FRAP 0.75  $mmol \cdot g^{-1}$ ); 其次为板蓝根颗粒组(DPPH  $IC_{50}$  595.97  $mg \cdot L^{-1}$ ; FRAP 0.12  $mmol \cdot g^{-1}$ ); 总有机酸、总生物碱部位效果较弱。结论: 测定了板蓝根中不同有效部位的抗氧化活性, 初步确定其抗氧化相关活性成分主要存在于木脂素部位。

**[关键词]** 板蓝根; 抗氧化; 1,1-二苯基苦基苯肼;  $Fe^{3+}$ 还原能力

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0184-03

### Antioxidation of Different Extracts from *Isatidis indigotica* in vitro

CHEN Han, LI Jin, LI Xiang\*, CHEN Jian-wei, XUE Ping

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** Antioxidation of different extracts from *Isatidis indigotica* were studied in vitro to supply the separating base of antioxidative components. **Method:** The extracts were prepared by macroporous resin and anion/cation exchange resin. Their antioxidant activities were assessed by two complementary test systems, namely 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. **Result:** The total lignin displayed strong activity in all test systems. (DPPH  $IC_{50}$  160.6  $mg \cdot L^{-1}$ ; FRAP 0.78  $mmol \cdot g^{-1}$ ) Banlangen Keli (DPPH  $IC_{50}$  595.97  $mg \cdot L^{-1}$ ; FRAP 0.12  $mmol \cdot g^{-1}$ ) showed relatively lower activity. Total organic acids and total alkaloid have a little activity. **Conclusion:** Antioxidative components could be justified existing in the total lignin initially.

**[Key words]** *Isatidis indigotica*; antioxidation; 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; ferric reducing antioxidant power

板蓝根是十字花科植物菘蓝的干燥根<sup>[1]</sup>, 具有清热解毒, 凉血利咽之功效。临床上广泛应用于治疗流行性感、扁桃体炎、腮腺炎、肝炎、丹毒

和流脑等病毒、细菌性疾病, 其中以治疗流行性感、冒应用最为广泛。许多文献有报道, 金银花<sup>[2]</sup>, 竹叶<sup>[3]</sup>, 连翘<sup>[4]</sup>等多种清热解毒药具有体外抗氧化活性, 板蓝根作为清热解毒的代表药之一, 其中的不饱和脂肪酸<sup>[5]</sup>和多糖<sup>[6]</sup>被研究证明有很强的抗氧化活性。板蓝根中还有许多不同类型的化合物, 如木脂素类, 有机酸类, 生物碱类等, 本实验室前期已经对提取分离得到的有机酸, 木脂素及生物碱部位进行了有关清热解毒方面的研究<sup>[7]</sup>, 这些部位在体外抗氧化方面药效如何, 本文首次做了一些初步研究, 选用两种互为补充的体外抗氧化方法, DPPH, FRAP 来研究板蓝根有效部位的抗氧化活性。

**[收稿日期]** 20111227(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073023); 江苏省产学研联合创新项目(BY2009109); 江苏高校优势学科建设工程项目(yssk-2010)

**[第一作者]** 陈瀚, 在读硕士, 主要从事中药活性物质基础研究, Tel: 025-51998182, E-mail: chenhanj@163.com

**[通讯作者]** \*李祥, 教授, 博士生导师, 主要从事中药活性物质基础研究, Tel: 025-51998182, E-mail: lixiang\_8182@163.com

## 1 材料

**1.1 提取部位的制备** 药材:板蓝根药材产地为安徽蒙城,经南京中医药大学药鉴定教研室陈建伟教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

**1.1.1 总木脂素制备和测定** 板蓝根药材用 8,6,6 倍量的 70% 乙醇加热回流提取 2,1.5,1.5 h,减压回收乙醇,浓缩至适当体积,过滤,分为 4 份。一份上清液通过 D101 大孔树脂吸附,水洗脱后,用 50% 乙醇溶液洗脱,得到板蓝根总木脂素部位<sup>[8]</sup>。紫外分光光度法测得总木脂素含量为 79.8%。

**1.1.2 总有机酸制备和测定** 一份浓缩液(pH 5~6)通过 732 强酸性阳离子交换树脂,流出液调 pH 9,通过 717 强碱性阴离子交换树脂,水洗无色后,用 0.8 mol·L<sup>-1</sup> 的酸性醇洗脱,洗脱液浓缩,得板蓝根总有机酸部位<sup>[9]</sup>。酚酞指示剂法滴定,以水杨酸计算,得总有机酸含量为 80.9%。

**1.1.3 总生物碱制备和测定** 一份浓缩液(pH 5~6)通过 732 强酸性阳离子交换树脂,水洗无色后,用 1.0 mol·L<sup>-1</sup> 的氨性醇洗脱,洗脱液加热挥去氨,回收乙醇。调 pH 9,通过 717 强碱性阴离子交换树脂,流出液浓缩,得板蓝根总生物碱部位<sup>[10]</sup>。甲基红-溴甲酚绿指示剂法滴定,以含硫生物碱表告依春计算,得总生物碱含量为 53.6%。

**1.1.4 板蓝根颗粒** 板蓝根颗粒(按药典法自制):1 g 相当于生药 2.86 g,用蒸馏水配成 20 g·L<sup>-1</sup> 备用。

**1.2 试剂与仪器** 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(美国 Sigma 公司);2,4,6-三吡啶基三嗪(上海阿拉丁有限公司,20100222);三氯化铁、硫酸亚铁(国药集团化学试剂有限公司);抗坏血酸(VC)(中国医药集团上海化学试剂公司)。

ELISA 酶标仪(美国 BIO-RAD 有限公司),雷磁 PHSJ-3F 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),Spectrum752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),costar 96 孔细胞培养板。

**1.3 用药的配制** 抗坏血酸(VC),用蒸馏水配成 1 g·L<sup>-1</sup> 备用。

## 2 方法

**2.1 清除 DPPH 自由基活性试验** 参照文献[11],并稍作改进:精密移取不同浓度的提取物溶液 20 μL 置 96 孔板中,再加入 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DPPH 对照品液 80 μL,振荡后反应 30 min,每样品

平行测定 3 复孔,于 517 nm 处测定吸光度( $A_i$ );以蒸馏水代替提取物溶液做空白对照,以 VC 做阳性对照,在 517 nm 处测定吸光度( $A_c$ );分析比较不同供试品 DPPH 自由基清除能力(scavenging activity)。

$$\text{清除率} = [1 - A_i/A_c] \times 100\%$$

## 2.2 还原 Fe<sup>3+</sup> 能力测定

**2.2.1 标准曲线的测定** 称取 2.78 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,溶解并定容至 2 mL,取适量 5 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液稀释至 0.31,0.62,1.25,2,2.5 mmol·L<sup>-1</sup>。按 2.2.2 方法测其吸光度,得到标准曲线  $Y = 0.4516X + 0.2553$  ( $R^2 = 0.9929$ )。

**2.2.2 方法** 参照 Benzie 的方法<sup>[12]</sup>,并稍作修改。该法原理为 Fe<sup>3+</sup>-TPTZ(2,4,6-tripyridyl-S-triazine,阿拉丁)可被样品中还原物质还原为 Fe<sup>2+</sup>-TPTZ 形式,呈现出明显的蓝色,并于 593 nm 处具有最大光吸收,根据吸光度的大小计算样品抗氧化活性的强弱。具体步骤如下:FRAP 试剂由 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸盐缓冲液 25 mL,pH 3.6(3.1 g 醋酸钠和 16 mL 冰醋酸用蒸馏水配成 1 L);0.01 mol·L<sup>-1</sup> TPTZ 溶液 2.5 mL(0.04 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶解),0.02 mol·L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> 溶液 2.5 mL 组成,在 96 孔板中加入 10 μL 各提取物溶液和 100 μL FRAP 工作液,以蒸馏水代替提取物溶液做空白对照,以 VC 做阳性对照,混匀后 37 °C 反应 10 min,593 nm 测定吸光度,以上试验重复操作 3 次。以 FeSO<sub>4</sub> 标准溶液表示,样品总抗氧化能力表示为每克提取物干重中相当于 FeSO<sub>4</sub> 的毫摩尔数(mmol·g<sup>-1</sup>)。

## 3 结果

**3.1 各提取部位清除 DPPH 自由基能力** 对板蓝根各提取部位母液浓度按表 1 进行梯度稀释,测其清除率,用 GraphPad Prism 5.0 计算 IC<sub>50</sub>,结果见表 1。

**3.2 各提取部位还原 Fe<sup>3+</sup> 能力** 对板蓝根各提取部位母液浓度按照 2.2 方法测其还原 Fe<sup>3+</sup> 能力,结果见表 2。

以上结果显示:板蓝根颗粒组及中药各个提取物组均有不同程度的体外抗氧化效果。在 DPPH 自由基清除试验中,总木脂素 > 板蓝根颗粒 > 总有机酸 > 总生物碱,都要弱于阳性对照 VC。就同一组别来看,抗氧化药效与浓度成一定线性关系,浓度越高,药效越强。板蓝根各个总提取物组相比,总木脂素部位抗氧化效果最佳,特别在 FRAP 试验中,与阳性药组药效相近;其次为总有机酸、总生物碱。

表 1 板蓝根提取物对 DPPH 自由基的清除能力 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	清除率 /%	IC <sub>50</sub> /mg·L <sup>-1</sup>
总木脂素	0.033	19.08 ± 0.14	160.6 ± 0.84
	0.066	30.60 ± 0.26	
	0.13	49.33 ± 0.46	
	0.26	69.89 ± 0.17	
	0.53	87.16 ± 0.2	
	1.06	93.68 ± 0.18	
VC	0.002 5	7.21 ± 0.68	5.63 ± 0.19
	0.005	35.99 ± 0.29	
	0.01	60.28 ± 0.05	
	0.025	84.97 ± 0.08	
	0.051	88.61 ± 0.85	
	0.97	9.45 ± 0.42	
总生物碱	0.19	10.47 ± 0.60	-
	0.39	9.16 ± 0.76	
	0.78	13.94 ± 1.10	
	1.55	19.95 ± 2.27	
	3.1	19.52 ± 0.44	
	6.2	19.52 ± 0.44	
总有机酸	0.04	11.97 ± 0.14	1 387.67 ± 8.08
	0.09	17.76 ± 0.74	
	0.18	22.95 ± 0.79	
	0.36	20.37 ± 0.53	
	0.72	45.89 ± 1.60	
	1.44	62.16 ± 0.95	
	2.88	62.16 ± 0.95	
	5.76	62.16 ± 0.95	
板蓝根颗粒	0.031	14.08 ± 0.31	595.97 ± 10.65
	0.062	16.62 ± 0.18	
	0.125	20.96 ± 0.43	
	0.25	29.66 ± 0.71	
	0.5	43.71 ± 1.36	
	1.0	68.98 ± 1.96	

注：“-”表示在测试样品浓度中清除率达不到 50% 无法计算 IC<sub>50</sub>。

表 2 板蓝根提取物还原 Fe<sup>3+</sup> 的能力 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

总提取物	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	A	FRAP /mmol·g <sup>-1</sup>
总木脂素	1.06	0.614 ± 0.005	0.75 ± 0.01
总有机酸	1.44	0.248 ± 0.005	-
总生物碱	3.1	0.288 ± 0.018	-
板蓝根颗粒	1	0.364 ± 0.009	0.12 ± 0.01
VC	0.06	0.467 ± 0.002	0.78 ± 0.01

注：“-”表示测试浓度的吸光值太小，不宜通过标曲计算出 FRAP 值。

#### 4 讨论

板蓝根作为清热解毒类中药的代表之一，目前研究得比较深入的部分是其抗病毒和抗内毒素作用，有人认为清热解毒中药所解之毒不仅包括外源性之毒（细菌、病毒、内毒素），还包括氧自由基和过度释放的细胞因子等内源性之毒<sup>[13]</sup>。结果表明板蓝根 3 个有效部位均具有不同程度的抗氧化药效，其中以木脂素部位最佳，其次为有机酸部位，生物碱部位较弱。结合生物碱的具有较强的抗病毒作用，有机酸具有较强的抗内毒素作用，这也从多途径，多靶点解释其清热解毒的功效。抗氧化药效除本实验

进行的体外研究之外，还需进一步做体内试验，如测定血清和肝组织中的 SOD, GSH-Px, MDA；细胞试验，如对过氧化氢致细胞损伤的保护作用等，才能综合评价板蓝根有效成分解内源性之毒的作用。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:191.
- [2] 关炳峰, 谭军, 周志娣. 金银花提取物的抗氧化作用与其绿原酸含量的相关性研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28 (10):127.
- [3] 林冠宇, 姚楠, 何蓉蓉, 等. 淡竹叶总黄酮对拘束负荷所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (7):177.
- [4] 王燕, 王儒彬, 孙磊, 等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (16):109.
- [5] 李海冬. 板蓝根高级不饱和脂肪酸类似物的合成及其活性研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2008.
- [6] 李吉萍, 江鸿, 刘墨祥. 板蓝根多糖减肥调血脂与抗氧化作用研究[C]. 武汉:中国药理学会第九次全国会员代表大会暨全国药理学术会议, 2007.
- [7] 程妍, 李祥, 许金国, 等. 板蓝根有效部位的抑菌解热药效研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21 (6):589.
- [8] 李良, 王小兵, 杨蕾, 等. 四种植物中对香豆酸:辅酶 A 连接酶(4CL)的活性定量分析与酶调控组分的含量关系研究(英文)[J]. 中国天然药物, 2010, 8 (4):274.
- [9] 马莉, 唐健元, 李祖伦, 等. 板蓝根提取物中总有机酸和水杨酸含量测定方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10):804.
- [10] 何军, 祝林, 奉建芳. 附子总生物碱含量测定方法比较[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(6):20.
- [11] 吴宏伟, 唐力英, 杨洪军, 等. 基于抗氧化活性的丹参药材质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10):3.
- [12] Benzie I F F, Strain J J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration[M]//Abelson J N, Simon M I, Sies H. Methods in Enzymology. San Diego: Academic Press, 1999:15.
- [13] 陈凯, 窦月, 陈智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):275.

[责任编辑 聂淑琴]