

基于抗氧化活性的丹参药材质量评价

吴宏伟, 唐力英, 杨洪军*, 李曼玲, 李德凤
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 探讨从药效角度评价药材质量的方法。方法: 采用 1, 1-二苯基-2-苦肼基自由基 (DPPH) 法对 10 个产地丹参药材抗氧化能力进行评价, 评价结果与药材中总丹酚酸类成分的含量进行比较。结果: 不同产地的丹参具有不同的抗氧化能力, 其能力的强弱与总丹酚酸的含量成正比。结论: 采用 DPPH 法可以从抗氧化方面简便、快捷地评价丹参药材的质量。

[关键词] 丹参; 抗氧化; 1, 1-二苯基-2-苦肼基自由基; 质量评价

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0003-03

Quality Evaluation of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by Antioxidative Activity

WU Hong-wei, TANG Li-ying, YANG Hong-jun*, LI Man-ling, LI Defeng

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by testing the antioxidative activity. **Method:** The antioxidative activity of *Salvia miltiorrhiza* Bge. collected in ten areas was tested by scavenging the free radical of DPPH. And the results of evaluation were compared with the contents of total phenolic acids in the medicinal materials. **Result:** Antioxidative activities of *Salvia miltiorrhiza* Bge. from different areas were not the same. And the more content of the total phenolic acids was, the stronger antioxidative activity was. **Conclusion:** The method of scavenging DPPH radical was a simple and efficient way to evaluate the quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza* Bge.; antioxidative capacity; DPPH; quality evaluation

中药作用的特点是多种有效成分综合作用, 目

前中药质量控制主要以化学方法为主, 通过一个或几个成分的含量来评价药材的质量; 然而一方面有效成分难以确定, 另一方面几个有效成分的含量能否全面反应药材的质量仍需进一步研究, 因此建立成分与活性之间的关系是中药质量评价的关键问题之一, 甚至以简单、可靠的药效指标直接评价药材的质量也是很好的研究方法。

[收稿日期] 2009-05-12

[基金项目] 科技部科研院所社会公益研究专项
(2005DIA1J172)

[通讯作者] * 杨洪军, (010) 64014411-2948; E-mail: hongjun0420@sina.com

1, 1-二苯基-2-苦肟基自由基^[1] (DPPH) 是一种稳定的以氮为中心的自由基, 常用于体外评价物质的抗氧化能力。若受试物能清除它, 则提示受试物可能具有降低羟自由基、烷自由基、过氧自由基和打断脂质过氧化链反应的作用。丹参为中药活血化瘀常用药^[2], 现代药理研究表明其在心血管及抗氧化方面具有活性, 因此可以通过测定丹参药材清除 DPPH 自由基的能力从抗氧化的角度来评价丹参药材的质量。

1 材料

1.1 样品及试剂 DPPH(1, 1-二苯基-2-苦肟基自由基), Sigma 公司产品。10 个产地的丹参药材及紫外法测定的总丹酚酸的含量^[3] (由本所李曼玲老师提供, 见表 3)。

1.2 仪器 UV-T6 新世纪紫外分光光度器, KQ-500E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Sartorius 电子天平。

2 方法与结果

2.1 清除 DPPH 自由基的检测方法^[4,5] 精密称定 8.4 mg DPPH, 溶于 100 mL 量瓶中, 乙醇定容。分别精密吸取各丹参待测液 2 mL, 加入 2 mL 的 DPPH 溶液(0.084 mg·mL⁻¹), 摇匀后放置 30 min, 以溶剂为空白对照, 测定 517 nm 处的 Abs 值记为 A1; 同时测定上述待测液 2 mL 与 2 mL 空白溶剂混合后 517 nm 的 Abs 值记为 A2; 再测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 空白溶剂混合后 517 nm 的 Abs 值记为 A3; 将三值根据下式计算对 DPPH 自由基的清除率。清除率(%) = $[1 - (A1 - A2)/A3] \times 100\%$ 。

2.2 丹参提取液对 DPPH 自由基清除率的测定

2.2.1 线型范围考察 取 DPPH 母液(0.084 mg·mL⁻¹), 分别稀释成下系列浓度 0.052 5, 0.042, 0.033 6, 0.031 5, 0.025 2, 0.021, 0.016 8, 0.010 5 mg·mL⁻¹, 测定吸光度; 以吸光度为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 回归方程为: $Y = 23.443X - 0.0009, R^2 = 0.9982$ 。结果表明: DPPH 含量在 0.052 5~0.010 5 mg·mL⁻¹ 之间, 浓度与吸光度成线性相关。

2.2.2 丹参提取溶剂的确定 精密称定 0.5 g 丹参药材(粉碎, 过 20 目筛), 分别加入 95%, 50%, 30% 的乙醇 50 mL, 称重、超声处理 30 min, 补重。再精密吸取 1 mL 稀释 100 倍后作为待测液, 按 2.1 项下进行测定。结果丹参以 30%, 50%, 95% 乙醇为提取溶

剂对 DPPH 自由基的清除率($n = 3$) 依次为(40.81 ± 1.52)%, (43.13 ± 0.86)%, (14.69 ± 0.87)%。30%, 50% 乙醇提取液清除 DPPH 自由基的能力明显强于 95% 乙醇, 故确定乙醇提取浓度为 50%。

2.2.3 提取时间的考察 精密称定 0.5 g 丹参药材(粉碎, 过 20 目筛), 分别加入 50% 的乙醇 50 mL, 称重, 超声处理 15, 30, 45 min, 补重。再精密吸取 1 mL 稀释 100 倍后按 2.1 项测定。结果丹参以 50% 乙醇超声提取 15, 30, 45 min 提取液对 DPPH 自由基的清除率($n = 3$) 依次为(23.17 ± 1.89)%, (42.32 ± 2.17)%, (42.11 ± 1.45)%。超声提取 30 min 丹参提取液对 DPPH 自由基的清除率达到最大。

2.2.4 反应时间的考察 精密称定 0.5 g 丹参药材(粉碎, 过 20 目筛), 加入 50% 的乙醇 50 mL, 称重、超声处理 30 min, 补重。再精密吸取 1 mL 稀释 100 倍后按 2.1 项下进行处理, 反应时间考察范围为 0~140 min, 进行实时检测。由图 1 可以看出, 随着反应时间的延长, 吸光度逐渐缓慢减小, 120 min 后反应仍在进行, 说明丹参提取液清除 DPPH 自由基在常温下是一个缓慢的过程, 而且经加热实验并不能改变其变化趋势。故从实际操作角度出发, 本实验确定在加入 DPPH 溶液充分反应 30 min 后统一测定样品, 此时样品的吸光度变化趋于平稳, 保证测定的准确性。

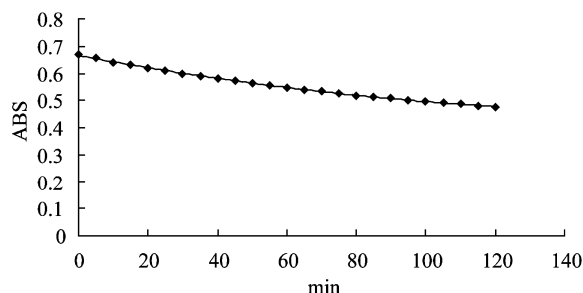


图 1 丹参提取液与 DPPH 液反应时间图

2.2.5 不同产地丹参药材的测定 取 10 个产地丹参药材, 包括同一产地家种及野生品种。粉碎过 20 目筛后, 分别精密称定 0.5 g, 加入 50% 的乙醇 50 mL, 称定, 超声处理 30 min 后补重。再分别稀释 20, 50, 100, 200, 400, 800 倍后, 按 2.1 项下分别测定, 并计算每个样品清除 DPPH 自由基的 IC₅₀, 根据 IC₅₀ 评价每个样品抗氧化能力的强弱, 结果见表 1。

采用 LSD-t 检验对不同产地丹参清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 进行统计分析, 山东平邑产丹参的 IC₅₀ 最小与其它产地比较具有显著差异($P < 0.05$), 表明其

抗氧化能力最强,且所含总丹酚酸的含量也最高;山东文登、四川中江所产丹参清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 最大,与其它产地丹参比较具有显著差异 ($P < 0.05$),表明其抗氧化能力最弱;河北承德家种及野生两个品种的 IC_{50} 差异显著 ($P < 0.05$),野生丹参抗氧化能力强于家种,且野生丹参总丹酚酸含量也高于家种。

表 1 不同产地丹参清除 DPPH 自由基的 IC_{50} ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

产地	总丹酚酸的含量 (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
河北承德家种	18.84	110.5 ± 4.4
承德野生	26.02	73.3 ± 3.1
青龙	18.84	111.9 ± 5.1
山东济南历城	20.64	68.1 ± 3.3
济南柳樟	24.98	88.7 ± 5.2
文登	15.79	151.3 ± 0.9
平邑	30.16	60.7 ± 6.3
湖北大悟	23.62	77.9 ± 6.7
四川中江	14.35	128.8 ± 11.0
江苏扬州	22.34	98.7 ± 10.4

总之,采用清除 DPPH 自由基的方法可以从抗氧化的角度直接评价不同产地丹参药材的质量,其评价结果与采用测定总丹酚酸法基本一致,同时也进一步说明用 DPPH 法评价丹参质量的可靠性。

3 讨论

目前用于评价药物抗氧化能力的方法很多^[6],主要分为体内和体外两种,体内实验成本高且繁琐,动物个体差异影响大;DPPH 法为体外实验筛选法,具有简便、迅速、影响因素少的特点,适合于中药质量的快速评价。不同物质与 DPPH 反应达到平衡所需的时间不同,如 $VC^{[3]}$ 与 DPPH 反应 20 min 即达到平衡,而丹参提取液与 DPPH 反应时间缓慢,经考察

反应 120 min 后样品的吸光度仍有微小变化,故从实际操作角度出发,本实验确定在加入 DPPH 溶液充分反应 30 min 后统一测定样品,此时样品的吸光度变化趋于平稳,保证测定的准确性。

如何控制中药的质量一直是中药研究工作者们所关心的问题,由于中药成分的复杂性,很难用一个或几个成分的含量评价中药的质量,本文从药效的角度出发采用清除 DPPH 自由基的方法直接评价不同产地丹参药材的质量,并与化学测定结果相比较,进一步验证方法的准确性、可行性。

从试验结果可以看出,丹参抗氧化能力主要与总丹酚酸含量有关外,总体上总丹酚酸含量越高抗氧化能力越强,但对于总丹酚酸含量接近的样品,两种方法评价结果并不完全一致,说明当有效成分总量接近时,各个成分的比例可能对药理活性产生影响,这一点体现了中药的作用的复杂性,“组效关系”将是下一步值得探讨问题之一。

[参考文献]

- [1] 宋怀恩, 闻 韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(2): 119-122.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余 靖. 中药现代研究[M]. 北京: 学院出版社, 1997: 1039-1194.
- [3] 马晓雷. 野生与栽培丹参化学成分研究[D]. 中国中医科学院中药所, 2005: 51-68.
- [4] 李小飞, 张 伟, 薛淑媛, 等. 两种测试方法对 DPPH 分光光度法测试结果的影响[J]. 生物技术, 2007, 17(4): 51-53.
- [5] 向志军, 赵广荣, 元英进, 等. 复方丹参的体外抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2006, 37(2): 211-213.
- [6] 彭长连, 陈少薇, 林植芳. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.