

鹿药提取物清除羟基自由基的研究

赵淑杰^{1,2}, 韩忠明², 李彦颖², 杨利民²

(1 吉林农业大学 资源与环境学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要:采用浸提、索氏提取、大孔吸附树脂分离等技术制备鹿药提取物,包括:鹿药水提液、醇提液、醇提水溶液,醇提液浓缩后经大孔树脂柱水洗后依次用 φ 为30%、50%、70%、90%的乙醇洗脱分离得到I、II、III、IV4部分干物质,从III中分离得到5个黄酮类化合物:3-甲氧基-8-甲基槲皮素(A)、8-甲基木犀草素(B)、3'-甲氧基木犀草素(C)、木犀草素(D)和槲皮素(E)。采用邻二氮菲- Fe^{2+} - H_2O_2 氧化法测定鹿药提取物抗氧化清除羟基自由基($\text{HO}\cdot$)的能力,结果表明,在试验浓度范围内,除鹿药醇提液之外,其他提取物制备液都具有清除 $\text{HO}\cdot$ 的作用,清除率23.30%~98.07%,其中5个黄酮单体化合物清除 $\text{HO}\cdot$ 的能力较强,且随浓度增大清除作用增强,并且作用强度明显好于对照维生素C。可见鹿药中具有较好的抗氧化活性成分。

关键词:鹿药; 提取物; 黄酮; 羟基自由基; 抗氧化活性

中图分类号:Q 949.95;R 285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)02-0059-04

Study on the Scavenging Hydroxyl Radical of the Extracts from *Smilacina japonica*

ZHAO Shu-jie^{1,2}, HAN Zhong-ming², LI Yan-ying², YANG Li-min²

(1 College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The extractions from the rhizomes of *Smilacina japonica* were obtained through hot water extraction, Soxhlet's extraction and macroporous adsorbing resin. Obtained water extraction, alcohol extraction, water solution of alcohol extraction from the rhizomes of *Smilacina japonica*, and I, II, III, IV four parts of matter were isolated from alcohol extract by macroporous adsorbing resin method in turn with 30%, 50%, 70%, 90% ethanol elution, and five flavonoids, 3-methoxy-8-methylquercetin (A), 8-methyluteolin (B), 3'-methoxyluteolin (C), luteolin (D) and quercetin (E) were isolated from the III. The method of phenanthroline- Fe^{2+} - H_2O_2 reaction system was used to measure scavenging effect to hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$). The results showed that all extracts of *Smilacina japonica* had ability to scavenge hydroxyl radical, the scavenging ability was 23.30% - 98.07% except alcohol extraction, the scavenging ability of five compounds were stronger even than that of Vit C in dose-dependant manner. Therefore, plant of *Smilacina japonica* has good antioxidant active ingredient.

Key words: *Smilacina japonica*; extraction; flavonoid; hydroxyl radical; antioxidation

许多疾病与自由基导致的生物大分子氧化损伤有关,尤其是活性氧与心血管疾病、糖尿病、癌症等密切相关。当前在药物工业中合成的各种抗氧化剂对肝脏的损伤和致癌作用已成为不容忽视的问题^[1]。因此,为了减小自由基对人体的危害,开发具

有低毒、高效的天然抗氧化剂已成为当前研究的热点之一。羟基自由基($\text{HO}\cdot$)是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基,因此,对 $\text{HO}\cdot$ 清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标。

鹿药 *Smilacina japonica* 为百合科鹿药属植物,鹿

收稿日期:2009-03-20

作者简介:赵淑杰(1976—),女,讲师,博士;通信作者:杨利民(1963—),男,教授,博士,E-mail:ylmh777@126.com

基金项目:吉林省科技发展计划重大项目(20075022)

药的干燥根茎及根为我国民间常用中药^[2],性味“甘、苦、温,无毒”,具有补气益肾、祛风除湿、活血调经功能,用于治疗风湿骨痛、神经性头痛、乳腺炎、月经不调、痈疖肿毒、跌打损伤等.鹿药属 *Smilacina* 植物在我国资源十分丰富,储量非常大^[3].除鹿药外,管花鹿药 *S. henryi*、高大鹿药 *S. atropurpurea*、紫花鹿药 *S. purpurea* 等也可药用^[4].除根茎入药外,有些种的地上部分是受人们喜爱的山野菜^[5].对于我国具有药、食两用价值的丰富鹿药属植物的研究,主要集中在生药鉴定与营养元素测定方面^[6-7],也有从鹿药属植物中分离出核苷^[8]和皂苷^[9]类化合物的报道,药理研究表明其皂苷具有抗真菌和抗肿瘤活性,而有关其他化学成分及药理研究鲜见报道.本研究通过制备鹿药提取液及从中分离得到的几个黄酮化合物清除羟基自由基作用的试验,以考察其抗氧化活性,旨在为开发利用鹿药属野生植物资源提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

鹿药全草采于吉林省左家老虎头山,经吉林农业大学中药材学院杨利民教授鉴定确定,洗净根及根茎,自然晾干,机械粉碎,备用.

1.2 仪 器 与 试 剂

电子分析天平、UV-1700 紫外分光光度计(日本岛津公司产品);D101 型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司产品),芦丁对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号:100080-200306),其他药品均为分析纯.

1.3 试 验 方 法

1.3.1 提取物的制备 精密称取 2.00 g 鹿药粉末,100 mL 水 85 °C 浸提 5 h 后抽滤,减压浓缩,真空干燥,称质量,干物质得率为 33.65%,用水定容至 100 mL,即得干物质质量浓度为 6.73 mg · mL⁻¹ 的水提液,冷藏备用.

精密称取 2.00 g 鹿药粉末,加 φ 为 90% 的乙醇 100 mL,索氏提取至无色(约 5 h)后抽滤,稍减压浓缩后用 φ 为 90% 的乙醇定容至 100 mL,即得鹿药的醇提液,备用.

另制备 1 份醇提液,将其减压浓缩,真空干燥,称质量,干物质得率为 36.72%,用水定容至 100 mL,即得干物质质量浓度为 7.34 mg · mL⁻¹ 的鹿药醇提水溶液,冷藏备用.

取鹿药醇提液过 D101 大孔吸附树脂柱,依次用

水和 φ 为 30%、50%、70%、90% 的乙醇洗脱,乙醇洗脱液分别减压浓缩,真空干燥得 I、II、III、IV 4 份干物质;将 III (φ 为 70% 乙醇洗脱物) 进行分离得到 5 个黄酮类化合物(A~E):3-甲氧基-8-甲基槲皮素(A)、8-甲基木犀草素(B)、3'-甲氧基木犀草素(C)、木犀草素(D)和槲皮素(E)(黄酮单体化合物的分离鉴定另作报道).分别称取 I、II、III、IV 干物质及 5 个黄酮单体化合物加 φ 为 20% 的乙醇配制成 0.4 mg · mL⁻¹ 的供试液,冷藏备用.

1.3.2 总黄酮含量测定 标准曲线的制定:精密称取芦丁对照品 10 mg,用 φ 为 90% 的乙醇配制成 0.10 mg · mL⁻¹ 的标准溶液.精密吸取标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,加 φ 为 90% 的乙醇补至 7.00 mL,再分别加入 50 mg · mL⁻¹ 的 NaNO₂ 溶液 2.0 mL,摇匀,放置 6 min,加 100 mg · mL⁻¹ 的 Al(NO₃)₃ 溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,加 40 mg · mL⁻¹ 的 NaOH 溶液 15.0 mL,最后用 φ 为 90% 的乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min.以第 1 瓶为空白,在波长 505 nm 处测光密度($D_{505\text{ nm}}$),以 $D_{505\text{ nm}}$ 为纵坐标,质量浓度(ρ)为横坐标,绘制标准曲线.其线性回归方程为: $D_{505\text{ nm}} = 0.5906\rho + 0.0039$, $R^2 = 0.9992$ (ρ 为每 25 mL 溶液中所含芦丁的质量),结果表明,芦丁在 0.004~0.028 mg · mL⁻¹ 质量浓度范围内线性良好.

按照标准曲线制定方法,分别测定鹿药水提液、醇提水溶液、及 I、II、III、IV 中总黄酮含量.

1.3.3 羟基自由基的测定 参照邻二氮菲-Fe²⁺-H₂O₂ 法^[10].吸取 1.5 mL 邻二氮菲溶液(5 mmol · L⁻¹),加入到 2.0 mL 磷酸缓冲液(PBS, 0.2 mol · L⁻¹, pH 7.4)中,充分混匀,加 1.0 mL FeSO₄ 溶液(7.5 mmol · L⁻¹),立即摇匀,再加 1.0 mL φ 为 0.1% 的 H₂O₂ 溶液,最后用去离子水补至 10 mL,在 37 °C 水浴中反应 60 min 后,测定 $D_{512\text{ nm}}$ (损伤);同上述方法,加入鹿药提取物后加入 H₂O₂,测定 $D_{512\text{ nm}}$ (加药);不加入提取物和 H₂O₂,测定 $D_{512\text{ nm}}$ (未损伤).所有测定以 2.0 mL PBS 加 8.0 mL 去离子水为参比.样品对 HO· 的清除率按下式计算:

$$\text{清除率} = [D_{512\text{ nm}}(\text{加药}) - D_{512\text{ nm}}(\text{损伤})] / [D_{512\text{ nm}}(\text{未损伤}) - D_{512\text{ nm}}(\text{损伤})] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 鹿药提取物中总黄酮含量

为确定鹿药抗氧化活性与总黄酮含量之间的相关性,测定鹿药水提液、醇提水溶液、部分分离物 I、

II、III、IV干物质中总黄酮的质量分数,结果分别为0.14%、0.43%、4.08%、17.28%、3.57%、2.73%。

2.2 鹿药水提取物和醇提取物对HO·的清除作用

分别取鹿药水提液、醇提液和醇提水溶液各0.20、0.60、1.00、1.40、1.80、2.20 mL,按“1.3.3方法”测定光密度,并计算对HO·的清除率,结果见图1。在试验用量范围内,鹿药水提液对HO·的清除能力大于醇提液和醇提水溶液;水提液和醇提水溶液对HO·的清除能力与其用量呈正相关,其量效线性相关方程分别为 $Y=11.709X+11.545, R^2=0.9196$ 和 $Y=7.708X+9.749, R^2=0.8477$,水提液线性相关系数较醇提水溶液大;而醇提液对HO·的清除能力与其用量呈负相关,与醇提水溶液相比,这可能与醇提液体系中乙醇含量增高有关;水提液用量达到1.4 mL后,对HO·的清除率增长平缓。

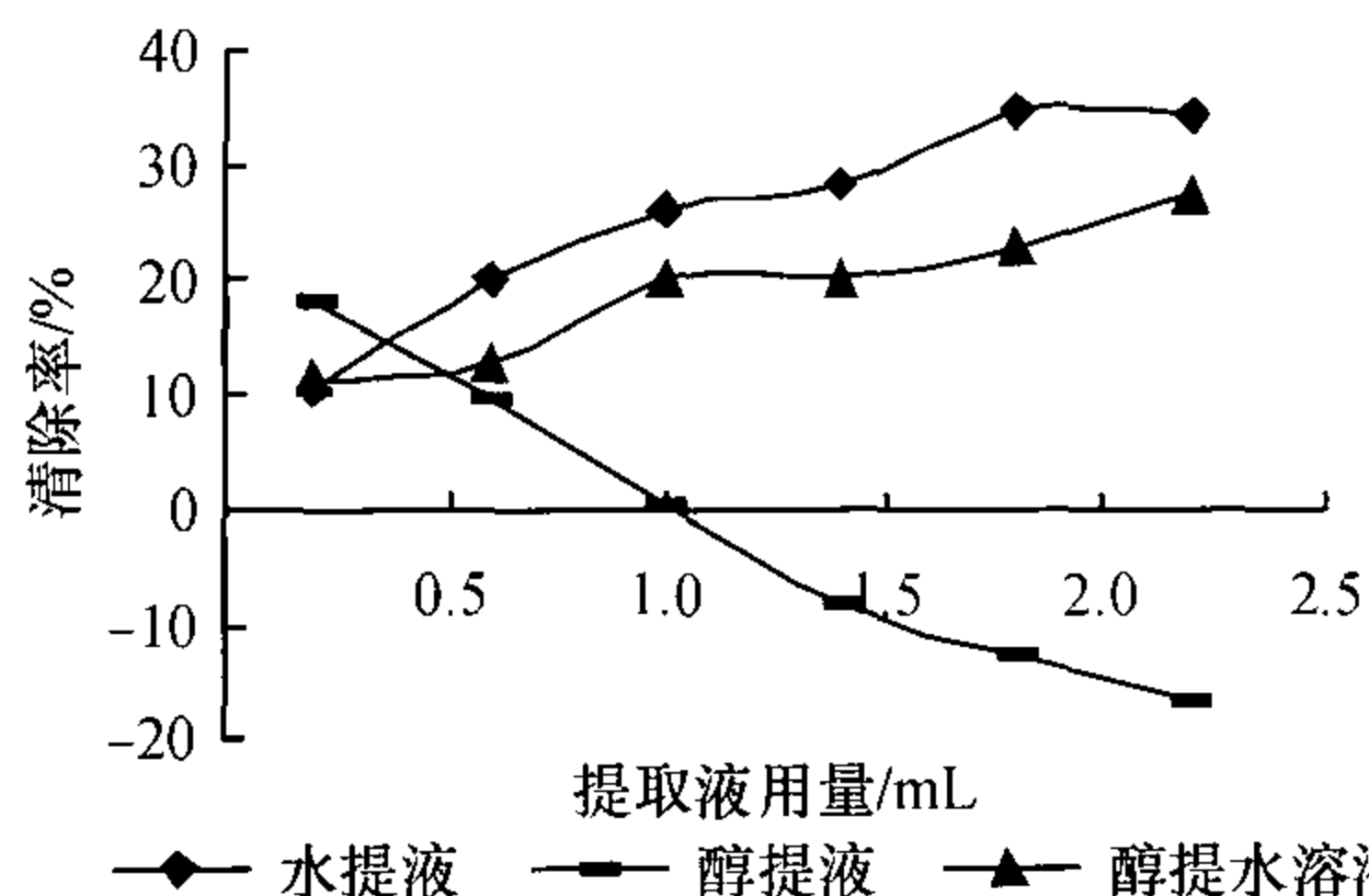


图1 鹿药水提取物和醇提取物对HO·的清除作用

Fig.1 The hydroxyl radical scavenging activity of water extract and alcohol extract from *Smilacina japonica*

2.3 鹿药大孔树脂分离物对HO·的清除作用

分别量取I、II、III、IV的供试液各0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、1.00、1.40、1.80 mL,按“1.3.3方法”测定光密度,并计算对HO·的清除率,试验以相同质量浓度的维生素C(V_C)为对照品,结果见图2。在试验浓度范围内鹿药提取物I、II、III、IV对HO·都具有一定的清除能力,在低用量范围内清除率随体系中所加供试液增多而增大,达到一定量后随供试液用量增加对HO·清除率反而下降;试验中各供试液用量在0.05~0.50 mL范围内对HO·的清除率高于V_C,各供试液用量在0.60~1.40 mL范围内,III和IV对HO·的清除率高于V_C,而I和II对HO·的清除率明显低于V_C,供试液用量达到1.8 mL时各供试液对HO·的清除率均低于V_C。

2.4 鹿药中黄酮单体化合物对HO·的清除作用

分别量取A、B、C、D、E供试液各0.20、0.60、1.00、1.40、1.80、2.20 mL,按“1.3.3方法”测定光密

度,并计算对HO·的清除率,试验以相同质量浓度的V_C为对照品,结果如图3所示。5个黄酮单体化合物对HO·的清除能力与其用量呈正相关,其量效线性相关方程及对HO·的50%清除率用量见表1,以各化合物对HO·的50%清除率作比较,其活性顺序为A>D>E>B>C。在试验用量范围内,化合物A、B、D、E对HO·的清除率均高于V_C的清除率,化合物C用量≥1 mL后对HO·的清除能力强于V_C。各化合物的最大试验用量对HO·的清除能力都显著强于V_C,其中D的清除率最高,达98.09%。

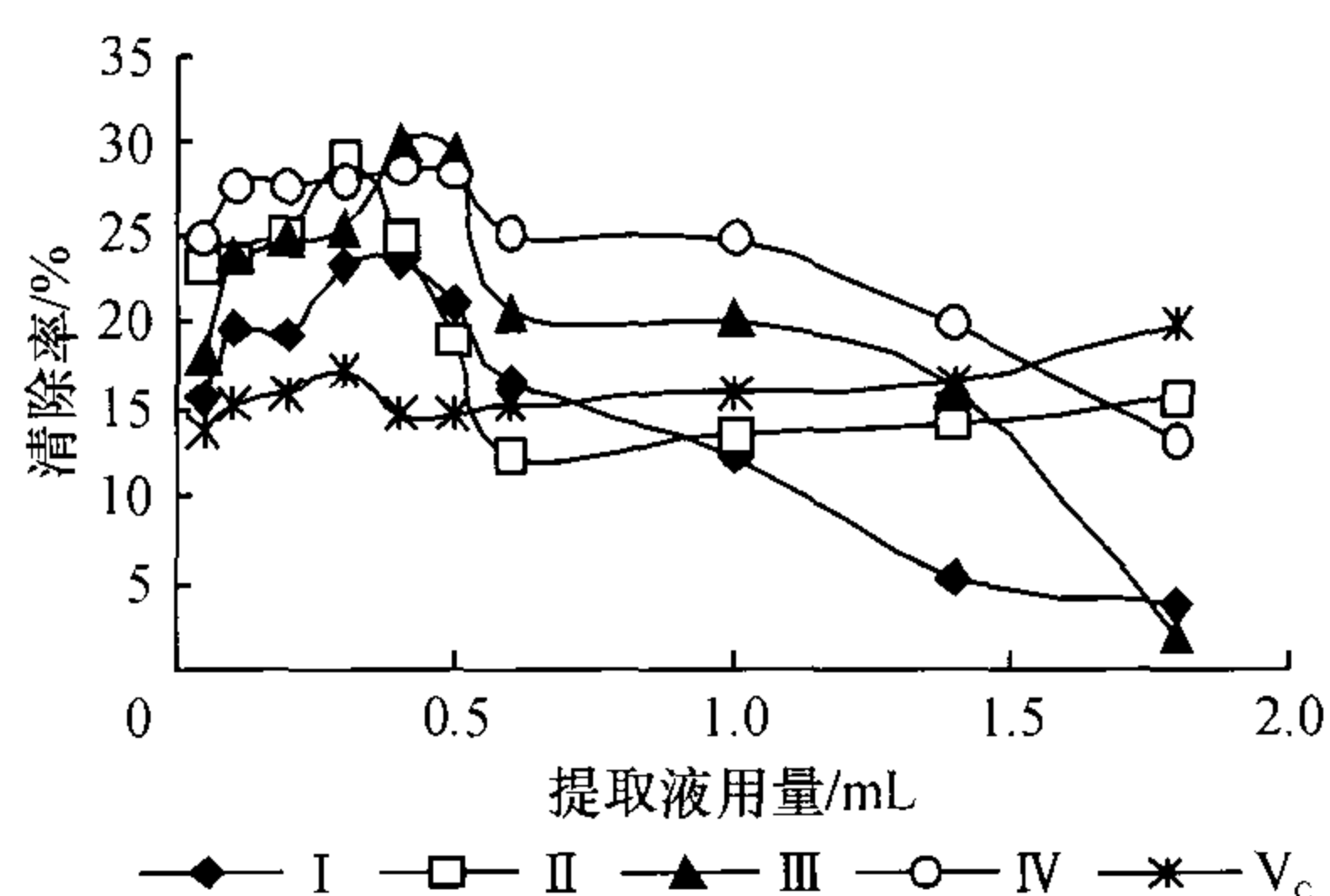


图2 鹿药大孔树脂分离物对HO·的清除作用

Fig.2 The hydroxyl radical scavenging activity of macroprorous resin separations from *Smilacina japonica*

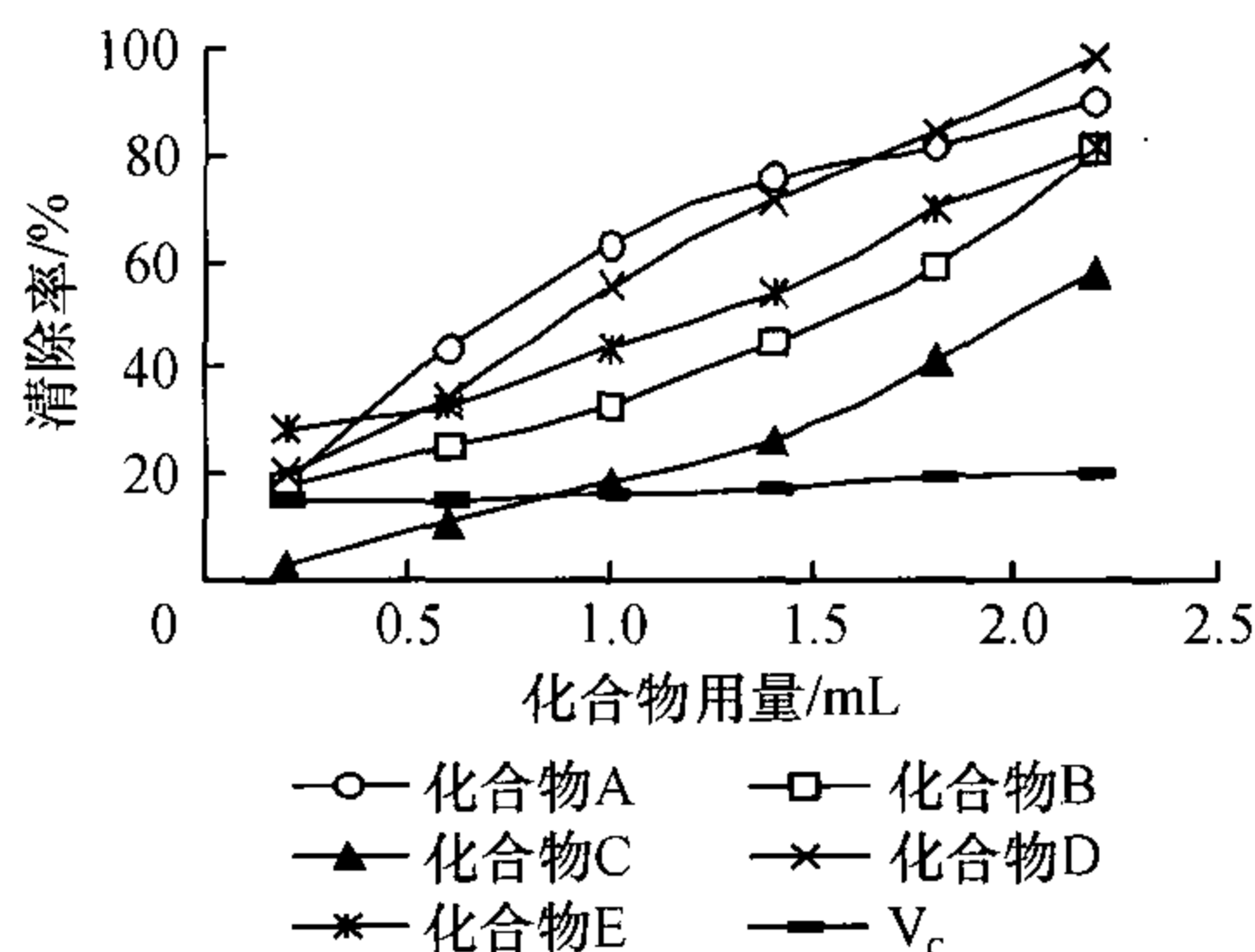


图3 鹿药中黄酮单体化合物对HO·的清除作用

Fig.3 The hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids monomeric compounds from *Smilacina japonica*

表1 鹿药中黄酮单体化合物对HO·清除作用的量效线性相关方程

Tab.1 Dose-effect relationship linear equations of the hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids monomeric compounds from *Smilacina japonica*

化合物	线性相关方程 ¹⁾	R ²	50%清除率用量/mL
A	$Y=34.402X+20.921$	0.933 3	0.845
B	$Y=30.634X+5.512$	0.955 3	1.452
C	$Y=27.050X-6.455$	0.964 7	2.087
D	$Y=39.511X+13.437$	0.993 4	0.925
E	$Y=27.555X+18.544$	0.954 1	1.142

1)Y为清除率,X为化合物用量。

3 讨论

预试验结果显示用 φ 为90%的乙醇索氏提取鹿药,其总黄酮含量最高,因此用 φ 为90%的乙醇提取得鹿药醇提物.鹿药的水提液和醇提水溶液对HO·的清除能力按体系中总黄酮含量计,其清除率都随总黄酮含量的增加而增高,这似乎可以说明鹿药提取液的抗氧化作用与黄酮类物质有关.另外,5个黄酮化合物是从鹿药醇提物的 φ 为70%的乙醇洗脱部分中分离出来的,5个单体化合物对HO·的清除率与浓度均呈良好的线性正相关,在本试验范围内最高清除率达到58.05%~98.07%;而 φ 为70%乙醇洗脱部分对HO·的清除率与供试液用量不呈线性相关,其最大清除率为30.16%.可见,黄酮类单体化合物具有较强的清除自由基作用,是鹿药中主要的抗氧化活性成分.但是,水提液和醇提水溶液按鹿药原材料的质量浓度比较,二者相同,按提取物干物质浓度比较,醇提水溶液干物质质量浓度比水提液的大 $0.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按总黄酮含量比较,醇提水溶液总黄酮含量为水提液的3倍,但是醇提水溶液对HO·的清除能力小于水提液,说明鹿药提取物的抗氧化活性成分除黄酮类化合物外,可能与水提取液中复杂的其他成分协同作用有关,其他抗氧化物质有待更进一步的研究.

鹿药的部分分离物I、II、III、IV在试验范围内,当物质用量达到0.5 mL左右时,对HO·的抑制作用最好,最高清除率分别为23.3%、29.2%、30.16%、28.6%,换算成总黄酮的含量比较各供试液对HO·的清除能力为:IV>III>II>I,当物质用量高于0.5 mL后,其清除率随物质用量增加呈降低趋势,这可能与4种干物质所用溶剂为 φ 为20%的乙醇有关,随着提取物用量增加,体系中乙醇含量增加,这与鹿药的醇提液直接用于清除HO·时随用量增加清除率反而下降一致.这些现象说明:在提取物比较复杂的条件下,黄酮类化合物对自由基氧化的抑制作用,受黄酮类物质浓度的影响;也与溶剂有关,乙醇对鹿药提取物清除HO·的能力有影响;此外,也与黄酮类化合物的种类有关,通常中草药提取物进行大孔树脂柱分离时, φ 为90%和70%的乙醇洗脱部分多含有苷元, φ 为50%乙醇洗脱部分多含单糖苷、二糖苷, φ 为30%乙醇洗脱部分主要为多糖苷^[11],化合物中羟基成苷会使黄酮的抗氧化性降低,甚至消失.

据文献[12]报道,黄酮类物质的抗氧化性强弱

与黄酮的具体结构有关,B环是黄酮类物质抗氧化、清除自由基的主要活性部位,4'-OH为强抗氧化性基团,是决定抗氧化性强弱的第1位因素;当4'-OH存在时,3'-OH和5'-OH属于增效基;A环7-OH属于增效基.本试验结果表明,5个黄酮化合物为木犀草素和槲皮素及它们的衍生物,其中化合物A、B、D、E的酚羟基数目都为4个,而且取代在B环的3'、4'位和A环的5、7位,化合物C为3个酚羟基,3'位羟基被甲氧基取代,因此化合物C清除HO·的作用小于其他4个化合物,但是它们清除HO·的活性都好于V_C.这与文献[12]报道一致.

鹿药的总提取物、部分分离物及单体化合物对HO·都有一定的清除能力,说明鹿药具有一定的抗氧化活性.

参考文献:

- [1] WANG Zhao-jing, LUO Dian-hui. Antioxidant activities of different fractions of poly saccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(1):54-58.
- [2] 江西新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008:2235-2236.
- [3] 傅立国. 中国高等植物:第13卷[M]. 青岛:青岛出版社, 2002:191-197.
- [4] 江纪武. 药用植物辞典[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2005:755.
- [5] 吕丽芬,袁理春,赵琪,等. 滇西北野生柱鹿药的资源分布与保护利用[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(3):17-18.
- [6] 唐自慧,逢云莉,何兴金,等. 鹿药属植物叶表皮特征及其系统学意义[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(6):550-557.
- [7] 张加研,周蛟,刘祥义. 云南高黎贡山管花鹿药茎叶营养成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 4:45-47.
- [8] 杨顺利,刘锡葵. 竹叶菜中的核苷类化学成分[J]. 中国天然药物, 2003, 1(4):196-198.
- [9] ZHANG Ying, LI Hai-zhou, ZHANG Ying-jun, et al. Atropurosides A-G, new steroidal saponins from *Smilacina atropurpurea* [J]. Steroids, 2006, 71(8):712-719.
- [10] 金鸣,李金荣,吴伟. 食品红花黄色素抗氧化作用的研究[J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(2):174-176.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:70-71.
- [12] 王婷,张金超,陈瑶,等. 6种淫羊藿黄酮抗氧化和抗肿瘤活性的比较[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8):715-718.

【责任编辑 李晓卉】