

大黄提取物抗氧化活性与游离蒽醌相关性的研究

吕慧英^{1,2}, 赵晨曦^{1*}, 吴海², 梁逸曾^{2*}, 李强¹

(1 长沙学院 生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003; 2 中南大学化学化工学院 中药现代化研究中心, 湖南 长沙 410083)

摘要:目的 优化大黄抗氧化物的提取条件, 以及研究大黄抗氧化活性与蒽醌的相关性。方法 以大黄提取物清除 DPPH 自由基的能力为参考指标, 考察溶剂种类、乙醇浓度、料液比、提取时间、提取次数等因素对大黄提取物抗氧化活性的影响; 应用偏最小二乘法建立 DPPH 自由基清除能力与游离蒽醌之间的关系模型, 对大黄提取物 DPPH 自由基清除能力进行预测。结果 确定了大黄抗氧化物的最佳超声提取条件为: 以 70% 乙醇为溶剂、料液比为 1: 30 (g/mL)、超声提取 2 次、每次提取 20 min, 超声提取 > 浸提 > 回流提取, 超声提取物清除率最高达 95.2%。PLS 模型的预测值与测定值间的相关系数(R) 为 0.954 8, 均方根误差(RMSEP) 为 0.032 4。结论 PLS 模型预测提示芦荟大黄素、大黄素与大黄提取物 DPPH 自由基清除能力呈现正相关, 而大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚与大黄提取物 DPPH 自由基清除能力呈现负相关。

关键词: 大黄; 蒽醌; 抗氧化活性; 偏最小二乘法; 超声提取

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)03-0412-04

大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根和根茎。大黄抗氧化活性的研究已有报道^[1], 但比较多的是对脂质体系的抗氧化作用^[2]和清除羟基自由基的研究^[3]。清除 DPPH 自由基法是一种快速、简便、灵敏的评估植物抗氧化能力的可行方法, 被广泛应用到评价各种天然产物的自由基的清除^[4]。自由基的清除能力与酚的量有高相关性已经在谷类植物^[5]、水果、饮料研究中有报道。DPPH 自由基清除测定法的结果显示, 在易感生物体和食物系统中, 氢和(或)电子供体的吸收, 可以阻止活性自由基接触如脂蛋白、多不饱和脂肪酸、DNA、氨基酸、蛋白质和糖等活质分子^[6]。大黄主要有效成分为蒽醌类衍生物, 包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚以及与葡萄糖结合成苷, 5 种游离蒽醌是大黄以及衍生中药大黄属质量控制的基础。然而, 关于游离蒽醌化合物及其量对于大黄的药效如抗氧化活性的影响研究却鲜有报道。本实验采用偏最小二乘法将大黄提取物抗 DPPH 自由基能力与游离蒽醌相关联, 为大黄药材的有效提取和抗氧化作用机制研究提供参考。

1 仪器和材料

Agilent 1100 型 HPLC (四元梯度泵, DAD 检测器, HP Chem Station 色谱工作站, 美国安捷伦科技), 上海 BRANSON SB2200 超声波发生器,

D1810C 型电子分析天平(上海申生科技有限公司), UV-2100 型紫外分光光度计(日本岛津)。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品购自中国药品生物制品检定所; 四川产大黄药材购于湖南国杏中药饮片有限责任公司, 经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 药材于 40 °C 干燥, 粉碎过 40 目筛, 贮于干燥器中置暗处保存备用; 甲醇、乙腈、磷酸均为江苏汉邦科技有限公司生产的色谱纯, 二次蒸馏水, 乙醇、醋酸乙酯、石油醚、正己烷均为北京化工厂生产的分析纯试剂, DPPH (Sigma 公司)。

2 方法与结果

2.1 对 DPPH 自由基的抑制试验方法: 取 2 mL 以甲醇配制成的 DPPH 溶液, 浓度为 2.0×10^{-4} mol/L, 与等体积不同浓度的大黄提取物充分混匀, 30 min 后在 517 nm 处测量其吸光度 AS, 控制样本用甲醇代替提取物, 以纯甲醇为空白样本, 计算对 DPPH 自由基的清除率 (S)^[7]。IC₅₀ 定义为抑制 50% 自由基所需的样品浓度, 通过获得的抑制 DPPH 回归方程计算所得。

$$S = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为控制样本的吸光度; A_s 为测试样本的吸光度

2.2 大黄提取物制备条件的优化

2.2.1 溶剂种类的选择: 称取 0.5 g 大黄细粉, 分

①收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 科技部中药国际合作项目(2007DFA40680); 湖南省科技计划项目(2007FJ3094)

作者简介: 吕慧英(1981—), 女, 硕士研究生, 从事中药现代化的分析与研究。E-mail: lhy110300@163.com

* 通讯作者 赵晨曦 Tel: (0731) 4261506 E-mail: cxzh003@gmail.com

梁逸曾 Tel: (0731) 8830831 E-mail: YiZeng_Liang@263.net

别加入 50 mL 不同溶剂(正己烷、石油醚、氯仿、醋酸乙酯、丙酮、甲醇、80% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、水), 超声提取 30min, 抽滤, 40 °C 下真空旋转蒸发至干, 后用甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中, 放入冰箱, 于 4 °C 下冷藏, 备用。分别移取 40 μL 大黄提取物样品于 10mL 量瓶中, 用甲醇定容, 对应药材质量浓度即为 0.2 mg/mL。上述溶液分别进行抗 DPPH 自由基的抑制试验(平行测定 3 次, 取平均值), 结果清除率分别为 5.6%、10.4%、10.2%、14.5%、20.6%、78.5%、90.2%、48%、87.4%、56.8%。可知 80% 甲醇提取物抗氧化能力最强, 70% 乙醇提取物次之; 正己烷、石油醚等低极性溶剂提取物抗氧化能力低, 不适宜用作提取剂; 水的极性最强, 但水提取物抗氧化能力并不高(56.8%), 考虑到甲醇有毒, 不宜用于食品和药物的加工, 而乙醇来源丰富, 成本低等诸因素, 本实验采用 70% 乙醇作为提取大黄的溶剂, 乙醇也是大多数研究工作和工业生产通常采用的溶剂^[8]。

2.2.2 乙醇体积分数的影响: 条件同 2.2.1, 考察不同体积分数乙醇(30%、60%、70%、80%、90%) 对提取物清除 DPPH 自由基能力的影响, 结果见图 1。可知, 乙醇体积分数在 30%~70% 大黄提取物抗氧化能力随乙醇体积分数的增加而增强, 乙醇体积分数达到 70% 时最强, 而后随乙醇体积分数的增加反而减弱, 且 90% 时抗氧化能力低于 30%。这可能是由于部分蒽醌类衍生物的低醇溶性导致的。综合考虑, 本实验选择 70% 乙醇提取。

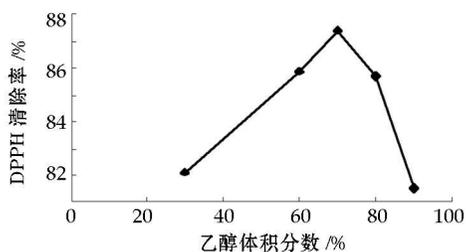


图 1 乙醇体积分数影响提取物清除 DPPH 自由基能力
Fig 1 Effects of ethanol concentration on DPPH free radical scavenging activity

2.2.3 超声提取时间的影响: 以 70% 乙醇为提取溶剂, 其他条件同 2.2.1, 考察不同超声提取时间(10、20、30、40、60 min) 对提取物清除 DPPH 自由基能力的影响。其测定结果如图 2 所示: 大黄提取物抗氧化能力在 10~20 min 快速增强, 20~30 min 几乎没有变化, 随后随提取时间的延长而减弱, 这可能是因为随着超声时间的延长、温度升高导致提取物不稳定从而降低抗氧化能力。因此确定提取时间为 20 min。

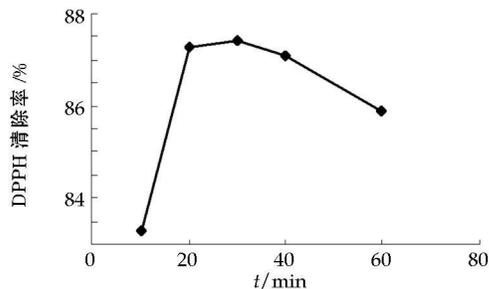


图 2 提取时间影响提取物清除 DPPH 自由基能力
Fig 2 Effects of extracting time on DPPH free radical scavenging activity

2.2.4 料液比的影响: 以 20 min 为超声提取时间, 其他条件同 2.2.3, 考察不同料液比(1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL) 对提取物清除 DPPH 自由基能力的影响, 结果分别为 60.1%、65.9%、66.4%、68.2%、68.9%、69.6%。可知大黄提取物抗氧化能力随料液比增加而增强, 1:30 料液比后增强缓慢。考虑溶剂耗量和回收溶剂的能耗, 选择 1:30 的料液比。

2.2.5 超声提取次数的影响: 以 1:30 g/mL 为料液比, 其他条件同 2.2.4, 考察不同超声提取次数(1、2、3) 对提取物清除 DPPH 自由基能力的影响。所得提取物对 DPPH 自由基的清除率依次为 83.4%、89.4%、90.0%。从工作效率和生产成本等因素考虑, 以两次提取较为合理。

2.2.6 提取方法的影响: 称取 0.5 g 大黄细粉, 加入 30 mL 70% 乙醇浸提 3 d, 抽滤, 40 °C 下真空旋转蒸发至干, 后用甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中, 放入冰箱, 于 4 °C 下冷藏, 备用, 作为浸提提取物。称取 0.5 g 大黄细粉, 加入 15 mL 70% 乙醇, 回流提取 1h, 抽滤, 再向滤渣中加 15 mL 70% 乙醇回流 1 h 后抽滤, 合并两次所得滤液, 抽滤, 40 °C 下真空旋转蒸发至干, 后用甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中, 放入冰箱, 于 4 °C 下冷藏, 备用, 作为回流提取提取物。称取 0.5 g 大黄细粉, 以料液比 1:30 加入 70% 乙醇溶液, 超声提取 2 次, 每次 20 min, 所得提取物分别经抽滤, 旋干后用甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中, 备用, 作为超声提取提取物。

移取上述溶液, 用甲醇配成不同浓度的溶液, 进行抗 DPPH 自由基的抑制试验。平行测定 3 次, 取平均值。结果见图 3。可知超声提取物自由基清除率最高, 其 DPPH 自由基清除率先增大后出现明显的平台, 到相当于药材浓度 0.3 mg/mL 时, 清除率达到最高 95.2%。对于图 3 中的曲线, 利用计算回归方程的方法计算得大黄超声提取、浸渍、回流提取

物的 IC₅₀ 值依次为 0.087、0.176、0.293 mg/mL, 结果与上述结论相同。

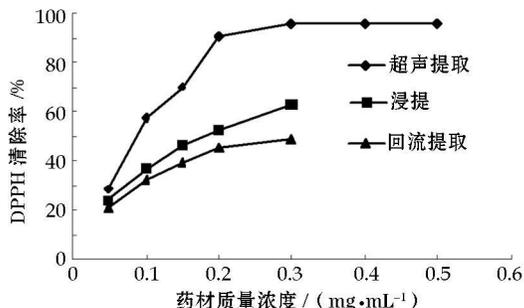


图 3 不同提取方法对大黄提取物清除 DPPH 自由基能力的影响

Fig 3 Effects of different extracting methods on DPPH free radical scavenging activity

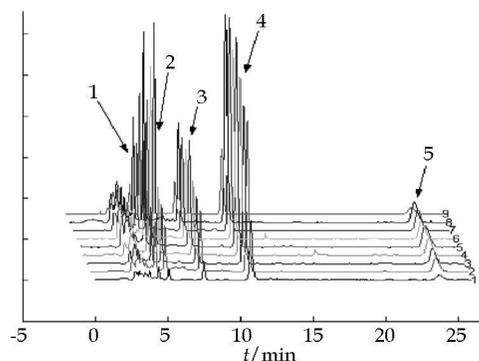
2.3 游离蒽醌对 DPPH 自由基清除能力的影响

2.3.1 HPLC-DAD 分析条件: Waters PAH C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇/乙腈/0.01% 磷酸缓冲溶液 (3: 5: 2); 检测波长: 225 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。进样液过 0.45 μm 的微孔滤膜后进行分析。

2.3.2 游离蒽醌的提取与测定: 称取 0.2 g 大黄细粉, 分别加入 30 mL 不同溶剂 (正己烷、氯仿、醋酸乙酯、丙酮、甲醇、80% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、水), 超声提取 20 min, 抽滤, 40 °C 下真空旋转蒸发至干, 加入

1 mol/L H₂SO₄ 30 mL 水解, 再加入 20 mL 三氯甲烷萃取 (萃取 3 次), 合并三氯甲烷层, 挥干, 用甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 放入冰箱, 于 4 °C 下冷藏, 备用。分别移取 2 mL 大黄提取物样品于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 对应药材质量浓度即为 4 mg/mL。

上述溶液分别进行游离蒽醌的测定和抗 DPPH 自由基的抑制试验 (平行测定 3 次, 取平均值)。其色谱叠加图见图 4, 游离蒽醌 (外标法测定) 及清除 DPPH 自由基的能力的测定结果见表 1。



1-芦荟大黄素 2-大黄酸 3-大黄素 4-大黄酚 5-大黄素甲醚
1-aloe emodin 2-rhein 3-emodin 4-chrysophanol 5-phycosin

图 4 大黄不同提取方法提取物的 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC Chromatograms of extracts of rhubarb by different extracting methods

表 1 蒽醌的量及游离蒽醌清除 DPPH 自由基的能力

Table 1 Contents of free anthraquinones and DPPH free radical scavenging activity

编号	溶剂	芦荟大黄素/ (mg · g ⁻¹)	大黄酸 (mg · g ⁻¹)	大黄素/ (mg · g ⁻¹)	大黄酚/ (mg · g ⁻¹)	大黄素甲醚/ (mg · g ⁻¹)	清除率/ %
1	正己烷	0.306	0.243	0.457	1.626	0.387	45.0
2	氯仿	1.210	1.213	1.592	4.371	1.147	48.3
3	醋酸乙酯	1.240	1.299	1.703	4.532	1.121	57.9
4	丙酮	1.396	1.490	1.916	5.137	1.416	50.6
5	甲醇	2.345	4.324	2.733	6.074	1.775	59.5
6	80% 甲醇	2.057	3.353	2.312	5.443	1.462	60.1
7	乙醇	1.902	2.572	2.439	6.207	1.713	60.0
8	70% 乙醇	2.336	3.937	2.583	5.965	1.658	65.3
9	水	0.715	2.414	0.829	1.844	0.527	27.3

2.3.3 抗 DPPH 自由基能力与游离蒽醌的 PLS 模型: 偏最小二乘法 (partial least square, PLS) 由于具有较强的提供信息的能力而成为化学计量学中最受推崇的多变量校正方法, 目前是最有效的分析方法之一, 它从自变量矩阵和应变量矩阵中提取偏最小二成分, 有效地降维, 并消除自变量间可能存在的复共线关系, 明显改善数据结果的可靠性和准确度^[9]。实验采用偏最小二乘 (PLS) 方法对大黄提取物 DPPH 自由基清除能力进行分析。首先采取留

一交互检验法确定最优主成分数为 3, 故选取 3 个主成分建立 DPPH 自由基清除能力与 5 种游离量之间的关系, 模型为 $y = 0.5576x_1 - 0.1478x_2 + 0.0810x_3 - 0.0437x_4 - 0.2574x_5 + 0.4034$ 。其中 y 为大黄提取物 DPPH 自由基清除能力, x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的量。根据此模型对大黄提取物 DPPH 自由基清除能力进行预测, 见图 5。其预测值与测定值间的相关系数 (R) 为 0.9548, 均方根误

差(RMSEP)为0.0324,说明建立的模型具有良好的预测能力。

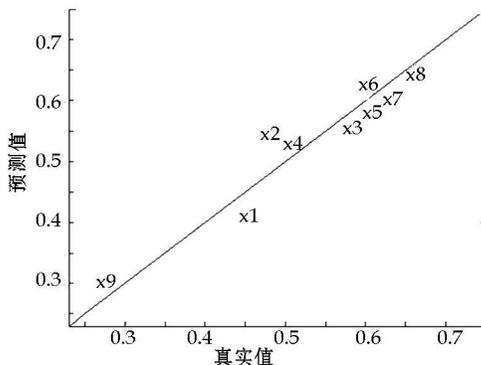


图 5 PLS模型预测结果(取3个主成分)

Fig 5 Prediction results of PLS model (three factors)

通过所建立的模型可以看出,芦荟大黄素和大黄素甲醚的回归系数的绝对值相对较大,分别为0.5576、0.2574,说明这两种物质的量对大黄提取物DPPH自由基清除能力的影响较大,而大黄酚的回归系数仅为0.0437,说明大黄酚对大黄提取物DPPH自由基清除能力的影响相对较弱。

3 讨论

本研究以提取物抗DPPH自由基能力为评价指标,确定了大黄抗氧化物的最适提取条件为:70%乙醇为溶剂,料液比1:30(g/mL),超声提取2次,每次提取20min。在同样的条件下,提取效率或清除率为超声提取法>浸渍提取法>回流提取法。这一结果为大黄抗氧化活性物质的有效提取提供了依据。

本实验采用PLS法就大黄提取物对DPPH自由基清除率与其中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的量进行关联,建立了大黄提取物抗氧化活性与5种游离蒽醌量之间的定量线性相关关系模型。结果表明,大黄提取物的抗氧化活性是各种性质物质的共同贡献。从模型的回归系数可以看出,芦荟大黄素、大黄素与大黄提取物DPPH

自由基清除能力呈现正相关,即抗氧化活性随芦荟大黄素、大黄素量的增加而增加;而大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚与大黄提取物DPPH自由基清除能力呈现负相关,即大黄提取物的抗氧化活性随这3种游离蒽醌量的增加而降低。这一结果与文献报道的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚清除羟基自由基能力一致的相关性^[10]。说明若提取物中芦荟大黄素、大黄素的量越高,或者大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的量越低,则大黄提取物DPPH自由基清除能力将会越强。这一结论为蒽醌类物质的抗氧化机制研究提供参考。

参考文献:

- [1] ztürk M, ztürk F A, Duru M E, et al. Antioxidant activity of stem and root extracts of *Rhubarb (Rheum ribes)*: An edible medicinal plant [J]. *Food Chem*, 2007, 103: 623-630
- [2] 张海晖,段玉清,裘爱泳. 大黄游离蒽醌及其衍生物对脂质体系抗氧化作用的研究[J]. *食品科技*, 2005, 8: 55-57
- [3] 熊辉岩,张晓峰,谭大风,等. 大黄属三种植物不同部分提取物清除羟基自由基的体外实验研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(1): 128-130
- [4] 邓红娟,郭延生,曲亚玲,等. 生当归、酒当归和油当归体外清除自由基洗性研究[J]. *中草药*, 2009, 40(5): 784-787
- [5] Peterson D M, Emmons C L, Hibbs A H. Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats [J]. *J Cereal Sci*, 2001, 33: 97-103
- [6] Arabshahī Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves [J]. *Food Chem*, 2007, 102: 1233-1240
- [7] Brandt Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT*, 1995, 28: 25-30
- [8] Hemwimon S, Pavasant P, Shotipruk A. Microwave assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* [J]. *Sep Puri Technol*, 2007, 54: 44-50
- [9] Zelditch M L, Swiderski D L, Sheets H D, et al. Partial least squares analysis [J]. *Geometric Morphometrics Biol*, 2004, 261-290
- [10] Yen G C, Duh P D, Chuang D Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone [J]. *Food Chem*, 2000, 70: 437-441