

DPPH·法评价伸筋草不同提取物清除自由基的能力

邹桂欣, 尤献民, 吴 怡

辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034

摘要: 目的 研究伸筋草石油醚、氯仿及正丁醇提取物在 DPPH·法体外模型中的抗氧化作用及作用时间与清除率的关系。方法 建立 DPPH 体系, 采用 HPLC 法测定反应体系中 DPPH 变化, 观察伸筋草各提取物不同时间对 DPPH 自由基的清除率。结果 伸筋草各提取物对 DPPH 的清除均有抑制作用, 且呈明显剂量-效应关系, 其清除率随作用时间增长而增加。石油醚、氯仿及正丁醇提取物对 DPPH 的 IC_{50} 分别为 0.56、0.31、0.13 g/mL; 结论 伸筋草正丁醇提取物具有较强的清除自由基活性。

关键词: 伸筋草提取物; 1,1-二苯基-2-苦肼基自由基; 高效液相色谱法; 评价; 清除能力

中图分类号: R977.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)05-0359-03

Evaluation of free radical scavenging ability of different extracts from *Lycopodium Herba* by DPPH· assay

ZOU Gui-xin, YOU Xian-min, WU Yi

Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicines, Shenyang 110034, China

Abstract: Objective To investigate the anti-oxidative activities of petroleum ether, ethyl acetate, and butanol extracts from *Lycopodium Herba* (ELH) using DPPH· model *in vitro*, and to study the relationship between action time and clearance rate. **Methods** The DPPH·-system was established, the change of DPPH in the system was determined by HPLC method, and the clearance rates of DPPH· by different ELH at different time points were observed. **Results** Anti-oxidative activity of butanol extract was the strongest, IC_{50} values of petroleum ether, ethyl acetate, and butanol extracts were 0.56, 0.31, and 0.13 g/mL, respectively. **Conclusion** The butanol extract has a strong ability of free radical scavenging.

Key words: extract from *Lycopodium Herba* (ELH); DPPH·; HPLC; evaluation; scavenging ability

伸筋草 (*Lycopodium Herba*) 为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草, 具有祛风除湿、舒筋活络之功效, 临床上主要用于风寒湿痹、关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤, 现代药理研究表明, 伸筋草具有抗炎、镇痛、调节免疫、抗风湿等作用^[1-3], 随着伸筋草在临床应用的不断扩大, 其在清除自由基方面的作用逐渐受到重视, 但目前伸筋草清除自由基的活性成分仍不明确, 影响了药物的开发应用。

1,1-二苯基-2-苦肼基自由基 (DPPH·) 是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 如果受试药物对它有清除作用, 则可说明受试药物可能具有降低体内羟基自由基、烷基自由基或过氧化自由基的浓度, 并可能具有打断脂质过氧化链反应的作用。本实验

采用 DPPH·模型观察了伸筋草各提取物对自由基的清除作用及作用时间与清除率的关系, 以期确定伸筋草清除自由基有效部位, 为进行伸筋草抗氧化活性成分的提取分离奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

伸筋草药材经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草; DPPH· (Sigma, 美国), 色谱甲醇 (美国天地公司), 乙醇、正丁醇、氯仿及石油醚等均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水; Agilent1100 液相色谱仪, DAD 二级管阵列检测器。

1.2 方法

1.2.1 伸筋草提取方法 取 1 kg 伸筋草药材, 粉碎,

收稿日期: 2012-06-18

基金项目: 国家 863 课题 (2004 AA 2Z3730-13)

作者简介: 邹桂欣 (1964—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事中药新药质量控制研究。Tel: (024)86803184 E-mail: yying_65@126.com

置于圆底烧瓶中,加入8倍量和6倍量70%乙醇溶液,分别回流2h及1h,滤过,滤液浓缩至无醇味,加水定容至1000 mL,即得到相当于原药材1 g/mL的乙醇提取液。

1.2.2 各提取物的制备 将上述提取液置分液漏斗中,用等倍量石油醚提取3次,合并石油醚提取液,减压干燥,得到石油醚提取物;提取后的水溶液用等倍量醋酸乙酯提取3次,减压干燥,得到醋酸乙酯提取物;醋酸乙酯提取后的水溶液再用等倍量正丁醇提取3次,减压干燥,得到正丁醇提取物。取各提取物适量,加甲醇超声提取30 min,制成相当于伸筋草生药材1 g/mL溶液,备用。

1.2.3 DPPH 高效液相测定色谱条件 YWG C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 10 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水(80:20),检测波长517 nm,体积流量1 mL/min。

1.2.4 各提取物清除 DPPH·活性的测定 参照 Yokozawa^[4]方法并改进,分别取以上制备不同组分溶液各10、20、30、40、50 μL,用80%甲醇补充至50 μL,摇匀,分别加入50 μL 0.1 mol/L DPPH·溶液,立即混匀,避光放置30 min,分别精密吸取各溶液5 μL,注入液相色谱仪中,测定,DPPH·试剂及与样品反应后的DPPH·液相色谱图见图1。

计算公式:清除率=[1-A/A₀]

式中A₀为未加试样的DPPH峰面积,A为抗氧化物质与DPPH·反应后的峰面积。

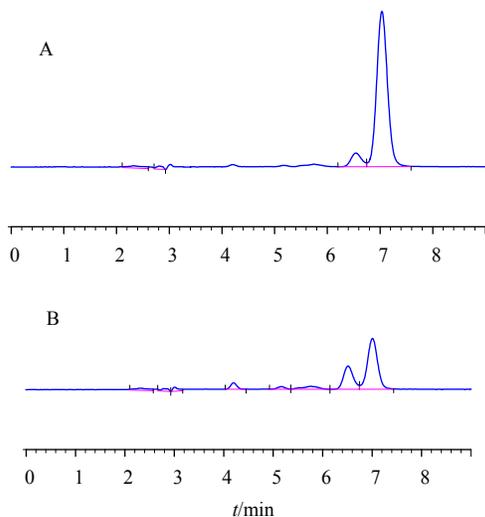


图1 DPPH·试剂(A)及其与样品反应后(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of DPPH reagents (A) and DPPH reagents reacted with samples (B)

1.2.5 半清除率的测定 半清除率(IC₅₀)指清除率为50%时所需抗氧化剂的浓度,根据不同浓度抗氧化剂的清除率,用Dax1.0软件计算。

1.2.6 反应时间对清除率的影响 取伸筋草石油醚提取物、氯仿提取物及正丁醇提取物溶液各25 μL,用80%乙醇补至50 μL,分别与50 μL DPPH·混合后,在0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12 h精密吸取5 μL,注入液相色谱仪中测定。

2 结果与分析

2.1 各提取物对 DPPH·的清除率

按上述方法,取不同组分溶液各10、20、30、40、50 μL,其清除DPPH·的作用结果见图2。

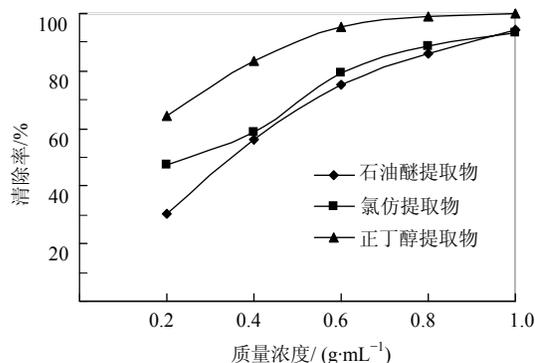


图2 伸筋草石油醚、氯仿、正丁醇提取物对DPPH自由基的清除率

Fig. 2 Clearance rate of DPPH radicals by petroleum ether, ethyl acetate, and butanol extracts

从图2可以看出,伸筋草石油醚、氯仿和正丁醇提取物对自由基清除作用有剂量依赖性,呈正相关,从整体看,正丁醇提取物的自由基清除率明显高于其他提取物。用Dax1.0软件计算石油醚、氯仿及正丁醇提取物对DPPH的IC₅₀,结果分别为0.56、0.31、0.13 g/mL

2.2 反应时间对 DPPH·清除率的影响

以各提取物与DPPH·反应时间为横坐标,以对DPPH·清除率为纵坐标制图,结果见图3。

由图3可以看出,随时间延长,各提取物的自由基清除率逐渐增大,在反应开始30 min至1 h时变化较大,之后随着作用时间加长,清除率缓慢增加,在1~3 h变化较小,可选择在此时间范围内测定比较。

3 讨论

本实验对DPPH自由基的测定方法进行了改进,采用HPLC方法,测定反应中DPPH自由基的

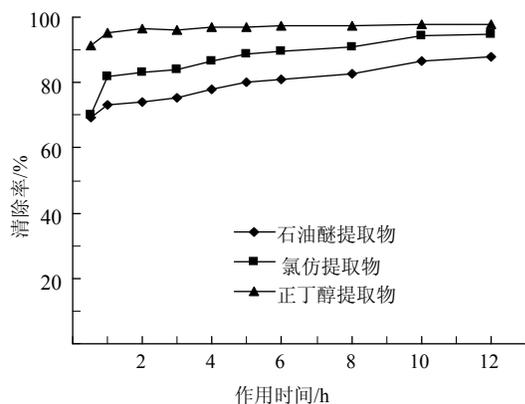


图3 石油醚、氯仿、正丁醇提取物对 DPPH·自由基作用时间与清除率关系图

Fig. 3 Time-clearance rate curves of petroleum ether, ethyl acetate, and butanol extracts on DPPH radicals

浓度，避免了伸筋草中色素对比色测定的干扰，使实验结果更准确，另外由于测定所需样品量很少，可以节约大量试剂。由于比色法可以同时测定多个样品，而高效液相色谱法所测样品必须依次测定，因此对供试液的稳定性要求较高，实验结果表明 DPPH 的保留时间为 7 min，测定时间 10 min，因此每隔 10 min 依次向样品中加入 DPPH，可消除由于测定时间不同造成的影响。本文考察了样品中加入 DPPH 后，在不同作用时间时清除率的变化趋势，结果表明在反应后 1~3 h 清除率变化较平稳，建议采用 HPLC 法测定 DPPH 在此时间范围内进行。

本文采用 DPPH·法对伸筋草不同提取物的体外抗氧化活性进行了评价研究，结果表明，各提取物均有不同程度的清除 DPPH·自由基作用，其中以正丁醇提取物的清除能力最强，氯仿提取物次之，石油醚提取物的作用较弱。据资料报道，伸筋草药材中主要含有三萜酸类、生物碱类及异黄酮类成分，三萜酸类成分易溶于石油醚等极性较小的溶剂中，生物碱类成分易溶于氯仿中，异黄酮类成分可溶解于正丁醇中，从实验结果分析，伸筋草中的三萜酸类及生物碱类成分的抗氧化性较弱，其所含生物碱对照品 α -玉柏碱对 DPPH 自由基基本无清除作用亦佐证了这一点，可能是其他极性较大的组分具有清除 DPPH·作用，提示其抗氧化成分的分离应在正丁醇提取物中进行。

参考文献

- [1] 郑海兴. 伸筋草煎剂对小鼠抗炎镇痛药理实验研究 [J]. 牡丹江医学院报, 2005, 26(2): 10.
- [2] 苗兵, 杨金, 周忠光. 伸筋草乙醇提取物对佐剂性关节炎大鼠类风湿因子和血清细胞因子的影响 [J]. 中医药信息, 2008, 25(3): 22.
- [3] 吕衡, 周忠光, 边晓燕. 伸筋草提取物对 AA 大鼠 RF 及 Ig 影响的实验研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2008, 24(3): 274.
- [4] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical scavenging activity of tea [J]. *Agric Food Chem*, 1998, 46: 2143.