

# 17 种清热中药抗活性氧作用的研究<sup>△</sup>

广西医科大学(南宁 530021)

龙盛京\*

广西中医学院

罗佩卓 章日昌

**摘 要** 为从天然产物中筛选出具有较好抗氧化性能的药物,利用  $H_2O_2$ -CTMAB-鲁米诺发光体系,研究了 17 种清热中药水提取物抗活性氧的作用。结果表明其对  $H_2O_2$  均有不同程度的清除作用,并呈量效关系。从抗氧化值(AOV)比较,白头翁(AOV=-0.836)抗氧化作用比维生素 C 强;连翘、鸦胆子、鱼腥草、半枝莲和大青叶(AOV<3)也具有较强的抗氧化能力。结果提示:白头翁、连翘、鸦胆子、鱼腥草、半枝莲和大青叶是首选的抗活性氧的药物。

**关键词** 化学发光分析法 抗活性氧 双氧水 清热中药

$H_2O_2$  为活性氧之一,活性氧分子在生物体内所引起的脂质过氧化可造成组织和细胞的损伤,从而引起病理过程。而机体内清除活性氧的活性物质不足是造成这种损伤的直接原因<sup>[1]</sup>。因此,从天然产物中寻找抗活性氧的物质已经引起国内外广泛重视。与人工合成的抗氧化剂相比较,中药抗氧化剂具有易得、经济,已有长期使用经验和毒副作用小等明显优点,故寻找和筛选具有良好的抗氧化性能的中草药对探索开发新药、指导老药临床新用及了解中药的作用机制等都有裨益。我们采用化学发光分析法,利用  $H_2O_2$ -CTMAB-鲁米诺发光体系,研究 17 种常用清热中药水提取物抗活性氧的作用。

## 1 实验材料与仪器

1.1 试样:受检中药均购自南宁药材站,经广西中医学院药学系周子静教授鉴定。金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera Japonica* Thunb 的干燥花蕾;白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge) Regel 的干燥根茎;黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎;山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gapnep 的干燥根及根茎;黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutel-*

*laria baicalensis* Georgi 的干燥根;天花粉为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 的干燥根;知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎;射干为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L)DC 的干燥根茎;黄柏为芸香科植物黄柏 *Phellodendron amurense* Rupr 除去栓皮的树皮;大青叶为十字花科植物松蓝 *Isatis indigotica* Fort 的干燥叶;连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia Suspensa* (Thunb) Vahl 的干燥果实;鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb 的干燥全草;栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实;半边莲为桔梗科植物半边莲 *Lobelia chinensis* Lour 的干燥全草;鸦胆子为苦木科植物鸦胆子 *Brucea javanica* (L) Merr 的干燥成熟果实;半枝莲为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草;玉竹为百合科植物玉竹 *Polygonatum oddratum* (Mill) Drnce 的干燥根茎。

1.2 试剂:鲁米诺(Luminol)为德国 Merck-schuchrat 公司产品;溴代十六烷基三甲胺(CTMAB)、双氧水、碳酸钠和碳酸氢钠等均

\* Address: Long Shengjing, Guangxi University of Medical Sciences, Nanning

龙盛京 男,副教授。广西师范大学化学系毕业,现任广西医科大学基础部副主任,广西高校化学学会常务理事。从事教学工作及医学自由基研究工作,目前研究方向:用化学发光方法研究天然产物抗活性氧的作用。曾参与承担并完成两项国家自然科学基金项目;现主持两项省教育厅科研项目。发表科研论文 30 余篇。

<sup>△</sup>国家自然科学基金资助项目 No 39060028

为国产分析纯试剂;所用水均为双蒸水。

1.3 仪器:DG3030 发光光度计(南京华东电子管厂生产)。

2 方法

2.1 供试液的制备:分别称取各受检中药材 5 g,用 150 mL 蒸馏水冷浸 1 h 后,煮沸 15 min,过滤,药渣第 2 次、第 3 次分别加水 100 mL 第 4 次加水 50 mL,各煮沸 15 min,合并 4 次滤液,水浴浓缩至 20 mL,装瓶备用(样品液 1 mL 相当于药材 0.25 g),临用时取原液 1 份,加双蒸水 4 份稀释成(1 mL 溶液相当于原药材 0.05 g)供试液。

2.2 固体物质含量的测定:准确量取中药水提液各 1.00 mL,置于经洗净,干燥至恒重的称量瓶中,于 105℃烘箱中烘烤 3 h,冷后称重,平行做 2 次,取平均值,以总固体含量 mg/mL 提取液表示。

2.3 测定方法:参照文献<sup>[2]</sup>的方法略加改进,以提高发光体系的发光强度和稳定性。在测定管中依次加入 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(临用时新配)100 μL、0.2 mol/L pH 10.77 碳酸盐缓冲液 500 μL,加入不同体积的供试液(同时用双蒸水作空白对照),混匀后置于仪器测定室中于 30℃加入 5 mmol/L 鲁米诺和 10 mmol/L CTMAB 的等量混合液 500 μL,启动反应,延时 15 s 后,测定 10 s 内发光强度的平均值。每种样品平行测定 3 次,取平均值。以下式计算相对清除率,用发光清除率的大小来表示中药清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用的大小。

清除率(%)= $\frac{\text{空白对照值}-\text{样品值}}{\text{空白对照值}}\times 100\%$

3 结果

3.1 表面活性剂对鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 发光体系的影响:按实验方法加入混合液 500 μL(鲁米诺 5 mL 与表面活性剂 5 mL 混合),同时以鲁米诺与双蒸水等量混合液作为空白对照,结果见表 1。结果表明,非离子型表面活性剂和阴离子型表面活性剂对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺发光体系基本无增强发光作用。而阳离子型

表面活性剂 CTMAB 能增强该体系的发光强度。

表 1 不同表面活性剂对鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 发光体系的影响(n=6)

| 表面活性剂   | 浓 度       | 发光值( $\bar{x}\pm s$ ) |
|---------|-----------|-----------------------|
| 吐温-20   | 1%        | 477.0±41.0            |
| 吐温-40   | 1%        | 467.8±58.1            |
| 吐温-80   | 1%        | 577.8±15.5            |
| 聚乙烯醇    | 1%        | 503.0±62.3            |
| CTMAB   | 10 mmol/L | 2464.0±62.3           |
| 十二烷基硫酸钠 | 10 mmol/L | 489.0±90.5            |
| 曲拉通-100 | 10 mmol/L | 482.2±68.1            |
| 十二烷基磷酸钠 | 10 mmol/L | 444.5±55.8            |
| 空白对照    | —         | 475.1±85.8            |

3.2 鲁米诺与 CTMAB 不同浓度混合液对发光体系的影响:按实验方法加入鲁米诺与 CTMAB 不同浓度混合液 500 μL。表 2 结果所示:鲁米诺与 CTMAB 按 1:1 混合比其它比例混合时的发光强度大,并且稳定性增加。这表明 CTMAB 表面活性剂对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺发光体系具有增敏增稳作用。

表 2 鲁米诺与 CTMAB 不同浓度混合液对发光体系的影响(n=6)

| 编号 | 用 量(mL)           |                      |     | 发光强度( $\bar{x}\pm s$ ) |
|----|-------------------|----------------------|-----|------------------------|
|    | 鲁米诺<br>(5 mmol/L) | CTMAB<br>(10 mmol/L) | 双蒸水 |                        |
| 1  | 5                 | 1                    | 4   | 911.67±236.84          |
| 2  | 5                 | 2                    | 3   | 1 391.00±116.15        |
| 3  | 5                 | 3                    | 2   | 1 956.80±124.05        |
| 4  | 5                 | 4                    | 1   | 2 186.00±92.39         |
| 5  | 5                 | 5                    | 0   | 2 464.00±62.33         |
| 6  | 4                 | 5                    | 1   | 2 029.60±283.28        |
| 7  | 3                 | 5                    | 2   | 1 748.40±309.37        |
| 8  | 2                 | 5                    | 3   | 1 440.17±157.94        |
| 9  | 1                 | 5                    | 4   | 1 193.00±179.83        |
| 10 | 5                 | 0                    | 5   | 477.83±20.49           |

3.3 清热中药抗活性氧作用:在弱碱条件下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化鲁米诺而发光,发光体系在 CTMAB 的存在下,可使发光体系增敏和增稳。在这发光体系中加入待测液,若待测液能清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,则体系发光强度下降,故可用发光抑制率的大小来表示待测液清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的程度。我们用公认的抗氧化剂——Vit C 作阳性对照物。17 种清热中药水提液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的消除作用见表 3。

表3 17种清热中药水提液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除率(%)

| 药名    | 颜色 | 提取液<br>总固体含量<br>(mg/mL) | 0.05 g/mL 中药水提液用量( $\mu$ L) |       |       | CI <sub>50</sub> |                  | AOV     |
|-------|----|-------------------------|-----------------------------|-------|-------|------------------|------------------|---------|
|       |    |                         | 10                          | 5     | 2     | 原液<br>( $\mu$ L) | 固体<br>( $\mu$ L) |         |
| 金银花   | 棕褐 | 123.0                   | 98.52                       | 89.27 | 40.04 | 2.31             | 284.13           | 3.207   |
| 半枝莲   | 黑褐 | 42.2                    | 64.46                       | 71.84 | 38.92 | 2.82             | 119.00           | 1.151   |
| 黄柏    | 棕褐 | 34.3                    | 52.68                       | 41.09 | 19.58 | 8.37             | 287.09           | 14.40   |
| 栀子    | 棕褐 | 69.8                    | 52.86                       | 70.82 | 25.39 | 4.72             | 329.46           | 8.966   |
| 山豆根   | 棕褐 | 6.6                     | 37.22                       | 9.91  | 10.27 | 32.54            | 214.76           | 43.79   |
| 连翘    | 棕黑 | 31.6                    | 13.30                       | 60.55 | 50.88 | 3.14             | 99.22            | 0.9968  |
| 射干    | 棕褐 | 43.8                    | 36.18                       | 24.91 | 10.39 | 23.79            | 1042.0           | 157.87  |
| 半边莲   | 棕黑 | 87.7                    | 64.29                       | 18.13 | 2.59  | 8.31             | 728.79           | 37.81   |
| 黄连    | 棕黑 | 32.7                    | 66.27                       | 41.69 | 28.58 | 5.64             | 184.43           | 5.811   |
| 知母    | 黄棕 | 117.6                   | 70.82                       | 70.35 | 32.28 | 3.39             | 398.66           | 7.662   |
| 白头翁   | 棕黑 | 28.9                    | 96.42                       | 92.67 | 63.04 | 0.94             | 27.17            | -0.836  |
| 黄芩    | 棕褐 | 76.6                    | 81.38                       | 78.57 | 33.88 | 2.88             | 220.61           | 3.072   |
| 鸦胆子   | 黄褐 | 21.3                    | 88.43                       | 68.59 | 26.64 | 3.48             | 74.12            | 0.6533  |
| 鱼腥草   | 棕褐 | 53.1                    | 75.04                       | 62.42 | 46.13 | 2.49             | 132.22           | 1.11    |
| 大青叶   | 棕褐 | 95.5                    | 83.86                       | 69.95 | 45.86 | 2.31             | 229.85           | 2.403   |
| 天花粉   | 橙黄 | 38.7                    | 27.24                       | 8.83  | 4.06  | 64.44            | 2493.8           | 1028.97 |
| 玉竹    | 橙黄 | 168.9                   | 42.61                       | 24.95 | 20.27 | 21.74            | 3671.9           | 510.63  |
| Vit C |    | 10.0                    | 97.83                       | 66.76 | 11.63 | 3.95             | 39.50            | 0.00    |

结果表明:17种清热中药水提取物对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>都有一定的清除作用,并且大多数呈线性量效关系,揭示它们都有直接清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的作用,但清除能力不同。如果单从量效关系曲线回归方程所推出的原液CI<sub>50</sub>(当清除率为50%时所需提取液用量的体积量)或固体CI<sub>50</sub>(当清除率为50%时所需水提取物中固体量)来比较抗氧化程度的大小,往往有些情况不好比较,为了便于统一比较,我们以生物体内公认的抗氧化剂Vit C做为抗氧化能力的比较标准,按下式计算中药对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的抗氧化值(AOV)。

$$AOV = \frac{SL_{\text{测}} - SL_{\text{标}}}{SL_{\text{标}}}$$

$$SL_{\text{测}} = \text{原液 } CI_{50} \times \text{固体 } CI_{50}$$

$$SL_{\text{标}} = \text{Vit C 原液 } CI_{50} \times \text{Vit C 固体 } CI_{50}$$

规定Vit C的AOV为零,当AOV为负值时,该中药抗双氧水的能力就比Vit C强,反之亦然。正值越大,与Vit C相比,抗双氧水的能力就越弱。从表3中AOV值来看,白头翁的抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化能力比维生素强;AOV值<3的有连翘、鸦胆子、鱼腥草、半枝莲、大青叶,这5种中药水提液具有强的抗双氧水的能力;3<AOV值<10的有金银花、黄芩、黄连、知母、栀子,这些中药水提取液抗双氧

水的能力较强。

#### 4 讨论

4.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺反应启动后发光强度在几秒内出现最高值,随后逐渐下降,发光强度和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量成正比<sup>[2]</sup>。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺体系中加入表面活性剂,结果表明非离子型和阴离子型的表面活性剂对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺发光体系没有增敏增稳作用,而阳离子型表面活性剂CTMAB可以使该体系发光强度增大。这种增敏作用是由于鲁米诺与双氧水在碱性条件下的化学发光是一种亲核加成反应过程,CTMAB胶束的生成可加快反应速度,从而引发化学发光反应输出信号的增加<sup>[3]</sup>。此外,CTMAB胶束的形成有利于反应物激发态寿命的延长,并且在胶束的stern区较小极性的环境中也有利于长时间辐射<sup>[4]</sup>,这两方面作用的结果可增大发光体系的稳定性。因此用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺-CTMAB化学发光体系来研究天然产物抗活性氧的作用,具有稳定性高、试剂用量少、发光强度大的优点。

4.2 从研究结果来看,大多数中药水提取液的量效关系呈线型关系,但也有例外,如半边莲、栀子、连翘,当药液用量为10  $\mu$ L时的清除率反而比5  $\mu$ L时的小,这可能是因为水提

液中含有某些金属微量元素,当金属浓度到达一定程度时,对发光有增大的影响。

4.3 中药抗氧化能力的大小与植物所含化学成分性质有关,与有效成分的溶解性有关。在比较天然产物水溶性物质的抗氧化能力时,以 Vit C 这种世界公认的体内优良抗氧化剂作为比较标准是合理并可被人们所接受的。AOV 能较全面反映水溶性物质抗氧化能力大小。笔者认为 AOV 值 $<5$ 的中药具有比较强的抗氧化能力,而 AOV 值 $>10$ 的中药其抗氧化能力就比较弱。从提取液的颜色来看,一般颜色较深者,其对  $H_2O_2$  的清除率

较高,这也提示这些清热中药水提液对  $H_2O_2$  的清除率与其所含的有效成分即溶出浓度有关,可能也与植物色素有关。

我们的研究证明了清热中药在体外对  $H_2O_2$  具有直接清除作用,而在体内是否也有或仅间接发挥作用,尚待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 陈 缓,等. 自由基医学. 北京:人民军医出版社,1991: 223
- 2 龙盛京,等. 广西医学院学报,1992,9(3):1
- 3 CA,94:21898o;105:6904 l
- 4 Paleos CM. J Photochem,1982,18(4):327

(1998-01-28 收稿)

## 连翘提取物的抗炎镇痛作用

天津市药品检验所(300070) 芮 菁\* 尾崎幸纮\*\* 唐元泰

**摘 要** 对连翘 70% 甲醇提取物的消炎镇痛作用及其活性部位进行了研究。将连翘干燥果实的甲醇提取液、正己烷萃取甲醇提取液后所得到的正己烷可溶物和水可溶物分别进行真空冷冻干燥,得到 3 种棕色粉末状物质。通过小鼠毛细血管通透性、扭体反应、足趾肿胀和肉芽肿实验表明,连翘甲醇提取物和正己烷可溶物具有消炎和镇痛作用,而水溶物则无上述效果。证明甲醇提取物中的消炎镇痛活性物质转移到正己烷液中,即极性较低的脂溶性物质为其活性部位。

**关键词** 连翘 抗炎 镇痛

连翘是传统的中草药,为清热解毒要药,具有抗菌<sup>[1]</sup>、抗病毒、消炎、镇痛等作用。国内外经常把连翘和其它的中草药配伍,制成复方制剂应用于临床<sup>[2,3]</sup>。目前,对于连翘单味药的研究多集中于连翘子<sup>[6]</sup>和叶<sup>[5]</sup>等所含的化学成分及结构定性定量的测定,而对连翘在抗炎镇痛方面药理作用及其活性部位的研究尚未见报道。因此,我们对这方面进行了探讨。

### 1 材料

1.1 连翘:购自天津中药饮片厂,经天津药品检验所鉴定为连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的果实。

1.2 连翘甲醇提取物的制备:将连翘干燥果实粉碎,用 70% 甲醇在 80℃ 水浴上回流提取 2 次,每次 6 h,用纱布过滤,得到连翘的甲醇提取液,减压蒸馏除去甲醇,再冷冻干燥处理得棕色粉末状的甲醇提取物。临用时用 1% 吐温-80 溶液配成所需浓度备用。

1.3 正己烷可溶物的制备:取以 1.2 法所得到的甲醇提取液,用正己烷以 1:1 进一步萃取精制,得到可溶于正己烷层的棕色粉末状提取物,即为正己烷可溶物。临用时按 70% 甲醇提取物 3 g/kg 剂量为基准,用 1% 吐温-80 溶液配成所需浓度备用。

1.4 水可溶物的制备:正己烷提取后溶于水

\* Address: Rui Jing, Tianjin Municipal Institute for Drug Control, Tianjin

\*\* 日本国立医药品食品卫生研究所生药部室长