

贯叶连翘标准提取物体外抗氧化活性

邹彦平¹, 俞仁昌², 卢艳花^{1*}, 魏东芝^{1*}, 於洪建³

(1. 华东理工大学生物工程学院 生物反应器国家重点实验室, 上海 200237; 2. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 273400; 3. 天津尖峰天然产物研究开发公司, 天津 300402)

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 为藤黄科金丝桃属植物, 又名千层楼、圣约翰草等, 地上部分或全草入药, 其性平味涩, 有清热解毒、收敛止血、利湿之功效。其主要成分有苯并二萜酮类、黄酮类、挥发油类和间苯三酚类。贯叶连翘富含黄酮类化合物, 高达 11.7%, 主要为金丝桃苷、槲皮素、槲皮苷及芦丁^[1]。研究表明, 黄酮类成分具有降低胆固醇、甘油三酯及抗动脉粥样硬化的作用, 在心血管方面具有独特的疗效。但迄今为止, 贯叶连翘的应用还局限于其甲醇提取物制剂用于治疗抑郁症, 其富含的黄酮类成分却未被开发利用。为进一步开发利用贯叶连翘, 本实验对贯叶连翘标准提取物 (EHP) 的体外抗氧化活性作了初步研究。

1 材料

1.1 药品与试剂: 贯叶连翘标准提取物 (EHP), 棕色粉末, 由天津尖峰天然产物公司提供 (含金丝桃素约 0.3%), 以缓冲液配成不同质量浓度的供试液。还原性辅酶 (NADH)、酚嗪二甲基硫酸盐 (PMS)、四氮唑蓝 (NBT)、1, 1-二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH) 及维生素 E (Vit E) 均为 Sigma 产品, 特丁基对苯二酚 (TBHQ) 为 Acros organics (美国) 产品, 硫代巴比妥酸 (TBA)、三氯乙酸 (TCA)、氯化亚铁 (FeCl₂)、抗坏血酸 (Vit C) 等均为国产分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司产品。

1.2 动物: 昆明种小鼠 18~22 g, 雄性, 由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 EHP 对 DPPH 自由基的清除作用: 参照 Nicole 等^[2]方法略加修改。取 2.5 mL DPPH 溶液 (2×10^{-4} mol/L, 以 50% 乙醇溶液配制) 分别加入到 2.5 mL 终质量浓度为 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 EHP 溶液中, 混匀, 室温下静置 30 min, 于 517 nm 波长处测定其吸光度 (A) 值, 并以 Vit E (终质

量浓度为 6.25、12.50、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 和 TBHQ (终质量浓度为 1、3、5、7、9 $\mu\text{g/mL}$) 作为阳性对照药物。结果见图 1。EHP 能显著清除 DPPH 自由基, 且呈量效关系, 其清除 DPPH 自由基的能力随 EHP 质量浓度的增加而增大, IC₅₀ (半数抑制浓度) 为 10.5 $\mu\text{g/mL}$, 阳性对照天然抗氧化剂 Vit E 的 IC₅₀ 为 11.2 $\mu\text{g/mL}$, 合成抗氧化剂 TBHQ 的 IC₅₀ 为 4.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

DPPH 清除率 = $[1 - (A_2 - A_3) / A_1] \times 100\%$
A₁ 为未加药品溶液时 DPPH (2.5 mL DPPH + 2.5 mL 溶剂) 的吸光度值, A₂ 为药品与 DPPH 反应后 (2.5 mL DPPH + 2.5 mL 药品溶液) 的吸光度值, A₃ 为药品溶液 (2.5 mL 药品溶液 + 2.5 mL 50% 乙醇) 的吸光度值。

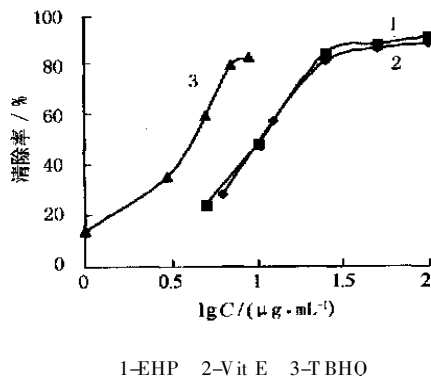


图 1 EHP 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1 Scavenging effect of EHP on DPPH free radical

2.2 EHP 对超氧阴离子自由基 (O₂^{·-}) 的清除作用: 参照文献方法^[1]。O₂^{·-} 由 NADA-PMS-NBT 系统 (16 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 内含 NADH 73 $\mu\text{mol/L}$ 、PMS 15 $\mu\text{mol/L}$ 、NBT 50 $\mu\text{mol/L}$) 产生, 空白管不加 PMS, 对照管不加 EHP 溶液, 均以等体积的缓冲液代替。EHP 溶液的终质量浓度为 12.5、25、50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$, 反应总体积为 3 mL, 室温下反应 5 min 后于 560 nm 波长处测定 A 值, 以 Vit C 作为阳性对照物, 并计算清除率。结果见图 2。EHP 能够明显抑制 NADH-

* 收稿日期: 2004-01-05

作者简介: 邹彦平 (1972—), 男, 湖北云梦人, 在读博士研究生, 研究方向为天然产物活性成分的提取分离研究。

E-mail: zypjmd@163.com

* 通讯作者

PMS-NBT 系统产生的 O_2^+ , 且抑制作用随 EHP 质量浓度的增加而增大。其 IC_{50} 为 $38.0 \mu g/mL$, 远远低于阳性对照药物 VitC (IC_{50} 为 $782 \mu g/mL$)。

$$O_2^+ \text{清除率} = [1 - (A_2 - A_3) / A_1] \times 100\%$$

A_1 为加入药品后的吸光度值, A_2 为空白管的吸光度值, A_3 为对照管的吸光度值。

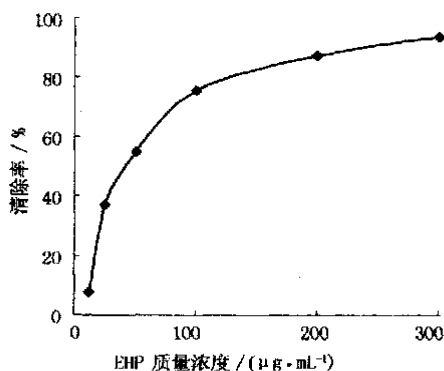


图 2 EHP 对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect of EHP on superoxide free radical

2.3 对小鼠肝微粒体膜脂质过氧化的抑制作用: 参照文献方法^[3]。选用 18~22 g 雄性小鼠, 饥饿过夜, 颈椎脱臼处死, 迅速取出肝脏放入冰浴的 PBS 缓冲液中, 洗净剪碎, 然后加入 3 倍的 PBS 缓冲液进行匀浆, 匀浆后, 于 9 800 r/min、4℃ 离心 20 min, 取上清液以 PBS 缓冲液配制成 5% 肝脏匀浆液, 4℃ 保存备用。1.95 mL 肝脏组织匀浆中加入 0.25 mL EHP 溶液 (终质量浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100 $\mu g/mL$), 再加入 4 mmol/L $FeCl_2$ 溶液 0.1 mL, 最后加入 6 mmol/L 的 VitC 溶液 0.2 mL 引发反应。并以 TBHQ (终质量浓度为 1.56、3.13、6.25、12.5、25 $\mu g/mL$) 作为阳性对照物。37℃ 下水浴振荡 90 min 后, 加入 1 mL 20% TCA 结束反应, 再加入 1.5 mL 0.67% TBA, 于沸水浴中显色 10 min, 冷却后离心, 于 532 nm 波长处测定上清液的 A 值。结果见图 3。EHP 能够抑制 Fe^{2+} -VitC 系统引起的小鼠肝微粒体脂质过氧化, 其 IC_{50} 为 $19.3 \mu g/mL$, 弱于阳性对照物 TBHQ (IC_{50} 为 $4.5 \mu g/mL$)。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_2 - A_3) / A_1] \times 100\%$$

A_1 为未加药品的反应液 (1.95 mL 肝脏匀浆 + 0.25 mL

PBS + 0.1 mL 4 mmol/L $FeCl_2$ + 0.2 mL 6 mmol/L VitC) 的吸光度值, A_2 为加 EHP 后的吸光度值 (1.95 mL 肝脏匀浆 + 0.25 mL EHP 溶液 + 0.1 mL 4 mmol/L $FeCl_2$ + 0.2 mL 6 mmol/L VitC), A_3 为样品的空白 (1.95 mL 肝脏匀浆 + 0.25 mL EHP 溶液 + 0.3 mL PBS) 的吸光度值。

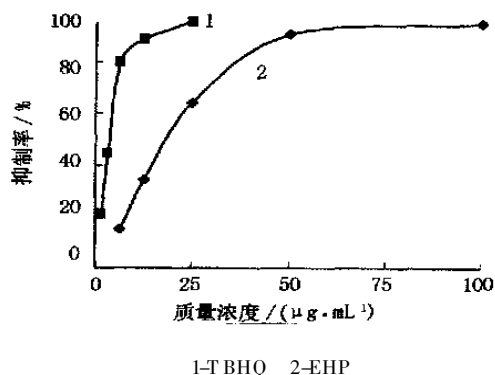


图 3 EHP 对小鼠肝微粒体脂质过氧化的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of EHP on mice liver microsome lipid peroxidation

3 讨论

近年来, 从植物中寻找清除自由基的药物已引起国内外的广泛重视。植物中酚类、黄酮类化合物等多种活性成分的抗氧化活性的研究越来越广泛, 富含金丝桃苷等黄酮类化合物的山楂提取物已被开发成治疗心血管疾病的药物。本实验利用 DPPH 自由基产生体系、NADH-PMS-NBT 系统产生 O_2^+ 、 Fe^{2+} -VitC 系统产生羟自由基 ($OH\cdot$) 诱导小鼠肝微粒体膜脂质过氧化来研究 EHP 清除自由基、抗氧化活性。结果表明 EHP 体外可有效地清除 DPPH 和 O_2^+ , 抑制小鼠肝微粒体脂质过氧化。研究结果证明了 EHP 具有清除自由基和抗氧化的作用, 为进一步开发和利用贯叶连翘总黄酮提供一定的理论依据。

References:

- [1] Ma X J, Xiao P G. Advance on the research of *Hypericum perforatum* [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 1990, 5(4): 150-154.
- [2] Nicole C, Jean L B, Jean P C, et al. Anxidant properties of hydroxy-flavones [J]. *Fre Rad Biol Med*, 1996, 20(1): 35-43.
- [3] Lu Y H, Zou Y P, Qin H L, et al. Comparison of antioxidant activity of *Vaccinium myrtillus* L. and *V. uliginosum* L. in vitro [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 674-675.