

金银花类中药提取物清除自由基的作用

李会军, 李 萍^①, 张重义, 赵明强

(中国药科大学药学教研室, 南京 210038)

摘 要 目的 比较金银花类中药以及忍冬不同提取部位清除自由基的作用。方法 生物化学发光法。结果 所检测样品对 3 种自由基系统 ($O_2^{\cdot -}$ 、 $^{\cdot}OH$ 、 H_2O_2) 都有不同程度的清除作用。同一物种, 道地产区河南、山东产忍冬清除自由基的作用强于江苏产忍冬; 不同物种, 清除自由基能力大小依次为灰毡毛忍冬、忍冬、细毡毛忍冬、黄褐毛忍冬、菰腺忍冬。忍冬不同提取部位清除自由基能力大小依次为正 醇部位、乙酸乙酯部位、水提液。绿原酸、忍冬苷均具有较强的清除作用, 而忍冬苷稍强于绿原酸。结论 金银花类中药清除自由基能力随产地、物种不同而有差异, 且与其所含酚酸类化合物密切相关。

关键词 金银花; 自由基; 生物化学发光法; 清除; 提取物

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)06-0496-03

研究表明, 自由基系统与人类健康、衰老以及疾病的发生、发展密切相关^[1], 例如心血管疾病、高血压、糖尿病、骨质疏松症以及帕金森氏综合征 (PD)、阿尔茨海默病 (AD) 等都可由自由基及其代谢产物诱发和加重^[2]。

近年来, 从植物中寻找清除自由基的有效药物已经引起国内外广泛重视。中药金银花具有清热解毒、消痈散痛、凉血止痢之功效^[3], 现代药理研究表明, 金银花对烫伤小鼠中性粒细胞释放过氧化氢有一定的改善作用, 能使中性粒细胞合成和释放溶体酶的能力减少^[4], 进一步的研究表明金银花水提液对 H_2O_2 溴代十六烷基三甲胺 (CTMAB)-鲁米诺 (luminol) 发光体系有一定的抑制作用^[5], 说明其具有抗氧化作用。为了进一步探讨金银花类中药清除氧自由基的活性, 本文采用邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液 (pH10.2), 邻菲罗啉- Cu^{2+} -抗坏血酸- H_2O_2 , H_2O_2 -鲁米诺-碳酸缓冲液 (pH9.5) 等三个产生活性氧的发光体系, 检测了金银花类中药清除 $O_2^{\cdot -}$ 、 $^{\cdot}OH$ 、 H_2O_2 的作用, 实验结果可为从金银花类中药中寻找和筛选自由基清除剂提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

实验所用金银花类药材为忍冬科植物忍冬

(*Lonicera japonica* Thunb.)、灰毡毛忍冬 (*L. macranthoides* Hand.-Mazz.)、细毡毛忍冬 (*L. similis* Hemsl.)、黄褐毛忍冬 (*L. fulvotomentosa* Hsu. et S. C. Cheng)、菰腺忍冬 (*L. hypoglauca* Miq.) 的干燥花蕾, 种名由作者鉴定, 忍冬苷及绿原酸由作者从忍冬中提取、分离, 经波谱及理化测定鉴定结构, HPLC 测定纯度 $\geq 95.0\%$ 。抗坏血酸为北京第二制药厂生产, 其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

BPCL-G-2 微弱发光测量仪及 BPCL App 2.6 数据处理工作站 (中国科学院北京生物物理研究所), 工作电压 890 V, 温度为 $25 \pm 0.5^\circ C$, pH S-25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), 涡旋混合器 (上海环宇仪器厂), 离心沉淀机 (上海医用分析仪器厂)。

2 实验方法

2.1 供试液的制备

5 种药材供试液的制备: 分别称取上述 5 种药材 5 g, 以 50 ml 水煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 过滤, 离心 ($15 min \times 2000 r/min$), 上清液水浴蒸干, 用甲醇溶解制成药材供试品溶液 (1 ml 相当于原药材 0.25 g)。

忍冬不同提取部位供试液的制备: 称取忍冬花蕾 (河南密县) 5 g, 按上法用水提取后依次用乙酸乙酯

① 收稿日期 2002-03-05 * 通讯作者 Tel (025) 5322256 E-mail: liping16@public1.ptt.js.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730500)

正丁醇萃取,回收溶剂,用甲醇溶解制成乙酸乙酯部位及正丁醇部位供试品溶液(1 ml相当于原药材0.05 g)。忍冬苷及绿原酸用甲醇溶解,制成0.25 mg/ml的供试品溶液。

2.2 清除 O₂⁻能力检测^[6]

取待测样品各 20 μl于测量杯中(以甲醇作空白对照),加入 1 mmol/L邻苯三酚溶液 10 μl,原位注入 970 μl 鲁米诺(1 mmol/L)碳酸缓冲液(pH 10.2),反应总体积 1 ml,启动发光,延时 10 s,测定 240 s内发光强度。

2.3 清除[·]OH能力检测^[6]

取待测样品各 50 μl于测量杯中(以甲醇作空白对照),依次加入 1 mmol/L CuSO₄溶液 50 μl, 1 mmol/L抗坏血酸溶液 20 μl, 1 mmol/L邻菲罗啉溶液 50 μl, 0.15 mol/L H₂O₂溶液 50 μl,原位注入 780 μl 0.05 mol/L硼砂溶液(pH 9.24),反应总体积 1 ml,启动发光,延时 10 s,测定 60 s内发光强度。

2.4 清除 H₂O₂能力检测^[6]

取待测样品各 50 μl于测量杯中(以甲醇作空白对照),加入 0.13% H₂O₂溶液 50 μl原位注入 900 μl 鲁米诺(1 mol/L)碳酸缓冲液(pH 9.5),反应总体积 1 ml,启动发光,延时 10 s,测定 60 s内发光强度。

2.5 样品清除自由基能力评价^[7]

生物化学发光法测定自由基清除作用时,一定浓度范围内发光强度(CL)与自由基数量呈量效关系,故可用 CL表示自由基的产生量。清除自由基的物质可以降低 CL,根据 CL下降可判断该物质清除自由基的能力。

发光抑制率(%) = $\frac{CL_{(空白对照)} - CL_{(样品)}}{CL_{(空白对照)}} \times 100\%$

以发光抑制率为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘出发光抑制曲线。一般用发光抑制率为 50%时的浓度 IC₅₀来衡量样品对自由基的清除能力。IC₅₀值越小,表明样品清除自由基的能力越强。

3 结果与讨论

1) 金银花类中药水提液清除自由基的作用见表 1 结果表明,所检测的 7个样品对 3种自由基系统均有清除作用。产地不同,清除自由基能力不同;物种不同,清除自由基能力亦不同。不同部位提取物及单体化合物清除自由基的作用见表 2 结果表明,乙酸乙酯、正丁醇部位的清除作用比水提液强,而正丁醇部

位强于乙酸乙酯部位。绿原酸、忍冬苷均具有较强的清除作用,而忍冬苷稍强于绿原酸。

Tab 1. Scavenging capacities on radicals of water extracts from *Lonicera* spp(n= 3)

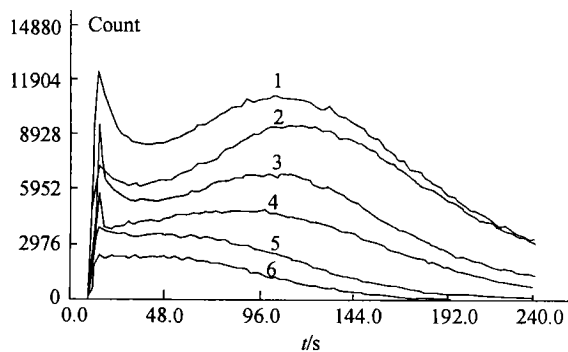
Sample	IC ₅₀ (mg/ml)		
	O ₂ ⁻	[·] OH	H ₂ O ₂
<i>L. japonica</i> (Henan, Mixian)	12.56	6.15	4.42
<i>L. japonica</i> (Shandong, Pingyi)	16.48	10.79	6.25
<i>L. japonica</i> (Jiangsu, Nanjing)	21.71	19.65	15.84
<i>L. macranthoides</i> (Chongqing, Wulong)	10.26	3.26	9.78
<i>L. similis</i> (Hubei, Enshi)	26.35	16.73	15.33
<i>L. fulvotomentosa</i> (Guizhou, Guiyang)	31.09	22.31	13.81
<i>L. hypoglauca</i> (Hunan, Yueyang)	28.13	17.11	20.38

Tab 2. Scavenging capacities on radicals of EtOAc and n-BuOH extracts from *L. japonica* (n= 3)

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)		
	O ₂ ⁻	[·] OH	H ₂ O ₂
EtOAc Extract	2.42	1.56	3.87
n-BuOH Extract	1.61	0.97	2.25
Chlorogenic acid	0.063	0.022	0.11
Lonicerin	0.049	0.018	0.055

2) 大量研究表明^[8],酚酸是一类典型的具有清除自由基作用的化合物,它们的作用是由于分子结构内的多酚羟基具有极强还原性而更易被自由基氧化,从而发挥自由基的清除作用。忍冬苷、绿原酸是金银花类中药中含量最高的两种酚酸类化合物,因此它们在样品中的含量直接影响样品清除自由基的能力。对金银花道地性的研究表明,同一物种,道地产区(河南、山东)忍冬中忍冬苷、绿原酸的含量明显高于非道地产区(本研究室待发表资料),不同物种,灰毡毛忍冬中绿原酸含量高于忍冬,细毡毛忍冬、黄褐毛忍冬、菰腺忍冬含量较低^[9],这与它们清除自由基作用的实验结果一致。TLC实验发现,虽然忍冬乙酸乙酯、正丁醇部位均含有忍冬苷及绿原酸,但正丁醇部位中忍冬苷及绿原酸含量明显高于乙酸乙酯部位,这亦与实验结果吻合。

3) 以 IC₅₀值来评价物质对自由基的清除能力,其前提条件是发光强度与物质浓度呈线性量效关系,从目前研究结果来看,多数情况如此。但对于所含成分相当复杂的中药水提液来说,也有例外,因为水提液中的某些金属微量元素可能对发光有干扰^[5]。因此,我们对忍冬(河南密县)水提液不同浓度样品进行了清除 O₂⁻自由基作用的考察(发光动力学曲线见图 1),结果表明在 3.125~ 50.00 mg/ml范围内发光动



1. blank; 2. 125 mg/ml; 3. 250 mg/ml; 4. 1250 mg/ml;
5. 2500 mg/ml; 6. 5000 mg/ml

Fig 1. Chemiluminescence curve of scavenging O_2^- of *L. japonica*

力学曲线形状一致,且发光强度与物质浓度之间有良好的线性量效关系。

参考文献

- [1] 方允中 (Fang YZ),李文杰 (Li WJ).自由基与酶 [M].北京:科学出版社,1994.44-45.
- [2] 商亚珍 (Shang YZ),苏佩清 (Su PQ).自由基系统和中药抗衰

- 老作用 [J].中草药 (*Chin Tradit Herb Drugs*),2000,31(增刊):177-179.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草 [M].上海:上海科学技术出版社,1998.1792.
- [4] 石钺 (Shi Y),石任兵 (Shi RB),陆蕴如 (Lu YR).我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展 [J].中国药理学杂志 (*Chin Pharm J*),1999,34(11):724-727.
- [5] 龙盛京 (Long SJ),罗佩卓 (Luo PZ),覃日昌 (Tan RC).17种清热中药抗活性氧作用的研究 [J].中草药 (*Chin Tradit Herb Drugs*),1999,30(1):40-43.
- [6] 徐红 (Xu H),刘峻 (Liu J),王峥涛 (Wang ZT)等.5种石斛及其组织培养物对活性氧的清除作用 [J].植物资源与环境学报 (*J Plant Res Envi*),2001,10(2):35-37.
- [7] 秦民坚 (Qin MJ),刘峻 (Liu J),吉文亮 (Ji WL)等.生物化学发光法测定射干类中药清除自由基的作用 [J].药学实践杂志 (*J Pharm Pra*),2000,18(5):304-306.
- [8] 孙铁民 (Sun TM),李铎 (Li X).抗自由基天然活性物质研究进展 [J].中草药 (*Chin Tradit Herb Drugs*),2000,31(增刊):191-193.
- [9] 李昌爱 (Li CA),姚满生 (Yao MS),郭宏滨 (Guo HB).金银花产地和类型对其质量的影响 [J].中成药 (*Chin Tradit Pat Med*),1993,16(5):5-6.

Scavenging Capacities on Radicals of *Flos Lonicerae* by Chemiluminescence

LI Hui-Jun, LI Ping, Zhang Zhong-Yi, ZHAO Ming-Qiang

Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

ABSTRACT **AIM** To study the scavenging capacities on radicals of *Flos Lonicerae*. **METHOD** Chemiluminescence. **RESULTS** All the samples show the scavenging capacities on three kinds of radicals to some extent. As the same species, the scavenging capacities of the samples from Henan and Shandong are stronger than those from Jiangsu, and as the different species, the scavenging capacities in descending order are *L. macranthoides*, *L. japonica*, *L. similis*, *L. fulvotomentosa* and *L. hypoglaucula*. With regard to *L. japonica*, the scavenging capacities of n-BuOH extract are stronger than those of EtOAc extract. **CONCLUSION** The scavenging capacities on radicals vary from locality and species, and are highly relative to the contents of phenolic acids.

KEY WORDS *Flos Lonicerae*; Radicals; Chemiluminescence; Extract; Scavenging capacities