

鸡骨草醇提物体外抗氧化自由基作用研究

林明霞^a, 李涂蓝^a, 潘冬贵^b, 黄锁义^{a*} (右江民族医学院, a.药学院; b.临床学院, 广西 百色 533000)

摘要: 目的 测定鸡骨草醇提物体外抗氧化自由基作用, 为充分利用鸡骨草资源提供理论依据。方法 鸡骨草饮片以 65% 乙醇作为溶剂, pH=3 条件下浸泡 24 h, 通过分光光度法测定鸡骨草醇提物清除超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力和清除 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基能力, 普鲁士法测定其还原 Fe^{3+} 能力, 并以丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole, BHA)作对照测定鸡骨草醇提物对金属离子 Fe^{2+} 螯合能力。结果 鸡骨草醇提物具有较强的清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基能力, 并能还原 Fe^{3+} 和螯合 Fe^{2+} 。结论 鸡骨草醇提物具有较强抗氧化作用, 其抗氧化性随着浓度的增大而增强。

关键词: 鸡骨草; 醇提物; 抗氧化作用; 清除; 自由基; 螯合

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)10-1047-04

Study on the *in Vitro* Antioxidant Activity of the Ethanol Extracts from Abri Herba

LIN Mingxia^a, LI Tulan^a, PAN Donggui^b, HUANG Suoyi^{a*} (Youjiang Medical University for Nationalities, a.School of Pharmacy; b.School of Clinical Medicine, Baise 533000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study *in vitro* antioxidant activity of the ethanol extracts from Abri Herba, and provide the theory to make use of Abri Herba. **METHODS** Abri Herba was soaked for 24 h with 65% ethanol as solvent and under the condition of pH=3, the abilities of the ethanol extracts of clearing $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, and DPPH were assayed by spectrophotometry. The ability of reducing Fe^{3+} was detected with Prussia method and, and chelating Fe^{2+} was detected comparison to BHA. **RESULTS** The ethanol extracts of Abri Herba could effectively clear $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ and DPPH, and reduce Fe^{3+} , chelate Fe^{2+} . **CONCLUSION** The ethanol extracts of Abri Herba antioxidation is strong, and its antioxidant activity was enhanced with the increase of concentration.

KEY WORDS: Abri Herba; the ethanol extracts; anti-oxidant activity; scavenging; hydroxyl radical; chelating

鸡骨草是豆科相思子属的植物, 常见于中国华南地区, 自然生长于深山隐谷处, 气味辛、甘, 性质温和, 香气四溢。药用干燥全株, 有清热利湿、解毒止痛的功效, 对急慢性肝炎、肝硬化腹水、胃痛等疗效显著。鸡骨草全草主要含相思子碱、甾醇化合物、皂苷、黄酮类、大黄酮、大黄素甲醚、氨基酸、胆碱、蒽醌类等化合物^[1-3]。为进一步拓展其应用, 本实验以鸡骨草作为原料, 研究了其醇提液体外抗氧化自由基作用, 为开发和利用鸡骨草的药用价值提供理论依据。

1 材料、试剂与设备

1.1 材料

鸡骨草干品(产于广西玉林, 经右江民族医学院民族中药学教研室刘春荣副教授鉴定为 *Abrus cantoniensis* Hance 的干燥全草), 粉碎, 于 65% 乙醇 pH=3 室温中浸泡 24 h^[4], 过滤后低温浓缩, 自

然晾干成浸膏备用。

1.2 试剂

盐酸(西陇化工股份有限公司, 批号: 110725); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)上海山浦化工有限公司, 批号: 20051010; 邻苯三酚(贵州遵义佳宏化工有限责任公司, 批号: 080112); 水杨酸(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20070722); 硫酸亚铁(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20040712); 过氧化氢(天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 110120); 无水乙醇(天津市北联精细化学品开发有限公司, 批号: 20111008); DPPH (Aladdin industrial Corporation, 批号: H1201006); 磷酸盐缓冲液(上海雷磁创益仪器表有限公司, 批号: 20011211); 铁氰化钾(天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20050425); 三氯乙酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20050409); 三氯化铁(上海实意化

基金项目: 国家中医药管理局“十二五”中医药重点学科建设项目(国中医药人教发[2012]32 号); 广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFAA 019240); 2013 年度右江民族医学院大学生创新训练计划立项项目(XJCCX201369)

作者简介: 林明霞, 女 Tel: 18778683216 E-mail: linmingxia1@163.com
E-mail: huangsuoyi@163.com

***通信作者:** 黄锁义, 男, 教授, 硕士 Tel: (0776)2850590

学试剂有限公司, 批号: 20050328); BHA (Aladdin industrial Corporation, 批号: 45023); 菲洛嗉 (Aladdin industrial Corporation, 批号: H1201006)。

1.3 仪器

GN2085 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); SHZ-DIII 循环真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); RE-3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); HHS-21-4 电热式恒温水浴(江苏金坛宏凯仪器厂); 722N 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 鸡骨草醇提液的制备

分别称取鸡骨草浸膏若干, 用 65%乙醇溶解后定容于 100 mL 量瓶, 配成不同浓度的溶液备用。

2.2 鸡骨草醇提液体外抗活性氧自由基作用研究

2.2.1 鸡骨草醇提液清除超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)作用

取 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.50 mL 于干燥具塞比色管中, 加入 3.20 mL 蒸馏水, 混匀后置 25 °C 恒温水浴预热 20 min, 取出后分别加入在 25 °C 恒温水浴预热 20 min 的浓度为 0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg·mL⁻¹ 的样品 1.00 mL 和 3 mmol·L⁻¹ 的邻苯三酚 0.30 mL, 混匀后静置反应 4 min, 立即加入 10 mmol·L⁻¹ HCl 2 滴终止反应, 以 Tris-HCl 缓冲液做参比, 在 321 nm 处测定吸光度 A 。按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

其中, A_0 : 加邻苯三酚但不加样品时的吸光度; A_1 : 加样品和邻苯三酚时的吸光度; A_2 : 加样品但不加邻苯三酚时的吸光度。

随着鸡骨草醇提物浓度的增加, 对 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除能力增强, 当浓度为 0.10 mg·mL⁻¹ 时, 清除率即超过 IC₅₀, 说明鸡骨草对超氧自由基有很强的清除能力。结果见图 1。

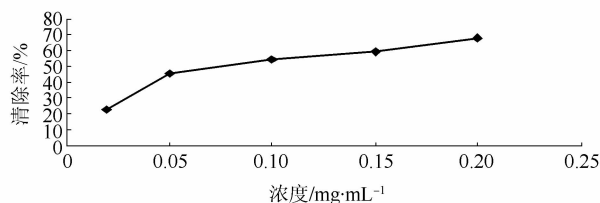


图 1 不同浓度的鸡骨草醇提物对超氧自由基的清除能力

Fig 1 The oxygen radical scavenging capacity of different concentrations of the ethanol extracts of Abri Herba

2.2.2 清除羟基自由基能力 采用 Fenton 反应体系产生羟基自由基。利用 H₂O₂ 与 Fe²⁺ 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 向体系中加入水杨酸捕捉并产生有色物质, 在 10 mL 具塞比色管中依次加 9 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 1 mL, 9 mmol·L⁻¹ 水杨酸-乙醇溶液 2.00 mL, 充分混匀后分别加入浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg·mL⁻¹ 的鸡骨草醇提物溶液 2.00 mL, 最后加入 8.8 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 2 mL 启动反应, 室温反应 1 h, 并与空白液比较, 于 510 nm 处测定其吸光度, 平行 3 次。按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

其中, A_1 : 空白对照液的吸光度; A_2 : 加样品时的吸光度。

鸡骨草提取液对羟基自由基有较强的清除作用, 0.05 mg·mL⁻¹ 时清除率即有 36.2%, 当浓度达到 0.6 mg·mL⁻¹ 时, 清除率即超过 IC₅₀, 结果见图 2。

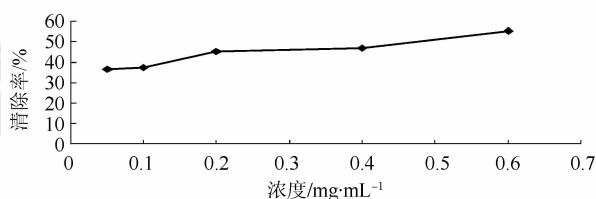


图 2 不同浓度的鸡骨草醇提物对羟基自由基的清除率变化关系

Fig 2 The relationship between different concentrations of the ethanol extracts of Abri Herba and the clear rate of $\cdot\text{OH}$

2.2.3 清除 DPPH 自由基能力 DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其醇溶液呈紫色, 具有单一电子, 能接受一个电子或氢离子, 与氧化剂发生反应, 提 H 被还原, 颜色发生变化, 由深紫色变为淡黄色, 在波长为 517 nm 下具有最大吸收, 可用紫外分光光度法测定。以高浓度逐渐稀释的方式检测不同浓度样品溶液对自由基的清除率, 以自由基清除率为 50% 是样品的浓度(IC₅₀)来衡量样品对自由基的清除能力。IC₅₀ 越小, 表明样品清除自由基的能力越强。

取新配制的 (6×10^{-4} mol·L⁻¹) DPPH 溶液 0.5 mL, 分别加入浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg·mL⁻¹ 的样品溶液, 混匀后用无水乙醇定容至 5 mL, 室温下暗光反应 30 min, 在 517 nm 处测定其吸光度 A , 平行 3 次。按下式计算清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

其中, A_1 : 空白吸光度($t=0$ min); A_2 : 反应 30 min 后吸光度。

在一定的浓度范围内, 鸡骨草对 DPPH 自由基的清除效率和浓度呈一定的量效关系, 随着醇提物浓度的增加, 鸡骨草对 DPPH 自由基的清除率也逐步增加。当浓度达到 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时清除率即超过 IC_{50} 。这些结果说明鸡骨草醇提物在一定浓度范围内对 DPPH 自由基具有一定的清除活性。结果见图 3。

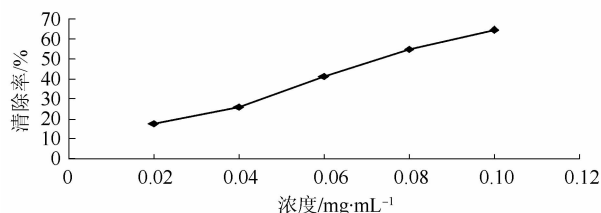


图 3 不同浓度的鸡骨草醇提液对 DPPH 自由基的清除率变化关系

Fig 3 The relationship between different concentrations of the ethanol extracts of Abri Herba and the clear rate of DPPH

2.2.4 还原 Fe^{3+} 能力 采用普鲁士兰法测定样品还原 Fe^{3+} 能力。在系列 10 mL 具塞比色管中依次加入 2.5 mL 浓度为 0.01, 0.02, 0.05, $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液, 2.5 mL $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.6 磷酸盐缓冲液和 2.5 mL 1% 铁氰化钾, 混匀后置于 50°C 水浴中反应 20 min, 然后加入 10% 三氯乙酸 2.5 mL, 混匀, 如溶液浑浊离心($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)10 min, 取上清液 2.5 mL, 加入蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% 的三氯化铁溶液 0.5 mL, 混匀, 以试剂空白作参比, 在 700 nm 处测定吸光度值, 吸光度值增加表明还原力增强。

随着醇提物浓度的增大, 还原 Fe^{3+} 增强, 吸光度增加, 说明鸡骨草有一定的抗氧化作用, 结果见图 4。

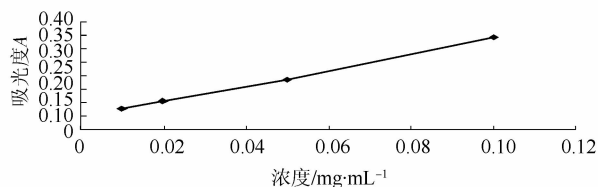


图 4 不同浓度的鸡骨草醇提液还原 Fe^{3+} 变化关系

Fig 4 The relationship between different concentrations the ethanol extracts of Abri Herba and reduction the ferric

2.2.5 金属离子(Fe^{2+})螯合能力 取相同浓度不同体积的样品及对照品 BHA 溶液于系列 10 mL 比色管中, 加入 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 0.1 mL 溶液中, 混

匀, 再加入 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 菲洛嗪 0.2 mL, 用 65% 乙醇定容到 5 mL, 剧烈振荡混合物后, 室温下放置 10 min。试剂空白作参比, 于 562 nm 处测定吸光度, 平行 3 次。吸光度值越低表示金属螯合能力越强。

$$\text{螯合率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中, A_0 : 不加样品时的吸光度值; A_1 : 加入样品时的吸光度值。

鸡骨草醇提液和 BHA 都有螯合 Fe^{2+} 的能力, 且随着浓度的增大螯合能力增强, 但 BHA 对 Fe^{2+} 的螯合能力强于鸡骨草醇提液。结果见图 5。

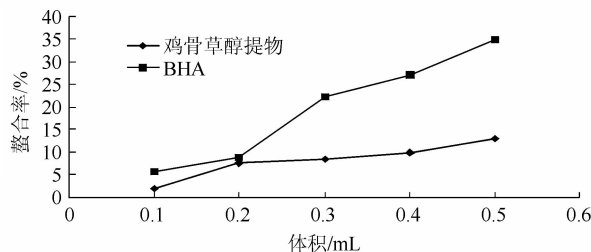


图 5 鸡骨草醇提物、BHA 对 Fe^{2+} 的螯合能力

Fig 5 The ability of ethanol extracts of Abri Herba and BHA chelating Fe^{2+}

3 讨论

鸡骨草醇提物体外抗氧化性试验表明, 鸡骨草具有较强的还原能力, 对自由基有良好的清除作用。鸡骨草具有较强清除超氧自由基和羟自由基的能力; 可作为电子供体, 将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ; 当醇提物浓度达到 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 DPPH 的清除率即超过 IC_{50} 。鸡骨草醇提物具有螯合 Fe^{2+} 能力, 但其螯合能力比 BHA 弱。

有资料显示, 自由基可介导机体组织脂质过氧化、蛋白质解聚、核酸断裂和多糖裂解等生化过程, 引发组织细胞病变, 导致各种疾病发生和加速机体衰老。随着社会的发展和生活水平的提高, 人们对天然抗氧化物质的需求量也逐年增加, 对天然药物的抗氧化活性的研究也逐渐增加^[5-6]。从本实验可看出, 鸡骨草醇提物具有明显的抗氧化作用, 这预示着它在医学和人类保健事业上具有潜在的利用价值。本实验为鸡骨草的开发利用提供了合理的依据。

REFERENCES

- [1] BAI L H, DONG Q S, PU R L. Study on Chinese medicine Chicken-bone Herba [J]. Guangxi Agriculture Sciences(广西农业科学), 2005, 36(5): 476-478.
- [2] HUANG R S, LUO Y M, HU Y, et al. Study on the content of

total saponins and its accumulation trend in Chicken-bone Herba [J].Guangxi Agr Sci(广西农业科学), 2006, 37(4): 391-393.

- [3] SHI H M, WEN J, TU P F, et al. Chemical constituents of *Abrus cantoniensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs(中草药), 2006, 37(11): 1610-1613.
- [4] CHEN X, XIAO C Y, MO L L, et al. Extraction and stability study on *Euphorbia thymifolia* red pigment [J]. Technol Dev Chem Ind(化工技术与开发), 2010, 39(3): 10-12.

- [5] LIU C H, WANG A L, LI Y Q, et al. Determination of antioxidation of polysaccharides in *Tussilago farfara* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(10): 886-889.

- [6] LIU Y J, CHEN D, QIU H X, et al. *In vitro* antioxidant effect of the total flavones of citrus *Aurantium L. var Daidai* Tanaka fruits [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 97-101.

收稿日期: 2013-01-14

小儿健脾膏促胃肠动力作用研究

李晓东¹, 陈婉姬^{2*}, 杨明华^{3*}, 叶俊杰¹(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省立同德医院, 杭州 310012; 3.浙江省中药研究所, 杭州 310012)

摘要: 目的 观察小儿健脾膏对豚鼠回肠和大鼠胃肌收缩、在体大鼠胃肌收缩及整体小鼠胃排空与肠推进的影响。

方法 离体和在体实验中, 运用生物机能实验系统检测小儿健脾膏对回肠和胃肌收缩张力的影响; 整体实验中, 运用称重法和标记法测定小鼠胃排空与肠推进比率。**结果** 离体实验中, 不同剂量的小儿健脾膏均可增大豚鼠回肠和大鼠胃肌的平均收缩幅度; 在体实验中, 中、高剂量小儿健脾膏可显著增加大鼠胃肌的平均收缩幅度, 且高剂量对大鼠胃肌的收缩与新斯的明具有协同作用; 整体实验中, 不同剂量的小儿健脾膏均能显著加速阿托品所致胃肠动力障碍模型小鼠的胃排空与肠推进。**结论** 小儿健脾膏具有促进胃肠动力的药理作用。

关键词: 小儿健脾膏; 胃肠动力; 贴剂; 药理作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)10-1050-05

Effects of Xiaoer Jianpi Cream on Promoting Gastrointestinal Motility

LI Xiaodong¹, CHEN Wanji^{2*}, YANG Minghua^{3*}, YE Junjie¹(1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 3.Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effects of Xiaoer Jianpi cream on the contractile activity in ileum of guinea-pig and stomach muscle of rat *in vitro*, and to evaluate the effects of Xiaoer Jianpi cream on the contractile activity in stomach muscle of rat in situ and on the gastric emptying and intestinal propulsion in mice. **METHODS** *In vitro* and in situ experiments, the biological functional system was used to observe the effects of Xiaoer Jianpi cream on the contraction of ileum and stomach muscle. The gastric emptying and intestinal propulsion was researched by weighting method and labeling method *in vivo*. **RESULTS** *In vitro* experiment, different dosages of Xiaoer Jianpi cream increased the amplitude of contraction in guinea-pig ileum and stomach muscle of rat. In situ experiment, the large dosage and medium dosage of Xiaoer Jianpi cream could increase significantly the average contractile amplitude in stomach muscle of rat. There was a synergy between the large dosage group and neostigmine. In animal experiment, different doses of Xiaoer Jianpi cream had a significantly promotion on gastric emptying and intestinal propulsion in gastrointestinal disorder mice induced by atropine. **CONCLUSION** Xiaoer Jianpi cream has the effects on promoting gastrointestinal motility.

KEY WORD: Xiaoer Jianpi cream; gastrointestinal motility; patch; pharmacological effect

随着生活节奏的加快及饮食习惯的变化, 胃肠动力障碍性疾病不断增多, 受其困扰的人群数量成倍增长。研究显示, 约 25% 的美国人及

5%~10% 的亚洲人存在胃肠动力障碍性疾病, 目前国内儿科常见消化道疾病中, 胃肠动力障碍所致的功能性消化不良(FD)的发病率高达 20%^[1-2], 且

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2012ZA002)

作者简介: 李晓东, 男, 硕士生 Tel: 15558050108 E-mail: Lxd6563580@sina.com
13588149485 E-mail: hzcwj702@163.com 杨明华, 男, 博士, 教授 Tel: 13857181369

*通信作者: 陈婉姬, 女, 主任医师 Tel: 13857181369
E-mail: ymh702@126.com