

甘草地上部分脂溶性总黄酮抗氧化活性研究

康雪芳 李红丽 王文全 侯俊玲

【摘要】 目的 建立甘草地上部分脂溶性成分高效液相指纹图谱,采用 DPPH 自由基清除能力、还原力、羟基自由基清除能力评价甘草地上部分脂溶性总黄酮抗氧化活性。**方法** 建立甘草地上部分脂溶性黄酮类成分高效液相指纹图谱,色谱条件:岛津 WondaSil[®]-C18 分析柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),乙腈-0.1% 磷酸-水溶液梯度洗脱,体积流量 1 mL/min,柱温 35 ℃,检测波长 190 ~ 400 nm。通过体外抗氧化活性法测定甘草地上部分脂溶性总黄酮的清除 DPPH 自由基能力、还原能力及清除羟基自由基能力。**结果** 甘草地上部分脂溶性黄酮类成分有良好的清除 DPPH 自由基活性、清除羟基自由基能力及还原能力。**结论** 建立的 HPLC-DAD 指纹图谱方法能较好的反应甘草地上部分脂溶性黄酮类成分,甘草地上部分脂溶性总黄酮有较强的抗氧化能力。

【关键词】 甘草地上部分; 脂溶性总黄酮; HPLC-DAD

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.011

Evaluation of the antioxidant activity of fat-soluble flavonoids in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*

Fisch. KANG Xue-fang, LI Hong-li, WANG Wen-quan, et al. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: WANG Wen-quan, E-mail:wwq57@126.com

【Abstract】 Objective To establish the HPLC fingerprint of fat-soluble flavonoids in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., the DPPH radical scavenging, reducing antioxidant power assay, hydroxyl free radical scavenging capacity was used to evaluate antioxidant activity of fat-soluble flavonoids in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.. **Method** HPLC fingerprint of the aerial parts of the fat-soluble flavonoids of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. was established, HPLC fingerprint chromatographic conditions: DIKMA Wonda Sil[®]-C18 analytical column (4.6×250mm, 5μm), acetonitrile-0.1% phosphoric acid - water gradient, the volumetric flow rate was 1mL/min, column temperature was 35℃, detection wavelength was 190 ~ 400 nm. In vitro antioxidant activity was measured by DPPH radical scavenging method, reducing power and scavenging hydroxyl radical assay. **Results** Fat-soluble flavonoids in aerial parts of *Glycyrrhiza*

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-002); 国家中医药管理局行业专项(201107009-03)

作者单位: 100102 北京中医药大学 中药学院[康雪芳(硕士研究生)、李红丽、王文全、侯俊玲]; 中国医学科学院药用植物研究所(王文全); 中药材规范化生产教育部工程研究中心(王文全、侯俊玲)

作者简介: 康雪芳(1990-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中药资源开发与利用。E-mail: gerile2920@sina.com

通讯作者: 王文全(1957-), 博士, 教授。研究方向: 中药材规范化生产及其调控机制研究。E-mail: wwq57@126.com

uralensis Fisch. had a strong antioxidant capacity. **Conclusion** HPLC-DAD fingerprint method can show fat-soluble flavonoids in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. . It has good DPPH radical scavenging activity, scavenging hydroxyl free radical activity and reducing power.

【Key words】 Aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; Total fat-soluble flavonoids; HPLC-DAD

甘草是豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎,具有补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸药的功效,在中国有悠久的用药历史。其地上茎叶部分资源丰富,黄酮类成分含量较高,研究发现,盛花期的甘草叶总黄酮含量约为 5.64%^[1]。国外研究者发现其具有抗菌、抗氧化等药理作用^[2-3]。本课题组在前期研究中发现,甘草叶醇提物上清液对大鼠慢性非细菌性前列腺炎有良好的预防和治疗作用,但提取物的沉淀部分未得到利用^[4]。而甘草地上部分提取物沉淀中含有较多脂溶性黄酮类成分,主要为异黄酮、二氢黄酮、黄酮醇类黄酮苷元物质^[5]。黄酮苷元类成分具有抗氧化、抗炎、抗菌等多种药理活性,并且苷元类物质在动物血液内可直接被吸收,其效价是苷类物质的 7 倍^[6]。

为使甘草地上部分资源得到充分利用,本实验对甘草地上部分提取物沉淀中的脂溶性黄酮类成分进行研究,通过 HPLC-DAD 建立甘草地上部分脂溶性黄酮类成分高效液相色谱方法,并对总黄酮进行体外抗氧化活性的测定,为甘草地上部分的进一步开发提供依据。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪,二极管阵列检测器,SP-752型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),CP224 电子天平(奥豪斯仪器有限公司),旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHB-循环水式多用真空泵(郑州长城科贸有限公司),GKC21CR4 可控硅恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪表有限公司),槲皮素(批号:YA0806YB13,纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司),芦丁(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司),DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼,东京化成工业株式会社生产)。

甘草地上部分于 2014 年采于宁夏银川,经北京中医药大学王文全教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的地上部分。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备及含量测定

取甘草地上部分茎叶粗粉 10 kg,70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 小时。提取液回收乙醇至无醇味,静置过夜,离心取沉淀部分,石油醚脱脂,真空干燥得沉淀部分样品。

甘草地上部分总黄酮含量采用紫外分光光度法^[7]测定,用槲皮素为对照品,以 10% KOH 为显色剂显色,测得甘草地上部分脂溶性总黄酮含量为 43.39%。

2.2 甘草地上部分脂溶性总黄酮 HPLC-DAD 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 高效液相色谱对各类黄酮化合物均可获得良好的分离效果。由于黄酮类化合物大多具有多个羟基,故用高效液相色谱分离时,往往采用反相柱色谱,根据文献发现,乙腈-磷酸-水溶剂系统可较好地分离甘草地上部分黄酮类成分,故选用此溶剂系统。经二极管阵列检测器检测波长 190 ~ 400 nm 范围紫外吸收,比较紫外吸收强度,在 280 nm 和 350 nm 波长下有很好的吸收。经考察不同洗脱流速、柱温及进样量、检测波长,确定 HPLC 最佳色谱条件如下:岛津 WondaSil-C₁₈ 分析柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈(A)-0.1% 磷酸-水溶液(B)梯度洗脱,体积流量 1 mL/min,柱温 35℃,检测波长 280 nm、350 nm。洗脱梯度:0 ~ 25 分钟(A-B,20 : 80),25 ~ 40 分钟(A-B,42 : 58),40 ~ 60 分钟(A-B,45 : 55),60 ~ 75 分钟(A-B,70 : 30),75 ~ 80 分钟(A-B,80 : 20),80 分钟(A-B,95 : 5),进样量为 10 μL。色谱图见图 1。

2.2.2 方法学考察 通过分析上述样品色谱峰保留时间和峰面积值计算 RSD 评价进样和仪器的精密性、方法重复性及样品稳定性。

(1)精密度试验:沉淀部分样品以甲醇配制供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件连续进样 5 次检测指纹图谱,计算得色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%,表明该仪器精密度良好。

(2)重复性试验:精密称取相同浓度样品溶液 5 份,按 2.2.1 项色谱条件进样,检测指纹图谱,计算

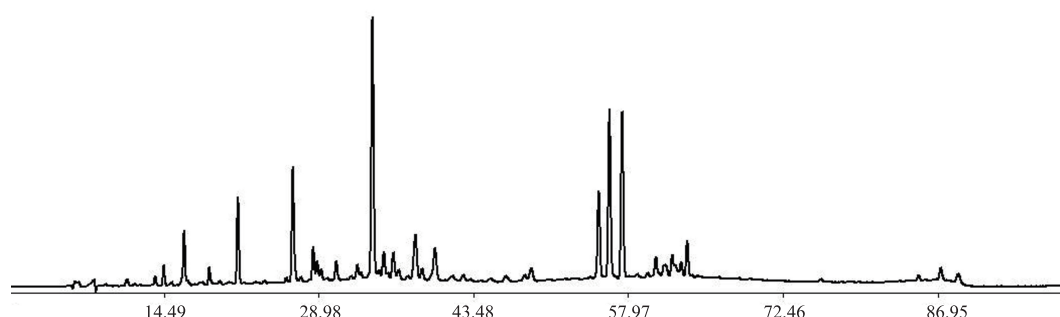


图 1 甘草地上部分脂溶性成分高效液相指纹图谱

得色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明方法重现性良好。

(3) 稳定性试验: 以沉淀部分样品配制供试品溶液, 室温存放, 按 2.2.1 项色谱条件进样, 分别在 0 小时、2 小时、8 小时、12 小时、24 小时检测指纹图谱, 经计算得色谱峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%, 表明稳定性良好。

2.3 抗氧化活性的测定

2.3.1 清除 DPPH 自由基活性测定 准确称取一定量甘草地上部分沉淀部分粉末, 分别加入甲醇配制成 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.4 mg/mL、1.6 mg/mL、1.8 mg/mL、2.0 mg/mL 的样品溶液。准确称取 DPPH 试剂 0.045 g, 以无水乙醇溶解至 1000 mL 容量瓶, 摇匀即得 0.045 mg/mL DPPH 溶液。分别取 1 mL 待测样液和 3 mL DPPH 溶液混合摇匀, 室温且避光反应 30 分钟, 517 nm 波长下测定吸光度值。以待测液溶剂为空白对照, 计算样品自由基清除率。每批样品重复试验 3 次^[8]。结果见图 2。

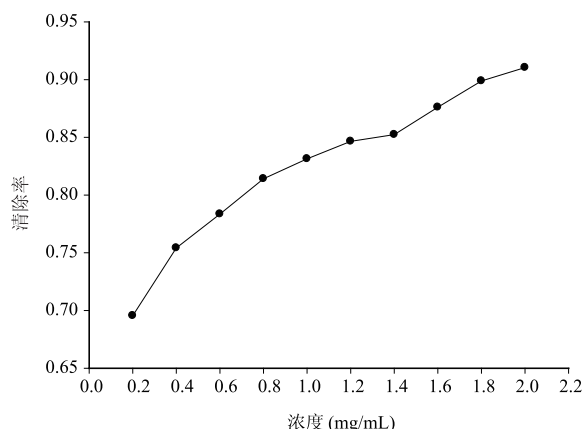


图 2 不同浓度甘草地上部分脂溶性总黄酮对 DPPH 自由基清除作用曲线

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [A_0 - (A_s - A_c)] /$$

$A_0 \times 100\%$, 式中 A_0 为空白组吸光度值, A_s 为样品溶液与 DPPH 反应吸光度值, A_c 为对照组吸光度值。

2.3.2 还原力的测定 取甘草地上部分脂溶性总黄酮样品, 配制成不同浓度的样品溶液 (0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.4 mg/mL、1.6 mg/mL、1.8 mg/mL、2.0 mg/mL), 各取 1 mL, 加入 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH=6.6) 2 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2 mL, 混合物于 50℃ 水浴保温 20 分钟, 然后加入 10% 三氯乙酸溶液, 3000 rpm 离心。取上清液 2 mL, 加入蒸馏水 2 mL 及 0.5 mL 的 0.1% 三氯化铁溶液, 混合溶液于 700 nm 波长下测吸光度, 重复实验 3 次, 结果如图 3。吸光度值越大, 还原能力越强, 物质的还原能力与其抗氧化活性有明显的相关性。由图 3 可知, 甘草地上部分脂溶性总黄酮有较强的还原能力, 且与浓度有一定相关性, 随着浓度的增加, 还原能力增强。

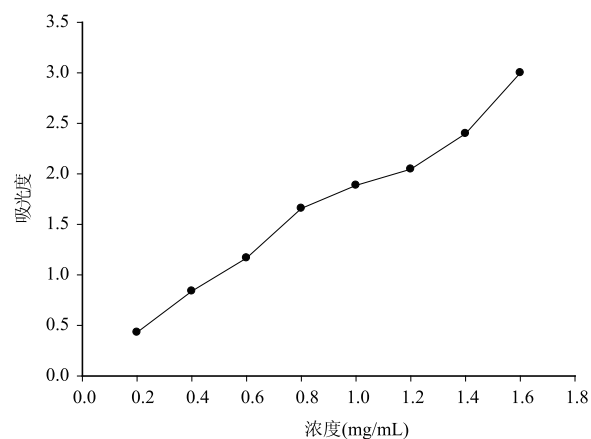


图 3 不同浓度甘草地上部分脂溶性总黄酮还原力曲线

2.3.3 清除羟基自由基活性测定 在 10 mL 试管中分别加入 9 mmol/L Fe_2SO_4 溶液及 10.0 mmol/L 水杨酸乙醇溶液, 分别加入 1.0 mL 不同浓度样品溶

液(0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.4 mg/mL、1.6 mg/mL、1.8 mg/mL、2.0 mg/mL),加蒸馏水至 5 mL,然后加入 6.0 mmol/L H_2O_2 溶液 1 mL,37℃ 水浴加热 10 分钟,510 nm 处测定吸光度。空白对照以相同体积蒸馏水代替样品;按照下列公式计算羟自由基清除率,实验重复 3 次。羟自由基清除率(%) = $[A_0 - (A_s - A_c)] / A_0 \times 100\%$,式中 A_0 为空白对照液吸光度值,只加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、过氧化氢,不加入样品溶液的吸光度值; A_s 为加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、过氧化氢、样品溶液的吸光度值; A_c 为加入硫酸亚铁、水杨酸-乙醇、样品溶液,不加过氧化氢引发反应的吸光度值。羟基自由基化学性质活泼,可损伤蛋白质核酸和脂类等多种生物大分子,尤其对脂质过氧化作用最强^[8]。由图 4 可知,甘草地上部分脂溶性总黄酮对羟基自由基有一定清除能力,随着总黄酮浓度增加,对羟基自由基的清除率也增加。当浓度增加到 2 mg/mL 时,甘草地上部分总黄酮对羟基自由基的清除率达到 36.93%。

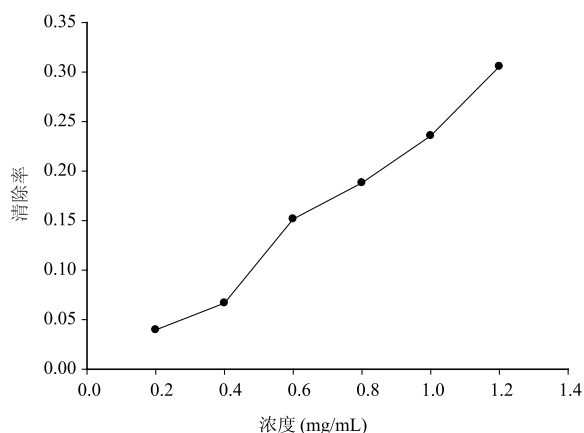


图 4 不同浓度甘草地上部分脂溶性总黄酮清除羟基自由基曲线

3 讨论

体外抗氧化测定实验具有快速、简便、灵敏的优点^[9]。现代研究表明,自由基是引起多种疾病和老化的重要因素,自由基引起的连锁反应经体内代谢后会引起脂质、DNA、细胞膜等体内大分子损伤,是多种疾病如癌症、心血管疾病、肾炎等的诱因^[10]。

DPPH·是一种化学性质较为稳定的以氮为中心的自由基,若被测物能清除它,则提示被测物有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基等自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用^[11]。国

内外广泛采用 DPPH 分光光度法筛选天然抗氧化剂^[12]。羟基自由基是活性氧中最活泼的自由基之一,也是毒性最大的自由基,可直接损伤各种生物膜,导致多种疾病的发生,从而危及生物体^[13]。因此,良好的羟基自由基清除能力表明甘草地上部分资源具有天然抗氧化剂的潜在开发价值。

本研究建立的 HPLC-DAD 高效液相指纹图谱能很好地反映甘草地上部分脂溶性黄酮类成分。体外抗氧化能力的测定表明甘草地上部分脂溶性黄酮类具有良好的抗氧化能力,其抗氧化活性有效成分有待进一步明确。指纹图谱的建立及抗氧化活性的研究为丰富甘草地上部分主要黄酮类成分种类、筛选活性指标成分及建立全面谱-效关系奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 张学静. 甘草茎叶及根中黄酮和多糖类成分积累动态研究[D]. 北京:北京中医药大学,2009.
- [2] 敖明章,李唯,崔永明,等. 胀果甘草叶成分分析及抗炎作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,(20):35-38.
- [3] Toshio FA, Ai Marumo, Kiyoshi Kaitou, et al. Anti-heli, cobacter pylori flavonoids from licorice extract[J]. Life Sciences, 2002, 71:1449-1463.
- [4] 郑巧云. 甘草叶抗慢性非细菌性前列腺炎活性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011.
- [5] 韩亚男. 甘草地上部分提取物化学成分的分段研究及其抗氧化活性分析[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
- [6] 张金亮,赵璐璐,王蒙,等. 天然黄酮的分离及高活性苷元制备方法的研究进展[C]//中国蚕学会桑树病虫害防治学术研讨会论文集,2008,171-178.
- [7] 程新宇,韩亚男,康雪芳,等. 甘草地上部分总黄酮含量测定方法的筛选[J]. 中医药信息,2015,32(2):1-5.
- [8] 许海顺,蒋剑平,徐攀,等. 红参多糖抗氧化活性的研究[J]. 浙江中医药大学学报,2011,35(6):909-912.
- [9] 王晓宇,杜国荣,李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(3):247-249.
- [10] 孙存善. 自由基生物学导论[M]. 合肥:中国科技大学出版社,1999.
- [11] Zheng JQ. Advance of empirical study on antioxidant[J]. Foreign Med Sci (Hyg) (国外医学卫生学分册), 2000, 27: 37-40.
- [12] 谷丽华,吴毅,张紫佳,等. 应用薄层色谱-生物自显影技术评价乌药等三种中药的抗氧化活性[J]. 药学报,2006,41(10):956-962.
- [13] 柳红,张静. 不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(4):356-359.

(收稿日期:2016-02-03)

(本文编辑:董历华)