

何首乌不同提取物清除羟自由基的活性研究

李 奇^{1*}, 王伽伯², 肖小河², 赵奎君^{1#} (1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 解放军第302医院全军中医药研究所, 北京 100039)

中图分类号 R932; R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1760-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.11

摘要 目的: 研究何首乌不同提取物清除羟自由基的活性。方法: 采用分析羟化产物法对何首乌不同提取物清除羟自由基能力与半数清除浓度(LC₅₀)进行比较, 结合何首乌不同提取物化学成分分析, 归属清除羟自由基可能的有效化学成分。结果: 何首乌不同提取物清除羟自由基能力从高到低与LC₅₀从低到高均依次为醇提水沉物、醇提物、醇提水溶物/总提物、水提醇溶物、水提物、水提醇沉物, 即何首乌醇提水沉物清除羟自由基活性最高。结论: 大黄酸可能是清除羟自由基的有效化学成分。应重点关注醇提水沉操作, 以使何首乌在清除羟自由基方面发挥更大功效。

关键词 何首乌; 醇提物; 醇提水沉; 清除羟自由基活性; 有效化学成分

Study on the Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Different Extracts of *Polygonum multiflorum*

LI Qi¹, WANG Jia-bo², XIAO Xiao-he², ZHAO Kui-jun¹ (1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hydroxyl radical scavenging activity of different extracts of *Polygonum multiflorum*. METHODS: The capabilities of different extracts of *P. multiflorum* in scavenging hydroxyl radical and LC₅₀ were studied and compared by analysis of hydroxylation products. Combined with chemical components analysis of different extracts of *P. multiflorum*, the potential active chemical components of hydroxyl radical scavenging were attributed. RESULTS: The capability of hydroxyl radical scavenging in descending order and LC₅₀ in ascending order, alcohol extraction and water-precipitation, alcohol extraction, alcohol extraction and water-soluble or total extraction, water extraction and alcohol-soluble, water extraction, water extraction and alcohol-precipitation. i.e. the alcohol extraction and water-precipitation had the highest scavenging activity. CONCLUSIONS: Rhein may be the active chemical components of scavenging hydroxyl radical. We should focus on the method of alcohol extract-water precipitation so that *P. multiflorum* may play a greater effect on the field of scavenging hydroxyl radical.

KEY WORDS *Polygonum multiflorum*; Alcohol extraction; Alcohol extract-water precipitation; Hydroxyl radical scavenging activity; Active chemical component

何首乌始载于《开宝本草》,为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,它与灵芝、人参、冬虫夏草历来并称为祖国草药中的“四大仙草”,具有益寿延年、补益抗衰老等功效^[1],系著名滋补中药。现代研究表明^[2],何首乌具有增强免疫功能、降低血脂、抗动脉粥样硬化、延缓衰老、保肝、抗菌等功效。近年来,针对何首乌抗衰老功效方面的研究十分活跃,主要集中在何首乌清除体内自由基方面,通过研究其清除自由基的水平高低从而可评判其抗衰老的功效。

众所周知,自由基在机体衰老的漫长变化过程中扮演着非常重要的角色。自由基是游离存在并且带有不成对电子的原子或原子基团,属机体氧化反应中产生的有害化合物,具有强烈的氧化性,被称为“万病之源”^[3]。据知,如炎症、肿瘤、细胞衰老等疾病^[4-5]均与体内自由基过多或清除自由基能力下降有关^[6-7]。在生物体系中遇到的主要是氧自由基^[8],包括超氧阴

离子自由基、脂氧自由基、二氧化氮自由基、一氧化氮自由基和羟自由基等,其中羟自由基是已知活性氧自由基中对生物体危害作用比较强的一种自由基。本文将选择具有抗衰老功效的传统中药何首乌作为模式药,研究其不同提取物清除羟自由基的水平,从而锁定起作用的有效部位及可能的化学成分。

1 材料

1.1 仪器

Synergy H1 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司); R-205 型旋转蒸发仪、Vacuubrand B-490 型水浴锅、2C 型真空泵(瑞士 BuChi 公司); AL104 型精密分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); MM400 型球磨机(德国 Retsch 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器、LGJ-18 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂); 真空干燥箱(上海精密仪器仪表公司); XW-80A 型旋涡混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 药材

何首乌(产地:湖北,批号:10050904)由北京绿野药业有限公司提供,经笔者鉴定为真品。

* 硕士研究生。研究方向:中药活性物质与质量标准化。电话:010-63138520。E-mail:2807455@163.com

通信作者:主任药师,教授。研究方向:中药质量分析与中药活性物质。电话:010-63138520。E-mail:zhao-1959292@sina.com

1.3 试剂

95%医用酒精(北京鸿志伟达工贸有限公司);水杨酸钠、30%过氧化氢(分析纯,西陇化工股份有限公司);硫酸亚铁(分析纯,天津市北辰骅跃化工试剂厂);水为蒸馏水。

2 方法

2.1 何首乌不同提取物的制备

分别采用醇提+水提、水提、醇提、水提醇沉、醇提水沉法制备何首乌总提取物、何首乌水提取物、何首乌水提醇溶物、何首乌水提醇沉物、何首乌醇提取物、何首乌醇提水溶物、何首乌醇提水沉物。

2.1.1 何首乌总提取物的制备 取生何首乌适量,粉碎至黄豆大小,加6倍量75%乙醇冷浸提取,共提取5次,每次48 h,收集醇提液并回收乙醇至无醇味,得浓缩液,放置;滤出残渣挥去残留乙醇,加10倍量蒸馏水继续加热提取1 h,得水提液,浓缩;将水提液与醇提液合并,进行浓缩并干燥,得何首乌总提取物。

2.1.2 何首乌水提取物、何首乌水提醇溶物和何首乌水提醇沉物的制备 取生何首乌适量,粉碎至黄豆大小,蒸馏水浸泡0.5~1 h,加入10倍量蒸馏水连续回流提取3次,合并各次提取液。过并浓缩,得何首乌水提取物;待水提物浓缩液静置冷却一段时间后,对其进行醇沉操作,向其中加入95%乙醇至溶液中含醇量为70%,加入过程中不时搅拌,封口并置于低温环境下保存24 h。上清液浓缩至无醇味,得何首乌水提醇溶物;沉淀减压抽滤处理,得何首乌水提醇沉物。

2.1.3 何首乌醇提取物、何首乌醇提水溶物、何首乌醇提水沉物的制备 取生何首乌适量,粉碎至黄豆大小,加6倍量的75%乙醇冷浸提取,共提取5次,每次48 h,合并醇浸提取液,得何首乌醇提取物;待醇提物浓缩液静置冷却一段时间后,对其进行水沉操作,加入2倍量的蒸馏水于浓缩液中,封口并置于低温环境下保存24 h。对上清液进行浓缩,得何首乌醇提水溶物;沉淀减压抽滤处理,得何首乌醇提水沉物。

2.2 供试液样品的制备

称取“2.1”项下何首乌不同提取物各0.01 g,分别置于经干燥的10 ml棕色量瓶内,加入10%甲醇溶解并稀释至刻度,制备成质量浓度为1 mg/ml的溶液,备用。临用时分别将各样品溶液稀释至质量浓度为0.15、0.3、0.45、0.6、0.75 mg/ml。

分别制备8 mmol/L FeSO₄、6 mmol/L H₂O₂、20 mmol/L 水杨酸钠溶液,避光贮藏,备用。

2.3 清除羟自由基活性测定

应用时分别将0.5 ml FeSO₄、0.8 ml H₂O₂、0.5 ml 蒸馏水和1.0 ml 已制备好的各浓度样品加入试管并混匀,最后加入0.2 ml 水杨酸钠至总体积为3.0 ml 为止。将各试管置于37 °C 水浴充分反应1 h,稍后将各样品加入96孔板中,于562 nm 波长处测量吸光度(A)值。按下式计算清除率:清除率(%)=[1-(A₁-A₂)/A₀] \times 100。式中,A₀为空白即不加样品时的A值;A₁为已加样品溶液的A值;A₂为不加水杨酸钠的A值。并计算其半数清除浓度(LC₅₀)。

3 结果

3.1 清除羟自由基能力比较和LC₅₀的测定

羟自由基清除能力大小顺序:何首乌醇提水沉物>何首乌醇提取物>何首乌醇提水溶物/何首乌总提取物>何首乌水提醇溶物>何首乌水提取物>何首乌水提醇沉物。可见,何首乌中醇溶性化学成分(极性较弱)在清除羟自由基作用方面可能起

着主导作用,而何首乌中水溶性化学成分存在一定的拮抗作用,可能会抑制醇溶性化学成分的清除能力。

何首乌不同提取物LC₅₀值差异比较大,这可能是各种提取物本身所含清除羟自由基能力的有效化学成分所决定的。笔者通过LC₅₀值的大小评价各提取物的羟自由基清除能力,LC₅₀值比较小的提取物说明其对羟自由基的清除能力较强,反之亦然。LC₅₀值大小顺序:何首乌醇提水沉物<何首乌醇提取物<何首乌醇提水溶物/何首乌总提取物<何首乌水提醇溶物<何首乌水提取物<何首乌水提醇沉物,这与羟自由基清除能力排序一致。质量浓度为0.15 mg/ml时各种提取物清除羟自由基能力比较见图1;何首乌不同提取物LC₅₀值比较见表1。

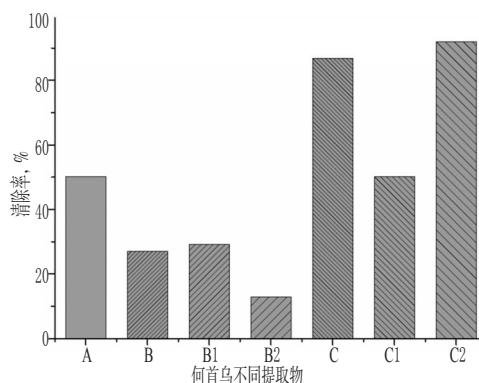


图1 质量浓度为0.15 mg/ml时各种提取物清除羟自由基能力比较

A.何首乌总提取物;B.何首乌水提取物;B1.何首乌水提醇溶物;B2.何首乌水提醇沉物;C.何首乌醇提取物;C1.何首乌醇提水溶物;C2.何首乌醇提水沉物

Fig 1 Comparison of hydroxyl radical scavenging of various extracts at concentration of 0.15 mg/ml

A.P. multiflorum total extract; B.P. multiflorum water extract; B1.P. multiflorum water extract and alcohol-soluble; B2.P. multiflorum water extract and alcohol-precipitation; C. P. multiflorum alcohol extract; C1. P. multiflorum alcohol extract and water-soluble; C2.P. multiflorum alcohol extract and water-precipitation

表1 何首乌不同提取物LC₅₀值比较

Tab 1 Comparison of LC₅₀ of different extracts of P. multiflorum

样品	LC ₅₀ ,mg/ml
何首乌总提取物	0.150
何首乌水提取物	0.370
何首乌水提醇溶物	0.210
何首乌水提醇沉物	2.720
何首乌醇提取物	0.075
何首乌醇提水溶物	0.150
何首乌醇提水沉物	0.050

3.2 何首乌不同提取物化学成分与羟自由基清除能力的多元线性回归分析

由上述羟自由基清除能力结果可知,何首乌不同提取物的羟自由基清除能力有所差异。为了阐明何首乌中化学成分类别与羟自由基清除能力的相关性,分别将不同提取物的各类化学成分含量(x)和清除率(y)作为自变量和因变量,采用SAS统计软件进行多元线性回归逐步回归分析。结果,由显著性检验可见只有x₆是有显著性(P=0.000 7<0.01)影响的变量,

其回归方程中只有 x_6 一个自变量。回归方程为 $y=0.000\ 103\ 97\ x_6$ ，标准回归系数为0.934 45(>0)。故可认为 x_6 对 y 的影响大于其他自变量，也就是说何首乌中大黄酸的含量对其羟自由基清除水平具有非常显著的影响，大黄酸的含量增加有助于清除羟自由基水平的提高。何首乌不同提取物化学成分含量比较见表2(表中A为何首乌总提物，B为何首乌水提物，B1为何首乌水提醇溶物，B2为何首乌水提醇沉物，C何首乌醇提物，C1何首乌醇提水溶物，C2何首乌醇提水沉物)。

表2 何首乌不同提取物化学成分含量比较

Tab 2 Comparison of chemical composition of different extracts of *P. multiflorum*

样品	没食子酸 (x_1)	二苯乙烯 苷(x_2)	芦荟大黄 素(x_3)	未知 (x_4)	未知 (x_5)	大黄酸 (x_6)	大黄素 (x_7)	大黄素甲 醚(x_8)
A	2 792 569	3 393 619	241 460	427 260	1 635 550	596 368	426 944	152 063
B	1 653 385	929 193	7 246	12 244	47 846	8 366	17 899	14 715
B1	6 245 354	4 790 765	116 991	186 681	342 727	69 580	12 309	14 541
B2	642 544	332 768	2 477	3 299	15 943	2 773	3 099	14 050
C	3 760 336	4 094 476	738 815	470 967	1 591 276	609 808	1 263 656	386 462
C1	4 410 687	4 950 274	963 686	572 749	1 878 658	733 788	898 920	115 411
C2	1 278 773	570 202	639 095	463 277	1 308 270	754 499	10 396 297	6 809 937

4 讨论

有文献表明^[9]，何首乌生品的抗氧化活性比其炮制品高，故本研究选择何首乌生品进行抗氧化试验。何首乌清除羟自由基的能力与其所含的化学成分密切相关。本研究结果表明，何首乌中醇溶性化学成分对羟自由基的清除能力大于水溶性化学成分，提示清除羟自由基的有效成分可能集中于醇提物部位。何首乌醇提物中富含蒽醌类成分^[10]，而大黄酸则是游离蒽醌的一种^[11]。多元线性回归结果显示，大黄酸对羟自由基清除水平具有非常显著的影响，推测其可能是何首乌清除羟自由基的有效化学成分。

Ip SP等^[12]研究发现，生何首乌水提物可以有效清除体内自由基，从而抑制四氯化碳导致的肝损伤，而Toshihiro N等^[13]也有过类似相关的报道。杨秀伟^[14]研究发现，何首乌醇提物可明显降低老年小鼠脑和肝组织中丙二醛的含量，增加超氧化物歧化酶(SOD)活性，从而消除自由基对机体的损害。边晓丽等^[15]指出，何首乌可以直接清除自由基，不必依赖于SOD机制。何首乌中所含化学成分二苯乙烯苷、白藜芦醇苷均有增强体内SOD活性的作用，而蒽醌、磷脂类成分也有直接的抗氧化作用，可有效清除体内自由基。本研究发现，何首乌醇提物对羟自由基的清除能力最强，这可能与其中所含的化学成分及自由基的种类和作用机制有关。

何首乌是一味传统的中药，历来被人们认为有延年益寿、抗衰老的功效。人体的衰老过程均与体内自由基过多或清除自由基能力下降有关，而通过消除体内自由基可以起到延缓衰老的作用。基于本研究结果，笔者建议何首乌以“药酒”的

形式服用，可以有效清除羟自由基，从而发挥一定的抗衰老功效。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010:164.
- [2] 李仪奎, 姜名琪. 中药药理学[M]. 1版.北京:中国中医药出版社, 1992:198.
- [3] 付林林, 郭玉华. 六种中药抗羟自由基活性研究[J]. 安阳工学院学报, 2010, 9(4):26.
- [4] Limoli CL, Kaplan MI. Attenuation of radiation-induced genotoxicity by free radical scavengers and cellular proliferation [J]. *Free Radical Bio Med*, 2001, 31(1):10.
- [5] Valko M, Izakovic M. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266(1/2):37.
- [6] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000:34.
- [7] Yamamoto H, Watanabe T. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of long-evans-cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis[J]. *Free Radical Bio Med*, 2001, 30(5):547.
- [8] 余庆皋, 刘捷频, 吴梅青. 中药清除羟自由基实验的改良[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5):1 107.
- [9] 古今, 刘萍, 马凤彩. 何首乌生品及不同炮制品的抗氧化活性研究[J]. 中国药房, 2005, 16(11):875.
- [10] 鲁彦, 郭建宇, 朱贤, 等. 分光光度法测定大黄中总蒽醌[J]. 理化检验:化学分册, 2011, 47(3):297.
- [11] 白研, 黄丽玫, 毋福海, 等. 德庆首乌中蒽醌类成分的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2001, 17(1):40.
- [12] Ip SP, Tse ASM, Poon MKT, et al. Antioxidant activities of *Polygonum multiflorum* Thunb., in vivo and in vitro[J]. *Phytother Res*, 1997, 11(1):42.
- [13] Toshihiro N, Takehiro Y, Tomoko O. Hot-water-extracts of *Polygonum multiflorum* do not induce any toxicity but elicit limited beneficial effects on the liver in mice[J]. *J Health Sci*, 2009, 55(5):720.
- [14] 杨秀伟. 何首乌醇提物对易老化小鼠肝脏和脑单胺氧化酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(1):48.
- [15] 边晓丽, 王晓理, 李金娜. 6种抗衰老中药清除氧自由基和抗脂质过氧化作用的测定[J]. 西北药学杂志, 2001, 16(2):68.

(收稿日期:2012-06-06 修回日期:2012-10-20)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊, 欢迎投稿、订阅