

封丘产金银花不同提取物的体外抗氧化、抗凝血及 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

朱小峰^{1,2*}, 朱晓娣¹, 王金梅^{1#}[1.河南大学中药研究所, 河南开封 475004; 2.赛诺菲(中国)投资有限公司上海分公司, 上海 200040]

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4804-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.16

摘要 目的:考察封丘产金银花不同提取物的体外抗氧化、抗凝血及 α -葡萄糖苷酶抑制活性。方法:以30%乙醇提取金银花得总浸膏,用水分散后依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取得相应部位萃取物。采用1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)自由基、2,2'-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)自由基清除试验和 Fe^{3+} 还原/抗氧化能力试验考察金银花不同提取物的体外抗氧化活性大小[分别以半数清除浓度(IC_{50})和Trolox当量反映];并考察4种不同提取物的体外凝血和抑制 α -葡萄糖苷酶的活性强弱。结果:4种提取物中,乙酸乙酯部位抗氧化能力最强,ABTS、DPPH自由基的 IC_{50} 分别为9.22、25.23 $\mu\text{g/ml}$,Trolox当量为(2 480.80 \pm 5.51) $\mu\text{mol/g}$;水提物部位促凝血活性最强、正丁醇部位抗凝血活性最强,血浆复钙时间分别为(210.28 \pm 2.19)、(149.20 \pm 1.25) s;总浸膏、乙酸乙酯部位均对 α -葡萄糖苷酶活性有较强的抑制作用,复筛 IC_{50} 分别为378.61、451.45 $\mu\text{g/ml}$ 。结论:封丘产金银花有较好的体外抗氧化、抗凝血及 α -葡萄糖苷酶抑制活性,可进一步开发。

关键词 金银花;封丘;抗氧化;凝血; α -葡萄糖苷酶;体外

Study on *in vitro* Antioxidant, Anticoagulant and α -glucosidase Inhibitory Activities of Different Extracts of *Lonicerae japonicae* from Fengqiu

ZHU Xiaofeng^{1,2}, ZHU Xiaodi¹, WANG Jinmei¹(1.Institute of TCM, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 2.Shanghai Branch, Sanofi (China) Investment Co., Ltd., Shanghai 200040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate *in vitro* antioxidant, anticoagulant and α -glucosidase inhibitory activities of different extracts of *Lonicerae japonicae* from Fengqiu. METHODS: The total extract was obtained from *L. japonicae* by extraction with 30% ethanol, and dispersed in water, from which the extracts of corresponding parts were obtained after extraction successively with trichloromethane and ethyl acetate. The *in vitro* antioxidant activity of different extracts from *L. japonicae* [reflected by IC_{50} , Trolox equivalent value] was investigated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) radical scavenging test and Fe^{3+} reduction and antioxidant capacity test. The α -glucosidase inhibitory activity and coagulant activity of 4 extracts were also studied *in vitro*. RESULTS: The ethyl acetate extract of *L. japonicae* had the highest antioxidant activity among 4 extracts, IC_{50} of ABTS and DPPH were 9.22, 25.23 $\mu\text{g/ml}$ and Trolox equivalent value was (2 480.80 \pm 5.51) $\mu\text{mol/g}$. Procoagulant activity of water extract and anticoagulation activity of *n*-butyl alcohol extract were the highest; the plasma recalcification time were (210.28 \pm 2.19) s and (149.20 \pm 1.25) s. Both total extract and ethyl acetate part inhibited the activity of α -glucosidase, and IC_{50} of re-screening were 378.61, 451.45 $\mu\text{g/ml}$. CONCLUSIONS: *L. japonicae* from Fengqiu have good antioxidant, anticoagulant and α -glucosidase inhibitory activities *in vitro*, and could be further developed and studied.

KEYWORDS *Lonicerae japonicae*; Fengqiu; Antioxidant; Coagulant; α -glucosidase; *in vitro*

金银花(*Lonicerae japonicae* Flos)为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾或带初开的花^[1],始载于《名医别录》,被列为上品。其性寒、味甘,具有清热解毒、凉散风热之功,主治痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等证^[2],为临床常用中药。研究表明,金银花中的活性成分包括挥发油、黄酮、三萜皂苷、有机酸等,具有抑菌、抗病毒、解热、抗炎、保肝、止血、抗氧化、降血脂等多种生物活性^[3]。

我国金银花资源丰富,传统以河南所产“南银花”和山东所产“东银花”质量最好,为道地药材。河南新密、封丘为“南银花”主产区,其中,封丘产金银花中绿原酸和木犀草苷含量均高于新密产金银花^[4],居全国各地金银花之首,并于2003年

1月获得国家质量监督检验检疫总局颁发的原产地标记注册证。文献调研发现,目前对封丘产金银花的研究较少,仅田野^[5]对其进行了系统的化学成分研究,但并未结合生物活性。本研究拟研究封丘产金银花的体外抗氧化、抗凝血及 α -葡萄糖苷酶抑制作用,为封丘产金银花资源的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AL104 电子天平、DELTA 320 pH计(美国Mettler-Toledo公司);LABOROTA 4000 旋转蒸发器(德国Heidolph公司);Multiskan MK3 酶标仪(美国Thermo Electron公司);LRH-150 恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)自由基(日本东京化成工业株式会社,批号:D0909,纯度:90%);2,2'-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)、三吡啶三嗪(TPTZ)

* 硕士。研究方向:中药化学。电话:0371-23880680。E-mail: zxfw0802@126.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药活性成分研究。电话:0371-23880680。E-mail:wangjinmeiscp@126.com

(美国 Fluka 公司,批号:101112411、1306929,纯度:均不低于 99.0%);6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧(Trolox, 美国 Aldrich 公司,批号:10327AD,纯度:97.0%);没食子酸丙酯(PG,批号:A019043001,纯度:98%)、丁基羟基茴香醚(BHA,批号:A019438801,纯度:96%)、二丁基羟基甲苯(BHT,批号:A020158601,纯度:99%)均购自比利时 Acros Organics 公司; α -葡萄糖苷酶(批号:129K1426,活力:194 U/mg)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,批号:026K1516,纯度: $\geq 99.0\%$)、阿卡波糖(批号:16869,纯度: $\geq 99.0\%$)均购自美国 Sigma 公司;维生素 K₁注射液(批号:1108023,规格:1 ml:10 mg)、2.775 g/L 氯化钙溶液(批号:1109051)均购自天津药业集团新郑股份有限公司;注射用灯盏花素(湖南恒生制药有限公司,批号:20110202,规格:20 mg/瓶);其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

金银花于 2012 年 7 月采集于河南省封丘县,由河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定为忍冬科(*Caprifoliaceae*)植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾或带初开的花,标本现存于河南大学中药研究所。

1.4 动物

獭兔,♂,体质量 2.0~2.5 kg,由河南大学中药研究所提供(合格证号:医动字 09-1-2 号)。

2 方法

2.1 金银花不同提取物的制备

取金银花 1.0 kg,30%乙醇回流提取 2 次,合并提取液,减压回收乙醇,得到总浸膏。将总浸膏分散于水中,用 50%硫酸调溶液 pH 至 2.0,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得相应部位萃取物。

2.2 体外抗氧化活性测定

2.2.1 Fe³⁺还原/抗氧化能力(FRAP)试验^[6] 将金银花 30%提取物总浸膏、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水提物样品分别用甲醇制备成 2 mg/ml 的溶液,按需稀释成不同质量浓度的样品溶液。用微量移液器取 0.2 ml 样品或对照品(PG、BHT、BHA)溶液加入到 3.8 ml 新鲜制备的 TPTZ 工作液中,混匀,于 37 ℃条件下反应 30 min 后用酶标仪测定其在 593 nm 波长处的吸光度,每份样品平行操作 3 次,取平均值。还原能力强弱以 Trolox 当量(每克样品相当于水溶性维生素 E 的微摩尔数)表示。

2.2.2 ABTS 自由基清除试验^[7] 按“2.1”项下方法制备金银花不同提取物的溶液,按需稀释成不同质量浓度的样品溶液。用微量移液器取 0.15 ml 样品或对照品(PG、BHT、BHA)溶液加入到 2.85 ml ABTS 自由基工作液中,混匀,10 min 后用酶标仪测定其在 734 nm 波长处的吸光度(A),每份样品平行操作 3 次,取平均值。计算 ABTS 自由基清除率:清除率(%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$,其中 $A_{\text{对照}}$ 为 ABTS 自由基工作液在 734 nm 波长处的 A 值, $A_{\text{样品}}$ 为样品或对照品与 ABTS 作用后并去除样品自身吸收后的 A 值。当样品初筛质量浓度为 2 000 $\mu\text{g/ml}$ 时,若清除率 $\geq 50\%$,则进行复筛试验,即将样品配制不同质量浓度,按上述方法测定清除率,用 Origin 软件绘制样品质量浓度与抑制率相关的曲线,求出半数清除浓度(IC₅₀);否则,不进行复筛试验。

2.2.3 DPPH 自由基清除试验^[6] 按“2.1”项下方法制备金银花不同提取物溶液,按需稀释成不同质量浓度的样品溶液。用微量移液器取 0.1 ml 样品或对照品(PG、BHT、BHA)溶液加入到 3.5 ml DPPH 甲醇溶液(0.06 mmol/L)中,混匀,静置 30 min 后用酶标仪测定其在 515 nm 波长处的吸光度(A),每份样

品平行操作 3 次,取平均值。计算 DPPH 自由基清除率:清除率(%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$,其中 $A_{\text{对照}}$ 为 DPPH 自由基工作液在 515 nm 波长处的 A 值, $A_{\text{样品}}$ 为样品与 DPPH 作用后并去除样品自身吸收后的 A 值。当样品初筛浓度为 2 000 $\mu\text{g/ml}$ 时,若清除率 $\geq 50\%$,则进行复筛试验,即将样品配制不同质量浓度,按上述方法测定清除率,用 Origin 软件绘制样品质量浓度与抑制率相关的曲线,求出 IC₅₀;否则,不进行复筛试验。

2.3 体外抗凝血活性测定

参考文献[8],设定空白组、4 个样品组(30%提取物总浸膏、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水提物)和 2 个阳性对照组(灯盏花素和维生素 K₁)。灯盏花素、维生素 K₁ 和各样品分别加入乙醇-丙二醇-注射盐水(2:2:6)溶液,超声振荡至溶解,制成质量浓度均为 1 mg/ml 的溶液。于兔耳缘静脉采血 3.6 ml,加至含 38 g/L 枸橼酸钠 400 μl 的 4 ml 离心管中,混匀,离心后取血浆,备用。取 1.5 ml 道夫管,空白组加入血浆 0.1 ml 及空白溶剂 0.1 ml;4 个样品组分别加入血浆 0.1 ml 及 30%提取物总浸膏、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水提物溶液各 0.1 ml;2 个阳性对照组分别加入血浆 0.1 ml 及相应药液 0.1 ml。于 37 ℃温育 1 min 后分别向每管加入 2.775 g/L 氯化钙溶液 0.1 ml,计时,直到检测到纤维蛋白丝时停止计时,即为血浆复钙时间。维生素 K₁、灯盏花素对照组和空白组分别平行测定 3 次,4 个样品组分别平行测定 6 次。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析法(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.4 体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

2.4.1 酶活力测定 参照文献[9],取 96 微孔板,每孔加入 8 μl 二甲亚砜(DMSO)、112 μl 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 6.8)和 40 U/ml 的 α -葡萄糖苷酶溶液 20 μl (溶于 PBS 缓冲液),振荡后于 37 ℃温育 15 min,然后加入 2.5 mmol/L PNPG 溶液(溶于 PBS),振荡后于 37 ℃温育 15 min,再加入 0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液 80 μl ,混匀。用酶标仪测定各孔在 405 nm 波长的光密度(OD)值。适量调整 α -葡萄糖苷酶溶液浓度,使 OD 值在 1.9~2.3 之间,可进行样品抑制活性测定。

2.4.2 体外 α -葡萄糖苷酶活力抑制能力测定 4 个样品均用 DMSO 制备成质量浓度为 30 mg/ml 的溶液,按需用 DMSO 稀释成相应质量浓度的样品溶液。根据反应体系,加入 8 μl 样品溶液、112 μl PBS(pH 6.8)、20 μl α -葡萄糖苷酶溶液(40 U/ml),振荡后于 37 ℃温育 15 min,加入 2.5 mmol/L PNPG 溶液,振荡后于 37 ℃温育 15 min,再加入 80 μl Na₂CO₃ 溶液(0.2 mol/L),用酶标仪测定其在 405 nm 波长下的光密度(OD)。同时设相同体系下不加酶的样品空白组、不加样品的空白对照组以及加阿卡波糖的阳性对照组。计算不同样品对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率:酶活性抑制率(%) = $(\text{OD}_{\text{样品+酶}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / (\text{OD}_{\text{DMSO+酶}} - \text{OD}_{\text{DMSO}}) \times 100\%$,当样品初筛质量浓度为 1 500 $\mu\text{g/ml}$ 时,若抑制率 $\geq 50\%$,则进行复筛试验,即将样品配制不同质量浓度,按上述方法测定抑制率,用 Origin 软件绘制样品质量浓度与抑制率相关的曲线,求出 IC₅₀;否则,不进行复筛试验。

3 结果

3.1 体外抗氧化活性测定结果

金银花水提物对 Fe³⁺还原能力和清除 ABTS、DPPH 自由基的活性均不好;金银花乙酸乙酯部位的抗氧化能力在 4 个提取物中最强,其 Trolox 当量大于 BHT,清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值低于 BHT;其次是总浸膏,但总浸膏的作用均弱于阳性对照,结果详见表 1。

3.2 体外抗凝血活性测定结果

表1 金银花不同溶剂提取部位的抗氧化活性测定结果

Tab 1 Antioxidant activity of different extracts from *L. japonicae*

| 样品 | Trolox 当量, μ mol/g($\bar{x} \pm s, n=3$) | ABTS 自由基的 IC ₅₀ , μ g/ml | DPPH 自由基的 IC ₅₀ , μ g/ml |
|-------------|---|--|--|
| 30%乙醇提取物总浸膏 | 690.73 ± 20.89 | 44.88 | NT |
| 乙酸乙酯部位 | 2 480.80 ± 5.51 | 9.22 | 25.23 |
| 正丁醇部位 | 216.87 ± 2.22 | 83.26 | NT |
| 水提物 | - | NT | NT |
| PG | 14 122.67 ± 366.78 | 0.98 | 4.04 |
| BHT | 1 160.27 ± 67.38 | 4.97 | 36.14 |
| BHA | 6 864.0 ± 565.24 | 2.86 | 9.33 |

注:“-”表示样品在最大质量浓度时 Trolox 当量为负值;“NT”表示清除率 < 50%, 未过初筛

Note:“-” means Trolox equivalent value is negative when the concentration of sample is in maximal value; “NT” means clearance rate < 50%, not passing preliminary screening

总浸膏组与空白组比较血浆复钙时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组与空白组比较血浆复钙时间显著缩短 ($P < 0.01$), 且与维生素 K₁ 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 乙酸乙酯部位和正丁醇部位表现出较强的体外促凝活性。水提物组与空白组比较血浆复钙时间显著延长 ($P < 0.001$), 与灯盏花素组比较血浆复钙时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 金银花水提物表现出较好的体外抗凝活性。综上所述, 具有促凝血作用的样品促凝顺序为维生素 K₁ > 正丁醇部位 > 乙酸乙酯部位; 具有抗凝活性的样品抗凝作用顺序为灯盏花素 > 水提物, 结果详见表 2。

表2 金银花不同溶剂提取部位对体外血浆复钙时间的影响 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 2 Effect of different extracts from *L. japonicae* on plasma recalcification time *in vitro* ($\bar{x} \pm s, s$)

| 样品 | n | 体外血浆复钙时间 |
|--------------------|---|------------------|
| 30%乙醇提取物总浸膏 | 6 | 191.88 ± 8.98 |
| 乙酸乙酯部位 | 6 | 153.80 ± 7.69** |
| 正丁醇部位 | 6 | 149.20 ± 1.25** |
| 水提物 | 6 | 210.28 ± 2.19*** |
| 空白组 | 3 | 174.13 ± 1.35 |
| 维生素 K ₁ | 3 | 146.33 ± 4.40** |
| 灯盏花素 | 3 | 215.55 ± 5.30** |

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.3 体外α-葡萄糖苷酶抑制活性测定结果

金银花水提物对α-葡萄糖苷酶活性的体外抑制作用较差。在初筛质量浓度为 1 500 μg/ml 时, 金银花 30% 乙醇提取物总浸膏和其乙酸乙酯部位的抑制率分别为 108.09%、102.81%, 均大于阳性对照阿卡波糖的 52.74%; 且其 IC₅₀ 分别为 378.61、451.45 μg/ml, 均小于阿卡波糖的 1 358.34 μg/ml。可见, 金银花 30% 乙醇提取物总浸膏、乙酸乙酯部位对α-葡萄糖苷酶活性均有较强的抑制作用, 且金银花乙酸乙酯部位效果要优于总浸膏, 结果详见表 3。

4 讨论

在前期研究^[10]中, 笔者从金银花 30% 乙醇提取物中的乙酸乙酯部位分离出 5 个化合物, 经过结构鉴定分别为二十五烷醇、β-谷甾醇、5-羟基-7, 4'-二甲氧基黄酮、α-D-葡萄糖和棕榈酸, 其中二十五烷醇和α-D-葡萄糖首次从该属植物中分离得到。本研究采用体外抗氧化活性的测定、体外凝血活性的测定以及α-葡萄糖苷酶活性抑制作用的测定, 考察了金银花不同

表3 金银花各溶剂部位对体外α-葡萄糖苷酶活性的影响

Tab 3 Effect of different extracts from *L. japonicae* on the activity of α-glucosidase *in vitro*

| 样品 | 初筛质量浓度, μg/ml | 初筛抑制率, % | 复筛 IC ₅₀ , μg/ml |
|-------------|---------------|----------|-----------------------------|
| 30%乙醇提取物总浸膏 | 1 500 | 108.09 | 378.61 |
| 乙酸乙酯部位 | 1 500 | 102.81 | 451.45 |
| 正丁醇部位 | 1 500 | 17.44 | NT |
| 水提物 | 1 500 | -4.42 | NT |
| 阿卡波糖 | 1 500 | 52.74 | 1 358.34 |

注:“NT”表示清除率 < 50%, 未过初筛

Note: “NT” means clearance rate < 50%, not passing preliminary screening

提取物的生物活性。其中, 抗氧化试验选择常用的食品抗氧化剂 PG、BHT、BHA 作为阳性对照, 这 3 种物质的 Trolox 当量和对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除能力均不同, 可更全面地评价金银花各样品的抗氧化活性。在体外凝血活性测定试验中, 以临床常用的止血药物维生素 K₁ (可促使肝脏合成凝血酶原) 作为促凝血活性的阳性对照, 以活血药物灯盏花素 (具有抗血小板聚集作用) 作为抗凝血活性的阳性对照, 可分别评价金银花不同样品的促凝血或抗凝血活性。

结果表明, 金银花乙酸乙酯部位的抗氧化活性以及对α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用均要优于其总浸膏、正丁醇部位及水提物; 金银花水提物的抗凝血作用效果较好, 而金银花的正丁醇部位的促凝血效果要优于乙酸乙酯部位, 原因可能与金银花各部位所含的化学成分有关。刘慧琼等^[11]研究半夏中β-谷甾醇的抗氧化作用发现, β-谷甾醇对氧自由基具有较强的抑制作用, 对油脂也有较强的抗氧化作用。从金银花乙酸乙酯部位中分离出的化合物中含有β-谷甾醇和黄酮类化合物, 因此根据本研究结果认为金银花乙酸乙酯部位的抗氧化活性较好, 此观点与文献^[11]相符。

综上, 本研究体外活性实验结果表明, 金银花具有一定的抗氧化、抗凝血及抑制α-葡萄糖苷酶活性, 其中以乙酸乙酯部位活性最强。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 72, 236.
- [3] 宋卫霞. 金银花水溶性化学成分研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [4] 李建军, 李军芳, 梁建强, 等. 豫金银花指标成分的 HPLC 测定分析[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2012, 30(2): 94.
- [5] 田野. 金银花化学成分研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [6] 宋艳丽, 康文艺. 帽蕊木抗氧化活性研究[J]. 精细化工, 2009, 26(2): 150.
- [7] 康文艺, 李彩芳, 宋艳丽. 蝉翼藤抗氧化吡啶酮成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1 982.
- [8] 顾海鹏, 王佳佳, 顾雪竹, 等. 黑莓(萨尼)和红树莓(哈瑞特斯)对凝血作用的影响[J]. 河南大学学报: 医学版, 2013, 32(1): 35.
- [9] 康文艺, 张丽, 宋艳丽. 滇丁香中抑制α-葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 406.
- [10] 朱小峰. 金银花活性成分研究[D]. 开封: 河南大学, 2014.
- [11] 刘慧琼, 郭书好, 沈英森, 等. 半夏中β-谷甾醇的抗氧化作用研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 281.

(收稿日期: 2016-03-21 修回日期: 2016-08-09)

(编辑: 林 静)