

滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位的抗氧化和降脂活性研究[△]

李欣坪*,王蒙蒙,王子晨,方琼莲,林玉萍*(云南中医药大学中药学院/云南省南药可持续利用重点实验室,昆明650500)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0220-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.16

摘要 目的:研究滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位的抗氧化活性和降脂活性。方法:取滇黄芩茎叶用95%乙醇回流提取,得乙醇提取物;取上述提取物,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂得到不同溶剂萃取部位。以维生素C(Vc)为阳性对照,采用羟基自由基、超氧阴离子自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除法检测滇黄芩茎叶乙醇提取物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物的体外抗氧化活性并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。以脂肪乳建立脂肪变性L02肝细胞模型,以非诺贝特(20 μg/mL)为阳性对照,考察高、低质量浓度(100、50 μg/mL)滇黄芩茎叶乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物对细胞中TC、TG含量的影响。结果:对羟基自由基的清除能力强弱排序为滇黄芩茎叶正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>Vc>乙醇提取物>石油醚萃取物,IC₅₀分别为0.15、0.17、0.35、0.75、1.17 mg/mL;对超氧阴离子自由基的清除能力强弱排序为Vc>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>乙醇提取物>石油醚萃取物,IC₅₀分别为0.034、0.55、0.75、3.32、3.73 mg/mL;对DPPH自由基的清除能力强弱排序为Vc>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>乙醇提取物>石油醚萃取物,IC₅₀分别为0.003 2、0.028、0.033、0.048、0.057 mg/mL。滇黄芩茎叶乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物对脂肪变性L02肝细胞中TC、TG含量均有显著的降低作用(P<0.01),其降脂能力强弱排序为正丁醇萃取物(低浓度)≈非诺贝特>乙酸乙酯萃取物(高浓度)>乙醇提取物(高浓度)>正丁醇萃取物(高浓度)>乙酸乙酯萃取物(低浓度)>乙醇提取物(低浓度)。结论:滇黄芩茎叶乙醇提取物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物均有一定的抗氧化活性和降脂活性(除石油醚萃取物外),其中正丁醇和乙酸乙酯萃取物的抗氧化活性和降脂活性较高。

关键词 滇黄芩茎叶;乙醇提取物;抗氧化活性;降脂活性

Study on Antioxidant Activity and Lipid-lowering Effect of Ethanol Extract and Its Different Solvent Extracts from the Stem and Leaves of *Scutellaria amoena*

LI Xinping, WANG Mengmeng, WANG Zichen, FANG Qionglian, LIN Yuping (School of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Resource, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the antioxidant activity and lipid-lowering effect of ethanol extract and its different solvent extracts from the stems and leaves of *Scutellaria amoena*. METHODS: The stem and leaves of *S. amoena* was extracted with 95% ethanol to obtain ethanol extract, and then extracted with petroleum, ethyl acetate and *n*-butanol to obtain corresponding different solvent extracts. Using vitamin C (Vc) as positive control, the antioxidant activities of ethanol extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract from the stems and leaves of *S. amoena* were determined by hydroxyl radical, superoxide anion radical and DPPH radical scavenging method, and the IC₅₀ was calculated. Steatosis L02 hepatocyte model was established with fat emulsion. Using fenofibrate (20 μg/mL) as positive control, the effects of high and low concentration (100 and 50 μg/mL) ethanol extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract from the stems and leaves of *S. amoena* on the contents of TC and TG in cells were investigated. RESULTS: The order of scavenging ability to hydroxyl radicals was *n*-butanol extract>ethyl acetate extract>Vc>ethanol extract>petroleum ether extract; IC₅₀ of them were 0.15, 0.17, 0.35, 0.75, 1.17 mg/mL, respectively. The order of scavenging ability to superoxide anion radical was Vc>*n*-butanol extract>ethyl acetate extract>ethanol extract>petroleum ether extract; IC₅₀ of them were 0.034, 0.55, 0.75, 3.32, 3.73 mg/mL, respectively. The order of DPPH scavenging ability to DPPH radical was Vc>*n*-butanol extract>ethyl acetate extract>ethanol extract>petroleum ether extract; IC₅₀ of them were 0.003 2, 0.028, 0.033, 0.048, 0.057 mg/mL, respectively. The ethanol extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract from the stems and leaves of *S. amoena* could significantly decrease the contents of TC and TG in steatosis L02 hepatocytes (P<0.01). The order of

[△] 基金项目:云南省科技厅云南中医学院应用基础研究联合专项[No.2017F117(-022)];云南中医药大学大学生创新、创业训练项目(No.2019)

* 硕士研究生。研究方向:中药资源利用与开发。电话:0871-67429034。E-mail:2515034118@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:中药、天然药物活性。电话:0871-67429034。E-mail:11217005@qq.com

lipid-lowering ability was *n*-butanol extract(low dose)≈fenofibrate>ethyl acetate extract(high dose)>ethanol extract(high dose)>*n*-butanol extract(high dose)>ethyl acetate extract(low dose)>ethanol extract(low dose). CONCLUSIONS: The ethanol extract, petroleum ether extract, ethyl acetate extract and *n*-butanol extract from the stems and leaves of *S. amoena* show good antioxidant activity and lipid-lowering effect (except for petroleum ether extract). Ethyl acetate extract and *n*-butanol extract possess the strongest antioxidant activity and lipid-lowering effect.

KEYWORDS Stem and leaves of *Scutellaria amoena*; Ethanol extract; Antioxidant activity; Lipid-lowering activity

滇黄芩 *Scutellaria amoena* C. H. Wright 是云南地区多种民族药的药用资源,又名小黄芩、西南黄芩、土黄芩等,为唇形科黄芩属植物,主要分布在我国云南、四川、贵州等地^[1-2]。《滇南本草》《中国彝药学》《云南民族药大辞典》等书记载,滇黄芩性寒、味苦,归肝、胆、胃、肺、大肠经,具有清肺胃热、燥湿气、消炎、解毒、安胎、止血等功效^[3-4]。滇黄芩茎叶作为具有降脂作用的黄芩茶使用历史悠久,其主要含有黄酮类化合物^[5]。近年来,随着对中药黄芩研究的不断深入,黄芩同属植物的药用价值日益受到国内外学者的关注,有关滇黄芩茎叶的药用价值已成为研究热点之一^[6-7]。

现代药理研究报道显示,滇黄芩根部总黄酮具有较强的抗氧化活性,可抗心律失常并可阻滞心肌细胞钠通道^[8-10];滇黄芩茎叶还具有降脂作用,可降低高脂血症模型大鼠的血脂水平^[11]。但其醇提取物及不同溶剂萃取部位抗氧化活性和降脂活性的比较研究尚未见报道。为此,本研究通过检测滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基、超氧阴离子自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除能力来评价其体外抗氧化活性;采用脂肪变性人L02肝细胞模型,通过检测细胞内总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)含量的变化来评价其降脂活性,筛选其抗氧化和降脂活性的有效部位,为滇黄芩茎叶的进一步研究与开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

本文所用实验仪器有:UV2450型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司)、SHZ-D型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限公司)、RE-2000A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、DK-98-II型电热恒温水浴锅(上海医疗器械股份有限公司医疗器械五厂)、BT2202S型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]、Infinite M200 Pro型酶标仪(瑞士Tecan公司)、MCO-20AIC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司)、SK3300LH型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

滇黄芩全株采自云南省新平县,经云南中医药大学普春霞副教授鉴定为唇形科植物滇黄芩 *S. amoena* C. H. Wright,取其茎叶进行研究。

20%脂肪乳注射液[批号201807,规格250 mL:50 g(大豆油):3 g(卵磷脂)]购自四川科伦药业股份有限公司,青霉素-链霉素双抗溶液、0.25%胰蛋白酶、RPMI-1640培养液、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)、胎牛血清(批

号0010419、0040819、0020319、2012004、1906287)均购自以色列BI公司,非诺贝特胶囊(批号28212,规格200 mg/粒)购自美国Abbott Laboratories Limited公司,TC、TG检测试剂盒(批号20200618、20200615)均购自南京建成生物工程研究所,DPPH购自美国Sigma公司,维生素C(Vc,批号20140102,纯度≥99.7%)和七水硫酸铁(FeSO₄·7H₂O)均购自广东光华科技股份有限公司,Trition X-100试剂(批号FZ6688A189)购自广州赛国生物科技有限公司,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、磷酸二氢钠、30% H₂O₂溶液、邻苯三酚、邻二氮菲、磷酸氢二钠(均为分析纯)均购自天津市风船化学试剂科技有限公司,无水乙醇、盐酸、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(均为分析纯)均购自云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞

正常人L02肝细胞株由中国科学院昆明动物研究所提供。

2 方法

2.1 滇黄芩茎叶乙醇提取物和不同溶剂萃取部位萃取物的制备

称取干燥的滇黄芩茎叶400 g,加入95%乙醇3 200 mL,加热回流提取3次,提取时间分别为2、1、1 h,减压过滤,合并提取液,减压蒸馏回收乙醇,干燥,得到滇黄芩茎叶乙醇提取物30.72 g(得率7.68%)。取上述乙醇提取物25 g,用水重悬,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,分别得到石油醚萃取物4.03 g(得率16.12%)、乙酸乙酯萃取物9.16 g(得率36.64%)、正丁醇萃取物3.42 g(得率13.68%)。

2.2 抗氧化试验

2.2.1 样品溶液的配制 分别称取滇黄芩茎叶乙醇提取物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和Vc各0.05 g,加水20 mL,超声(功率200 W,频率53 kHz)处理5 min,滤过,滤液用水定容于50 mL量瓶中,配制成质量浓度均为1.0 g/mL(以提取物或Vc质量计,下同)的母液,备用。临用时用水稀释至所需浓度,浓度按预试验结果设置。

2.2.2 对羟基自由基的清除能力的检测 参考文献[12]方法,在10 mL具塞试管中,分别加入质量浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg/mL(乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和Vc)或0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL(乙醇提取物、石油醚萃取物)的样品溶液和0.75

mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液各 1 mL, 再加入 0.75 mmol/L 邻二氮菲溶液和 0.01% H_2O_2 溶液各 1 mL, 于 37 °C 保温 1 h, 取出, 使用紫外-可见分光光度计在 536 nm 波长处检测吸光度 (A_n'); 另以水替代 H_2O_2 溶液同法检测吸光度 (A_n), 以水替代样品溶液同法检测吸光度 (A_0'), 以水替代样品溶液和 H_2O_2 溶液同法检测吸光度 (A_0)。以 Vc 作为阳性对照, 每个样品重复检测 3 次, 取平均值, 计算羟基自由基清除率: 羟基自由基清除率 (%) = $[1 - (A_n - A_n') / (A_0 - A_0')] \times 100\%$ 。以清除率 ($y, \%$) 为纵坐标、质量浓度 ($x, \text{mg/mL}$) 为横坐标进行回归分析, 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.2.3 对超氧阴离子自由基的清除能力的检测 参考文献[13]方法, 在 10 mL 具塞试管中, 分别加入质量浓度分别为 0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL (Vc) 或 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL (乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物) 或 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL (乙醇提取物、石油醚萃取物) 的样品溶液 1 mL、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 4.5 mL, 在 25 °C 下恒温水浴 20 min, 再加入 3 mol/L 的邻苯三酚溶液 0.5 mL, 迅速混匀后于 37 °C 下保温 5 min, 立即加入浓盐酸 (8 mol/L) 2 滴终止反应, 使用紫外-可见光光度计在 425 nm 波长处检测吸光度 (A_1); 另以水替代邻苯三酚溶液同法检测吸光度 (A_2), 以水替代样品溶液同法检测吸光度 (A_0)。以 Vc 作为对照, 每个样品重复检测 3 次, 取平均值, 计算超氧阴离子自由基清除率: 超氧阴离子自由基清除率 (%) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。按“2.2.2”项下方法计算 IC_{50} 。

2.2.4 对 DPPH 自由基的清除能力的检测 参考文献[14]方法, 在 10 mL 具塞试管中, 分别加入质量浓度分别为 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006 mg/mL (Vc) 或 0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL (乙醇提取物、石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物) 的样品溶液和 0.125 mmol/L DPPH 溶液各 2 mL, 混匀, 于 37 °C 水浴中反应 30 min, 使用紫外-可见光光度计在 517 nm 波长处检测吸光度 (A_1); 以无水乙醇替代 DPPH 溶液同法检测吸光度 (A_2), 以无水乙醇替代样品溶液同法检测吸光度 (A_0)。以 Vc 作为对照, 每个样品重复检测 3 次, 取平均值, 计算 DPPH 自由基清除率: DPPH 自由基清除率 (%) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。按“2.2.2”项下方法计算 IC_{50} 。

2.3 降脂试验

2.3.1 供试品药液的配制 分别精密称滇黄芩茎叶乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物 (根据抗氧化活性结果选择样品, 其中石油醚萃取物抗氧化活性欠佳, 故不进行降脂试验) 各 2.0 g, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配制成质量浓度均为 1 mg/mL 的母液, 再用 RPMI-1640 培养液将其稀释成 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品药液。同法将非诺贝特 (阳性对照) 配制成质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品药液。浓度按预试验结果设置。

2.3.2 培养液和造模液的配制 (1) 含 0.2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液: 将胎牛血清 1 mL 和青霉素-链霉素双抗溶液 5.6 mL 加入至 RPMI-1640 培养液 500 mL 中, 即得含 0.2% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养液。(2) 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液: 将胎牛血清 55 mL 和青霉素-链霉素双抗溶液 5.6 mL 加入至 RPMI-1640 培养液 500 mL 中, 即得含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养液。(3) 10% 医用脂肪乳造模液: 将医用脂肪乳 10 mL 加入至含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 90 mL 中, 即得。

2.3.3 脂肪变性 L02 肝细胞模型的建立 参考文献方法^[15], 取对数生长期的 L02 肝细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱及饱和湿度条件 (培养条件下) 下培养, 当细胞长至 80% 融合时, 用含 0.2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液进行饥饿处理 24 h, 使细胞周期同步化, 随后每孔加入 10% 医用脂肪乳造模液 2 mL, 继续培养 24 h, 以建立脂肪变性 L02 肝细胞模型。

2.3.4 分组、给药与处理 将细胞周期同步化后的细胞分为正常对照组、模型组、非诺贝特组和提取物/萃取物高、低浓度组, 每组设 3 个复孔。除正常对照组细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养 24 h 外, 其余各组细胞均按“2.3.3”项下方法建模。建模后, 正常对照组和模型组细胞分别加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 2 mL, 非诺贝特组和提取物/萃取物高、低浓度组细胞分别加入“2.3.1”项下供试品药液 2 mL。培养 24 h 后, 用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 收集细胞并置于 1.5 mL 离心管中, 以 2 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 沉淀加入 2% Triton X-100 试剂 30 μL , 反复冻融 3 次, 待细胞充分裂解后, 于 4 °C 下以 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按生化法以酶标仪测定 TC 和 TG 的含量, 具体操作按试剂盒说明书操作。

2.4 数据处理

统计图和回归分析采用 GraphPad Prism 5.0 软件处理, 统计学分析使用 SPSS 18.0 软件完成。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基清除能力的影响

滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基均有不同程度的清除能力, 其清除率有随质量浓度增加而升高的趋势。其中, 滇黄芩茎叶乙醇提取物和石油醚萃取物对羟基自由基的清除能力均弱于 Vc, 而其乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物对羟基自由基的清除能力均强于 Vc。各提取物/萃取物清除能力强弱 (即 IC_{50} 由小到大) 排序为: 正丁醇萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > Vc > 乙醇提取物 > 石油醚萃取物。回归分析结

果显示,滇黄芩茎叶乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的质量浓度与清除率的相关系数(R^2)均大于0.9,表明其对羟基自由基的清除能力与质量浓度之间具有良好的线性关系。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基清除能力的影响见图1,回归分析结果见表1。

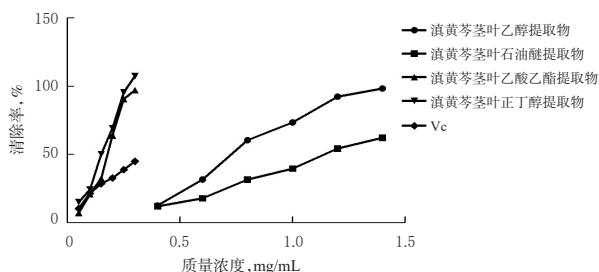


图1 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基清除能力的影响

Fig 1 Effects of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* on hydroxyl radicals scavenging ability

表1 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基清除率的回归分析结果

Tab 1 Regression analysis results of scavenging rate of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* to hydroxyl radicals

待测样品	回归方程	R^2	IC ₅₀ ,mg/mL
滇黄芩茎叶乙醇提取物	$y=94.63x-21.2301$	0.9487	0.75
滇黄芩茎叶石油醚萃取物	$y=49.36x-7.8657$	0.8816	1.17
滇黄芩茎叶乙酸乙酯萃取物	$y=391.43x-16.3332$	0.9711	0.17
滇黄芩茎叶正丁醇萃取物	$y=381.62x-7.0105$	0.9831	0.15
Vc	$y=122.33x+8.2261$	0.9407	0.35

3.2 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基清除能力的影响

滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基均有不同程度的清除能力,其清除率有随质量浓度增加而升高的趋势,但当乙醇提取物和石油醚萃取物的质量浓度 ≥ 4 mg/mL时,其清除率上升减慢。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基的清除能力强弱(即IC₅₀由小到大)排序为:Vc>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>乙醇提取物>石油醚萃取物。回归分析结果显示,滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基的清除能力与质量浓度之间具有良好的线性关系。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基清除能力的影响见图2,回归分析结果见表2。

3.3 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对DPPH自由基清除能力的影响

滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对

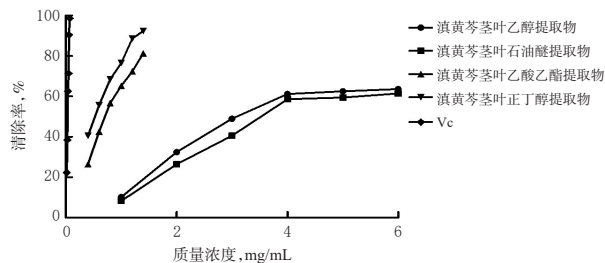


图2 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基清除能力的影响

Fig 2 Effects of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* on superoxide anion radical scavenging ability

表2 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对超氧阴离子自由基清除率的回归分析结果

Tab 2 Regression analysis results of scavenging rate of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* to superoxide anion radicals

待测样品	回归方程	R^2	IC ₅₀ ,mg/mL
滇黄芩茎叶乙醇提取物	$y=10.5537x+9.5687$	0.8530	3.32
滇黄芩茎叶石油醚萃取物	$y=10.9369x+4.1762$	0.8953	3.73
滇黄芩茎叶乙酸乙酯萃取物	$y=53.1300x+9.6013$	0.9722	0.75
滇黄芩茎叶正丁醇萃取物	$y=52.2986x+23.2834$	0.9747	0.55
Vc	$y=1561.43x-6.3210$	0.9815	0.034

DPPH自由基均有不同程度的清除能力,其清除率有随质量浓度增加而升高的趋势。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对DPPH自由基的清除能力强弱(即IC₅₀由小到大)排序为:Vc>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>乙醇提取物>石油醚萃取物。回归分析结果显示,滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位的质量浓度与清除率的 R^2 均大于0.9,表明其对DPPH自由基的清除能力与质量浓度之间具有良好的线性关系。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对DPPH自由基清除能力的影响见图3,回归分析结果见表3。

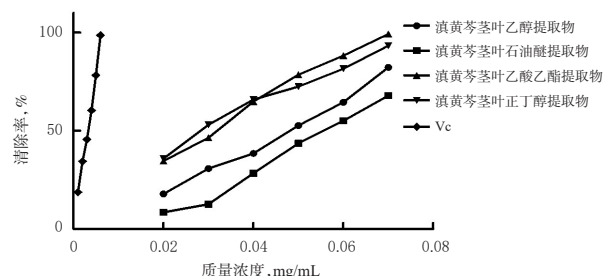


图3 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对DPPH自由基清除能力的影响

Fig 3 Effects of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* on DPPH radical scavenging ability

表3 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对DPPH自由基清除率的回归分析结果

Tab 3 Regression analysis results of scavenging rate of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* to DPPH radicals

待测样品	回归方程	R ²	IC ₅₀ /mg/mL
滇黄芩茎叶乙醇提取物	y=1 237.94x-7.307 4	0.992 8	0.048
滇黄芩茎叶石油醚萃取物	y=1 248.40x-20.521 3	0.986 4	0.057
滇黄芩茎叶乙酸乙酯萃取物	y=1 320.23x+8.256 4	0.999 6	0.033
滇黄芩茎叶正丁醇萃取物	y=1 084.57x+18.174 3	0.979 0	0.028
Vc	y=1 5587.1x+1.446 7	0.990 8	0.003 2

3.4 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对脂肪变性L02肝细胞中TC、TG水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中TC、TG含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组细胞中TC、TG含量均显著降低($P<0.01$),说明滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位均能显著降低脂肪变性L02细胞中的TC、TG水平,降脂活性强弱(即TC、TG变化程度)排序为:正丁醇萃取物(低浓度)≈非诺贝特>乙酸乙酯萃取物(高浓度)>乙醇提取物(高浓度)>正丁醇萃取物(高浓度)>乙酸乙酯萃取物(低浓度)>乙醇提取物(低浓度)。滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对脂肪变性L02肝细胞中TG、TC含量的影响见表4。

表4 滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对脂肪变性L02肝细胞中TG、TC含量的影响

Tab 4 Effects of ethanol extract and different solvent extracts from the stems and leaves of *S. amoena* on the contents of TG and TC in steatosis L02 hepatocytes

组别	给药浓度, μg/mL	TC, mmol/L	TG, mmol/L
正常对照组		2.34±0.21	1.01±0.27
模型组		3.15±0.50**	1.48±0.15**
非诺贝特组	20	2.39±0.16 ^{##}	1.02±0.15 ^{##}
滇黄芩茎叶乙醇提取物高浓度组	100	2.43±0.52 ^{##}	1.20±0.08 ^{##}
滇黄芩茎叶乙醇提取物低浓度组	50	2.77±0.55 ^{##}	1.29±0.15 ^{##}
滇黄芩茎叶乙酸乙酯萃取物高浓度组	100	2.40±0.09 ^{##}	1.19±0.13 ^{##}
滇黄芩茎叶乙酸乙酯萃取物低浓度组	50	2.74±0.52 ^{##}	1.28±0.14 ^{##}
滇黄芩茎叶正丁醇萃取物高浓度组	100	2.72±0.56 ^{##}	1.26±0.23 ^{##}
滇黄芩茎叶正丁醇萃取物低浓度组	50	2.35±0.34 ^{##}	1.05±0.17 ^{##}

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ^{##} $P<0.01$

4 讨论

自由基是机体正常代谢的产物,其含量轻微增加可提升机体抗氧化的能力;但当自由基含量过高时,其会攻击细胞膜造成机体的损伤^[16]。近年来医学研究证实,诸多疾病,例如恶性肿瘤、动脉粥样硬化、糖尿病、脂代谢异常等都与人体内异常积聚的自由基有关^[17-18]。中药含有的黄酮类、酚类、皂苷、多糖等化学成分具有良

好的抗氧化活性,寻找天然抗氧化剂来清除人体内的自由基从而预防相关疾病的发生已成为研究热点之一。^[19-21]。

本研究采用羟基自由基、超氧阴离子自由基、DPPH自由基清除法对滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位的抗氧化能力进行了评价。结果表明,滇黄芩茎叶乙醇提取物及其不同溶剂萃取部位对羟基自由基、超氧阴离子自由基、DPPH自由基均表现出不同程度的清除作用,并呈一定的量效关系趋势。其中,正丁醇和乙酸乙酯萃取物的抗氧化作用较强(IC₅₀均相对较小),提示滇黄芩茎叶抗氧化活性成分可能主要集中在正丁醇和乙酸乙酯部位。本文同时以脂肪变性L02细胞中TC、TG含量的变化来评价具有显著抗氧化活性的乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物的降脂活性,并选择了常用于治疗高TG血症、血脂异常、糖尿病等代谢性疾病的非诺贝特为阳性药物^[22]。研究表明,滇黄芩茎叶乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物均能显著降低脂肪变性L02细胞中TC、TG含量,具有明显的降脂活性。

综上所述,滇黄芩茎叶乙酸乙酯和正丁醇部位的抗氧化和降脂活性较强,可作为探究滇黄芩茎叶抗氧化和降脂活性部位继续研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第65卷:第2分册[M].北京:科学出版社,2016:192.
- [2] 杨本雷,于惠祥.中国彝族药学[M].昆明:云南民族出版社,2004:78.
- [3] 兰茂.滇南本草[M].昆明:云南人民出版社,1976:466.
- [4] 郑进,张超,钱子刚.云南民族医药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2019:673.
- [5] 付胜男,虎春艳,刘海鸥,等.滇黄芩地上部分化学成分的分鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(10):55-59.
- [6] 庞溢媛,周玉枝,宋佳,等.基于¹H-NMR血清和肝脏代谢组学的黄芩叶抗衰老作用研究[J].药科学报,2020,55(1):74-82.
- [7] 冯雪,周玉枝,柴建新,等.基于¹H-NMR代谢组学的黄芩茶与黄芩叶水提物延长果蝇寿命研究[J].药科学报,2020,55(6):1214-1221.
- [8] 刘海鸥,虎春艳,赵声兰,等.滇黄芩总黄酮酶解超声提取及抗氧化活性研究[J].中国酿造,2016,35(1):110-114.
- [9] 何晓山,周宁娜,林青,等.滇黄芩总黄酮抗心律失常作用的实验研究[J].中国中药杂志,2010,35(4):508-510.
- [10] 何晓山,彭林,林青,等.滇黄芩总黄酮对豚鼠心肌细胞电压依赖性钠通道电流的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):192-195.
- [11] 何春年,彭勇,肖伟,等.黄芩茶的应用历史与研究现状[J].中国现代中药,2011,13(11):3-7,19.
- [12] 杨皓彬,杨娜,柏雪,等.白茶中茶多酚提取工艺及抗氧化活性的研究[J].中国食品学报,2014,14(12):24-31.
- [13] 王君,陈新,张兆英,等.二色补血草生物活性成分提取及

一测多评法同时测定扶正固本颗粒中6种成分的含量^Δ

仝立国*,牛艳艳,王若瑜,吉海杰,宋美卿,冯玛莉,夏召弟,汪欣文[#](山西省中医药研究院,太原 030012)

中图分类号 R944.2⁷;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0225-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.17

摘要 目的:建立扶正固本颗粒中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等6种成分含量的测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为275 nm(0~8 min)、320 nm(8~9 min)和275 nm(9~33 min),流速为1.0 mL/min,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。以黄芩苷为基准物,采用多点校正法和斜率校正法分别计算另外5种成分的相对校正因子(f_{ks}),并采用保留时间差值法对待测成分进行色谱峰定位,比较上述两种一测多评法所得计算值与外标法实测值的差异。结果:2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、黄芩苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素检测进样量的线性范围分别为0.053~2.12、0.163~6.52、0.059~2.36、0.021 6~0.864、0.03~1.2、0.021~0.84 μg($r>0.999$),精密度、稳定性(12 h)、重复性试验的RSD均小于3%;平均加样回收率为98.72%~99.82%(RSD为0.89%~1.24%, $n=9$)。以黄芩苷为基准物,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷、淫羊藿苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素多点校正法的 f_{ks} 分别为1.172、0.528、1.479、1.820、2.534,斜率校正法的 f_{ks} 分别为1.234、0.550、1.559、1.939、2.664;3种方法测得10批扶正固本颗粒中6种成分含量的RSD为0.29%~2.77%($n=10$);两种一测多评法测得结果与外标法的Pearson相关系数均不低于0.999 9($P<0.001$)。结论:成功建立了可用于同时测定扶正固本颗粒中6种成分含量的一测多评法。

关键词 一测多评法;扶正固本颗粒;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯基葡萄糖苷;黄芩苷;淫羊藿苷;汉黄芩苷;黄芩素;汉黄芩素;含量

Simultaneous Determination of the Contents of 6 Components in Fuzheng Guben Granules by QAMS

TONG Ligu, NIU Yanyan, WANG Ruoyu, JI Haijie, SONG Meiqing, FENG Mali, XIA Zhaodi, WANG Xinwen (Shanxi Academy of TCM, Taiyuan 030012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination of 6 components in Fuzheng guben granules, such as 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene glucoside, baicalin, icariin, scutellarin, baicalein and wogonin. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 275 nm (0-8 min), 320 nm(8-9 min) and 275 nm(9-33 min). The column temperature was set at 25 ℃, and sample size was 10 μL. With baicalin as reference material, the relative correction factors (f_{ks}) of other five components were calculated by multi-point

- 抗氧化功能研究[J].植物生理学报,2019,55(12):1785-1796.
- [14] 陈石梅,黄比翼,黄锁义.草果醇提取物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J].中国药房,2020,31(8):953-956.
- [15] 罗燕,和兴萍,李雪,等.几种细胞脂肪变性模型的建立与比较分析[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2074-2077.
- [16] 樊岫珊.羟基自由基诱导DNA损伤机理研究进展[J].生物学杂志,2017,34(1):80-84.
- [17] 张蕊,仝媛媛,陈龙,等.天然来源的抗氧化剂的临床应用及研究进展[J].山东化工,2020,49(22):48-52.
- [18] 马丹丹,汪雯翰,薛蓓,等.桦褐孔菌降糖活性成分及治疗糖尿病机制研究进展[J].南京师大学报(自然科学版),2019,42(4):111-117.
- [19] 刘玉婷,李井雷.多糖体外抗氧化活性研究进展[J].食品研究与开发,2019,40(6):214-219.
- [20] 李婧雯,包怡红.不同溶剂的蒲公英根提取物的抗氧化活性及降糖能力比较分析[J].现代食品科技,2020,36(5):64-72.
- [21] SAGAR NA, PAREEK S, GONZALEZ-AGUILAR GA. Quantification of flavonoids, total phenols and antioxidant properties of onion skin: a comparative study of fifteen Indian cultivars[J]. J Food Sci Tech, 2020, 57 (7) : 2423-2432.
- [22] 张丹,周波,邓溢,等.非诺贝特对非酒精性脂肪性肝病小鼠模型肠道菌群多样性的影响[J].临床肝胆病杂志,2020,36(4):829-834.

Δ 基金项目:山西省中药现代化关键技术研究振东专项基金项目(No.2016ZD0302)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药药效物质基础及质量标准。E-mail: dboy-007@163.com

通信作者:副主任医师。研究方向:肿瘤内科学。E-mail: zf-xfdy@163.com

(收稿日期:2020-09-13 修回日期:2020-12-13)
(编辑:邹丽娟)