

文章编号:1001-6880(2014)3-0318-06

电子顺磁共振对五种中草药抗氧化活性的研究

周丽芳¹,朱翔¹,赵红莉¹,蓝闽波^{1,2*},史新梅²¹华东理工大学 上海市功能性材料化学重点实验室;²华东理工大学分析测试中心,上海 200237

摘要:采用电子顺磁共振(EPR)技术,通过大黄、香青兰、香茅草、槲寄生和骆驼蓬子五种中草药对1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基(O_2^-)3种自由基清除能力大小的比较,研究了大黄等五种中草药抗氧化活性能力。这五种中草药对3种自由基均有一定的清除作用,其中大黄清除DPPH和超氧阴离子自由基的 IC_{50} 小于0.5 mg/mL,清除羟基自由基的 $\text{IC}_{50} = 1.892 \text{ mg/mL}$ 。结果表明五种中草药中大黄的抗氧化活性能力最强,为中草药用于生物体的抗氧化应激研究提供依据。

关键词:电子顺磁共振;抗氧化活性;中草药;自由基

中图分类号:O657.61

文献标识码:A

Study on Antioxidant Activities of Traditional Chinese Medicines by Electron Paramagnetic Resonance Technique

ZHOU Li-fang¹, ZHU Xiang¹, ZHAO Hong-li¹, LAN Min-bo^{1,2*}, SHI Xin-mei²¹Shanghai Key Laboratory of Functional Materials Chemistry, East China University of Science and Technology;²Research Centre of Analysis and Test, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: In this study, electron paramagnetic resonance (EPR) technique was used to investigate the antioxidant activities of five traditional Chinese medicines (TCM), including rhubarb, *Dracocephalum moldavica* L., lemongrass, mistletoe and seed of common peganum. The 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH), hydroxyl free radical and superoxide anion free radicals scavenging abilities of the five studied TCMs were investigated. The results indicated that the five studied TCMs all showed scavenging abilities against three free radicals, in which rhubarb exhibited the strongest activities. Its IC_{50} of scavenging DPPH and superoxide anion free radical were all less than 0.5 mg/mL and the IC_{50} of scavenging hydroxyl free radical was 1.892 mg/mL.

Key words: electron paramagnetic resonance; antioxidant activities; traditional Chinese medicine; free radical

通常情况下,生物体在代谢的过程中不断地产生自由基,也有许多自由基中间体的参与,体内自由基的产生和消除在正常情况下始终保持着一种动态的平衡状态^[1]。当环境有害因素诱导生物体体内活性氧自由基大量释放,大大超出了正常水平,就导致了机体的氧化应激状态,引起机体的氧化应激损伤^[2]。而一些抗氧化剂能有效地清除生物体体内产生的过量的自由基,提高机体的抗氧化能力,降低氧化应激引起的脂质过氧化反应,有效地起到防止氧化损伤^[3]。中草药是天然抗氧化剂,其抗氧化能力和中草药清除自由基的能力有关。本文主要利用电子顺磁共振技术研究比较了大黄等5种中草药对

DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的清除能力的大小,得到了抗氧化活性能力较强的中草药,为中草药用于生物体的抗氧化应激研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验材料:大黄、香青兰、香茅草、槲寄生和骆驼蓬子,购自上海雷允上药品连锁凌云店。

实验试剂:5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)、二乙三胺五乙酸(DETAPAC)、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH)、黄嘌呤(X)和黄嘌呤氧化酶(XOD)均购自于Sigma公司;硫酸亚铁(Fe-SO₄)购置于中国医药(集团)上海化学试剂公司;30%过氧化氢(H₂O₂)购置于金鹿化工有限公司;超纯水。

实验仪器:EMX-8/2.7 电子顺磁共振波谱仪

收稿日期:2013-01-23 接受日期:2013-09-12

基金项目:上海市科委纳米专项(12nm0501100)

*通讯作者 Tel:86-21-64253574;E-mail:minbolan@ecust.edu.cn

(德国 Bruker 公司); R201 旋转蒸发仪(上海申胜生物技术有限公司); SHZ-D (Ⅲ) 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); Hitech-Sciencetool 高端型超纯水机(上海和泰仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 中草药的提取

称量 5 g 中药, 放置于 250 mL 的圆底烧瓶中, 加入 100 mL 双蒸水, 浸泡 2 h, 回流 0.5 h, 减压抽滤, 再加入 100 mL 双蒸水, 回流 0.5 h, 减压抽滤, 第三次加入 100 mL 双蒸水, 回流 0.5 h, 减压抽滤。合并 3 次滤液, 减压旋蒸浓缩, 定容于 50 mL 容量瓶中得到 0.1 g/mL 原药放置于 4 ℃ 冰箱中待用。

1.2.2 中草药的抗氧化活性实验

1.2.2.1 中草药对 DPPH 的清除作用

量取不同浓度(8、6、4、2、1、0.5 mg/mL)的中药样品 50 μL, 加入到 100 μL 0.5 mmol/L 的 DPPH 溶液中, 混合均匀后室温避光反应 30 min, 用微量注射器取上清液注入 Teflon 毛细管(直径 1 mm, 管壁 0.1 mm 厚, 长度大约 6 cm)中, 将毛细管对折, 插入顺磁石英样品管底部, 将样品管插入谐振腔中心位置进行 EPR 常温检测。

实验参数: 中心磁场: 3513 G; 扫场宽度: 150 G; 调制频率: 100 KHz; 调制幅度: 1.5 G; 放大倍数: 2.00e + 004; 扫描次数: 1; 微波功率: 2.010 mW; 时间常数: 163.84 ms; 扫场时间: 41.943 s。

1.2.2.2 中草药对羟基自由基的清除作用

量取不同浓度(8、4、2、1、0.5 mg/mL)的中药样品 50 μL, 加入 40 μL 0.2 mmol/L FeSO₄ 的水溶液、40 μL 的双蒸水和 40 μL 0.1 mol/L DMPO 的水溶液, 混合均匀后加入 40 μL 0.1% H₂O₂, 混合后立即取样, 用微量注射器取上清液注入 Teflon 毛细管中, 将毛细管对折, 插入顺磁石英样品管底部, 将样品管插入谐振腔中心位置进行 EPR 检测, 整个过程控制在 3 min 内完成。

实验参数: 中心磁场: 3510 G; 扫场宽度: 100 G; 调制频率: 100 KHz; 调制幅度: 1.0 G; 放大倍数: 2.00e + 004; 扫描次数: 1; 微波功率: 2.017 mW; 时间常数: 163.84 ms; 扫场时间: 41.943 s。

1.2.2.3 中草药对超氧阴离子自由基的清除作用

量取不同浓度(8、4、2、1、0.5 mg/mL)的中药样品 50 μL, 加入 40 μL 0.5 mmol/L DETAPAC 的 PBS (pH7.8) 溶液、40 μL 25 mmol/L X 的 PBS 溶液、80 μL 0.1 mol/L DMPO 的水溶液, 混合均匀后加入 40

μL 0.25 u/mL XOD 的 PBS 溶液, 混合后立即取样, 用微量注射器取上清液注入 Teflon 毛细管中, 将毛细管对折, 插入顺磁石英样品管底部, 将样品管插入谐振腔中心位置进行 EPR 检测, 整个过程控制在 3 min 内完成。

实验参数: 中心磁场: 3513 G; 扫场宽度: 100 G; 调制频率: 100 KHz; 调制幅度: 1.0 G; 放大倍数: 5.64e + 004; 扫描次数: 1; 微波功率: 20.12 mW; 时间常数: 163.84 ms; 扫场时间: 41.943 s。

1.2.3 实验数据处理

所有 EPR 实验均重复三次, 以平均值表示, 数据处理使用 Origin 8.0, 自由基清除率(radical scavenging activity)的计算公式为 RSA = (H₀-H)/H₀ × 100%^[4], 其中 RSA 为中药对自由基的清除率, H₀ 为空白对照样特征峰的峰高, H 为样品特征峰的峰高。

2 结果与讨论

2.1 中草药对 DPPH 的清除作用

DPPH 自由基是一种稳定的自由基, 可以直接在室温检测得到 EPR 信号, 并且在短时间内不会发生衰减。利用电子顺磁共振法研究了不同浓度的大黄等五种中草药对 DPPH 自由基的清除能力。DPPH 的 EPR 信号为五重峰, 随着中草药浓度的升高而变小, DPPH 峰形基本不变, 只是高度发生了变化(图 1 以香茅草为例)。

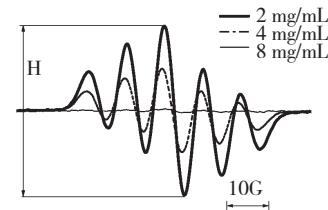


图 1 不同浓度的香茅草对 DPPH 的清除作用的 EPR 谱图

Fig. 1 EPR spectra of DPPH after adding different concentrations of lemongrass

根据 DPPH 清除率的计算公式, RSA = (H₀-H)/H₀ × 100%, H₀ 为空白对照样中间峰的峰高, H 为样品中间的峰高, 可以得到 5 种中草药对 DPPH 自由基的清除率(表 1)。

从表 1 可以看出, 加入不同浓度的 5 种中草药对 DPPH 都有一定的清除作用, 而且清除作用快, 几分钟内就能清除大量的 DPPH 自由基, 清除率和中药浓度呈现明显的量效关系, 清除率随着中药浓度

表 1 五种中药对 DPPH 的清除率
Table 1 DPPH scavenging rates of five TCMs

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	8	6	4	2	1	0.5
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	98.91	98.49	81.52	41.03	18.29	11.78
香茅草 Lemongrass	98.58	92.94	70.41	33.33	21.29	12.93
槲寄生 Mistletoe	52.41	46.61	36.01	23.13	12.66	9.275
骆驼蓬子 Seed of common peganum	63.81	42.31	31.25	12.41	9.790	5.690
大黄 Rhubarb	100.0	100.0	100.0	100.0	94.19	65.81

的增加而增加(图 2 以香茅草为例),并且在一定的清除率范围内(一般为 15% ~ 75%)呈现很好的线性相

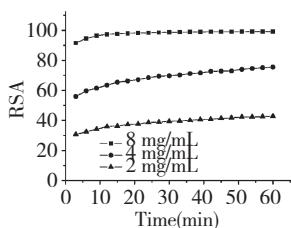


图 2 不同浓度的香茅草对 DPPH 的清除率随时间的变化曲线

Fig. 2 The DPPH radical scavenging rate-time curves of different concentrations of lemongrass

关^[5],清除率太高或太低的时候线性相关性下降。

中草药清除 DPPH 自由基能力一般采用 IC_{50} 表示, IC_{50} 的物理意义为中草药对 DPPH 自由基清除率达到 50% 时的质量浓度, IC_{50} 值越低,中草药清除自由基的能力越强。用 Origin 软件对中草药浓度和清除率进行多项式拟合,相关系数 R^2 均大于 0.9800,说明回归方程具有可靠性,能较好的解释中草药对 DPPH 自由基清除作用的剂量一效应关系。

由回归方程可以计算出 5 种中草药对 DPPH 自由基清除率为 50% 时所需的样品质量浓度 IC_{50} 的值。5 种中草药质量浓度和清除率的相关拟合方程,相关系数和 IC_{50} 见表 2。

表 2 中草药对 DPPH 自由基清除作用的量效拟合方程

Table 2 Dose-effect relationship simulated equations of the DPPH scavenging activity of TCMs

样品 Sample	清除回归拟合曲线 Regression equation of scavenging activity	相关系数 R^2 Correlation coefficient R ²	IC_{50} mg/mL
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	$y = -6.466 + 29.58x - 2.038x^2$	0.9910	2.261
香茅草 Lemongrass	$y = -0.5551 + 22.33x - 1.216x^2$	0.9863	2.645
槲寄生 Mistletoe	$y = 3.935 + 10.19x - 0.5163x^2$	0.9979	7.012
骆驼蓬子 Seed of common peganum	$y = 3.322 + 5.039x + 0.3051x^2$	0.9871	6.614
大黄 Rhubarb	-	-	<0.5

实验结果表明 5 种中草药对 DPPH 均有一定的清除作用,并且清除率随着中草药浓度的增加而增加,其中大黄、香茅草和香青兰对 DPPH 的清除作用较强,而大黄对 DPPH 的清除率更为显著, $IC_{50} < 0.5$ mg/mL,槲寄生和骆驼蓬子的对 DPPH 的清除率较弱。

2.2 中草药对羟基自由基的清除作用

羟基自由基是一种短寿命的氧自由基,在水溶液中寿命只有 10^{-6} s,不能直接在室温检测得到 EPR 信号,必须加入自由基捕捉剂形成比较稳定的自由基加合物^[6]。通过 DMPO 捕捉剂捕捉到的自由基加合物虽然比原有的羟基自由基稳定,但是也会发

生衰减(图 3),因此实验加入 DMPO 捕捉剂后在 3 min 内完成 EPR 的检测。

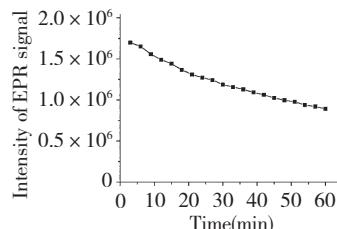


图 3 DMPO-OH 的 EPR 强度随时间的变化曲线

Fig. 3 The changing curve of EPR intensity of DMPO-OH with time

本文利用电子自旋捕捉技术^[7],研究了5种中草药对通过Fenton反应产生的羟基自由基的清除能力。DMPO-OH的EPR信号为四重峰,强度比为1:2:2:1,超精细耦合常数 $a_N = a_H = 14.9\text{G}$ 。DMPO-OH信号强度随着中草药浓度的升高而变小,而四重峰的峰形基本不变,只是高度发生了变化(图4以香茅草为例)。

根据羟基自由基清除率的计算公式, $RSA = (H_0 - H)/H_0 \times 100\%$, H_0 为空白对照样第二个峰的峰高,H为样品第二个峰的峰高,可以得到5种中草

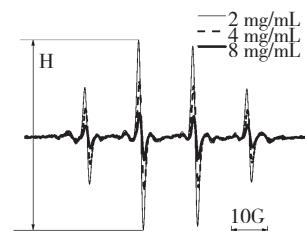


图4 不同浓度的香茅草对·OH的清除作用的EPR谱图

Fig. 4 EPR spectra of DMPO-OH after adding different concentrations of lemongrass

药对·OH的清除率(表3)。

表3 五种中药对·OH的清除率

Table 3 ·OH scavenging rate of five TCMs

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	8	6	4	2	1	0.5
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	78.95	70.92	59.19	36.52	20.07	7.030
香茅草 Lemongrass	86.34	80.62	69.50	46.26	29.94	15.36
槲寄生 Mistletoe	60.38	58.73	53.42	41.70	33.21	25.66
骆驼蓬子 Seed of common peganum	54.08	43.46	32.27	22.03	15.05	6.530
大黄 Rhubarb	78.63	73.52	66.02	52.61	42.52	33.25

用Origin软件对中草药浓度和清除率进行多项式拟合,得到5种中草药质量浓度和清除率的相关

多项式拟合方程,相关系数和 IC_{50} 见表4。

表4 中草药对·OH自由基清除作用的量效拟合方程

Table 4 Dose-effect simulation equations of the ·OH scavenging activity of TCM

样品 Sample	清除回归拟合曲线 Simulation equation of dose and ·OH scavenging activity	相关系数 R^2 Correlation coefficient R^2	IC_{50} (mg/mL)
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	$y = 0.0154 + 19.75x - 1.254x^2$	0.9918	3.168
香茅草 Lemongrass	$y = 8.177 + 20.97x - 1.418x^2$	0.9904	2.376
槲寄生 Mistletoe	$y = 21.81 + 11.07x - 0.7891x^2$	0.9906	3.330
骆驼蓬子 Seed of common peganum	$y = 5.226 + 7.986x - 0.2445x^2$	0.9826	7.189
大黄 Rhubarb	$y = 29.49 + 12.31x - 0.7838x^2$	0.9865	1.892

实验结果表明5种中草药对·OH均有一定的清除作用,并且清除率随着中草药浓度的增加而增加,其中大黄和香茅草对·OH的清除作用较强,而大黄对·OH的清除率更为显著, $IC_{50} = 1.892\text{ mg/mL}$,骆驼蓬子对·OH的清除率较弱, $IC_{50} = 7.189\text{ mg/mL}$ 。

2.3 中药对超氧阴离子自由基的清除作用

超氧阴离子自由基和羟基自由基一样也是一种短寿命氧自由基,不能直接在室温检测得到EPR信号,必须加入自由基捕捉剂形成较稳定的自由基加合物。本文利用电子自旋捕捉技术,研究了5种中

草药对黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶体系反应产生的超氧阴离子自由基的清除能力,得到了DMPO-OOH的

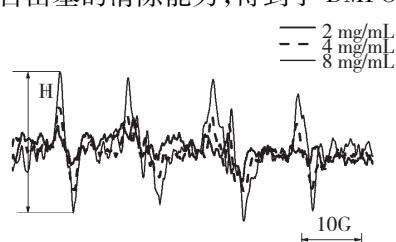


图5 不同浓度的香茅草对 O_2^- 的清除作用的EPR谱图

Fig. 5 EPR spectra of DMPO-OOH after adding different concentrations of lemongrass

EPR 谱图(图 5 以香茅草为例),有 12 条谱线组成,超精细耦合常数 $a_N = 14.3\text{G}$, $a_H^\beta = 11.3\text{G}$, $a_H^\gamma = 1.4\text{G}$ 。

根据超氧阴离子自由基清除率的计算公式,

表 5 五种中药对 O_2^- 的清除率
Table 5 O_2^- scavenging rate of five TCMs

样品浓度 Sample concentration (mg/mL)	8	6	4	2	1	0.5
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	81.42	77.41	68.46	54.22	40.80	30.26
香茅草 Lemongrass	80.02	77.16	69.72	51.19	35.05	21.56
槲寄生 Mistletoe	77.75	71.24	61.41	41.96	26.11	18.03
骆驼蓬子 Seed of common peganum	80.61	72.91	67.31	57.04	50.97	44.57
大黄 Rhubarb	94.57	91.92	87.67	87.16	86.57	85.63

用 Origin 软件对中草药浓度和清除率进行多项式拟合,得到 5 种中草药质量浓度和清除率的相关

$RSA = (H_0 - H) / H_0 \times 100\%$, H_0 为空白对照样第一个峰的峰高, H 为样品第一个峰的峰高, 可以得到不同中草药对 O_2^- 的清除率(表 5)。

表 6 中草药对 O_2^- 自由基清除作用的量效拟合方程

Table 6 Dose-effect simulation equations of the O_2^- scavenging activity of TCMs

样品 Sample	清除回归拟合曲线 Simulation equation of dose and $\cdot \text{OH}$ scavenging activity	相关系数 R^2 Correlation coefficient R^2	IC_{50} (mg/mL)
香青兰 <i>D. moldavica</i> L.	$y = 25.52 + 15.02x - 1.018x^2$	0.9846	1.866
香茅草 Lemongrass	$y = 15.41 + 19.31x - 1.426x^2$	0.9820	2.125
槲寄生 Mistletoe	$y = 10.71 + 16.85x - 1.073x^2$	0.9950	2.848
骆驼蓬子 Seed of common peganum	$y = 42.63 + 7.443x - 0.3496x^2$	0.9834	1.041
大黄 Rhubarb	-	-	<0.5

实验结果表明 5 种中草药对 O_2^- 均有一定的清除作用, 并且清除率随着中草药浓度的增加而增加, 5 种中草药对 O_2^- 的清除作用都比较强, 而大黄对 O_2^- 的清除率更为显著, $\text{IC}_{50} < 0.5 \text{ mg/mL}$ 。

2.4 讨论

我国的中草药是天然抗氧化剂的重要来源, 从中药中筛选出抗氧化活性强的物质, 用于生物体的抗氧化应激研究方面具有一定的应用价值。目前研究中草药抗氧化活性的方法有好几种, 如勾明玥^[8]等人采用 DPPH 分光光度法测定了 26 种植物的抗氧化活性, 刘建华^[9]等人采用 DPPH 和总抗氧化能力(FRAP)法对大黄蒽醌类化合物抗氧化活性的研究。中草药的抗氧化活性能力的大小主要表现为中草药清除自由基能力的大小, 而电子顺磁共振方法是研究自由基最直接和最有效的方法和技术。本文采用了电子顺磁共振方法研究了大黄等 5 种中草药清除 3 种不同自由基的能力。实验结果表明大黄中草药对稳定自由基和活性氧自由基的清除作用

多项式拟合方程, 相关系数和 IC_{50} 见表 6。

最强, 表现出较强的抗氧化活性能力。陈玉霞^[10]等人用总抗氧化能力方法也研究过大黄等 41 种中草药的抗氧化活性能力表明大黄等一些中药具有较强的抗氧化作用。

3 结论

运用电子顺磁共振研究了大黄等 5 种中草药对 DPPH、 $\cdot \text{OH}$ 和 O_2^- 三种自由基的清除作用, 实验结果表明大黄等 5 种中草药对 3 种自由基均有一定的清除作用, 其中大黄对 3 种自由基的清除率均为最大, 大黄中草药的抗氧化活性能力较强, 可应用于生物体的氧化应激研究, 为中草药用于生物体的抗氧化应激研究提供依据。

参考文献

- Murray AR, Kisin E, Leonard SS, et al. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 2009, 257: 161-171.

- 2 Teixeira MC, Telo JP, Duarte NF, et al. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324:1101-1107.
- 3 Han X(韩雪), Chen XL(陈小连), Xu JX(徐建雄). Effects of composite antioxidants on oxidative stress and free radicals metabolism in mice. *J Shanghai Jiaotong Univ*(上海交通大学学报), 2010, 28:526-529.
- 4 Liu Q, Kong BH, Jiang LZ, et al. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *Food Sci Technol*, 2009, 42:956-962.
- 5 Wu Q(吴青), Huang J(黄娟), Luo LX(罗兰欣), et al. Studies on the antioxidant activity of extracts of 15 Chinese medicinal herbs. *J Chin Food Sci Technol*(中国食品学报), 2006, 6:284-289.
- 6 Gao ZH, Huang KX, Yang XL, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of lavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1472:643-650.
- 7 Ma ZR, Zhao BL, Yuan ZB. Application of electrochemical and spin trapping techniques in the investigation of hydroxyl radicals. *Anal Chim Acta*, 1999, 389:213-218.
- 8 Gou MY(勾明玥), Liu L(刘梁), Zhang CZ(张春枝). Determination of antioxidant activity in 26 plants by DPPH method. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2010, 36: 148-150.
- 9 Liu JH(刘建华), Han LQ(韩立强), Yuan L(苑丽), et al. Effects of extraction methods on anthraquinone components and the antioxidant activity in rhubarb. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2008, 36:9484-9486.
- 10 Chen YX(陈玉霞), Liu JH(刘建华), Lin F(林峰), et al. Determination of antioxidative activity of 41 kinds of Chinese herbal medicines by using DPPH and FRAP methods. *Res Exp Lab*(实验室研究与探索), 2011, 30:12-14.