

决明子生品及炮制品的抗氧化活性研究

孔祥密, 王培卿, 康文艺*

河南大学中药研究所, 开封 475004

摘要: 采用清除二苯代苦味肼基 (DPPH) 自由基、清除 [2, 2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二氨盐] (ABTS) 自由基及铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP) 测定法, 以二丁基羟基甲苯 (BHT) 为阳性对照, 对决明子生品及炮制品进行抗氧化活性评价。实验结果表明, 决明子生品及炮制品均有一定的抗氧化活性。酒蒸决明子乙酸乙酯部位清除 DPPH 自由基的能力 (IC_{50} 值为 93.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 较其它提取部位强; 酒炙决明子乙酸乙酯部位清除 ABTS 自由基 (IC_{50} 值为 8.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和还原 Fe^{3+} 的能力 ($\text{TEAC} = 319.22 \mu\text{mol}/\text{g}$) 最强。不同炮制方法对决明子抗氧化活性具有不同程度的影响。

关键词: 决明子; 抗氧化活性; DPPH; ABTS; FRAP

中图分类号: R282

文献标识码: A

Antioxidant Activity of Raw and Processed *Cassia obtusifolia* L.

KONG Xiang-mi, WANG Pei-qing, KANG Wen-yi*

Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: In this study, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, [2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid] diamonium salt (ABTS) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluate the antioxidant activities of the extracts of raw *Cassia obtusifolia* L. and its different processed products with BHT as positive control. The results showed that the extracts of *C. obtusifolia* and its different processed products all showed antioxidant activity. The ethyl acetate extract of wine steamed *C. obtusifolia* showed higher radical scavenging power on DPPH radical ($IC_{50} = 93.8 \mu\text{g}/\text{mL}$) than other extracts. The ethyl acetate extract of wine fried *C. obtusifolia* exhibited the highest radical scavenging power on ABTS radical ($IC_{50} = 8.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) and ferric reducing antioxidant power ($\text{TEAC} = 319.22 \mu\text{mol}/\text{g}$). The experimental results indicated that different processing methods of *C. obtusifolia* affected the antioxidant activity in various degrees.

Key words: *Cassia obtusifolia* L.; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP

决明子为豆科草本植物决明 (*Cassia obtusifolia* L.) 或小决明 (*Cassia tora* L.) 的干燥成熟种子。其味甘、苦、咸, 性微寒, 归肝、肾、大肠经, 具有清肝明目、润肠通便的功效^[1]。在中国传统医学上用于保护肝脏^[2], 此外还用于治疗目赤肿痛、羞明泪多、头痛头晕、大便秘结。现代药理学研究证明, 决明子具有降血压、降血脂、抗氧化、抗菌等活性^[3], 是一种被广泛应用的药用同源的植物。化学研究表明, 萘并吡喃酮类和蒽醌类化学物质是决明子的主要药效成分^[4]。至今研究显示决明子提取物可以抑制活性氧自由基活性, 消除羟自由基, 在细胞和细胞膜中

与脂类结合而有效抑制脂质的氧化过程^[5]。郑荣波, 黄晓丹等^[6]研究了决明子提取物对链脉佐菌素诱发糖尿病小鼠晶状体氧化应激状态的影响, 发现决明子提取物可以通过清除自由基和抑制脂质过氧化过程改善 STZ 诱导糖尿病小鼠晶状体内的过氧化状态, 说明决明子具有一定的抗氧化能力。本课题组采用 DPPH、ABTS 和 FRAP 三种方法对决明子及其炮制品的抗氧化活性进行了综合考察, 以评价不同炮制方法对决明子抗氧化作用的影响。

1 仪器、材料与试剂

1.1 主要仪器

UV-2000 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼可仪器有限公司); 旋转蒸发器 (日本东京理化公司); 电子天平 (美国 Mettler-Toledo 仪器有限公司); Mul-

收稿日期: 2013-02-27 接受日期: 2013-08-20

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (13B360981); 河南省科技厅重点项目 (132102310261)

* 通讯作者 Tel: 86-378-3880680; E-mail: kangwenyi@hotmail.com

tiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Electron 公司)。

1.2 材料

决明子购于开封乐仁堂总店,经河南大学中药研究所李昌勤副教授鉴定为豆科草本植物决明(*Cassia obtusifolia* L.)或小决明(*Cassia tora* L.)的干燥成熟种子,标本存于河南大学中药研究所。

1.3 试剂

DPPH(日本东京化成工业株式会社);[2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS,美国 Fluka 公司); Fe^{3+} -三吡啶三咪嗪(tripyridyl-triazine, TPTZ;比利时 Acrosorganics 公司);6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸(Trolox,美国 Aldrich 公司);二丁基羟基甲苯(BHT,比利时 Acrosorganics 公司);其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 决明子炮制及浸膏提取

决明子生品:决明子原药材除去杂质,洗净后干燥;炒决明子:取净决明子 500 g,置于锅内用中火,炒至颜色加深,断面浅黄色,爆鸣声减弱并有香气溢出是,取出放凉;盐决明子:取净决明子 500 g,加盐水(2 kg/100 kg),拌匀闷透,置于锅内用文火加热,炒至表面棕褐色,微鼓起,有香气溢出,取出放凉;酒炙决明子:取净决明子 500 g,加入适量黄酒浸泡过夜,置于锅内用文火炒干,取出放凉;醋炙决明子:取净决明子 500 g,加入适量米醋浸泡过夜,置于锅内用文火炒干,取出放凉;酒蒸决明子:取净决明子 500 g,加入适量黄酒浸泡过夜,恒温 55 °C 蒸 2 h,取出放凉。

各取决明子生品、炒决明子、盐决明子、酒炙决明子、醋炙决明子和酒蒸决明子 200 g,用甲醇冷浸提取三次,回收溶剂,得甲醇总浸膏。甲醇总浸膏用 10% 甲醇水分散,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,得到决明子生品及 5 种炮制品各石油醚部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位。

2.2 抗氧化活性筛选

2.2.1 DPPH 法

按照文献^[7]的方法,在 515 nm 波长处测定样品及对照品 BHT 对 DPPH 自由基的清除能力。计算清除率及半数抑制率 IC_{50} 值。

2.2.2 ABTS 法

按照文献^[8]的方法,在 734 nm 波长处测定样品及阳性对照 BHT 对 ABTS 自由基的清除能力。计算清除率及半数抑制率 IC_{50} 值。

2.2.3 FRAP 法

按照文献^[9]的方法,在 593 nm 波长处测定样品及阳性对照 BHT 还原 Fe^{3+} 的能力,结果以 Trolox 当量表示。当 $C(\text{Trolox}) = 25 \sim 400 \text{ mol/L}$ 时,有良好的线性关系($r = 0.9996$)。

3 结果与分析

3.1 对 DPPH 自由基的清除能力

表 1 显示,除酒炙、酒蒸和盐蒸决明子 EA 部位外其他决明子生品及其炮制品提取物均无清除 DPPH 自由基的作用,酒炙、酒蒸和盐蒸决明子 EA 部位清除 DPPH 自由基的能力(IC_{50} 分别为 94.4、93.8 和 104.6 $\mu\text{g/mL}$)远弱于阳性对照 BHT(IC_{50} 为 23 $\mu\text{g/mL}$)。

表 1 决明子生品及不同炮制品各部位的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of extracts of raw and different processed of *C. obtusifolia*

样品 Samples	提取物 Extracts	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP TEAC($\mu\text{mol/g}$)
炒决明子 Fried <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	32.6	83.82
	PE 部位 PE extract	-	11.1	208.85
	EA 部位 EA extract	-	16.3	123.94
	BU 部位 BU extract	-	11.7	120.96
醋炙决明子 Vinegar fried <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	41.5	45.38
	PE 部位 PE extract	-	43.1	50.3
	EA 部位 EA extract	-	15.4	174.11
	BU 部位 BU extract	-	44.8	47.87
酒炙决明子 Wine fired <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	25.7	76.91
	PE 部位 PE extract	-	47.1	69.47

	EA 部位 EA extract	94.4	8.1	319.22
	BU 部位 BU extract	-	13.7	152.88
酒蒸决明子 Wine steamed <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	21.6	83.74
	PE 部位 PE extract	-	88.5	12.74
	EA 部位 EA extract	93.8	10.7	298.49
	BU 部位 BU extract	-	15.3	175.23
盐蒸决明子 Salt steamed <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	31.9	55.81
	PE 部位 PE extract	-	-	1.44
	EA 部位 EA extract	104.6	9.7	290.92
	BU 部位 BU extract	-	9.7	217.56
决明子生品 <i>C. obtusifolia</i>	ME 总浸膏 ME total extract	-	20.7	86.35
	PE 部位 PE extract	-	60.7	28.88
	EA 部位 EA extract	-	10.5	195.59
	BU 部位 BU extract	-	29.9	44.89
阳性对照 Positive control	BHT	23	2.3	1532.7

注: BHT 为阳性对照品。

Note: BHT was used as positive control.

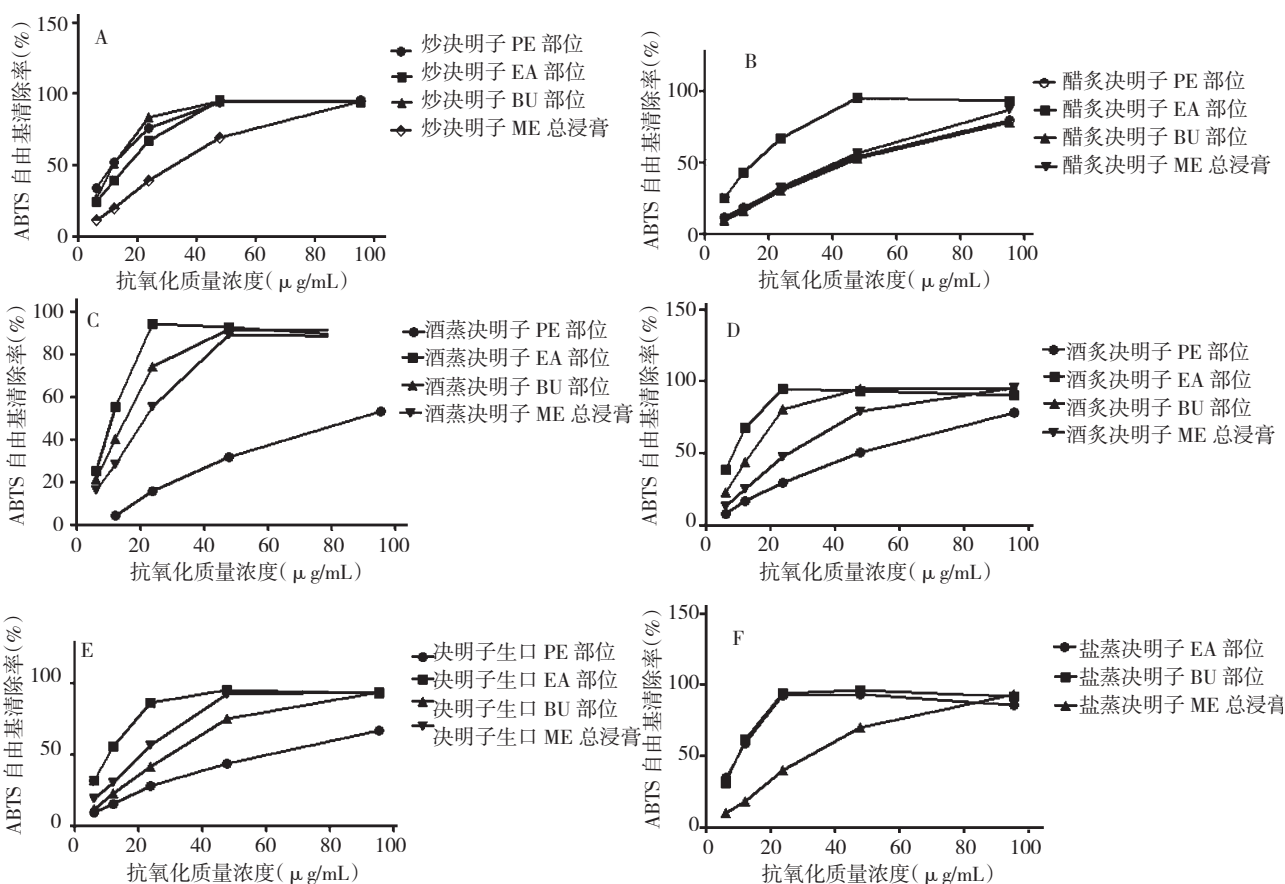


图 1 炒决明子(A)、醋炙决明子(B)、酒蒸决明子(C)、酒炙决明子(D)、决明子生品(E)及盐蒸决明子(F)各部位对 ABTS 自由基的影响

Fig. 1 Scavenging activities of different concentrations of fried(A), vinegar fried(B), wine steamed(C), wine fired(D), raw(E) and salt steamed(F) *C. obtusifolia* on ABTS free radical

3.2 对 ABTS 自由基的清除作用

决明子及其炮制品提取部位的质量浓度对 ABTS 自由基的清除率的影响见图 1(A)~(F)。结果显示,决明子生品及其炮制品各提取部位对 ABTS 自由基的清除率随着质量浓度的增加而增大。除炒决明子 ME 总浸膏、醋炙决明子各提取部位、酒蒸决明子 PE 部位、酒炙决明子 PE 及 ME 部位、决明子生品 BU 及 PE 部位和盐蒸决明子 ME 总浸膏外,其他部位当达到一定浓度后,再继续增加浓度,抑制率变化不大,即抗氧化活性接近饱和。

由表 1 可以看出,决明子及其炮制品清除 ABTS 自由基的能力都弱于阳性对照 BHT(IC_{50} 为 $2.3 \mu\text{g}/\text{mL}$)。炒决明子、醋炙决明子和酒炙决明子 PE 部位清除 ABTS 自由基的能力(IC_{50} 分别为 11.1 、 43.1 和 $47.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)强于决明子生品 PE 部位(IC_{50} 为 $60.7 \mu\text{g}/\text{mL}$);酒炙决明子和盐蒸决明子 EA 部位清除 ABTS 自由基能力(IC_{50} 分别为 8.1 和 $9.7 \mu\text{g}/\text{mL}$)均强于决明子生品 EA 部位(IC_{50} 为 $10.5 \mu\text{g}/\text{mL}$);炒决明子、酒炙决明子、酒蒸决明子和盐蒸决明子清除 ABTS 的能力(IC_{50} 分别为 11.7 、 13.7 、 15.3 和 $9.7 \mu\text{g}/\text{mL}$)均强于决明子生品 BU 部位(IC_{50} 为 $29.9 \mu\text{g}/\text{mL}$)。

3.3 对 Fe^{3+} 的还原能力

表 1 显示,决明子生品及炮制品各提取部位还原 Fe^{3+} 的能力均弱于阳性对照 BHT,炮制后的决明子 ME 部位还原 Fe^{3+} 的能力均降低;炒决明子、醋炙决明子和酒炙决明子 PE 部位 Fe^{3+} 的还原能力(TEAC 分别为 208.85 、 50.3 和 $69.47 \mu\text{mol}/\text{g}$)强于决明子生品 PE 部位(TEAC = $28.88 \mu\text{mol}/\text{g}$);酒炙、酒蒸和盐蒸决明子 EA 部位 Fe^{3+} 的还原能力(TEAC 分别为 319.22 、 298.49 和 $290.92 \mu\text{mol}/\text{g}$)强于决明子生品 EA 部位(TEAC = $195.59 \mu\text{mol}/\text{g}$);炒炙、醋炙、酒炙、酒蒸及盐蒸决明子 BU 部位 Fe^{3+} 的还原能力(TEAC 分别为 120.96 、 47.87 、 152.88 、 175.23 和 $217.56 \mu\text{mol}/\text{g}$)强于决明子生品 BU 部位(TEAC = $44.89 \mu\text{mol}/\text{g}$)。

4 结论

本文首次采用 DPPH、ABTS 和 FRAP 3 种抗氧

化方法,对决明子及其 5 种炮制品不同提取部位进行研究,结果表明,决明子及其炮制品的抗氧化活性较弱,均低于阳性对照 BHT。与生品相比,经炮制后的决明子的抗氧化能力均发生了变化,此外,各部位的活性均与浓度呈正相关性,具有一定的浓度依赖性。

参考文献

- 1 China Pharmacopoeia Committee(国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing:Chemical Industry Press,2005.98.
- 2 Kang WY, Yu HL, Wang JX. α -Glucosidase inhibitory compounds from seeds of *Cassia obtusifolia*. *Chem Nat Comp*, 2012,48:465-466.
- 3 Mei QX(梅全喜). Modern Pharmacology and Clinical Application Manual(现代中药药理与临床应用手册), Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine,2008.232-233.
- 4 Zhang QW(张启伟), Yin J(阴健), Zhang J(张俊). Comparison of contents of some active components between crude and processed seeds of *Cassia tora* and their decoctions by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),1996,27(2):79-81.
- 5 Ju MS, Kim HG, Choi JG, et al. Cassiae semen, a seed of *Cassia obtusifolia*, has neuroprotective effects in Parkinson's disease models. *Food Chem Toxicol*,2010,48:2037-2044.
- 6 Zheng RB(郑荣波), Huang XD(黄晓丹), He RR(何荣荣), et al. Effects of *Cassia obtusifolia* extract on oxidative stress status in STZ-induced diabetic mice. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2012,18:233-237.
- 7 Kang WY, Li CF, Liu YX. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of *Mitragyna rotundifolia*(Roxb.) Kuntze in vitro. *Med Chem Res*,2010,19:1222-1232.
- 8 Kang WY, Wang JM. In vitro antioxidant properties and in vivo lowering blood lipid of *Forsythia suspense* leaves. *Med Chem Res*,2010,19:617-628.
- 9 Zhao WE(赵文恩), Li QQ(李茜倩). Determination of total antioxidant capacity of red pigments from Chinese iujube peel by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Zhengzhou Univ, Eng Sci*(郑州大学学报,工学版),2011,32(3):28-30,35.