

# 鸡骨草黄酮体外抗活性氧自由基作用的研究

史柳芝<sup>1</sup>, 史恒芝<sup>2</sup>, 黄锁义<sup>3\*</sup>, 李 容<sup>3</sup>

<sup>1</sup>右江民族医学院 医学检验学院, 百色 533000;

<sup>2</sup>湖南省郴州市第一人民医院, 郴州 423000; <sup>3</sup>右江民族医学院 药学院, 百色 533000

**摘要:**对鸡骨草进行黄酮提取及抗活性氧自由基作用的研究。以70%乙醇为溶剂, 超声波提取法提取鸡骨草中的黄酮; 采用比色法测定鸡骨草黄酮对 DPPH· 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 两种自由基的清除作用以及还原能力。鸡骨草黄酮对 DPPH· 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 两种自由基都有明显的清除作用, 清除能力为 DPPH· > O<sub>2</sub><sup>-</sup>; 对 Fe<sup>3+</sup> 也具有较强的还原能力。清除率与浓度存在明显的量效关系, 当黄酮的浓度为 0.306 mg/mL 时, 其对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除率为 12.57%; 当黄酮的浓度为 0.228 mg/mL 时, 其对 DPPH· 清除率为 50%。对自由基的清除能力总体强弱是: DPPH· > O<sub>2</sub><sup>-</sup>; 还原 Fe<sup>3+</sup> 能力随黄酮的浓度增加而增强。

**关键词:** 鸡骨草; 黄酮; 超声波提取; 体外; 抗活性氧自由基

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Study on Vitro Anti-oxygen Free Radical of Flavonoids from *Abrus cantoniensis*

SHI Liu-zhi<sup>1</sup>, SHI Heng-zhi<sup>2</sup>, HUANG Suo-yi<sup>3\*</sup>, LI Rong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Clinical Laboratory Medicine, Youjiang Medical Universities for Nationalities, Baise 533000, China;

<sup>2</sup>Chenzhou No. 1 People's Hospital of Hunan, Chenzhou 423000, China;

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Youjiang Medical Universities for Nationalities, Baise 533000, China

**Abstract:** Collection and study on flavonoids of *Abrus cantoniensis* scavenge capability of oxygen free radical. The flavonoids were extracted with 70% ethanol as the solvent from *Abrus cantoniensis* with ultrasonic wave and extraction method. Examining scavenging action and ability of deoxidation of flavonoids extracted from *Abrus cantoniensis* on DPPH· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Colorimetric method. Total flavanone from *Abrus cantoniensis* has a scavenging activity on DPPH· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals and an evident reduction capacity on Fe<sup>3+</sup>, the ability of clearance is DPPH· > O<sub>2</sub><sup>-</sup>. There is obvious concentration-response relationship between clearance and concentration. When the content of the total flavanone of *Abrus cantoniensis* was  $\rho(\text{flavanone}) = 0.228 \text{ mg/mL}$ , the clearance rate of DPPH· was 50%; When the content of the total flavanone of *Abrus cantoniensis* was  $\rho(\text{flavanone}) = 0.306 \text{ mg/mL}$ , the clearance rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was 12.57%. Free radical scavenging ability overall strength is DPPH· > O<sub>2</sub><sup>-</sup>. The flavanone's evident reduction capacity on Fe<sup>3+</sup> was increased by the concentration.

**Key words:** *Abrus cantoniensis*; flavanone; ultrasonic extraction; *in vitro*; antioxidant free radical activity

黄酮类(flavones)化合物是植物光合作用产生的一大类化合物, 其药用价值很高, 具有抗癌、抗肿瘤、抗心脑血管疾病、抗炎镇痛、免疫调节、降血糖、治疗骨质疏松、抑菌抗病毒、抗氧化、抗衰老、抗辐射等作用<sup>[1]</sup>。现代研究表明<sup>[2,3]</sup>, 由于氧化损伤的机制在疾病的发生发展中起着重要的作用, 因此, 中药

的抗氧化作用是其达到治疗效果的重要因素。很多疾病包括肿瘤、心脑血管疾病、老年痴呆等都不同程度地与自由基损伤有关。而黄酮类化合物是自然界中抗氧化作用最强的一类天然化合物, 由于它具有很强的抑制活性氧、清除自由基作用, 同时毒副作用相对小于化学合成药, 因此黄酮类化合物一直是人们致力于寻找新药的重要研究领域。

鸡骨草 *Abrus cantoniensis*, 又名广州相思子、土甘草, 为豆科相思子属植物鸡骨草去除荚果后的干燥全草, 主要分布于广东、广西、福建及海南等地区。

收稿日期: 2012-12-31 接受日期: 2013-04-10

基金项目: 国家中医药管理局“十二五”中医药重点学科建设项目(2012-32); 广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019240)

\* 通讯作者 Tel: 86-776-2850590; E-mail: huangsuoyi@163.com

具有清热解毒,疏肝止痛之功效,是临床常用中药,广泛用于黄疸,胁肋不舒,胃脘胀痛,急、慢性肝炎<sup>[4]</sup>。鸡骨草是治疗急、慢性肝炎和肝硬化腹水较为理想的药材<sup>[5]</sup>。目前,对鸡骨草黄酮抗氧化研究鲜见报道,故本文对鸡骨草黄酮体外抗活性氧自由基作用进行了研究,旨在为开发利用鸡骨草黄酮资源提供科学依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

新鲜鸡骨草,经右江民族医学院民族医教研室覃道光副教授鉴定,样品标本存放在中药化学实验室(购自广西百色市右江区药店)。

#### 1.1.2 试剂

无水乙醇,95%乙醇,丙酮,乙醚,苯酚,浓硫酸等均为国产分析纯,葡萄糖标准品(J&KCHEMICAL LTD)。

#### 1.1.3 仪器设备

KQ5200DB型数控超声波清洗器(超声工作频率40 Hz,昆山市超声仪器有限公司);722N型光栅分光光度计(上海精密仪器有限公司);TG3288.电子天平(上海天平仪器厂);SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HHszL-Ni6-C电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的准备

#### 2.1.1 样品提取纯化方法

准确称取鸡骨草10 g,烘干、粉碎。称取鸡骨草粉末约6 g,加80 mL 95%乙醇,超声波提取2.5 h,抽滤。滤渣再加80 mL 95%乙醇,超声波提取2.5 h,抽滤,合并两次滤液,减压回收乙醇至滤液仅剩25 mL左右为止,放置250 mL容量瓶中,用60%乙醇稀释至刻度,得到鸡骨草黄酮提取液。

#### 2.1.2 黄酮的含量测定

已经有文献鸡骨草黄酮进行了含量测定<sup>[6]</sup>:分别精密吸取黄酮提取液0.5 mL于10.00 mL容量瓶中,分别加入5%亚硝酸钠溶液0.30 mL,摇匀,静置6 min;再加10%硝酸铝溶液0.30 mL,摇匀,静置6 min;再加4%氢氧化钠溶液4.00 mL,用60%乙醇稀释至刻度,摇匀,静置12 min,以试剂空白作参比液,于500 nm处测吸光度 $A_0$ ,根据回归方程: $A =$

$13.5184C - 0.0311$ ,计算样品中总黄酮的含量 $\rho = 0.3063 \text{ mg/mL}$ 。

### 2.2 黄酮提取物清除 DPPH 自由基能力

DPPH是一种稳定的自由基,与抗氧化剂发生反应,提供H被还原,颜色发生变化,由深紫色变为淡黄色,可以用紫外可见分光光度法定量测定。取0.5 mL新配置的DPPH溶液 $[c(\text{DPPH}) = 6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}]$ 置于10 mL的具塞比色管中,然后加入不同体积的样品溶液,无水乙醇定容至5 mL,室温暗光下反应30 min,以无水乙醇调零,在517 nm处测定其吸光度A。以高浓度逐渐稀释的方式检测不同浓度样品对自由基的清除率,以自由基清除率为50%时样品的浓度( $IC_{50}$ )来衡量样品对自由基的清除能力。 $IC_{50}$ 越小,表明样品清除自由基的能力越强。其清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\%$$

其中 $A_1$ 为反应时间 $t = 0 \text{ min}$ 时空白吸光度, $A_2$ 为反应时间 $t = 30 \text{ min}$ 时的吸光度。

以实验提取液总黄酮作为样品用无水乙醇定容至5 mL分别测其对DPPH自由基清除的作用,由图1可以看出,随着黄酮浓度的增加,对DPPH的清除作用增大,自由基清除率为50%时样品的浓度( $IC_{50}$ )为0.228 mg/mL,浓度较小,表明鸡骨草黄酮清除DPPH自由基的能力较显著。

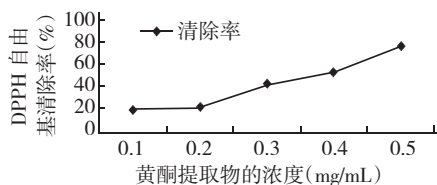


图1 DPPH 自由基清除率

Fig. 1 DPPH free radicals clearance

### 2.3 黄酮提取物清除超氧自由基能力

采用邻苯三酚自氧化法<sup>[7]</sup>进行测定。具体方法如下:取0.5 mol/L, pH8.2的Tris-HCl缓冲液4.0 mL于干燥具塞比色管中,置于25 °C水浴中预热20 min,分别加入不同浓度的待测品0.2 mL,后均加入2.5 mmol/L邻苯三酚(由10 mmol/L HCl制)0.8 mL,混匀后25 °C水浴中准确反应4 min,立即加入10 mmol/L HCl 2滴终止反应,蒸馏水调零,在320 nm处测定吸光度A。其清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

其中 $A_0$ :为加邻苯三酚但不加样品时的吸光

度;  $A_1$ : 为加样品和邻苯三酚时的吸光度;  $A_2$ : 为加样品不加邻苯三酚时的吸光度。

从图2中可以看出, 鸡骨草总黄酮提取液对  $O_2^-$  有一定的清除作用, 随着鸡骨草总黄酮提取液浓度的增加, 对  $O_2^-$  自由基的清除能力也增强, 说明当黄酮类物质的浓度增加时, 其清除率也增大。

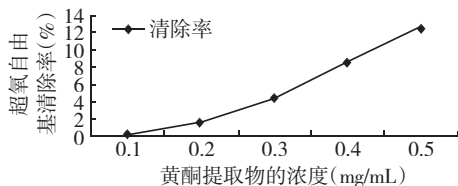


图2 超氧自由基清除率

Fig. 2 The clearance rate of superoxide radical

表1 还原  $Fe^{3+}$  能力吸光度值

Table 1 Absorbency value of evident reduction energy

浓度 Concentration ( mg/mL)	0.000	0.061	0.120	0.184	0.245	0.306
吸光度 Absorbance	0.000	0.915	1.114	1.369	1.540	1.707

### 3 结论

从实验研究发现, 鸡骨草黄酮对 DPPH· 和  $O_2^-$  两种自由基均具有较好的清除作用, 而且清除作用随着黄酮液浓度的增加而增强的特点。当黄酮的浓度为 0.306 mg/mL 时, 其清除率  $O_2^-$  为 12.57%; 当黄酮的浓度为 0.228 mg/mL 时, 其清除率 DPPH· 为 50%。对自由基的清除能力总体强弱是: DPPH· >  $O_2^-$ ; 对金属  $Fe^{3+}$  的还原能力随着黄酮浓度增加而增强。因此, 鸡骨草黄酮具有较强的体外抗活性氧自由基活性, 也就具有较强的抗氧化作用。

近年来, 世界上掀起了植物药开发的热潮, 植物药以其天然低毒的特点备受青睐, 而黄酮类化合物以其光谱的药理作用引人瞩目。鸡骨草的来源广泛, 因此, 本文的研究结果为进一步深入研究鸡骨草的药理活性及其深入开发奠定基础。

#### 参考文献

- Zhu D (朱丹), Yuan F (袁芳), Meng K (孟坤), et al. The research progress of flavonoids. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2007, 22: 387-389.
- Arruda SF, Souza EMT, Siqueira EMA. Carotenoids from

### 2.4 还原 $Fe^{3+}$ 能力

采用普鲁士兰法<sup>[7]</sup>测定样品还原  $Fe^{3+}$  能力。在系列 10 mL 具塞比色管中依次加入不同浓度的样品溶液 2.5 mL, 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 [C(磷酸盐缓冲液) = 0.2 mol/L pH6.6] 和 2.5 mL 铁氰化钾 (1%), 混匀后置于 50 °C 水浴中反应 20 min, 然后加入 2.5 mL 三氯乙酸 (10%), 混匀后将溶液浑浊离心 (3000 rpm) 10 min, 取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL (0.1%) 三氯化铁溶液, 混匀, 以试剂空白作参比, 在 700 nm 处测定吸光度值, 吸光度值增加表明还原能力增强。

由表1可以看出, 随着黄酮浓度增大, 其吸光度值增加, 对  $Fe^{3+}$  还原能力增强。

malnga (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves protect cells against oxidative stress in rats. *Int J Vitam Nutri Res*, 2005, 75: 161-163.

- Jagtap UB, Panaskar SN, Bapat VA. Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp. *Plant Foods Hum Nutr*, 2010, 65: 102-106.
- Association of Chinese Medicinal Plant (中华人民共和国药典委员会). *Chinese Medicinal Plant (中国药典)*. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005. 135.
- Zhu Q (朱奇), Chen Y (陈彦). The development device and present studies of biological nitrogen fixation in Chinese agricultural production. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2003, 23: 40-43.
- Zhang LD (张丽丹), Luo JH (罗建华), Meng CY (蒙春越), et al. Extracting total flavone from *Abrus cantoniensis* and the effect of its extract on scavenging of hydroxyl radicals. *Studies of Trace Elements and Health* (微量元素与健康研究), 2007, 24: 44-45.
- Wen ZJ (温昭君), He YP (何燕平), Wu WL (吴韦柳), et al. The antioxidant effect of flavonoid of caudexes of *Jasminum sambac*. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医药), 2012, 23: 1866-1867.