

溶解, 放冷, 加 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀即得。

标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 ml, 分别置于 25 ml 容量瓶中, 各加 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 1 ml, 在加 60% 乙醇至刻度, 摇匀, 以不加芦丁对照品溶液的溶液为空白对照, 于 420 nm 处测定吸收度。

表 12 芦 标准曲线的绘制

	1	2	3	4	5	6
C(ug/ml)	4.08	8.16	12.24	16.32	20.4	24.48
D	0.1048	0.2322	0.3398	0.4506	0.5698	0.6724

过原点 $D = 0.0277C - 0.0007$ $r = 0.9998$

表 13 黄酮含量测定(按无水芦 计算, $n = 4$)

编号	样品称重(g)	D 值	C(mg/ml)	百分含量
1	10.0754	0.8314	30.0397	0.0745%
2	10.1036	0.8646	31.2383	0.0772%
3	3.3075(9.9809)	0.5758	20.8123	0.0521%
4	3.3166(10.0083)	0.6334	22.8917	0.0572%

芦丁浓度在 4.0~25.0 ug/ml 范围内, 浓度于 D 值呈线形关系含量测定 取 10g 样品(或相当于原药材 10g), 精密称定, 置 50ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇至刻度, 摇匀, 放置 24hr, 滤过, 吸取 5ml 滤液置 25ml 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 1ml, 加 60% 乙醇至刻度, 以不加样品的溶液为空白, 于 420 nm 处测定吸收度。

3 讨论

3.1 由实验结果可看出, 颗粒型中药饮片中的有效成分的含量与原药材中有效成分的含量较接近; 山楂与苦杏仁有效成分的含量比原药材中有效成分的含量低的

多。其原因可能是微波处理过程对易挥发性成分的影响。由此可见, 速溶中药饮片颗粒虽然服用方便, 但是在加工过程中, 部分中药有效成分损失过多, 其微波物化过程对质量的影响颇大。

3.2 黄芪性质稳定, 此类中药饮片较适宜加工为颗粒型中药饮片, 应颗粒型中药饮片的发展方向; 山楂、苦杏仁均含有易挥发性成分, 在加工过程中, 其有效成分损失过多, 应考虑加工工艺的改进。

3.3 颗粒型中药饮片的有效成分比等量原药材低, 要找出加工过程中有效成分在物化过程中变化的原因, 并加以改进, 才能达到实用标准, 但颗粒型中药饮片对中药走向国际市场方向, 无疑是可取的。另外颗粒型中药有效成分的含量低于原药材的含量, 也有可能是因为一包颗粒的重量根本就没有它所指出的相当于原药材的 9g, 因此, 颗粒型中药包装上所指出的相当于原药材 9g, 其等量化的标准应得到控制。

3.4 山楂的有机酸含量均小于药典规定的含量, 故收购时应注意购买符合药典规定的山楂, 以保证其药效。对苦杏仁仁, 由于苦杏仁甙不易保存, 因此应注意物化处理后饮片均不宜放置过长时间, 以免有效成分的散失。

3.5 因此次试验仅选了三种中药, 得出的结果仅能部分代表颗粒型中药饮片的质量情况, 目前本课题正在进一步扩大中药饮片的考察品种, 力图全面验证颗粒型中药饮片的质量情况。

参考文献(略)

收稿日期: 2000-08-28

生物化学发光法测定射干类中药清除自由基的作用*

秦民坚, 刘俊, 吉文亮, 赵俊, 冢宜, 余国奠(中国药科大学中药学院, 南京 210038)

摘要: 本文采用生物化学发光法, 对射干类中药甲醇提取物和天然产物单体清除自由基的能力进行了研究。结果表明: 射干类中药甲醇提取物和天然产物单体具有清除自由基的作用, 提示抗自由基的作用可能是射干类药物防治疾病的机理之一。

关键词: 射干; 鸢尾; 自由基; 生物化学发光法

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2000)05-0304-03

Scavenging Capacities on Radicals of Rhizoma Belamcandae and Rhizoma Iris Determined by Chemiluminescence

QIN Min-jian, LIU Jun, JI Wen-liang, ZHAO Jun, DING Jia-yi, YU Guodian(College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

ABSTRACT: The scavenging capacities on radicals(O_2^- , OH^+ , H_2O_2) by meOH-extracts of Rhizoma Belamcandae and Rhizoma Iris and compounds isolated from Rhizoma Belamcandae were determined

* 江苏省自然科学基金资助项目, 编号 BK97085

by Chemiluminescence. The results indicated that mEtOH - extracts of *Rhizoma Belamcandae* and *Rhizoma Iris* and compounds isolated from *Rhizoma Belamcandae* have significant scavenging effects on radicals (O_2^- , OH^+ , H_2O_2)

KEY WORDS: rhizoma belamcandae, rhizoma iris, radical, chemiluminescence

近年来的研究发现, 中草药中的不少有效成分具有清除自由基的作用, 例如甘草中的甘草酸和甘草次酸具有不同程度的抑制 O_2^- 的作用^[1], 云芝糖肽和灵芝多糖具有清除活性氧的作用, 与其提高机体免疫能力和抗癌抗癌机制有关^[2]。不同的天然产物对不同类型的自由基清除效果各异, 机理各不相同, 所以应建立不同的自由基模型来评价药物的抗氧化自由基活性。

本文采用邻苯三酚- 鲁米诺(luminol) - 碳酸缓冲液($\text{pH}10.2$), 邻菲罗啉- Cu_2^+ - 抗坏血酸- H_2O_2 , H_2O_2 - 鲁米诺(luminol) - 碳酸缓冲液($\text{pH}9.5$)等三个产生活性氧和化学发光的体系, 检测了射干类中药甲醇提取物及单体产物清除 O_2^- , OH^+ , H_2O_2 的作用, 实验结果可为射干类中药筛选自由基清除剂提供一条有效的途径。

1 实验材料

实验所用材料均为鸢尾科植物的干燥根茎, 并经作者正确鉴定, 凭证标本存中国药科大学标本馆。

1 德国鸢尾 *Iris. germanica* L. 中国药科大学药用植物园

2 玉蝉花 *I. ensata* Thunb. 吉林省吉林市

3 野鸢尾 *I. dichotoma* Pall. 陕西省西安市

4 鸢尾 *I. tectorum* Maxim 四川省石柱县

5 鸢尾 *I. tectorum* Maxim 四川省都江堰市中药材公司

6 鸢尾 *I. tectorum* Maxim 四川省成都市中药材公司

7 射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 武汉市湖北省药检所

8 射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 吉林省桃南市药品站

9 射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 吉林省松源市医药商店

10 射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 云南省昆明市药材公司

2 仪器与试剂

2.1 主要仪器

SHG-C 生物化学发光测量仪(上海上立检测仪器厂), 分析天平(上海天平仪器厂), PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂), 旋涡混合器(上海环宇仪器厂), 进样枪, 微量进样器, Eppendorf 管, 486 型计算机。

2.2 试剂

无水碳酸钠(天津化学试剂厂, 优级纯), 碳酸氢钠(上海虹光化工厂, 分析纯), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)

(上海化学试剂总厂, 标准纯), 焦性没食子酸(邻苯三酚)(遵义第二化学厂, 分析纯), 3- 氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺, luminol) (Sigma 公司), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (南京化学试剂厂, 分析纯), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (上海试剂二厂, 分析纯), 四硼酸钠(硼砂)(太仓化工二厂, 分析纯), 1, 10- 菲罗啉(邻菲罗啉)(上海试剂三厂, 分析纯), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (合肥工大化学试剂厂, 分析纯), 30% 过氧化氢(上海桃浦化工厂, 分析纯), 精密试纸(上海试剂三厂)

3 实验方法

3.1 实验材料前处理

实验所用药材粉碎后精称 10.00g, 置沙氏提取器中, 以 300ml 无水甲醇(分析纯)加热回流 6h, 过滤, 提取液浓缩得到稠膏, 以无水甲醇按不同浓度溶解稠膏, 置于 4℃ 冰箱中待用。

3.2 邻苯三酚- 鲁米诺- 碳酸缓冲液($\text{pH}10.2$)体系检测 O_2^- 清除能力

向测量管中加入 $10\mu\text{l}$ 待测样品(或 $10\mu\text{l}$ 甲醇作空白), 再加入 $20\mu\text{l} \times 10^{-3}\text{mol/l}$ 邻苯三酚溶液, 放入反应池中。原位注入 $970\mu\text{l}$ 鲁米诺- $\text{pH}10.2$ 碳酸缓冲液混合液(体积比 1:2)启动发光(反应总体积为 1ml), 记录发光强度。

3.3 邻菲罗啉- Cu_2^+ - 抗坏血酸- H_2O_2 体系检测 OH^+ 清除能力

向测量管中依次加入 $50\mu\text{l}$ 待测样品(或 $50\mu\text{l}$ 甲醇作空白), $50\mu\text{l} \times 10^{-3}\text{mol/l}$ CuSO_4 溶液, $20\mu\text{l} \times 10^{-3}\text{mol/l}$ 抗坏血酸溶液, $50\mu\text{l} \times 10^{-3}\text{mol/l}$ 邻菲罗啉溶液, $50\mu\text{l}$ 15mol/l H_2O_2 溶液, 放入反应池中。原位注入 $780\mu\text{l}$ $\text{pH}9.24$, 0.05mol/l 硼砂溶液启动发光(反应总体积为 1ml), 记录发光强度。

3.4 H_2O_2 - 鲁米诺- 碳酸缓冲液($\text{pH}9.5$)体系检测 H_2O_2 清除能力

向测量管中加入 $50\mu\text{l}$ 待测样品(或 $50\mu\text{l}$ 甲醇作空白), $50\mu\text{l}$ 15% H_2O_2 溶液, 放入反应池中。原位注入 $900\mu\text{l}$ 鲁米诺- ($\text{pH}9.5$)碳酸缓冲液混合液(体积比为 1:17)启动发光(反应总体积为 1ml), 记录发光强度。

3.5 发光抑制率的计算

生物化学发光法测定自由基时, 一定浓度范围内发光强度(CL)与自由基的数量呈相关关系, 故可用 CL 表示自由基的产生量。清除自由基的物质可以降低 CL , 根据 CL 下降可判断物质清除自由基的能力。

$$\text{发光抑制率} = \frac{\text{对照 } CL - \text{样品 } CL}{\text{对照 } CL} \times 100\%$$

表1 射干类中药甲醇提取物清除自由基的作用 IC_{50} (mg/ml) $X \pm SD$ ($n=2$)

中药名称	O_2^- 清除能力 IC_{50} (mg/ml)	OH·清除能力 IC_{50} (mg/ml)	H_2O_2 清除能力 IC_{50} (mg/ml)
1 德国鸢尾	15.675+ 0.076	0.618+ 0.001	1.013+ 0.031
2 玉蝉花	21.098+ 0.030	1.625+ 0.006	0.832+ 0.079
3 白射干	31.585+ 0.091	1.366+ 0.087	2.367+ 0.121
4 川射干	14.491+ 0.015	3.666+ 0.026	1.822+ 0.002
5 川射干	32.112+ 0.023	5.22+ 0.0037	0.978+ 0.015
6 川射干	35.993+ 0.052	1.680+ 0.013	3.281+ 0.175
7 射干	27.395+ 0.006	5.410+ 0.112	4.973+ 0.071
8 射干	59.624+ 0.045	3.301+ 0.086	1.677+ 0.314
9 射干	14.963+ 0.037	1.312+ 0.008	0.632+ 0.132
10. 射干	20.546+ 0.056	5.001+ 0.002	1.332+ 0.117

表2 单体化合物清除自由基的作用 IC_{50} (mg/ml) ($n=2$)

单体化合物	O_2^- 清除能力 IC_{50} (mg/ml)	OH·清除能力 IC_{50} (mg/ml)	H_2O_2 清除能力 IC_{50} (mg/ml)
单体94	2.181+ 0.007	无	0.365+ 0.121
单体125	0.380+ 0.021	0.184+ 0.009	0.263+ 0.032
单体176	无	1.259+ 0.036	无
单体223	无	0.239+ 0.057	1.687+ 0.135

以发光抑制率为纵坐标,样品浓度为横坐标,绘出发光抑制曲线。一般用发光抑制率为50%时的浓度 IC_{50} 来衡量样品对自由基的清除能力。 IC_{50} 值越小,表明样品清除自由基的能力越强。

4 结果与讨论

4.1 射干类中药甲醇提取物清除自由基的作用:

4.2 单体化合物清除自由基的作用:

4.3 讨论

由以上结果可以看出,不同产地的同一味中药对相同自由基具有不同的抑制作用,相同产地的同一味中药对不同自由基具有不同的抑制作用。德国鸢尾、玉蝉花、射干(9号样品)对三种活性氧的清除效果很好,对 O_2^- 的 IC_{50} 值均低于30mg/ml,对OH·与 H_2O_2 的 IC_{50} 值均低于3mg/ml;川射干(4号)、射干(10号)对 O_2^- 与 H_2O_2 的清除效果较好,对 O_2^- 的 IC_{50} 值均低于30mg/ml,对 H_2O_2 的 IC_{50} 值均低于3mg/ml;白射干对OH·与 H_2O_2 的清除效果较好,对OH·与 H_2O_2 的 IC_{50} 值均低于3mg/ml。单体化合物中以单体125对三种活性氧的清除效果很好,其它化合物也有较好的清除活性氧的作用。

实验中发现,异黄酮类化合物具有较好的清除自由

基的作用。前人的研究表明,黄酮类化合物具有抗自由基^[3,4],抗氧化,抗菌,抗病毒,抗炎症,等多种生理活性及药理作用,而射干类药物相对于以前文献所报道的其它一些含有黄酮类化合物的中药,其整体清除自由基能力更强。

由于生物化学发光法研究自由基清除剂具有简单,快速,灵敏等优点,对于筛选抗氧化剂类的抗衰老药物和清除自由基,防癌,抗辐射损伤的药物具有重要意义。在化妆品工业上,天然产物中有一些小分子物质具有清除自由基的活性作用,可以迅速渗入皮肤,清除过多的自由基以达到防止皮肤衰老,美容的功效。

参考文献:

- [1] 高东英. 甘草中皂甙类成分对超氧自由基的研究[J]. 自由基生命科学进展. 第一集, 1993. 149.
- [2] 胡大喜. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(5): 465.
- [3] 郑学钦. 用化学发光法检测芦丁等物质清除超氧阴离子自由基的作用[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(3): 140
- [4] 张英. 黄酮类化合物结构与清除活性氧自由基效能关系的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 10(4): 26.

收稿日期: 2000-08-28

《西北药学杂志》2001年征订启事

《西北药学杂志》是国内外公开发行的综合性药学期刊。1986年3月创刊连续数年被我国医药重要检索期刊《中国药学期刊》、《中国生物医学文献》、《中文科技资料目录—中草药》、《中文科技资料目录—医药卫生》、《中国医学文献·内科学》等收录。《中国药学期刊》对本刊载文平均收录率70%。在陕西省科技期刊审评中连年获一等奖。本刊设有药物分析、中药及天然药物、药理、药剂、药物与临床、药事管理、科研简报、方法改进、问题讨论、综述、药学期人物、国外药学、不良反应、经验、文摘、信息、读者园地等栏目;按年度报道计划组稿,整体构思明确,面向即定读者。本刊为双月刊,大16开版本,48页,每双月25日出版。国内统一刊号CN61-1108/R。国际标准连续出版物号ISSN 1004-2407。国内邮发代号52-106,定价5.00元(含邮费),全年30.00元。欢迎广大读者到当地邮局订阅,也可直接汇款到本刊编辑部订阅。国外发行代号BM 6523。编辑部地址:西安市朱雀大街南段205号,西安交通大学(医学校区)《西北药学杂志》编辑部。邮政编码:710061。电话:(029) 5275134