

## 黄连抗氧化活性研究

袁王俊<sup>1,2</sup>, 李彩芳<sup>1,2</sup>, 丁秋瑾<sup>1</sup>, 康文艺<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南大学 天然药物研究所, 河南 开封 475004; 2. 河南省天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475004)

**摘要:** 利用 DPPH、FRAP 和 ABTS 三种抗氧化活性分析方法对黄连植物不同部位的有机溶剂提取部分进行抗氧化评价, 将所测定结果与 Trolox 进行比较, 发现黄连植物不同部位抗氧化活性不同。其中, 黄连须根的抗氧化活性最高; 同一部位中, 乙酸乙酯和甲醇提取物抗氧化活性一般要高于石油醚提取物。在三种方法中, 黄连不同部位的提取物清除自由基的能力均随浓度增大而增大; 三种方法之间有很好的相关性, 以 FRAP 法与 DPPH 法相关性最好( $r=0.9261, P<0.01$ )。

**关键词:** 黄连; 抗氧化活性; DPPH; FRAP; ABTS

**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0694-04

## Studies on the antioxidant activity of *Coptis chinensis*

YUAN Wang-Jun<sup>1,2</sup>, LI Cai-Fang<sup>1,2</sup>, DING Qiu-Jin<sup>1</sup>, KANG Wen-Yi<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Natural Products, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Key Lab of Natural Drug & Immune Engineering of Henan Province, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** Antioxidant activities of different extracts from different parts of *Coptis chinensis* were evaluated by the DPPH assay, FRAP assay and ABTS assay, and the results were compared to Trolox. The results showed that different parts had different activity, and fibrous root had the highest antioxidant activity; and different polar solvent extracts of the same part also demonstrated different antioxidant activity, ethyl acetate and methanol extracts generally had higher antioxidant activity than the petroleum ether extract. The antioxidant activity of the extracts from different parts of *C. chinensis* increased when the concentration of the extracts increased; there were good correlation among the three methods, and the values obtained by FRAP assay were correlated best with those obtained by DPPH assay( $r=0.9261, P<0.01$ ).

**Key words:** *Coptis chinensis*; antioxidant activity; DPPH; FRAP; ABTS

黄连(*Coptis chinensis*)为毛茛科黄连属植物,其药用部位为根茎,主要功能为清热燥湿,泻火解毒。用于湿热痞满,呕吐吞酸,泻痢,黄疸,高热神昏,心火亢盛,心烦不寐,血热吐衄,目赤,牙痛,消渴,痈肿疔疮;外治湿疹,湿疮,耳道流脓(国家药典委员会, 2005)。杨澄等(2001)研究表明,黄连炮制品可清除次黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶系统所产生的超氧阴离子(SAFR)和 Fenton 反应生成的羟自由基(HFR),并能

抑制 HFR 诱导的小鼠肝脏匀浆脂质过氧化作用。黄连须根、茎叶及花茎均能直接清除羟自由基、超氧自由基、过氧化氢并具有抗猪油自动氧化的活性(屠大伟等, 2007)。谢云峰等(2000)研究表明黄连解毒汤组方中 4 种单味药黄连、黄芩、黄柏、栀子都具有直接清除活性氧作用,其中黄连解毒汤全方与单味药及交叉配伍相比较,其清除作用最强。黄连解毒汤体外给药能明显抑制红细胞自氧化或  $H_2O_2$  所致红细胞溶

收稿日期: 2008-02-28 修回日期: 2009-01-16

基金项目: 河南省卫生厅艾滋病科技攻关项目(2006038)[Supported by Key Technology Research and Development Program for AIDS, Health Development of Henan Province(2006038)]

作者简介: 袁王俊(1972-),男,陕西澄县人,在读博士,讲师,主要研究方向为药用植物资源, (E-mail) yuanwangjun@henu.edu.cn.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: kangweny@hotmail.com)

血,并抑制小鼠肝匀浆自发性或  $\text{Fe}^{2+}$ -Vit C 诱发的脂质过氧化反应,对  $\text{H}_2\text{O}_2$  所产生的羟自由基亦有直接的清除作用(王利津等,2001)。黄连解毒汤提取物对脑缺血小鼠脑组织有很强的抗氧化作用(徐静华等,2006),黄连解毒汤通过抗脂质过氧化,可以对大鼠结肠炎损伤进行修复,减轻抑制结肠炎大鼠炎症反应(廖泽云等,2006)。黄连解毒汤有效成分对多发脑梗塞大鼠脑脂质过氧化损伤也有显著保护作用(吴彦等,2004)。本文用三种不同极性的有机溶剂对黄连根茎、叶、须根进行提取,再采用清除二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)、铁离子还原/抗氧化力测定法(ferric reducing/antioxidant power assay,FRAP)和清除 ABTS 自由基的方法来研究这三个部位的体外抗氧化活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄连于 2006 年 7 月采自重庆市石柱县黄水镇,经笔者鉴定为黄连(*Coptis chinensis*)。DPPH(日本东京化成工业株式会社);TPTZ(Acros organics);Trolox(Aldrich);ABTS(Fluka);甲醇,醋酸钠, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,冰醋酸,过二硫酸钾均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

UV-2000 型紫外可见分光光度计(尤尼可上海仪器有限公司),电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),旋转蒸发器(东京理化),电热套(北京中兴伟业仪器有限公司),超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.3 黄连浸膏的提取

将黄连根茎、叶、须根分别粉碎,然后依次用石油醚、乙酸乙酯和甲醇热提,浓缩,得到浸膏。黄连种子粉碎后,用石油醚冷浸,浓缩得到浸膏;残渣再依次用乙酸乙酯、甲醇热提,浓缩得到浸膏。

### 1.4 提取物抗氧化方法

1.4.1 DPPH 方法 按照文献 Liu 等(2004)的方法将样品用甲醇配制成一系列浓度,取 0.1 mL 样品加入 3.5 mL DPPH 甲醇溶液(0.06 mmol/L),混合 30 min 后测定 515 nm 处吸光度。每份样品平行操作 3 次,计算公式为:清除率(%) =  $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100\%$

式中 AControl 为 3.5 mL DPPH 溶液与 0.1 mL 甲醇混合后的吸光度,ASample 为 3.5 mL DP-

PH 溶液与 0.1 mL 样品混合后的吸光度。以 Trolox 为参照来表示样品的抗氧化活性,当 Trolox 浓度在 6.25~800  $\mu\text{mol/L}$  时,与自由基清除率有很好的线性关系, $R^2 = 0.9990$ 。

1.4.2 FRAP 方法 按照 Thaipong 等(2006)的方法将样品用甲醇配制成一系列浓度,取 0.15 mL 样品加入 2.85 mL 新鲜配制的 TPTZ 工作液,混匀后 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 后测定 593 nm 处吸光度,结果以 Trolox 当量表示。每份样品平行操作 3 次。当 Trolox 浓度在 4~900  $\mu\text{mol/L}$  时,与自由基清除率有很好的线性关系, $R^2 = 0.9985$ 。

1.4.3 ABTS 方法 按照 Lee & Yun(2006)和 Chun(2005)的方法配制 ABTS 自由基工作液。将样品用甲醇配制成一系列浓度,取 0.15 mL 样品加入 2.85 mL ABTS 自由基工作液,混合,放置 10 min 后,在 734 nm 处测定吸光度。每份样品平行操作 3 次,计算公式为:清除率(%) =  $[(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100\%$

式中 AControl 为 2.85 mL ABTS + 溶液与 0.15 mL 甲醇混合后的吸光度,ASample 为 2.85 mL ABTS + 溶液与 0.15 mL 样品混合后的吸光度。以 Trolox 为参照来表示样品的抗氧化活性,当 Trolox 浓度在 3.125~800  $\mu\text{mol/L}$  时,与自由基清除率有很好的线性关系, $R^2 = 0.9995$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄连不同部位的抗氧化活性

黄连四个部位的抗氧化排序见表 1 结果。(1) DPPH 法测定:须根乙酸乙酯提取物>须根甲醇提取物>叶乙酸乙酯提取物>根茎乙酸乙酯提取物>根茎甲醇提取物>须根石油醚提取物>根茎石油醚提取物>种子甲醇提取物>叶甲醇提取物>种子乙酸乙酯提取物>叶石油醚提取物>种子石油醚提取物,其中最与最弱相差 87.7 倍。(2)FRAP 法测定:须根乙酸乙酯提取物>须根甲醇提取物>叶乙酸乙酯提取物>根茎甲醇提取物>根茎乙酸乙酯提取物>叶甲醇提取物>根茎石油醚提取物>种子甲醇提取物>叶石油醚提取物>种子乙酸乙酯提取物>种子石油醚提取物,其中最与最弱相差 170.4 倍(黄连须根石油醚在此方法中未测定)。(3)ABTS 法测定:须根甲醇提取物>须根乙酸乙酯提取物>根茎甲醇提取物>叶乙酸乙酯提取物>根茎乙酸乙酯提取物

>叶甲醇提取物>种子甲醇提取物>根茎石油醚提取物>种子乙酸乙酯提取物>叶石油醚提取物>种子石油醚提取物,其中最强与最弱相差 60.2 倍(黄连须根石油醚提取物在此方法中未测定)。

表 1 黄连不同溶剂提取物的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of the extracts of different solvents of *Coptis chinensis* ( $\bar{x} \pm SD, n=3$ )

样品 a	提取溶剂 Solvent	DPPH b	FRAP b	ABTS b
须根	石油醚	278.5	—	—
Fibrous roots	乙酸乙酯	692.8	851.8 $\pm$ 15.6	490.8 $\pm$ 0.8
	甲醇	399.2	762.6 $\pm$ 8.7	493.9 $\pm$ 0.7
叶 Leaf	石油醚	64.2	86.7 $\pm$ 1.9	84.4 $\pm$ 2.1
	乙酸乙酯	397.4	704.3 $\pm$ 7.6	468.6 $\pm$ 3.2
	甲醇	164.0	290.0 $\pm$ 4.6	411.5 $\pm$ 6.1
根茎	石油醚	179.4	266.6 $\pm$ 24.7	175.6 $\pm$ 12.4
Rhizome	乙酸乙酯	350.1	467.0 $\pm$ 8.9	436.4 $\pm$ 1.8
	甲醇	327.0	679.1 $\pm$ 3.0	477.6 $\pm$ 0.9
种子 Seed	石油醚	7.9	5.0 $\pm$ 1.1	8.2 $\pm$ 3.4
	乙酸乙酯	73.8	45.8 $\pm$ 1.9	139.4 $\pm$ 4.1
	甲醇	170.9	98.2 $\pm$ 2.3	243.9 $\pm$ 3.0

注: a. 样品浓度均为 2.0 mg/mL; b. 结果表示为 Trolox 当量。

表 2 黄连不同部位提取物的 IC50 值与 RACT50 值

Table 2 The values of IC50 and RACT50 of extracts from different parts of *Coptis chinensis*

黄连 <i>Coptis chinensis</i>	提取溶剂 Solvent	IC50 ( $\mu$ g/mL)	RACT50
须根 Fibrous roots	乙酸乙酯	20.44	0.28
	甲醇	15.79	0.37
叶 Leaf	乙酸乙酯	31.18	0.19
	甲醇	52.56	0.11
根茎 Rhizome	乙酸乙酯	43.40	0.13
	甲醇	23.37	0.25
种子 Seed	甲醇	89.92	0.06

## 2.2 三种抗氧化方法比较

表 1 三种抗氧化分析方法结果显示:黄连须根的抗氧化活性最高;同一部位不同极性溶剂提取物的抗氧化活性不同。其中,乙酸乙酯和甲醇提取物比石油醚提取物具有更强的抗氧化活性。分析结果显示:黄连不同部位的提取物 FRAP 值与 DPPH 值呈高度正相关( $r=0.9261, P<0.01$ );FRAP 值与 ABTS 值亦呈高度正相关性( $r=0.9029, P<0.01$ );DPPH 值与 ABTS 值成正相关性( $r=0.8354, P<0.01$ )。

## 2.3 黄连不同部位的抗氧化活性与 Trolox 抗氧化活性的比较

在 ABTS 方法中, Trolox 的半数抑制率为 5.83  $\mu$ g/mL。参照韩光亮等(2004)的方法,计算出

样品的 RACT50(RACT50=清除 50% 自由基需要的 Trolox 浓度/清除 50% 自由基需要的样品的浓度)。样品的 IC50 值越小, RACT50 则越大,表示此样品的抗氧化活性越强。表 2 显示,黄连须根甲醇提取物对 ABTS 自由基的清除力是最大的。

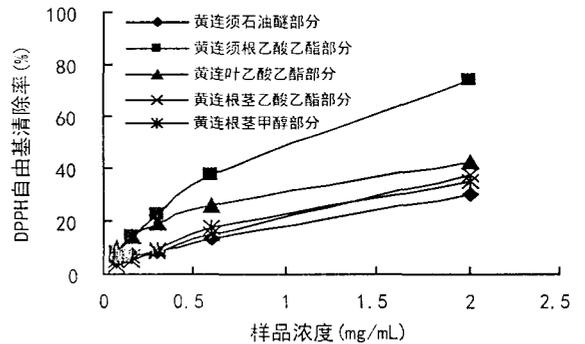


图 1 黄连提取物对 DPPH 自由基清除力  
Fig. 1 The scavenging activity of extracts from *Coptis chinensis* to DPPH.

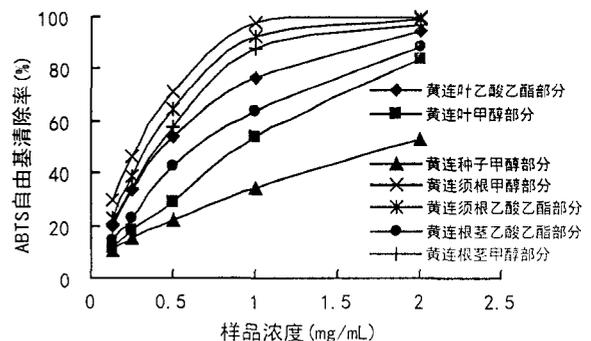


图 2 黄连提取物对 ABTS 自由基清除力  
Fig. 2 The scavenging activity of extracts from *Coptis chinensis* to ABTS.

## 2.4 黄连不同部位的抗氧化活性随浓度的变化

将自由基清除率较大的样品分别用图 1 和图 2 表示出来,从图 1 可看出,黄连不同部位的提取物清除 DPPH 自由基的能力随浓度增大而增大,其中黄连须根乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基的清除率最大,其随浓度变化最大;从图 2 可看出,黄连不同部位的提取物清除 ABTS 自由基的能力随浓度增大而增大,其中黄连须根甲醇提取物清除 ABTS 自由基的能力最大,但当其浓度在 1.0 mg/mL 时,自由基清除力趋于平缓;须根乙酸乙酯提取物和根茎甲醇提取物在浓度为 1.0 mg/mL 时,自由基清除力亦是趋于平缓。

### 3 结论

本文采用三种抗氧化分析方法对黄连抗氧化活性进行研究,发现黄连须根部位抗氧化活性最高;同一部位中,乙酸乙酯和甲醇提取物比石油醚提取物有更强的抗氧化活性;对这三种抗氧化分析方法进行相关性分析,虽然不同的样品在不同抗氧化方法中的抗氧化能力有差异,但是这三种方法之间都有很高的相关性,说明这三种分析方法都适合于样品抗氧化活性的测定,并且结果可靠。其中以 FRAP 方法与 DPPH 方法相关性最好( $r=0.9261$ ,  $P<0.01$ ),说明 FRAP 方法和 DPPH 方法比 ABTS 方法更能准确、可靠地反映黄连提取物总的抗氧化活性。

这三种方法都是基于分光光度法来测定样品的抗氧化活性,然而这三种方法在测定样品的抗氧化活性时却有不同之处,主要是反应机制和反应条件的不同。ABTS 方法用来测定样品清除 ABTS 自由基的能力,可以适用于酸性条件下抗氧化活性的测定;DPPH 方法用来测定样品清除 DPPH 自由基的能力,对酸性条件较敏感;FRAP 方法反应需要在酸性条件下进行。尽管 ABTS 和 DPPH 都是基于清除自由基来测定样品的抗氧化活性,但 ABTS 自由基与自由基清除剂反应速度较 DPPH 方法快,原因是 DPPH 自由基相对稳定,主要与相对活泼的还原性物质反应。FRAP 方法反映样品还原  $Fe^{3+}$  的能力,所需反应时间更长,也容易受干扰。因此在测定样品的抗氧化活性时,需要采用多种方法来综合评价分析样品的抗氧化活性。

#### 参考文献:

- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 213—214
- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, et al. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against[J]. *Helicobacter pylori Process Biochemistry*, **40**: 809—816
- Han GL(韩光亮), Li CM(李翠梅), et al. 2004. Application of modified ABTS<sup>+</sup> assay method to monitor antioxidant extraction from fruit(改良的 ABTS<sup>+</sup> 法及其在优化抗氧化活性物质提取中的应用)[J]. *J Hygiene Res(卫生研究)*, **33**: 620—622
- Lee IK, Yun BS. 2006. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity[J]. *Bioorganic Med Chem Letters*, **16**: 2 376—2 379
- Liao ZY(廖泽云), Jiang JL(姜锦林). 2006. The influence of HuangLianJieDu decoction on tissue injuries of experimental colitis in rat(黄连解毒汤对大鼠结肠炎组织损伤的影响)[J]. *Prac J Med Pharm(实用医药杂志)*, **23**: 1 349—1 351
- Liu JK, Hu L, et al. 2004. DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China[J]. *Chemistry Biodiversity*, **1**: 601—605
- Thaipong K, Boonprakob U, et al. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. *J Food Composition Analysis*, **19**: 669 - 675
- Tu DW(屠大伟), Zhang BS(张保顺), Li XG(李学刚). 2007. *In vitro* antioxidant activity of water extracts from different parts of *Coptis* plants(黄连副产物体外抗氧化活性研究)[J]. *Chin Agric Sci Bull(中国农学通报)*, **23**: 108—111
- Wang LJ(王利津), Xu Q(徐强). 2001. Anti-oxidative activity of Huanglianjiedetang, a traditional Chinese recipe(黄连解毒物的抗氧化作用研究)[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, **32**: 51—53
- Wu Y(吴彦), Sun JN(孙建宁), Yu SK(于绍坤). 2004. Protection effects of the active fraction of Huanglianjiedu decoction on lipid peroxidation damage in the rat with multiple cerebral infarction(黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元谷氨酸损伤的保护作用)[J]. *J Beijing Univ TCM(北京中医药大学学报)*, **27**: 47—49
- Xie YF(谢云峰), Long SJ(龙盛京), Liu LJ(刘露军). 2000. Study on scavenging effects of *Coptidis* toxin-resolving decoction (cross compatibility) on oxygen free radicals(黄连解毒汤交叉配伍对氧自由基清除作用的研究)[J]. *Chin Trad Patent Med(中成药)*, **22**: 677—681
- Xu JH(徐静华), Yu QH(于庆海), Li LZ(李立志). 2002. Study on the antioxidation effects of extract of Huanglianjiedetang in cerebral ischemic mice(黄连解毒汤对脑缺氧小鼠的抗氧化作用研究)[J]. *Pharm Clin Chin Trad Med(中药药理与临床)*, **18**: 2—4
- Yang C(杨澄), Qiu X(仇熙), Kong LD(孔令东). 2001. Effects of different processing products of *Rhizoma Coptidis* on scavenging oxygen free radical and antilipid peroxidation(黄连炮制品清除氧自由基和抗脂质过氧化作用)[J]. *J Nanjing Univ(Nat Sci)(南京大学学报·自然科学)*, **37**: 659—663