

不同提取方法对温肺化纤汤提取物的抗氧化活性评价[※]

● 朱伟^{1*} 王敏¹ 张元兵² 兰智慧² 付向春² 刘良倚^{2▲}

摘要 目的:比较不同提取方法制备的温肺化纤汤提取物的体外抗氧化活性。方法:分别采用水提取法和不同条件乙醇回流提取法制备温肺化纤汤的提取物,采用 DPPH 法、ABTS 法和还原力测定法,以维生素 C 为阳性对照,测定不同温肺化纤汤提取物的抗氧化作用强度。结果:阳性对照(维生素 C)清除 DPPH、ABTS + IC₅₀ 值分别为 7.42、22.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,还原力 EC₅₀ 值为 65.81 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,温肺化纤汤的 60% 乙醇提取物具有最强的体外抗氧化活性,其清除 DPPH、ABTS + IC₅₀ 值分别为 247.11、440.41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,还原力 EC₅₀ 值为 972.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论:温肺化纤汤具有一定的抗氧化活性,这为温肺化纤汤的临床应用提供科学依据,并为其新药研发奠定基础。

关键词 温肺化纤汤 抗氧化 DPPH ABTS + 还原力

肺间质纤维化是由多种原因引起的弥漫性肺部炎性疾病,病变主要累及肺间质,常累及肺泡上皮细胞及肺血管,其发病率在我国呈明显上升的趋势。肺间质纤维化的病死率高,中位存活期为 3.2 年,早期即使对糖皮质激素有效,5 年生存率也不足 50%^[1-2]。温肺化纤汤是在治疗阴疽的古方——阳和汤基础上,增加土鳖虫、桃仁、红花等药而组成的中药复方,具有温阳散寒、化痰行瘀之功效,临床应用治疗肺间质纤维化取得良好效果^[3]。本研究对不同提取方法制备的温肺化纤汤提取物的抗氧化活性

进行评价,并深入探讨其抗肺间质纤维化的作用机制。

1 实验方法

1.1 药品与试剂 1,1—二苯—2—苦基肼(DPPH,阿拉丁公司,D109423-250mg),2,2'—联氮—二—(3—乙基—苯并噻唑啉—磺酸)(ABTS, SIGMA 公司,A1888—1G),抗坏血酸(VitaminC,批号:20120418,天津市大茂化学试剂厂);铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、甲醇等皆为国产分析纯。

1.2 仪器 紫外双光束分光光度计(型号:U—2910,日本 HITACHI 公司),电子天平(型号:BS224S,0.0001g,北京赛多利斯仪器系统有限公司),电热恒温水浴锅(精宏 XMTD—8222,上海精宏实验设备有限公司),医用离心机(白洋 B600A,安新县白洋离心机厂),旋转蒸发仪(型号:Rotavapor R—215,BU—CHI)。

1.3 供试药材 中药饮片生麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的草质茎,鹿角霜为鹿科动

※基金项目 国家自然科学基金(No. 81260537);江西省高等学校科技落地计划项目(No. KJLD13063);江西省自然科学基金(No. 20132BAB205093);江西省卫生厅中医药科研计划(No. 2012Z004);江西省科技厅科技计划项目(No. 20111BBG70020-6);江西省卫生厅中医药科研计划(重点)(No. 2013Z001)

*** 作者简介** 朱伟,男,博士,研究员。主要从事中药复方药效物质基础研究。

▲通讯作者 刘良倚,男,医学博士,主任医师。主要从事中医肺系病的临床和基础研究。E-mail:llj6505@163.com

• 作者单位 1. 广州中医药大学第二临床医学院(510006);江西中医药大学附属医院肺病科(330006)

物梅花鹿 *Cervus Nippon Temminck* 鹿角去除胶质的角块,肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia Presl* 干燥树皮,炮姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 干燥根茎的炮制品,熟地为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa Libosah*. 块根的炮制品、白芥子为十字花科植物白芥子 *Brassica alba* (L.) Boiss. 的干燥种子,地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体,土鳖虫为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的干燥体,桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥种子,红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 干燥花,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanguixiong* Hort. 的根茎。以上中药统一购自广东康美药业股份有限公司,经广东省中医院黄志海主任中药师鉴定符合《中华人民共和国药典》(2010 版)标准,样品凭证标本存于我科中药标本室。

1.4 温肺化痰汤不同提取方法提取物的制备 将各种药材按方剂比例称重:生麻黄 10g,鹿角霜 15g,肉桂 4g,炮姜 10g,熟地 20g,白芥子 10g,地龙 10g,土鳖虫 10g,桃仁 10g,红花 10g,川芎 10g。

水提法:将以上中药加 10 倍量清水浸泡 1h,武火煎煮沸后,文火再煎 40min,共煎 2 次,合并提取液,静置 24h,过滤,常压浓缩至 500mL(即每毫升药液含 0.258g 原药),平行共制备 6 份样品,冷却后密封,置于冰箱 4℃ 备用待测。

醇提法:将以上中药分别加 10 倍量的 30% 乙醇、60% 乙醇和 90% 乙醇浸泡 1h,回流提取 1h,共提取 2 次,合并提取液,静置 24h,过滤,常压浓缩至 500mL(即每毫升药液含 0.258g 原药),平行共制备 6 份样品,冷却后密封,置于冰箱 4℃ 备用待测。

1.5 阳性对照溶液的配制 精密称取 10mg 维生素 C,予蒸馏水定容于 10mL,即得 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的维生素 C 溶液,再予无水甲醇稀释成质量浓度为 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的维生素 C 溶液,置于冰箱 4℃ 备用待测。

1.6 清除 DPPH 自由基活性测定 DPPH 溶液制备:参照文献实验方法^[4],精密称取约 0.1g DPPH,溶于 1000 mL 无水甲醇中,即得质量浓度为 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 溶液,置于冰箱中避光冷藏保存

(临用时配,只能稳定存在 5h,深蓝色)。取供试液 2mL,加入浓度为 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 溶液 2mL,避光反应 30min,于 517nm 处测定其吸光度 A_m 。同时设定溶剂空白组(A_n ,DPPH 溶液用等体积甲醇代替),样品空白组(A_o ,样品溶液用等体积甲醇代替)和阳性对照组。实验平行操作 3 次,根据下列公式计算提取液对 DPPH 的清除率:抑制率(%) = $(1 - (A_m - A_n) \cdot A_o^{-1}) \times 100\%$ 。

1.7 清除 ABTS + 活性测定 ABTS + 溶液制备:参照文献实验方法^[5],将 25mL 的 7mM ABTS 和 440ul 的 140 mM 过硫酸钾混合,在室温、避光的条件下静置过夜,形成 ABTS + 储备液。临用前用无水甲醇稀释成工作液,控制其在 734nm 波长下的吸光度为 (0.70 ± 0.02) 。取供试液 0.4mL,加入 ABTS + 溶液 4mL,反应 6min,于 734nm 处测定其吸光度 A_i 。同时设定溶剂空白组(A_j ,ABTS + 溶液用等体积甲醇代替),样品空白组(A_h ,样品溶液用等体积甲醇代替)和阳性对照组。实验平行操作 3 次,根据下列公式计算提取液对 ABTS + 的清除率:抑制率(%) = $(1 - (A_i - A_j) \cdot A_h - 1) \times 100\%$ 。

1.8 还原力测定 参照文献实验方法^[6],取供试液 0.8mL,加入 2mL 磷酸盐缓冲液(PH = 6.6)和 2mL 1% 铁氢化钾,50℃ 水浴 20min,加 2mL 10% 三氯乙酸,3000rpm,离心 10min,取 2mL 上清加 2mL 去离子水,0.4mL 0.1% 三氯化铁,反应 5min,于 700nm 处测吸光度值,以维生素 C 为阳性对照,实验平行操作 3 次,测得的吸光度值越大表示还原能力越强。

1.9 数据处理 根据温肺化痰汤提取物溶液的质量浓度(X, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与清除率(Y,%)的关系拟合方程,得出相关系数 r,并计算出各提取物清除率为 50% 时药物浓度(IC₅₀),通过 IC₅₀ 值比较抗氧化活性大小。

2 结果

2.1 不同提取方法制备的温肺化痰汤提取物清除 DPPH 自由基能力 DPPH 是一种稳定的自由基,它在 517nm 处有一强吸收,其褪色程度与其所接受的

电子数量呈定量关系,因而国内外广泛将此法用于自由基清除剂的筛选研究。由表1可知,温肺化纤汤四种提取物均具有一定的清除DPPH自由基的能力,且在一定浓度范围内清除率与浓度呈现较好的线性关系,其中,温肺化纤汤水、30%、60%、90%乙

醇提取物对DPPH自由基清除能力的大小为:60%乙醇提取物>90%乙醇提取物>水提取物>30%乙醇提取物,阳性对照维生素C清除DPPH自由基的能力明显强于温肺化纤汤各提取物($P<0.01$),其IC₅₀为 $7.42\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表1 温肺化纤汤提取物清除DPPH自由基活性($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	回归方程	r	IC ₅₀ /ug·mL ⁻¹
维生素C	Y=6.0721X+4.9185	0.9998	7.42±1.02
水提取物	Y=0.1358X+1.2893	0.9996	358.69±22.14 ^{**△△}
30%乙醇提取物	Y=0.1852X-1.0123	0.9986	375.64±30.18 ^{**△△}
60%乙醇提取物	Y=0.1906X+1.5663	0.9996	217.11±18.25 ^{**}
90%乙醇提取物	Y=0.1852X+1.5876	0.9974	261.41±17.69 ^{**△}

注:与水提取组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与60%乙醇提取物组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

2.2 不同提取方法制备的温肺化纤汤提取物清除ABTS+能力 较DPPH这种有机性的自由基而言,ABTS能溶于水相和酸性的乙醇介质中,因此,ABTS法既可测定亲水性,又可测定亲脂性物质的抗氧化能力。表2的结果显示,温肺化纤汤四种提取物对ABTS+的清除能力亦存在量效关系,通过比较IC₅₀

值,可知温肺化纤汤的60%乙醇提取物对ABTS+清除能力要明显强于其它三种提取物($P<0.01$),从大到小的排列顺序为:60%乙醇提取物>90%乙醇提取物>30%乙醇提取物>水提取物,但均比阳性对照维生素C弱($P<0.01$)。

表2 温肺化纤汤提取物清除ABTS+活性($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	回归方程	r	IC ₅₀ /ug·mL ⁻¹
维生素	CY=1.8769X+7.3073	0.9971	22.75±3.26
水提取物	Y=0.0756X+0.1036	0.9989	660.01±36.21 ^{**△△}
30%乙醇提取物	Y=0.1006X+0.7858	0.9998	489.21±33.48 ^{**△△}
60%乙醇提取物	Y=0.1144X-0.3826	0.9993	340.41±30.25 ^{**}
90%乙醇提取物	Y=0.1110X+0.5006	0.9996	445.94±28.45 ^{**△△}

注:与水提取组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与60%乙醇提取物组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

2.3 不同提取方法制备的温肺化纤汤提取物还原力能力 测定还原能力在一定程度上可以反映样品的抗氧化活性。如表3所示,温肺化纤汤的四种提取物都具有一定的还原力,且在一定浓度范围内还

原能力与浓度呈现较好的线性关系。温肺化纤汤的60%乙醇提取物的还原力要明显强于其它三种提取物($P<0.01$),但和阳性对照维生素C比较,则明显为弱($P<0.01$)。

表3 温肺化纤汤提取物还原力测定($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	回归方程	r	IC ₅₀ /ug·mL ⁻¹
维生素C	Y=0.0075X+0.0064	0.9998	65.81±10.58
水提取物	Y=0.0004X+0.0155	0.9964	1211.25±96.35 ^{**△△}
30%乙醇提取物	Y=0.0004X+0.0147	0.9952	1213.25±125.47 ^{**△△}
60%乙醇提取物	Y=0.0005X+0.0137	0.9997	872.60±63.41 ^{**}
90%乙醇提取物	Y=0.0004X+0.0130	0.9999	1217.50±100.96 ^{**△△}

注:与水提取组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与60%乙醇提取物组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

3 讨论

肺间质纤维化的病理特点以慢性炎症和纤维素渗出为主,基质胶原进行性沉积并逐步取代正常肺组织,最终引起患者不同程度的缺氧、呼吸困难,最后因呼吸衰竭而死亡。肺间质纤维化中医学属“肺痿”范畴^[7],我们在继承历代医家学术思想的基础上,结合数十年临床实践,认为肺间质纤维化是一个本虚标实之证,阳虚是本病的内因,痰和瘀是本病的继发因素,自创温肺化纤汤治疗肺间质纤维化获得较好疗效^[8]。毒性氧化物是目前被证实的最主要的致损伤物质,研究发现氧化应激在肺间质纤维化发病机理中起着非常重要的作用。当患肺间质纤维化时,炎症细胞释放大量氧化物质,使机体氧化抗氧化失衡,谷胱甘肽(GSH)水平降低,它所造成的广泛肺损伤是肺间质纤维化发病中的重要环节^[9-10]。临床研究结果显示 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)作为 GSH 的前体,在体内可以转化为 GSH,增强肺组织内抗氧化和毒物损伤的能力^[11-13]。温肺化纤汤的药理学效应的重要组成部分是否是清除氧自由基能力,其中又是何种成分群发挥抗氧化作用,这使得要在分子水平阐明其药理作用受到很大限制。

本研究采用三种抗氧化评价方法,以维生素 C 为阳性对照,测定不同提取方法温肺化纤汤提取物的抗氧化作用强度,结果显示,温肺化纤汤的不同提取物均具有一定的抗氧化活性,其中温肺化纤汤的 60% 乙醇提取物具有最强的抗氧化效果,虽然清除效果和维生素 C 比较还有很大的差距,但其是混合物,有效成分含量低,杂质多,有待我们更深入地开展温肺化纤汤的分离纯化及其抗氧化作用的研究。

参考文献

- [1] Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2010, 363: 620-628.
- [2] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [3] 刘良倚, 闻海菊, 李少峰. 温肺化纤汤治疗肺间质纤维化 6 例分析[J]. 中医药通报, 2011, 10(6): 55-58.
- [4] Chen Z, Bertin R, Foldi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH? assay using several statistical programs[J]. Food Chem, 2013, 138(1): 414-420.
- [5] 廖月霞, 卜平. 半枝莲乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 520-523.
- [6] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36-40.
- [7] 郑岚, 郑建平. 中医药治疗肺间质纤维化近 10 年研究进展[J]. 光明中医, 2011, 26(1): 188-191.
- [8] 兰智慧, 张元兵, 朱伟, 等. 从阳虚论治肺间质纤维化探讨[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 1940-1942.
- [9] Hecker L, Cheng J, Thannickal VJ. Targeting NOX enzymes in pulmonary fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(14): 2365-2371.
- [10] O'Connell OJ, Kennedy MP, Henry MT. Idiopathic pulmonary fibrosis: treatment update[J]. Adv Ther, 2011, 28(11): 986-999.
- [11] Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2012, 366(21): 1968-1977.
- [12] Homma S, Azuma A, Taniguchi H, et al. Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respirology, 2012, 17(3): 467-477.
- [13] Bando M, Hosono T, Mato N, et al. Long-term efficacy of inhaled N-acetylcysteine in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Intern Med, 2010, 49(21): 2289-2296.

医 论

劳逸有方

车牛多骨立, 驿马多早毙, 休息少也。山禽与野兽, 不为人猎取, 从未见有自死者, 散逸多也。牛马有病, 役于人也。禽兽无病, 得自由也。易曰: 天行健, 君子自强不息。人可饱食不事事乎? 但不可过劳, 不可焦心。黎明至午, 应行之事, 只管去做; 午后不妨休息养神。

夫牛马之劳, 本非所愿, 为畜于人, 欲罢不能; 山禽野兽, 一巢一穴之外, 惟觅食不饥则已。人能若是乎, 大则为国为民, 小则谋食谋衣, 各行其志, 亦各有所乐。故虽劳能臻上寿, 颓惰自甘者, 亦未必延龄也。外厩之马, 田家之牛, 刍豢得宜, 劳逸得中, 亦何尝骨立而早毙耶? 前作摄生一卷, 每言静养。然人之于事, 岂可尽废。故书此可参阅之。

(摘自清·黄凯钧·《友渔斋医话》)