

# 虎杖醇提物抗氧化及抑制多酚氧化酶作用研究

郭蕊<sup>1</sup> 刘吉华<sup>1</sup> 余伯阳<sup>1,2</sup>

(1. 中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 211198)

(2. 中国药科大学现代中药重点实验室, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 探讨了虎杖醇提物抗氧化及抑制多酚氧化酶的活性. 采用70%乙醇水溶液提取虎杖中的有效成分, 以化学发光法测定提取物对超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )的清除作用; 以左旋多巴为底物测定其抑制多酚氧化酶的活性. 结果表明: 虎杖醇提物对超氧阴离子自由基、羟自由基和过氧化氢均具有良好的清除作用,  $IC_{50}$ 值分别为0.82 mg/mL、0.39 mg/mL和0.008 9 mg/mL, 均优于对照品Vc乙基醚; 对多酚氧化酶活性抑制作用与浓度呈量效关系,  $IC_{50}$ 为0.14 mg/mL, 优于对照品熊果苷.

**[关键词]** 虎杖提取物 抗氧化 清除自由基 抑制多酚氧化酶

**[中图分类号]** Q946.5; R285.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)04-0111-05

## Study on the Antioxidation and Polyphenoloxidase Inhibitory Activities of *Polygonum cuspidatum* Extract

Guo Rui<sup>1</sup> , Liu Jihua<sup>1</sup> , Yu Boyang<sup>1,2</sup>

(1. Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

(2. Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** The antioxidative activity and the polyphenoloxidase inhibitory activity of 70% alcohol extraction of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. were investigated in this paper. Chemiluminescence method was employed to detect the free radical scavenging activity against  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$  and  $H_2O_2$ , while L-DOPA was used as substrate for the determination of polyphenoloxidase inhibitory activity. The results indicated the extraction exhibited a higher free radical scavenging activity against  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$  and  $H_2O_2$  than VC ethylether, with an  $IC_{50}$  value of 0.82 mg/mL, 0.39 mg/mL and 0.008 9 mg/mL, respectively. Compared with arbutin, the extraction also showed a higher polyphenoloxidase inhibitory activity than arbutin, with an  $IC_{50}$  value of 0.14 mg/mL, in a dose-dependent manner.

**Key words:** *Polygonum cuspidatum* extraction, anti-oxidative activity, scavenging free radical, inhibiting polyphenoloxidase

虎杖为蓼科蓼属多年生灌木状草本植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的根及根茎,又名斑根、斑杖等,主要含蒽醌类化合物、白藜芦醇、蓼苷、有机酸、葡萄糖苷等成分,为我国传统中药<sup>[1,2]</sup>,具有祛风利湿、活血定痛、止咳化痰等广泛的药理作用,临床上用于治疗湿热黄疸、肺热咳嗽、关节痹痛、经闭经痛、水火烫伤、跌打损伤、疮痍肿毒等<sup>[3,4]</sup>.

研究表明,机体中活性自由基如超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等是人类疾病发生和衰老的重要原因<sup>[5]</sup>,因此寻找天然来源的抗氧化活性物质已成为近年来的研究热点之一. 中药中的抗氧化活性成分主要有黄酮类、多酚类、多糖类、皂苷类、鞣质类等,目前研究较多的主要集中在黄酮类和多酚类物质<sup>[6]</sup>. 虎杖乙醇提取物中主要成分是白藜芦醇,它属于芪三酚类成分,具有很好的抗氧化活性<sup>[7]</sup>. 多酚氧化酶广泛存在于动植物体内,是生物体合成黑色素的關鍵酶<sup>[8,9]</sup>. 多酚氧化酶抑制剂在医药、化妆品、食品和农业等领域有着广阔的应用前景<sup>[10]</sup>,广泛用于人体的色素障碍性疾病、恶性黑色素

收稿日期: 2011-03-25.

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(108071)、江苏省“六大人才高峰”.

通讯联系人: 余伯阳 教授 研究方向: 生药学. E-mail: boyangyu59@163.com

瘤和老年性痴呆等疾病的治疗<sup>[11]</sup>,以及水果蔬菜的保鲜<sup>[12]</sup>和作为食品添加剂.本文以化学发光法研究虎杖提取物的抗氧化活性,同时检测其多酚氧化酶的抑制作用,为寻找天然来源的抗氧化剂、多酚氧化酶抑制剂及其在食品和医药领域中的应用奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

虎杖饮片购于南京市传统中医门诊部,经中国药科大学余伯阳教授鉴定为蓼科植物虎杖 *P. cuspidatum* Sieb. et Zucc.

多酚氧化酶、左旋多巴、3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺)购自 Sigma 公司;对照品 Vc 乙基醚和熊果苷由苏州珈依生化有限公司提供;其他试剂均为国产分析纯试剂.

### 1.2 仪器

AL204 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),R-200 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司),HH-4 智能数显恒温水浴锅(南京科尔仪器设备有限公司),冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),A-5080 型酶标仪(奥地利 Tecan 公司),LUMistar OPTIMA 化学发光仪(德国 BMG Labtech 公司).

### 1.3 方法

#### 1.3.1 虎杖醇提取物的制备<sup>[13]</sup>

取 50g 虎杖饮片,加入 300 mL 70% 乙醇,静置 30min 以润湿药材,加热回流提取 1h,趁热过滤.按同样方法重复提取一次,合并提取液,用旋转蒸发仪回收溶剂后,冷冻干燥得冻干粉.

#### 1.3.2 抗氧化活性测定

##### 1.3.2.1 化学发光仪器的参数设置

Measurement interval time: 1.00 s

Emission filter: lens

Temperature: 25℃

Pump speed(码/s): 420

Shaking time: 2 s.

##### 1.3.2.2 清除超氧阴离子自由基能力的测定<sup>[14]</sup>

采用邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲溶液发光体系.在 96 孔板中依次加入样品溶液 2  $\mu$ L(以相同量的 DMSO 作为空白对照)和 0.001 mol/L 邻苯三酚溶液 4  $\mu$ L,再由发光仪自动加入 0.001 mol/L 鲁米诺-pH10.2 碳酸缓冲溶液(1:2)混合溶液 194  $\mu$ L 启动反应,记录发光强度(Chemical Luminescence, CL),取峰值计算清除率.

##### 1.3.2.3 清除羟自由基能力的测定

采用邻菲罗啉-Cu<sup>2+</sup>-抗坏血酸-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系.在 96 孔板中依次加入样品溶液 10  $\mu$ L(以相同量的 DMSO 作为空白对照)和 0.01 mol/L CuSO<sub>4</sub> 溶液 10  $\mu$ L 0.01 mol/L 抗坏血酸溶液 4  $\mu$ L 0.01 mol/L 邻菲罗啉溶液 10  $\mu$ L 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 10  $\mu$ L,再由发光仪自动加入 0.10 mol/L 硼砂-0.20 mol/L 硼酸(8:2)混合溶液 156  $\mu$ L 启动反应,记录发光强度(CL),取峰值计算清除率.

##### 1.3.2.4 清除过氧化氢能力的测定<sup>[15]</sup>

采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺-碳酸缓冲溶液体系.在 96 孔板中依次加入样品溶液 10  $\mu$ L(以相同量的 DMSO 作为空白对照)和 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 10  $\mu$ L,再由发光仪自动加入 0.001 mol/L 鲁米诺-pH9.5 碳酸缓冲液(1:17)混合溶液 180  $\mu$ L 启动反应,记录发光强度(CL),用曲线下面积计算清除率.

##### 1.3.2.5 自由基清除率的计算<sup>[16]</sup>

根据发光强度(CL)大小可以判断物质清除自由基的能力.自由基清除率用以下公式计算,以 Vc 乙基醚作为阳性对照品.

$$\text{自由基清除率}(\%) = (\text{CL}_{\text{空白对照}} - \text{CL}_{\text{样品}}) / \text{CL}_{\text{空白对照}} \times 100\%.$$

将样品从高浓度逐渐稀释,检测不同浓度样品对自由基的清除率.样品平行测定 3 次,建立量效关系,计算自由基清除率为 50% 时样品的浓度(IC<sub>50</sub>).IC<sub>50</sub> 越小,表明样品清除自由基的能力越强.

### 1.3.3 多酚氧化酶抑制活性测定<sup>[17]</sup>

在 96 孔板中,依次加入 0.10 mol/L pH6.8 的磷酸缓冲溶液 40  $\mu$ L,样品溶液 40  $\mu$ L(以相同量的含 10% 丙二醇的蒸馏水作为空白对照) 200 U/mL 多酚氧化酶 40  $\mu$ L 25℃ 下温育 10 min,再加入 5 mmol/L LDOPA 40  $\mu$ L,在 37℃ 下温育 10 min,迅速置于酶标仪中,在 475 nm 下测定 OD 值,以熊果苷为阳性对照。

样品对多酚氧化酶的抑制率按下式进行计算:

$$\text{抑制率}/\% = [(OD_{\text{空白}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白}}] \times 100\%.$$

检测不同浓度样品对多酚氧化酶的抑制率,计算其半数抑制率( $IC_{50}$ )并以此衡量样品对多酚氧化酶的抑制作用。 $IC_{50}$  越小,表明样品抑制多酚氧化酶的能力越强。

## 2 结果与分析

### 2.1 虎杖醇提物清除超氧阴离子自由基的能力

虎杖醇提物清除超氧阴离子自由基的化学发光曲线显示(图 1),在邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液(pH10.2)的发光体系中,化学发光值约在 60 s 处出现最高峰,在 200 s 后发光基本结束。

不同浓度虎杖醇提物对超氧阴离子自由基的清除作用结果显示(图 2),虎杖醇提物能有效清除超氧阴离子自由基,清除率随着提取物浓度增大而增大,浓度在 0.2 mg/mL ~ 1.0 mg/mL 之间呈现很好的量效关系,量效关系曲线为  $y = 48.47x + 10.478$  相关系数  $R^2 = 0.9846$ 。虎杖醇提物的  $IC_{50}$  值为 0.82 mg/mL,低于 Vc 乙基醚  $IC_{50}$  值 1.26 mg/mL,表明虎杖醇提物清除超氧阴离子自由基的能力优于 Vc 乙基醚。

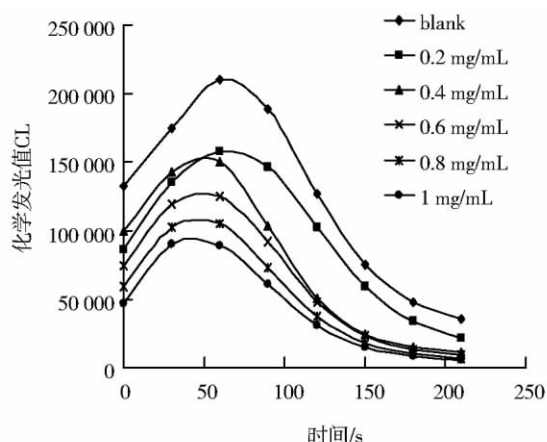


图 1 虎杖醇提物清除超氧阴离子自由基的化学发光曲线  
Fig.1 Chemical luminescence curve of the extraction scavenging  $O_2^-$  radical

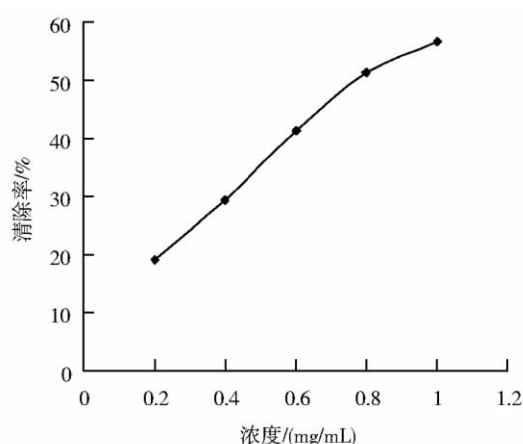


图 2 虎杖醇提物对超氧阴离子自由基的清除作用  
Fig.2 Scavenging effect of the extraction against  $O_2^-$  radical

### 2.2 虎杖醇提物清除羟自由基的能力

虎杖醇提物清除羟自由基的化学发光曲线显示(图 3),在邻菲罗啉- $Cu^{2+}$ -抗坏血酸- $H_2O_2$  发光体系中,化学发光值约在 20 s ~ 40 s 处出现最高峰,随提取物浓度增大,峰值出现越晚,在 140 s 后发光基本结束。

不同浓度虎杖醇提物对羟自由基的清除作用结果显示(图 4),虎杖醇提物能有效清除羟自由基,其清除率随着提取物浓度增大而增大,浓度在 0.1 mg/mL ~ 0.8 mg/mL 之间呈现很好的量效关系,量效关系曲线为  $y = 56.414x + 27.908$  相关系数  $R^2 = 0.9623$ 。虎杖醇提物的  $IC_{50}$  值为 0.39 mg/mL,低于 Vc 乙基醚  $IC_{50}$  值(0.48 mg/mL),表明虎杖醇提物清除羟自由基的能力优于 Vc 乙基醚。

### 2.3 虎杖醇提物清除过氧化氢的能力

虎杖醇提物清除  $H_2O_2$  的化学发光曲线显示(图 5), $H_2O_2$ -鲁米诺-碳酸缓冲溶液(pH9.5)发光体系是一个不出峰的体系,在 400 s 后发光基本结束。

不同浓度虎杖醇提物对  $H_2O_2$  的清除作用结果显示(图 6),虎杖醇提物能有效清除  $H_2O_2$ ,其清除率随着提取物浓度增大而增大,浓度在 0.001 mg/mL ~ 0.015 mg/mL 之间呈现很好的量效关系,量效关系曲线为  $y = 4840.4x + 6.6848$  相关系数  $R^2 = 0.951$ 。虎杖醇提物的  $IC_{50}$  值为 0.0089 mg/mL,低于 Vc 乙基醚  $IC_{50}$

值(0.015 mg/mL)表明虎杖醇提取物清除  $H_2O_2$  的能力优于 Vc 乙基醚。

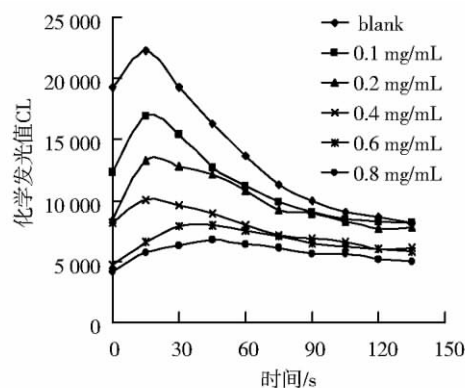


图3 虎杖醇提取物清除羟自由基的化学发光曲线

Fig.3 Chemical luminescence curve of the extraction scavenging  $\cdot OH$

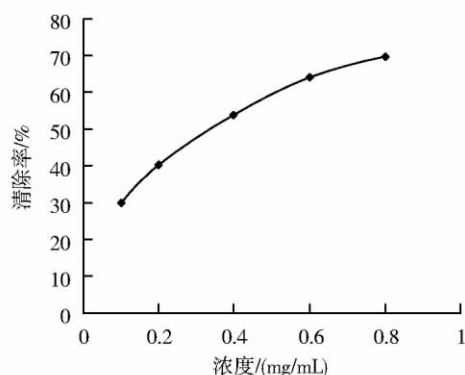


图4 虎杖醇提取物对羟基自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of the extraction against  $\cdot OH$

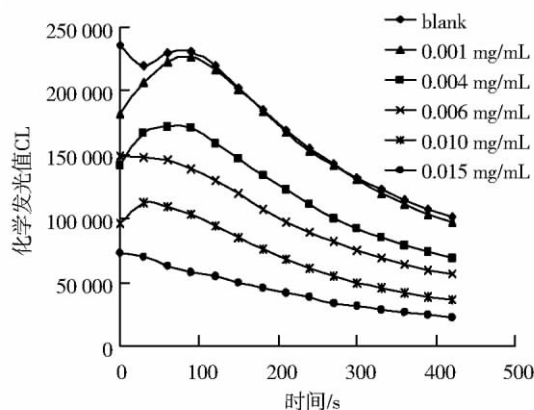


图5 虎杖醇提取物清除  $H_2O_2$  的化学发光曲线

Fig.5 Chemical luminescence curve of the extraction scavenging  $H_2O_2$

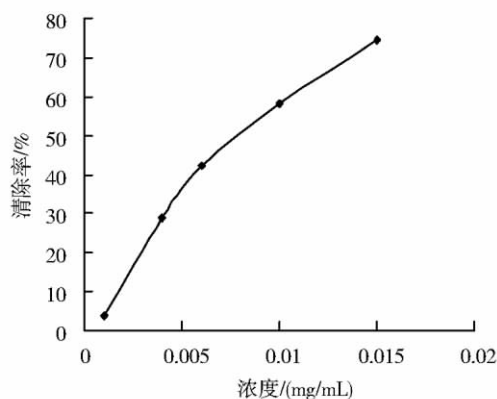


图6 虎杖醇提取物对  $H_2O_2$  的清除作用

Fig.6 Scavenging effect of the extraction against  $H_2O_2$

## 2.4 虎杖醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用

不同浓度的虎杖醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用结果显示(图7),虎杖醇提取物对多酚氧化酶的抑制作用随着虎杖醇提取物浓度增大而增大,浓度在 0.1 mg/mL ~ 1 mg/mL 之间呈现很好的量效关系,量效关系曲线为  $y = 38.95x + 44.268$ ,相关系数  $R^2 = 0.9818$ .虎杖醇提取物的  $IC_{50}$  值为 0.14 mg/mL,低于熊果苷  $IC_{50}$  值(0.18 mg/mL),表明虎杖醇提取物对多酚氧化酶抑制活性优于熊果苷。

## 3 小结

自由基和抗氧化剂研究已成为近年来医药领域的研究重点,特别是挖掘天然植物中的抗氧化剂在抗衰老及治疗与自由基相关的疾病方面具有非常重要的意义。目前,对抗氧化研究常用的方法有二苯代苦味酰基自由基(DPPH)法、硫代巴比妥酸(TBA)法、 $Fe^{3+}$ 还原/抗氧化能力(FRAP)法<sup>[18]</sup>等。但由于中药提取物常常具有较深的颜色,因此使得上述3种基于显色反应的抗氧化方法的应用受到限制。化学发光法具有灵敏度高、线性范围宽、分析速度快及仪器设备简单等优点,被广泛应用于抗氧化活性药物的研究和筛选<sup>[19]</sup>。应用化学发光法研究中药提取物的抗氧化作用,可以有效避免中药提取物颜色的干扰,使研究结果更加真实可靠。本实验中化学发光仪是采用96孔酶标板进行测定的,可以同时测

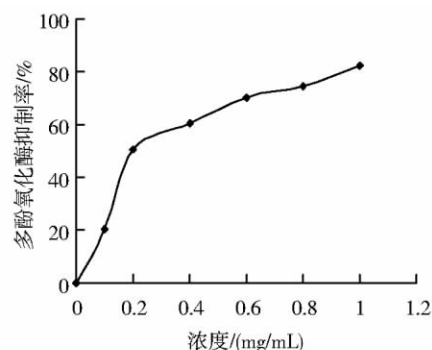


图7 虎杖醇提取物抑制多酚氧化酶的作用

Fig.7 Polyphenoloxidase inhibitory activity of the extraction

定多种样品,试剂使用量小、简单快速、灵敏度高、重复性好。本实验中虎杖 70% 乙醇提取物具有显著的抗氧化和抑制多酚氧化酶的作用。抗氧化作用清除超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )的 $IC_{50}$ 值分别为 0.82 mg/mL、0.39 mg/mL 和 0.008 9 mg/mL,活性均优于对照品 Vc。乙基醚,其对过氧化氢的清除作用尤其显著。多酚氧化酶抑制剂在美白化妆品行业中应用广泛,现在已有很多的多酚氧化酶抑制剂应用于美白化妆品添加剂。因此从天然药用植物中筛选高效、低毒、价廉的美白活性成分具有良好的前景。本实验同样采用 96 孔酶标板进行反应和测定,与传统的紫外分光光度法相比,具有方法简便、可同时测定多种样品的优点。本实验中虎杖醇提物抑制多酚氧化酶的 $IC_{50}$ 值为 0.14 mg/mL,活性优于对照品熊果苷。本文实验结果表明该虎杖醇提物是一种非常有潜力的天然抗氧化剂及多酚氧化酶抑制剂,为虎杖在医药、保健品、化妆品及食品行业中的应用奠定了良好的基础。

### [参考文献]

- [1] 金雪梅,金光洙.虎杖的化学成分研究[J].中草药,2007,38(10):1446-1448.
- [2] 叶勇,罗月婷,王延芳.虎杖蒽醌的荧光特性和自由基清除活性研究[J].中药药理与临床,2010,26(5):61-63.
- [3] Kim Y S, Hwang C S, Shin D H. Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities [J]. Food Microbiol, 2005, 22(1): 139-144.
- [4] Chang J S, Liu H W, Wang K C, et al. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line [J]. Antivir Res, 2005, 66(1): 29-34.
- [5] 李丹,田莹.葡萄汁抗氧化作用的研究[J].安徽农业科学,2010,38(3):1429-1431.
- [6] 陈会良,顾有方,王月雷.中草药化学成分与抗氧化活性的研究进展[J].中国中医药科技,2006,13(1):63-64.
- [7] 赵鸿宾,陈华国,周欣,等.虎杖中白藜芦醇的提取工艺[J].华西药学杂志,2010,25(1):85-86.
- [8] Kubo I, Chen Q X, Nihei K I, et al. Molecular design of anti-browning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors [J]. Food Chem, 2003, 81(2): 241-247.
- [9] 郭云集,宋康康,李智聪,等.甘醇酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用[J].厦门大学学报:自然科学版,2008,47(3):383-386.
- [10] 邓湘庆,龚盛昭,揭向阳.川芎提取物抑制酪氨酸酶活性的研究[J].中药材,2007,30(4):469-471.
- [11] Wu T W, Fung K P, Wu J, et al. Morin hydrate inhibits azo-initiator induced oxidation of human low density lipoprotein [J]. Life Sci, 1996, 58(2): 17-23.
- [12] Chen Q X, Ke L N, Song K K, et al. Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom tyrosinase [J]. The Protein J, 2004, 23(2): 135-141.
- [13] 黄志芳,易进海,刘倩伶,等.酶解法提取纯化虎杖提取物中白藜芦醇的工艺研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(6):1061-1064.
- [14] 彭密军,彭胜,吴吉林,等.杜仲素抗氧化活性研究[J].食品科学,2010,31(19):84-86.
- [15] 秦民坚,吉文亮,刘峻.射干中异黄酮成分清除自由基的作用[J].中草药,2003,34(7):640-641.
- [16] 刘荣华,余伯阳,邱声祥,等.山楂叶中多元酚类成分抗超氧阴离子活性研究及构效关系分析[J].中国药学杂志,2005,40(14):1066-1069.
- [17] Hearing V J Jr. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed [J]. Methods Enzymol, 1987, 142(1): 154-165.
- [18] 李秋红,李廷利,黄莉莉,等.中药抗氧化的作用机理及评价方法研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(5):1257-1258.
- [19] 尹文清,段少卿,张岩,等.钩藤不同溶剂提取物及总生物碱抗氧化活性研究[J].广西师范大学学报:自然科学版,2010,28(3):31-34.

[责任编辑:黄敏]