

3 讨论

临床研究^[5]表明,毛冬青甲素对治疗心力衰竭有良好的临床疗效,并有多重抗心衰血流动力学效应和保护心肌作用。动物实验方面通过结扎家兔冠状动脉前降支制作心梗模型,测定毛冬青甲素对心梗后及手术前后炎性细胞因子水平的改变。结果表明,毛冬青甲素能够抑制心梗后的炎症反应,显著降低心梗后 CRP、IL-6 水平^[6]。毛冬青酸能够抑制肝枯否细胞释放 TNF- α ,其机制可能是上调可溶性枯否细胞中的 TOLL 样受体 4(TLR4),而可溶性 TLR4 是 TLR4(识别脂多糖的受体)的剪接异构体,缺少部分跨膜结构和胞内部分,能有效抑制 NF- κ B 活性和 TNF- α 的生成^[7]。由高血压引起充血性心衰的盐敏感大鼠,其心脏组织中 IL-1 β mRNA 的含量较正常增加 6.2 倍^[8],IL-1 β 刺激大鼠心肌细胞 iNOS mRNA、蛋白质 NO 的产生,抑制培养的大鼠心肌细胞的 L 型 Ca 离子电流,从而降低心肌收缩力。采用腹主动脉缩窄法复制 CHF 动物模型^[9],其血清 IL-1 β 的含量较假手术组明显升高($P < 0.01$),说明 IL-1 β 参与了 CHF 的发生、发展过程。经药物干预后,各治疗组大鼠血清中 IL-1 β 的含量均低于模型组($P < 0.01$),说明各治疗组用药能调节机体免疫功能,可通过抑制巨噬细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 等炎症介质,达到减轻心肌损伤的作用。研究显示^[10],心力衰竭大鼠肺脏内 NF- κ B 的活化水平明显增高,与细胞因子的浓度变化呈正相关,与相应的大鼠心脏功能(主要比较指标为 $\pm dp/dt_{max}$)呈负相关。大鼠心力衰竭发生过程中存在组织中细胞因子表达增高,且增高的程度与相应组织中 NF- κ B 的活化程度有关。

研究表明,毛冬青可以提高 EF 和 FS($P < 0.05$),

其作用强度与卡托普利相似。毛冬青改善心功能作用机理复杂,本研究验证了毛冬青对慢性心力衰竭炎症相关因子的影响作用,结果显示,经毛冬青干预后大鼠血清 IL-1 β 、NF- κ B 水平明显下降,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明中药毛冬青可能是通过改善慢性心力衰竭的炎症状态作用从而改善心功能。

参考文献:

- [1] Barry Greenberg. Acute decompensated heart failure— treatments and Challenges[J]. Circulation Journal, 2012, 76:532–543.
- [2] 廖华,郭小梅. 慢性心力衰竭诊断与治疗新进展[J]. 心血管病学进展, 2011, 32(1): 94–97.
- [3] 张双伟,冼绍祥. 毛冬青在慢性心力衰竭中抗炎作用的临床研究[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(2): 120–123.
- [4] Cuttilletta AF, Rudnik M, Iak R. Muscle and nonmuscle cell RNA polymerase activity during the development of myocardial hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 1978, 10: 677–682.
- [5] 丁有钦. 毛冬青甲素治疗慢性充血性心力衰竭的临床观察[J]. 新中医, 1996, 28(10): 40.
- [6] 褚晨宇. 毛冬青甲素对心肌梗塞后缺血心肌保护作用和对细胞因子影响的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [7] 宋媛媛,李媛,张洪泉. 毛冬青抗炎免疫药理作用的研究进展[J]. 安徽医药, 2009, 13(10): 1157–1159.
- [8] Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, et al. Increased expression of Interleukin-1 β and monocyte Chemotactic and activating Factor Failing heart with pressure overload[J]. Circ Res, 1997, 81(5): 664–671.
- [9] 张志霞,张一昕,李国川,等. 人参强心滴丸对充血性心力衰竭大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(8): 549–551.
- [10] 李彦华,王士雯,朱梅. 心力衰竭大鼠组织中核因子 κ B 的活化与细胞因子的表达[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2009, 10, 8(5): 449–451.

(编辑: 宋威)

DPPH 法测定芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性

秦媛媛¹, 冯育林^{1,2}, 邵崇钰¹, 张武岗^{1,2}, 黄文平², 杨世林^{1,2} (1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 研究芒果叶中不同含量总黄酮提取物的抗氧化活性。方法 采用 DPPH 法测定芒果叶中以芒果苷为指标的不同含量的总黄酮提取物的抗氧化活性。结果 抗氧化活性由大到小依次为: VC > 芒果苷含量为

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 秦媛媛,女,硕士研究生,研究方向: 中药材有效成分提取工艺的研究。Email: 814579681@qq.com。通讯作者: 张武岗,副教授,主要从事天然产物研究工作。Email: zwgch98@foxmail.com。

基金项目: 江西创新药物与高效节能降耗制药设备协同创新中心[赣教高字(2012)89 号]。

78.48 %的总黄酮提取物 > 芒果苷对照品 > 芒果苷含量为 52.13 %的总黄酮提取物 > 芒果苷含量为 38.65 %的总黄酮提取物 > 芒果苷含量为 15.24 %的总黄酮提取物 > BHT。结论 不同含量的总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除作用呈现一定的线性关系。

关键词: 芒果叶; 总黄酮提取物; 芒果苷; DPPH; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0185-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.018

Determination of Antioxidant Activity of Total Flavonoids Extract in Mango Leaves with DPPH Assay *in Vitro*

QIN Manman¹, FENG Yulin^{1,2}, SHAO Chongyu¹, ZHANG Wugang^{1,2}, HUANG Wenping², YANG Shilin^{1,2} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the *in-vitro* antioxidant activity of total flavonoids extract with different percentages of mangiferin content from mango leaves. **Methods** DPPH assay was applied for the determination of antioxidant activity of total flavonoids extract from mango leaves with different contents of mangiferin. **Results** The antioxidant activity of the total flavonoids extracts was in decreasing sequence, and they were VC, total flavonoids extract with 78.48 % of mangiferin, mangiferin control, total flavonoids extract with 52.13 % of mangiferin, total flavonoids extract with 38.65 % of mangiferin, total flavonoids extract with 15.24 % of mangiferin, and BHT. **Conclusion** The scavenging effect of total flavonoids extract on DPPH free radicals presents a linear relationship with the percentages of mangiferin content.

Keywords: Mango leaves; Total flavonoids extract; Mangiferin; DPPH; Antioxidant activity

芒果叶是漆树科植物芒果(*Mangifera indica* L.)的叶,具有行气疏滞、去痧积的功效,用于治疗热滞腹痛、气胀、小儿疳积、消渴等症^[1]。化学研究表明,芒果叶中含有芒果苷、异芒果苷、高芒果苷等黄酮类成分。而黄酮类成分具有抗氧化作用^[2-5]。目前,已证实自由基与人的病理(肿瘤^[6]、炎症^[7]、糖尿病及其慢性并发症^[8-11]等)有着密切关系。因此,研究芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性有着非常重要的意义。而对芒果叶总黄酮的抗氧化活性研究非常少见,为了挖掘芒果叶总黄酮潜在的药用价值,本实验采用 DPPH 法评价不同含量的总黄酮提取物的抗氧化生物活性。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Milli-Q 型纯水处理系统,美国 MILLIPORE 公司; DT5-3 型低速台式自动平衡离心机,北京时代北利离心机有限公司; KQ-250 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; AUW220D 十万分之一天平,日本岛津公司; AB104-N 万分之一天平,瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.2 试药 芒果叶干燥药材由昆明制药厂提供,经南

昌市食品药品检验所吴蓓主管药师鉴定为漆树科植物芒果(*Mangifera indica* L.)的叶。

1, 1-二苯基-2-苦基肼(DPPH),日本东京化成工业株式会社; 2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT),批号: C1223011,上海晶纯生化科技股份有限公司; 芒果苷对照品,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(含量 $\geq 98\%$); 甲醇为色谱纯; 抗坏血酸(VC),天津市福晨化学试剂厂,超纯水,无水乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的提取及分离 称取芒果叶干燥药材,采用乙醇回流提取、多次沉淀等方法分别制得含量为 15.24 %、38.65 %、52.13 %及 78.48 %的总黄酮提取物。

2.2 抗氧化实验方法的建立

2.2.1 样品溶剂的选择 在文献^[12-14]的基础上进行改进。称取 5 份芒果苷对照品适量,分别用水、30 %乙醇、60 %乙醇、无水乙醇、DMSO 进行溶解,将其配成 $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,按照文献方法^[12]进行测定。结果显示,样品溶剂为 30 %乙醇时,

DPPH 清除率最高, 如图 1a 所示。

2.2.2 样品与 DPPH 的质量比 称取芒果苷对照品适量, 将其配成浓度为 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按照样品与 DPPH 1 : 9, 2 : 9, 3 : 9, 4 : 9 和 5 : 9 的质量比进行测定。结果显示, 样品与 DPPH 的质量比为 4 : 9 时, DPPH 清除率最高, 如图 1b 所示。

2.2.3 样品浓度的选择 将芒果苷对照品分别配成 5.0, 8.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,

按照样品与 DPPH 4 : 9 的质量比进行测定。结果显示, 样品浓度为 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, DPPH 清除率最高, 如图 1c 所示。

2.2.4 反应时间的选择 将芒果苷对照品配成 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按照文献所示方法, 分别反应 10, 20, 30, 40, 60 min, 测定其吸光度。结果显示, 反应 30 min, DPPH 清除率最高, 如图 1d 所示。

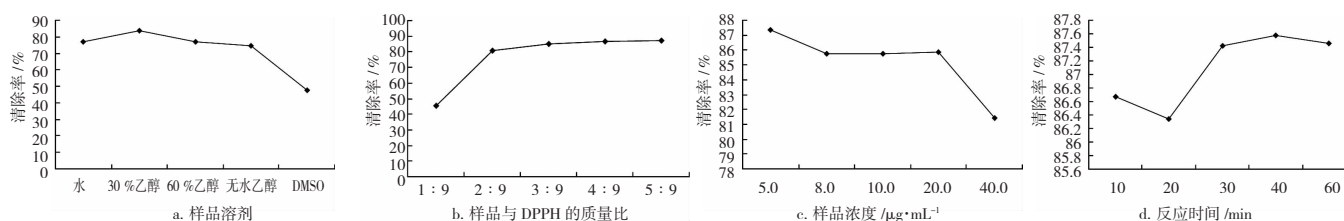


图 1 抗氧化实验方法的建立

Figure 1 Establish the antioxidant experiment method

2.2.5 最佳实验方法 DPPH 溶液的配制: 称取 DPPH 适量, 以无水乙醇溶解, 定容, 现配成 $0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的反应液。对照品测定: 分别吸取 8 mL 溶剂和 3 mL DPPH 溶液置于试管中, 摇匀混合, 室温 25°C , 避光放置, 分别反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定吸光度 (A_0)。空白溶液的测定: 分别吸取 8 mL 的样品溶液和 3 mL 无水乙醇溶液置于试管中, 摇匀混合, 室温 25°C , 避光放置, 反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定吸光度 (A_j)。样品溶液的测定: 分别吸取 8 mL 的样品溶液和 3 mL DPPH 溶液置于试管中, 摇匀混合, 室温 25°C , 避光放置, 反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定吸光度 A_i 。清除率按下式计算:

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

同法以相同浓度的 VC、BHT 做参照试验。所有测定重复操作 3 次, 取平均值。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取芒果苷含量为 15.24 % 的总黄酮提取物适量, 将其配成 $40.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按抗氧化性测定方法测定, 连续测定 6 次, 测定值 RSD 为 0.399 % ($n=6$)。

2.3.2 重复性试验 分别取芒果苷含量为 15.24 % 的总黄酮提取物适量, 将其配成 6 份浓度为 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按抗氧化性测定方法测定, 重复测定, 测定值 RSD 为 1.14 % ($n=6$)。

2.3.3 稳定性试验 取 DPPH 溶液, 避光保存, 分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h 与芒果苷含量为 15.24 % 的总黄酮提取物进行反应, 按抗氧化性测定

方法测定, 测定值 RSD 为 0.26 % ($n=6$)。

2.4 不同样品 DPPH 自由基清除能力的评价 体外抗氧化活性研究中, 以清除 DPPH 自由基最为常见, 本实验以天然抗氧化剂 VC、人工合成抗氧化剂 BHT 及芒果苷对照品为参照, 配制不同含量的总黄酮提取物, 按照 2.2.5 所得的方法测定吸光度, 分析不同含量的总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力, 以 IC_{50} 值评价其抗氧化活性, IC_{50} 值越小, 其抗氧化活性越强。实验重复操作 3 次, 将吸光值代入 DPPH 自由基清除率计算公式, 得到样品对 DPPH 自由基的清除率, 以浓度为横坐标, 清除率为纵坐标, 得图 2。

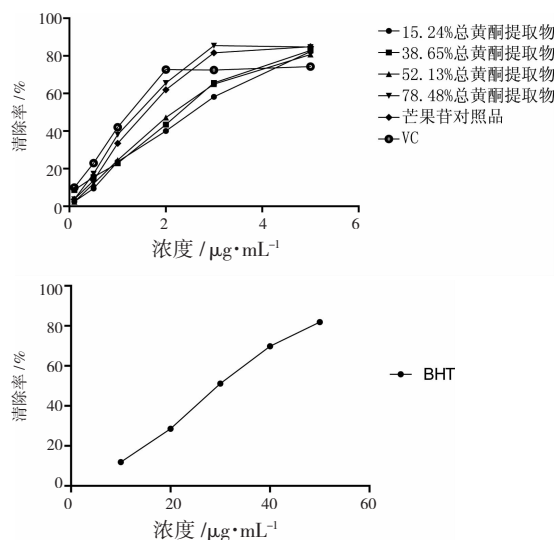


图 2 各样品浓度与 DPPH 自由基的清除率的关系

Figure 2 Relationship between the concentration of the sample and scavenging DPPH radical rate

2.5 数据处理 应用 Excel 软件对数据进行曲线拟合, 运用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 数据用均值 ± 标准差表示, 并采用 Graphpad Prism 5.0 绘制图形。

由图 2 可知, 不同含量的总黄酮提取物均具有清除 DPPH 自由基的能力, 且呈浓度依赖性。由曲线可知, 芒果苷含量为 15.24 %、38.65 %、52.13 %、78.48 %、芒果苷对照品及 VC 在 0 ~ 3 μg·mL⁻¹ 浓度范围内, 清除率随浓度变化明显, 而在 3 ~ 5 μg·mL⁻¹ 浓度范围内, 变化不明显; BHT 在 10 ~ 50 μg·mL⁻¹ 浓度范围内变化明显。

应用 Excel 软件对实验数据进行曲线拟合, 得回归方程, 计算 IC₅₀ 值, 运用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 结果见表 1。由表 1 可知, 各样品的 IC₅₀ 值由小到大为 VC < 芒果苷含量为 78.48 %总黄酮提取物 < 芒果苷对照品 < 芒果苷含量为 52.13 %总黄酮提取物 < 芒果苷含量为 38.65 %总黄酮提取物 < 芒果苷含量为 15.24 %总黄酮提取物 < BHT, IC₅₀ 值越小其清除能力越强, 故不同含量的总黄酮提取物对 DPPH 自由基清除能力优于 BHT 但弱于 VC。其中, 芒果苷含量为 78.48 %的总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力均优于芒果苷对照品。单因素方差分析结果表明: 各样品与 VC、BHT 及芒果苷对照品的 IC₅₀ 比较, 均存在非常显著性差异 ($P < 0.01$); 各样品两两之间比较也存在显著性差异 ($P < 0.01$); 而芒果苷含量为 38.65 %的总黄酮提取物与芒果苷含量为 52.13 %的总黄酮提取物存在显著性差异 ($P < 0.05$)。故在整体趋势上, 抗氧化活性随着样品含量的增加而增加, 且呈现一定的线性关系。

表 1 不同含量的总黄酮提取物及对照药抗氧化活性比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Antioxidant activity of total flavonoids extract of different determination and the positive control medicine

样品	IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹
15.24 %总黄酮提取物	2.512 ± 0.054
38.65 %总黄酮提取物	2.265 ± 0.057
52.13 %总黄酮提取物	2.150 ± 0.084
78.48 %总黄酮提取物	1.413 ± 0.028
芒果苷对照品	1.579 ± 0.007
VC	1.166 ± 0.011
BHT	29.857 ± 0.244

3 讨论

从试验数据上看, 不同含量的总黄酮提取物与 VC 及 BHT 之间存在显著性差异, 且提取物随着芒果苷含量的提高, 抗氧化活性不断提高。本文建立了

芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性方法, 并通过方法学考察表明, 该方法结果可靠, 为芒果叶中总黄酮提取物的抗氧化活性研究提供了可信的检测手段。但由于 DPPH 见光分解, 应避光试验, 且反应时间要适宜。芒果叶中含有芒果苷、异芒果苷和高芒果苷等多种黄酮类成分, 与 DPPH 发生反应时, 共同起作用, 因而芒果苷含量为 78.48 %的总黄酮提取物的抗氧化作用优于芒果苷对照品。由此可以得出, 芒果叶中不同含量的总黄酮提取物与 DPPH 的清除作用呈现一定的线性关系。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1040.

[2] Roginsky VA, Barsukova TK. Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solution[J]. Am. Oil Chem. Soc., 1996, 73(6): 777-786.

[3] Van AS, Koymans LMH, Bast A, et al. Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity[J]. Free Rad Biol Med, 1993, 15: 311-328.

[4] 胡春, 丁霄霖. 黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化作用研究[J]. 食品与发酵工业, 1996, 3: 46-52.

[5] 胡春. 黄酮类化合物的抗氧化性质[J]. 中国油脂, 1996, 21(4): 18-21.

[6] 李八方. 功能食品与保健食品[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 1997: 96.

[7] 方微, 张惠信, 王绿娅, 等. 何首乌总苷抗氧化与实验性小鼠主动脉粥样硬化病变的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1320-1322.

[8] 马丽, 朱邦豪, 陈健文, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 1030-1033.

[9] 陈玲, 贾汝汉, 丁国华, 等. 缬草油对 2 型糖尿病大鼠肾脏氧化应激和蛋白激酶 C 活性的影响[J]. 中国中西医结合肾脏病杂志, 2003, 4(4): 192-195.

[10] 郝伟欣, 贾力, 徐慧媛, 等. 筋脉通对大鼠坐骨神经传导速度及红细胞抗氧化作用的影响[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(5): 343-345.

[11] 王普艳, 梁晓春. 中药干预糖尿病氧化应激机制研究现状[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(12): 100-101.

[12] 唐鹏程, 焦士蓉, 唐远谋, 等. 石榴皮提取物体外抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1): 12.

[13] Olufunmiso OO, Anthony JA. Phenolic content and antioxidant property of thebark extracts of Ziziphus mucronata Willd. subsp. mucronata Willd[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, 11: 130.

[14] Khan RA, Khan MR, Sahreen S. Assessment of flavonoids contents and in vitro antioxidant activity of Launaea procumbens[J]. Chem Centr J, 2012, 6: 43.

(编辑: 宋威)