

光果甘草与乌拉尔甘草清除活性氧能力的比较

谢毛成, 丁家宜, 李 刚

(中国药科大学中药生物技术教研室, 江苏 南京 210038)

摘要: 采用化学发光法测定了光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)与乌拉尔甘草(*G. uralensis* Fisch.)中总黄酮和总皂甙对3种重要活性氧(O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2)的清除能力,发现它们对3种活性氧均有很强的清除能力,其中光果甘草对活性氧的清除能力超过乌拉尔甘草;黄酮类化合物对3种活性氧的清除能力强于皂甙类化合物。因此,若以清除活性氧为应用目标,应尽量使用光果甘草。

关键词: 光果甘草; 乌拉尔甘草; 活性氧; 化学发光法

中图分类号: S567.7⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)01-0029-03

A comparative study on scavenging reactive oxygen species of *Glycyrrhiza glabra* and *G. uralensis*
XIE Mao-cheng, DING Jia-yi, LI Gang (Research Department of Herb Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 29-31

Abstract: The abilities of scavenging reactive oxygen species ROS (O_2^- , $\cdot OH$ and H_2O_2) of flavonoids and total saponins in roots of *Glycyrrhiza glabra* L. and *G. uralensis* Fisch. were analysed by chemluminescence. The results showed that both of them have significant effects on ROS, moreover *G. glabra* has a stronger effect and the flavonoids' effect is stronger than that of total saponins. *G. glabra* should be possible used if the target is to scavenge ROS.

Key words: *Glycyrrhiza glabra* L.; *G. uralensis* Fisch.; reactive oxygen species (ROS); chemluminescence

甘草是目前使用量最大的中药之一,2000年版《中华人民共和国药典》记载甘草是豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza* Linn.)植物乌拉尔甘草(*G. uralensis* Fisch.),胀果甘草(*G. inflata* Batalin)或光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根及根茎。甘草能补脾益气,清热解毒,止咳祛痰,调和诸药^[1]。现代药理研究发现甘草具有抗氧化作用^[2]。

近年来中草药的药效和清除活性氧的作用受到了注意和重视。研究发现,不少有效成分具有清除活性氧的功效。甘草中含有丰富的皂甙和黄酮类化合物,高东英等^[3]对甘草中的甘草酸和甘草次酸进行了清除活性氧的检测,发现它们具有不同程度的抑制 O_2^- 作用。在20世纪90年代郑学钦等通过对芦丁的研究,证实了黄酮具有清除活性氧的作用^[4]。根据所查阅的资料,目前尚未见不同甘草种类的抗氧化和清除活性氧能力的研究报告,因此在2002年3月-6月作者用生物化学发光法检测比较了光果甘草和乌拉尔甘草中总黄酮与总皂甙清除活性氧的能力,试图寻找它们之间差别,以便在应用中有针对性地开发利用甘草药用植物资源。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)由新疆石河子医学院李学禹教授惠赠;乌拉尔甘草(*G. uralensis* Fisch.)购自南京市药材公司,经中国药科大学丁家宜研究员鉴定。

1.2 主要仪器与试剂

BPCL-4微弱发光检测仪(中国科学院生物物理研究所),焦性没食子酸(邻苯三酚)(遵义第二化工厂,AR),3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺 luminol, Sigma公司),邻菲罗啉(上海试剂三厂,AR)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 实验样品制备^[5] 实验所用药材样品粉碎,过20目筛,取500g用95%乙醇室温浸渍48h,每次

收稿日期: 2002-09-20

作者简介: 谢毛成(1976-),男,湖南耒阳人,硕士,主要从事药用植物的生物转化及天然活性成分研究。

1 L, 共2次, 合并提取液, 浓缩成稠膏状, 加热水搅拌溶解后, 依次用石油醚和乙酸乙酯萃取3次, 乙酸乙酯萃取液用5% Na₂CO₃水溶液萃取, 碱水液用浓盐酸调至pH 5~6后, 再用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩乙酸乙酯, 于60℃恒温真空干燥, 即得棕黄色的甘草总黄酮类化合物。

将上述95%乙醇浸渍提取后的残渣再用1 L 10%乙醇室温浸渍48 h, 共2次, 合并提取液, 过滤, 滤液浓缩至原体积的1/8, 加入浓盐酸调至pH 2, 静置, 析出沉淀, 抽滤, 用少量水洗至中性, 于60℃恒温真空干燥, 即得棕黄色的甘草总皂甙。

分别称取20 mg总黄酮类化合物及总皂甙类化合物, 用适量的10%乙醇溶解, 定容至20 mL待用, 其余浓度的样品均以此为母液用10%乙醇稀释而得到。

1.3.2 测定方法^[6] 应用邻苯三酚-鲁米诺(luminol)-碳酸盐缓冲液、邻菲罗啉-Cu²⁺-抗坏血酸-H₂O₂和H₂O₂-鲁米诺-碳酸盐缓冲液等3个体系, 检测比较了乌拉尔甘草与光果甘草中的总黄酮及总皂甙清除O₂[·]和·OH和H₂O₂的能力。

1.3.2.1 邻苯三酚-鲁米诺-碳酸盐缓冲液体系检测O₂[·]清除能力 向测量管中加入10 μL待测样品(空白为10 μL 10%乙醇), 再加入20 μL 1 mmol/L邻苯三酚溶液, 放入反应池中, 原位注入970 μL鲁米诺-碳酸盐缓冲液(pH 10.2), 启动发光(反应总体积为1 mL), 记录发光强度。

1.3.2.2 邻菲罗啉-Cu²⁺-抗坏血酸-H₂O₂体系检测·OH清除能力 向测量管中依次加入50 μL待测样品(空白为50 μL 10%乙醇)、50 μL 1 mmol/L CuSO₄溶液、20 μL 1 mmol/L抗坏血酸PBS溶液、50 μL 1 mmol/L邻菲罗啉PBS缓冲液(pH 6.2)、50 μL 0.15 mol/L H₂O₂, 放入反应池中, 原位注入780 μL 0.05 mol/L硼砂缓冲液(pH 9.24), 启动发光(反应总体积为1 mL), 记录发光强度。

1.3.2.3 H₂O₂-鲁米诺-碳酸盐缓冲液体系检测H₂O₂清除能力 向测量管中依次加入50 μL待测样品(空白为50 μL 10%乙醇)和50 μL 0.15 mol/L H₂O₂, 加入反应池中, 原位注入900 μL鲁米诺-碳酸盐缓冲液(pH 9.5)混合液, 启动发光(反应总体积为1 mL), 记录发光强度。

1.3.2.4 活性氧(ROS)定量方法 生物化学发光

法测定ROS时, 一定浓度范围内发光强度(CL)与ROS呈线性关系, 故可用CL表示ROS的产生量。清除氧自由基的物质可以降低CL, 根据CL下降程度可以判断物质清除ROS的能力。

抑制率 $I = [(空白 CL - 样品 CL) / 空白 CL] \times 100\%$

以发光抑制率为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘出发光曲线。用发光抑制率为50%时的浓度IC₅₀来衡量样品对活性氧的清除能力。IC₅₀值越小, 表明样品清除活性氧能力越强。

2 结果与分析

2.1 光果甘草和乌拉尔甘草清除O₂[·]的作用

光果甘草和乌拉尔甘草清除O₂[·]作用的比较见表1。由表1可见, 在一定浓度范围内, 不论是光果甘草还是乌拉尔甘草对O₂[·]的清除能力随样品浓度的下降而降低。光果甘草总黄酮清除O₂[·]的能力最强, 它的IC₅₀为1.5 mg/mL; 乌拉尔甘草总皂甙清除O₂[·]的能力最弱, 它的IC₅₀为6.5 mg/mL。光果甘草总黄酮对O₂[·]清除能力高于乌拉尔甘草总黄酮; 光果甘草总皂甙对O₂[·]的清除能力同样高于乌拉尔甘草总皂甙; 总黄酮对O₂[·]的清除效果远远强于总皂甙。

表1 光果甘草和乌拉尔甘草清除O₂[·]能力的比较
Table 1 Comparison of the abilities of scavenging O₂[·] of *Glycyrrhiza glabra* L. and *G. uralensis* Fisch.

样品浓度 Concentration (mg/mL)	总黄酮的抑制率(%) The inhibiting rate of flavonoids		总皂甙的抑制率(%) The inhibiting rate of total saponins	
	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>
20.0	99	99	80	78
10.0	90	84	60	59
5.0	71	67	47	45
1.0	46	41	31	28
0.5	33	30	16	16
0.1	23	22	6	6
0(CK)	0	0	0	0
IC ₅₀	1.5	2.1	6.1	6.5

2.2 光果甘草和乌拉尔甘草清除H₂O₂的作用

光果甘草和乌拉尔甘草清除H₂O₂作用的比较见表2。由表2可见, 在一定浓度范围内, 不论是光果甘草还是乌拉尔甘草对于H₂O₂的清除能力随样

品浓度的下降而降低。光果甘草总黄酮清除 H_2O_2 的能力最强, IC_{50} 为 0.015 mg/mL; 乌拉尔甘草总皂甙清除 H_2O_2 的能力最弱, IC_{50} 为 0.20 mg/mL。光果甘草总黄酮对 H_2O_2 的清除能力显然强于乌拉尔甘草总黄酮; 光果甘草总皂甙对 H_2O_2 的清除能力也强于乌拉尔甘草总皂甙; 总黄酮对 H_2O_2 的清除能力要远远强于总皂甙。

表2 光果甘草和乌拉尔甘草清除 H_2O_2 能力的比较¹⁾
Table 2 Comparison of the abilities of scavenging H_2O_2 of *Glycyrrhiza glabra* L. and *G. uralensis* Fisch.¹⁾

样品浓度 Concentration (mg/mL)	总黄酮的抑制率(%) The inhibiting rate of flavonoids		总皂甙的抑制率(%) The inhibiting rate of total saponins	
	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>
10.000	100	100	90	90
5.000	99	99	82	80
1.000	90	86	70	65
0.100	85	84	48	46
0.010	48	40	35	30
0.001	30	25	-	-
0(CK)	0	0	0	0
IC_{50}	0.015	0.022	0.15	0.20

¹⁾ - : 无实验数据 no experimental data.

2.3 光果甘草和乌拉尔甘草清除·OH的作用

光果甘草和乌拉尔甘草清除·OH作用的比较见表3。由表3可知, 不论是光果甘草总黄酮还是乌拉尔甘草总黄酮, 在一定浓度范围内, 它们清除

表3 光果甘草和乌拉尔甘草清除·OH能力的比较¹⁾
Table 3 Comparison of the abilities of scavenging ·OH of *Glycyrrhiza glabra* L. and *G. uralensis* Fisch.¹⁾

样品浓度 Concentration (mg/mL)	总黄酮的抑制率(%) The inhibiting rate of flavonoids		总皂甙的抑制率(%) The inhibiting rate of total saponins	
	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	光果甘草 <i>G. glabra</i>	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>
10.00	100	100	0	0
5.00	100	100	-	-
1.50	90	92	-	-
0.75	76	80	-	-
0.50	66	71	-	-
0.25	48	52	-	-
0.10	20	25	-	-
0(CK)	0	0	0	0
IC_{50}	0.29	0.24	-	-

¹⁾ - : 无实验数据 no experimental data.

·OH的能力随样品浓度的降低而减弱。乌拉尔甘草总黄酮清除·OH的 IC_{50} 值小于光果甘草总黄酮, 这表明乌拉尔甘草总黄酮清除·OH的能力强于光果甘草总黄酮。而总皂甙对于·OH却无明显的清除能力。在实验过程中对总皂甙清除·OH能力的检测还做了20、40和80 mg/mL 3个浓度, 结果发现它们对·OH没有抑制作用。

3 讨论

因为总黄酮与总皂甙对不同活性氧的清除能力不同(它们对 H_2O_2 的清除能力最强), 所以在本实验过程中对不同的活性氧采用了不同浓度的样品。

本文检测比较了光果甘草总黄酮与乌拉尔甘草总黄酮、光果甘草总皂甙与乌拉尔甘草总皂甙清除3种重要活性氧 ROS(O_2^- 、·OH 和 H_2O_2) 的能力, 发现不论是光果甘草总黄酮还是乌拉尔甘草总黄酮对3种 ROS 均有相当强的清除能力, 这从一个方面验证了甘草具有抗氧化作用。但总皂甙对3种 ROS 并非都有清除作用, 它们对 O_2^- 和 H_2O_2 有较强的清除作用, 对·OH却无明显的清除作用。另外光果甘草对 O_2^- 和 H_2O_2 的清除能力均强于乌拉尔甘草, 但对·OH清除能力稍弱于乌拉尔甘草。目前在甘草使用的过程中一般不注意甘草的种类, 根据光果甘草和乌拉尔甘草对3种 ROS清除作用的研究结果, 在今后甘草的开发应用中如以清除氧自由基为应用目标, 则应尽量使用光果甘草。

参考文献:

- [1] 徐国钧. 生药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 235-239.
- [2] 李明. 甘草的研究概况[J]. 甘肃中医学院学报, 2000, 17(3): 62-63.
- [3] 高东英. 甘草中皂甙成分对超氧自由基的研究[A]. 方允中. 自由基生命科学进展第一集[C]. 北京: 原子能出版社, 1993. 149-152.
- [4] 郑学钦. 用化学发光法检测芦丁等物质清除超氧阴离子活性氧的作用[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(3): 140-142.
- [5] 高素莲, 王雪梅. 甘草中皂甙和黄酮化合物的提取分离与测定[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2000, 24(4): 71-74.
- [6] 刘峻, 丁家宜, 周倩耘. 人参毛状根培养过程中对活性氧清除能力的动态变化[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(4): 22-24.