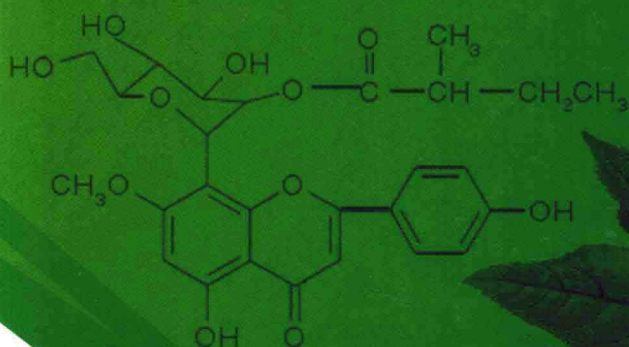


中药抗氧化成分的 现代分离和分析技术

主编 李 丽 刘春明



中药抗氧化成分的 现代分离和分析技术

王 强 王 强 著

中国医药出版社

中药抗氧化成分的 现代分离和分析技术

主 编 李 丽 刘春明
副主编 王 晶

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书精选 30 种中药实例,详细介绍了中药苯乙醇苷类、人参皂苷类、黄酮类、生物碱类、蒽醌类和多糖类成分的现代分离、分析方法,以及抗氧化活性评价方法,着重介绍了中药抗氧化成分研究新思路、新技术和新方法。

本书可供药学研究人员参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

中药抗氧化成分的现代分离和分析技术 / 李丽,刘春明主编. —北京:科学出版社,2011.5

ISBN 978-7-03-030933-4

I. 中… II. ①李… ②刘… III. ①中草药-抗氧化酶(运动生理)-中药化学成分-分离 ②中草药-抗氧化酶(运动生理)-中药化学成分-药物分析 IV. ①R282 ②TQ461

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 077383 号

责任编辑:向小峰 / 责任校对:张凤琴

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011 年 5 月第 一 次印刷 印张:25

印数:1—2 000 字数:594 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(双青))

前 言

研究发现,过量的自由基可以攻击生物膜不饱和脂肪酸和蛋白质等,引发氧化损伤,使机体抵抗力下降,从而导致各种疾病发生,如癌症、心脑血管疾病等。所以,寻找能有效清除人体多余自由基的药物已引起人们的广泛关注。

目前,在食品、化妆品及药品等许多领域广泛使用 BHT、BHA、PG 等合成抗氧化剂,虽具有较好的抗氧化性能,但长期使用具有明显的不良反应,从而使天然抗氧化剂的研究备受关注。传统中药在缓解衰老及衰老性疾病的防治方面有着极为丰富的实践经验。现代药理学研究表明,许多中药提取物或从中分离得到的单体化合物具有提高抗氧化酶活性、降低氧化酶活性或直接清除氧自由基作用。

传统中药提取、分离方法有效成分得率低,杂质含量高,步骤繁琐,不仅浪费时间和样品,而且对于一些微量组分的分离和鉴定也十分困难。这使得一些新兴的现代提取、分离及分析技术,如超临界萃取、高速逆流色谱、液-质联用技术等受到越来越多的关注。这些新技术对于快速分离、分析中药中抗氧化有效成分显得尤为重要。

本书是在查阅大量相关文献、结合编者自己多年研究工作的基础上整理编写而成,介绍了中药各类抗氧化成分的现代提取、分离、分析、结构表征及抗氧化体外评价方法。

限于编者水平,恳请读者对书中的错误、不妥之处惠予批评指正。

编 者

2011 年 1 月于长春师范学院

目 录

第一章 中药抗氧化的研究	1
第一节 自由基和氧化伤害	1
第二节 中药抗氧化成分及其作用机制	2
第三节 中药抗氧化活性测定方法	3
第四节 中药抗氧化成分的提取、分离及分析技术	7
第二章 苯乙醇苷类化合物	16
第一节 概述	16
第二节 车前子	17
第三节 车前草	26
第四节 肉苁蓉	42
第五节 玄参	62
第三章 人参皂苷类化合物	80
第一节 概述	80
第二节 人参	83
第三节 西洋参	107
第四节 三七	127
第五节 人参	144
第四章 黄酮类化合物	160
第一节 概述	160
第二节 山楂	166
第三节 金莲花	183
第四节 银杏叶	204
第五节 生姜	227
第六节 仙人掌	232
第七节 马齿苋	242
第八节 荞麦	250
第五章 生物碱类化合物	266
第一节 概述	266
第二节 钩藤	267
第三节 吴茱萸	272
第四节 萝芙木	288
第五节 荷叶	303
第六节 长春花	313
第六章 蒽醌类化合物	325

第一节 概述.....	325
第二节 决明子.....	325
第三节 虎杖.....	332
第七章 多糖类化合物.....	337
第一节 概述.....	337
第二节 枸杞.....	341
第三节 刺五加.....	354
第四节 葛根.....	359
第五节 灵芝.....	362
第六节 芦荟.....	367
第七节 蛹虫草.....	376
第八节 防风.....	379
第九节 麦冬.....	381

第一章 中药抗氧化的研究

自 1956 年 Harman 在生物学基础上提出衰老自由基学说以来,人们对自由基的产生及其对人体的危害有了越来越深刻的认识。大量研究发现,过量的自由基可以攻击生物膜不饱和脂肪酸和蛋白质等,引发氧化损伤,使机体抵抗力下降,从而导致各种疾病发生,如癌变和老化等病理性变化。所以,寻找能有效清除人体多余自由基的药物已引起人们的广泛关注。目前,在食品、化妆品以及药品等许多领域广泛使用的合成抗氧化剂,如 BHT、BHA、PG 等虽具有较好的抗氧化性能,但长期使用具有明显的不良反应。传统中药在缓解衰老以及衰老性疾病的防治方面有着极为丰富的实践经验。现代药理学研究表明许多中草药具有提高抗氧化酶活性、降低氧化酶活性或直接清除氧自由基作用。

第一节 自由基和氧化伤害

一、自由基及其形成

自由基(reactive oxygen species, ROS)是机体在生化反应中产生的性质活泼的具有极强的氧化功能、可以导致机体衰老的物质。在化学结构上,自由基是指外层轨道上含有一个或一个以上未配对电子的分子、原子、离子或基团。因而表现出顺磁特性,不成对电子具有成对趋向,夺取或失去一个电子构成成对电子,因此自由基具有较强的化学性质,极易和其他物质反应形成新的自由基,呈现明显的连串反应。

自由基的形成有生化、化学、物理等多方面的因素,但主要是来自人体内的生化反应,如各种酶的催化反应或疾病(炎症、缺血、心肌梗死等)都可以产生大量自由基。此外,一些化学物质(如腐败、霉变食物、杀虫剂、农药等)、空气污染、辐射、运动和心理压力等都会激发活性氧和自由基的产生。人体在氧的利用过程中,会因各种内因性和外因性因素而产生各种活性氧和自由基,这些自由基在维持机体正常代谢和疾病防治中起到积极的作用。

人体内的自由基主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、氢自由基($H\cdot$)、有机自由基($R\cdot$)、单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)、臭氧(O_3)及脂类过氧化自由基($LOO\cdot$)和脂类自由基($L\cdot$)等^[1~13]。

二、氧化伤害、疾病与氧化防御系统

为维持身体的正常功能,抵御各种活性氧和自由基对器官和组织的伤害,体内有各种清除活性氧和自由基的抗氧化物质,如抗氧化酶类、蛋白质类和抗氧化维生素等。抗氧化酶类主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽转移酶(GS-T)等,这些酶是机体内部的第一道防线,但会随着年龄的增长而下降;蛋白质类包括铁传递蛋白、肝球蛋白、血红素结合蛋白等;抗氧化维生素有维生素 C、尿酸、 α -

维生素 E、 γ -维生素 E、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素等。

当活性氧和自由基浓度超过生理限度时,多余的自由基成为有害物质,攻击脂质、蛋白质、糖类和脱氧核糖核酸等大分子物质,发生各种氧化反应,引发各种氧化损伤,进而导致细胞结构和功能的变化,使机体抵抗力下降,从而导致各种疾病发生,如癌症、动脉硬化、心脑血管疾病、肝肾损伤、糖尿病、缺血再灌注障碍等多种疾病。氧化导致疾病的主要原因之一是血液中的不饱和脂肪酸因氧化而成为过氧化物质,经小肠吸收、经淋巴和血液而流入各组织,发生有害作用。

为加强防御系统,促进机体的健康,就有必要从体外补充各种具有抗氧化能力的物质,包括抗氧化食品和药品^[2]。

第二节 中药抗氧化成分及其作用机制

研究表明很多中药提取物或从中分离得到的单体化合物可抑制自由基的产生,或对抗自由基对组织及细胞的损伤,或直接清除自由基,还可增强机体本身抗氧化系统的功能,从多个环节阻断自由基的损伤作用。如来源于中药中的黄酮^[14~16]、生物碱^[17~22]、皂苷^[23~30]、醌类^[31~34]、酚类^[35]、多糖等^[36~38]都具有很好的抗氧化活性。

中药抗氧化的作用机制主要表现在如下几个方面^[39~41]。

1. 清除自由基 机体在正常细胞代谢中产生的 $O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 、 1O_2 等自由基可诱发机体内不饱和脂肪酸的一系列脂质氧化连锁反应,造成生物膜结构和功能损伤,并可破坏核酸、蛋白质等生物分子,导致人体的衰老和死亡^[41]。大量研究表明很多中草药具有清除自由基的作用。何首乌、山楂、五加皮、益母草、女贞子、甘草 6 种药物水提液对具有细胞损伤作用的超氧阴离子自由基(SA FR)和羟自由基(H FR)均有清除作用,并能抑制羟自由基(H FR)所诱发的膜脂质过氧化 LPO 反应^[42]。羌活、川芎、柴胡、独活、蛇床子、小茴香、当归、北沙参、白芷、藁本、白花前胡、防风及川党参 13 种伞形科中药 95%乙醇提取液对超氧自由基均有清除作用,其中羌活、川芎、柴胡醇提液抗 $O_2^- \cdot$ 的能力最强。提取液的加入量与抑制 O_2^- 自由基的能力呈现明显的量效关系^[43]。在连苯三酚自氧化体系中,山楂、薏仁和三七的石油醚提取物,茵陈、柴胡、青蒿的乙醇提取物,以及茵陈、柴胡、桑皮、薏仁的水提取物都具有较好的抑制连苯三酚自氧化、清除超氧阴离子的作用。其中山楂的石油醚提取物和柴胡的乙醇提取物抗氧化效果最强^[44]。山楂、白蒺藜及枸杞乙醇和水浸提物在卵黄脂蛋白不饱和脂肪酸(PUFA)过氧体系中,山楂和白蒺藜具有一定的清除 $\cdot OH$ 的能力;3 种中药均具有较强的清除 $O_2^- \cdot$ 的能力^[45]。十大功劳具有清除 $O_2^- \cdot$ 和 $\cdot OH$ 的能力,在一定范围内随药物浓度的升高而增强^[46]。Ni 等采用电子顺核磁共振技术证实枸杞多糖清除羟自由基作用非常显著^[47];Wang 等也发现枸杞多糖对 $Fe^{2+}-H_2O_2$ 产生的羟自由基具有强烈的清除作用,并呈明显的剂量相关性^[48]。

2. 增强抗氧化酶活性 机体内存在着自由基防御酶和酶促系统,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,它们能清除自由基,保护机体免受损伤^[49]。其中 SOD 和 GSH-Px 是机体清除自由基的主要抗氧化酶,红景天、沙棘、刺五加、罗布麻、绞股蓝、蚂蚁等中药可提高机体 SOD 含量和活性,增强机体对自由基损害的防御能力。Li 等^[50]证实枸杞子水提物在体内能显著升高急性缺氧小鼠心、肝、肺等器官

组织中的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性以及总抗氧化能力,枸杞子对小鼠由急性缺氧而造成的自由基损伤有保护作用。

3. 降低脂质过氧化物(LPO)含量 LPO 含量增加,可引起内皮细胞生物膜系统损伤,影响细胞的功能。丙二醛(MDA)是主要的脂质过氧化产物,其含量反映了机体细胞受脂质过氧化损伤的程度^[51]。李自成等^[52]报道,当归注射液能抗脂质过氧化反应,降低 MDA 水平。临床应用丹参治疗后,血中 LPO 含量明显降低^[53]。

4. 能量代谢的影响 线粒体是细胞能量代谢的中心,研究表明衰老时,线粒体会发生肿胀、变性、空洞化、数量减少等一系列退行性变化,所以线粒体被认为在细胞衰老中起到重要的作用^[54,55]。琥珀酸脱氢酶(SDH)和线粒体内膜紧密结合,是受氢体中最重要的酶,不需要辅酶,自身有黄素蛋白作为辅基,在组织反应中常用来反映三羧酸循环的情况,成为线粒体的标志酶。葛迎春等研究表明人参皂苷能增加不同年龄的人胚肺成纤维细胞中 SDH 的含量,维持了细胞能量代谢的稳定性,并且提高了衰老细胞的增殖率^[56]。

5. 增加胆碱系统或脑内神经递质 学习和记忆是大脑高级功能之一,而记忆力的减退是动物老化的早期症状之一。现代研究已证实神经递质及其受体的变化与脑功能的衰老有密切关系,表现为学习与记忆力障碍。乙酰胆碱(ACh)是中枢胆碱能神经系统的重要递质。它由乙酰转移酶(ChAT)合成,乙酰胆酯酶(AChE)分解,通过乙酰胆碱受体(ACh-R)发挥生物学效应。ChAT 和 AChE 共同维持 ACh 平衡。随着生物体年龄增长,胆碱能系统功能逐渐衰退,表现为代谢失调、受体数目和亲和力的变化,导致中枢神经生理异常。增加大鼠海马 ChAT 的活性,可提高大鼠空间学习的能力^[57]。

6. 基因调控学说 细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。细胞周期运转十分有序,沿着 G₁ 期—S 期—G₂ 期—M 期的顺序进行,G₁ 期是启动细胞周期循环的关键。细胞衰老最显著的特征是细胞在很长一段时间内仍维持代谢活性,但因阻滞于 G₁ 期,失去了对有丝分裂原的反应和合成 DNA 的能力,不能进入 S 期。在衰老的成纤维细胞中,其细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)、CDK 抑制因子发生量与活性的变化。cyclin E 是一种周期性表达的细胞周期蛋白,在 G₁ 期与 S 期交界处,与 CDK 一起发挥其蛋白激酶的活性,是细胞从 G₁ 期进入 S 期的关键性周期蛋白。

赵海花等探讨了人参皂苷对老龄大鼠 NBM 神经元 TrkB mRNA 表达的影响^[58],结果显示老龄组大鼠 NBM 神经元 TrkB mRNA 表达显著低于青年组,而给药组较老龄组大鼠表达增多。

7. 保护 DNA 自由基可造成 DNA 单、双链断裂以及碱基损伤,使细胞发生突变。DNA 分子的损伤又使主要的酶表达缺乏,引起细胞死亡^[51]。吕明庄等^[59]报道,芦荟可以有效减轻臭氧衰老模型中小鼠肝、脾细胞 DNA 的损伤程度。

第三节 中药抗氧化活性测定方法

生物体在进行氧化还原反应的过程中伴有活性氧的产生,不同的中药对不同的氧自由基清除效果各异,机制也各不相同,所以应根据不同的中药以及氧自由基建立其相应的检测方法来评价中药的抗氧自由基活性。

1. 铁离子还原法 铁离子还原法(ferric reducing antioxidant power, FRAP)是一种测定物质总的抗氧化能力的方法,具有快速、易于操作、重复性好等优点。该方法已广泛用于抗氧化活性物质的分析测定。其原理是基于氧化还原反应的比色法,在低 pH 的溶液中, Fe^{3+} -TPTZ(Fe^{3+} -三吡啶三嗪)被抗氧化剂还原成 Fe^{2+} -TPTZ,使反应液变成深蓝色,在 593nm 处有最大光吸收,这样通过测量样品吸光度的变化来测量其抗氧化能力^[60]。

实验中将 Acetate 缓冲液 (300mmol/L, pH 3.6), 10mmol/L TPTZ (溶解在 40ml HCl)和 20mmol/L FeCl_3 以 10 : 1 : 1 (V : V : V)比例混合,配制成 FRAP 试剂。需要注意的是 FRAP 试剂一定要新鲜配制。取 10 μl 的标准品或样品溶液,迅速加入 300 μl FRAP 试剂,混匀。测试温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,仪器波长为 593nm,测量时间为 4min。样品 FRAP 测量值通过 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 L-ascorbic acid 来计算。计算公式如下^[61]:

$$\text{FRAP 值}(\mu\text{mol/L}) = (0 \sim 4\text{min} \Delta A_{593\text{nm}}^{\text{样品}}) / (0 \sim 4\text{min} \Delta A_{593\text{nm}}^{\text{标准品}}) \times 500 \times 2(\mu\text{mol/L})$$

2. β -胡萝卜素-亚油酸法(β -carotene bleaching test, β -CLAMS) β -胡萝卜素是一种多烯色素,容易被氧化而褪去黄色,在反应介质溶液中,由亚油酸(linoleic acid)氧化产生的过氧化物能使 β -胡萝卜素褪色,随着时间的延长吸光度越来越小。加入抗氧化剂后, β -胡萝卜素降解速率减少,其降解的程度与体系中抗氧化活性物质的强弱有关,抗氧化能力越强,降解越慢,这样在波长 491nm 处通过测量所有样品的吸收度,根据吸光度曲线便可分析抗氧化剂的抗氧化能力^[62]。

将 25 μl 亚油酸和 200mg 吐温 40 溶解在 2ml 氯仿溶液中,加入 0.5mg β -胡萝卜素,利用旋转蒸发仪在减压条件下挥干氯仿($<40^{\circ}\text{C}$),然后加入 100ml 氧化水(HPLC grade),制得测试混合液(新鲜配制)。35 μl 水(空白液),标准品 (2,6-二叔丁基对甲酚, BHT)或样品溶液中迅速加入 250 μl 测试混合液。测试温度为 45 $^{\circ}\text{C}$,波长为 491nm,每 15min 测一次,一共运行 180min^[63]。

3. PCL 方法 实验采用 Photochem[®] (Berlin, Germany)超快速抗氧化剂和自由基全自动分析仪。该设备可以测定水溶性或脂溶性物质的抗氧化能力,并用相当于维生素 C(水溶性物质)或 Trolox(脂溶性物质)当量值表示测定结果。该法具有很高的灵敏度,能测出 10^{-9}mol/L 级浓度的非酶抗氧化物,测定时间短。其原理是由光化学法生成自由基,并利用化学发光法检测自由基。在实验中使用具有光化学激发作用的光敏剂(photosensitizer,发光氨)激发反应分子,使之在紫外灯的作用下以比正常条件下快 1000 倍的速度发生氧化反应,迅速产生自由基。发光氨(luminol)是一种光致化学发光物质,通过测量反应所生成的光强度来测量自由基的瞬间含量(光强与自由基含量成正比)^[63]。

实验中需要稀释样品溶液,以使滞后时间距(lag-phase)落在标准曲线的线性范围内。Photochem[®]产生标准曲线和测试样品的抗氧化活性都是自动进行的,样品的抗氧化活性是用相当于 L-ascorbic acid 或 Trolox 的纳摩尔数来计算。

4. DPPH $\cdot$ 分析方法 二苯基苦味肼基自由基[DPPH $\cdot$]是一种稳定的以氮为中心的自由基,在 515nm 波长处有最大吸收。[DPPH $\cdot$]甲醇溶液呈紫色,其浓度与吸光度呈线性关系。在[DPPH $\cdot$]甲醇溶液中加入抗氧化剂后,抗氧化剂可以与[DPPH $\cdot$]自由基结合或发生替代,使[DPPH $\cdot$]自由基数量减少,溶液颜色变浅,表现为其在 515nm 波长处的吸光度不断减小,直至达到稳定。

实验中配置一定浓度的[DPPH $\cdot$]溶液,以浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标制作[DPPH $\cdot$]

标准曲线方程。之后配制不同浓度的样品和标准品溶液,分别取 0.1ml 样品或标准品溶液,加入 3.9ml 质量浓度为 2.5mg/100ml [DPPH·] 标准液(现用现配)。乙醇溶液为空白对照,将混合溶液摇匀,用比色皿在 515nm 波长处测定其不同时间的吸光度值,根据标准曲线方程换算成 [DPPH·] 的质量浓度,计算出 [DPPH·] 残留率。根据 [DPPH·] 残留率和相应的样品添加量,绘制样品清除 [DPPH·] 自由基的曲线。根据 [DPPH·] 的质量浓度与吸光度的关系曲线,将添加自由基清除剂后测得的吸光度换算为 [DPPH·] 的质量浓度,计算出添加自由基清除剂后的 [DPPH·] 残留率,计算公式如下:

$$[\text{DPPH}\cdot]_{\text{REM}} = [\text{DPPH}\cdot]_T / [\text{DPPH}\cdot]_{T=0} \times 100\%$$

其中 $[\text{DPPH}\cdot]_T$ 为自由基清除过程中某一时刻 DPPH· 的质量浓度, $[\text{DPPH}\cdot]_{T=0}$ 为 DPPH· 的原始质量浓度。

根据抗氧化剂添加量与 [DPPH·] 残留率,制作二者的关系曲线,通过线性回归分析可以得到回归方程,根据回归方程式可以计算出 [DPPH·] 残留率为 50% 时的抗氧化剂量即半抑制量 (EC_{50}) 和自由基清除能力 AE (antiradical efficiency), $AE = 1/EC_{50}$ [64]。

5. 清除羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的作用 按 Fenton 反应原理, Fenton 反应体系邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法进行测定, 芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$, 向体系中加入的是 $\cdot\text{OH}$ 产生的抑制剂, 则 $\cdot\text{OH}$ 减少, 呈色反应的吸光度也相应地减少。

取 1.5ml 0.1mol/L 邻二氮菲分别放入试管中, 加入 4.5ml 0.1mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液, 混匀后加入 1ml 0.001mol/L FeSO_4 溶液, 立即混匀, 分别加入 1ml 一定浓度的试样, 然后加入 1ml 0.1% H_2O_2 启动反应, 于 37℃ 保温 60min, 510nm 处测定吸光度值。同时设置损伤管(加入 1ml 蒸馏水代替样品液, 1ml 0.1% H_2O_2 启动反应)和未损伤管(加入 2ml 蒸馏水代替样品液和 H_2O_2)以相同浓度的维生素 C 作对比实验, 其中损伤管和未损伤管以磷酸盐缓冲溶液调零, 加药管以同浓度不加 H_2O_2 的加药管调零。按下式计算羟基自由基的清除率:

$$\text{OH}\cdot \text{的清除率}(\%) = (A_{\text{加药}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\% [65]$$

6. 超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^-\cdot$) 清除能力测定 利用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 当加入电子传递物质及 Gress 显色剂后, 溶液呈现紫红色, 在 550nm 下测定其吸光度。以 0.15mg/ml 维生素 C 为样品对照, 以蒸馏水做空白对照, 具体操作过程按照试剂盒说明进行。按照下面公式计算其清除率。清除率(%) = $(A_b - A_s) / A_b \times 100$, 式中: A_b 为空白对照管的吸光度值, A_s 为样品测定管的吸光度值 [66]。

7. 邻苯三酚法 按邻苯三酚自氧化反应方法, 取 6 支比色管分别移取 50mmol/L (pH8.2) 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.5ml, 在 2~6 号比色管中分别加 0.5ml 浓度为 0.07、0.14、0.28、0.42、0.56mg/ml 的样品溶液, 置于 25℃ 水浴中预热 20min, 再向这 5 支试管中加入 25℃ 预热的 3mmol/L 邻苯三酚 0.3ml 立即混匀后, 在 30s 内用蒸馏水补至 25.0ml, 最后在 25℃ 水浴中准确反应 4min, 立即滴加 0.5ml 浓度为 8mol/L HCl 终止反应。在 325nm 处测定吸光度。以等体积 pH 2 的 Tris-HCl 缓冲液作为空白。吸光度越低, 清除超氧阴离子自由基效果越好。超氧阴离子的清除率 = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$ 式中, A_0 为空白对照组吸光值; A_1 为某浓度黄酮溶液的吸光值。

邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液体系产生的超氧阴离子 ($\text{O}_2^-\cdot$) 的清除能力, 采用化学发光法, 在发光杯中加入 10 μl 样品溶液(以 10 μl DMSO 作空白对照)和 20 μl 邻苯三酚溶液,

加入鲁米诺-碳酸缓冲液混合溶液启动反应,记录发光强度(CL),计算各供试品对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率,自由基清除率(%) = $(CL_{\text{空白}} - CL_{\text{样品}}) / CL_{\text{空白}} \times 100\%$,以高浓度逐渐稀释的方法检测不同浓度样品对自由基的清除率,采用 BPCL Appl7.2 数据处理工作站计算各化合物 IC_{50} ,以 IC_{50} 作为活性评价指标^[67,68]。

8. 脂质过氧化值测定法 分别精密称取样品 5、15、25、35mg,用 5ml 乙醇溶解,加入到装有 15g 融化猪板油的碘量瓶中,不时搅拌成匀相,使抗氧化剂充分扩散进油样中。置于 70℃ 恒温箱中强化保存,每隔 12h 搅拌 1 次,并交换在培养箱中的位置,确保环境条件相同。5d 后测定其过氧化值(POV),以不加抗氧化剂的油样为空白对照(CK)。采用国标方法(GB/T5538-1995)测定 POV 值,POV 的计算公式如下: $POV = C \times (V_1 - V_2) \times 0.1269 \times 100$ 。式中,POV 为样品过氧化值(mmol/100g);C 为硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度(mol/L); V_1 为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积(ml); V_2 为空白试验消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积(ml); m 为样品质量(g);0.1269 为与 1ml $Na_2S_2O_3$ 标准滴定溶液相当的碘的质量(g)。取 2g 混匀的样品,置于碘量瓶。加入 10ml 三氯甲烷及 15ml 冰乙酸和 1ml 碘化钾饱和溶液迅速盖好瓶塞,混匀 1min,避光静置 5min。然后加入 50ml 蒸馏水,充分混合均匀,立即用 2mmol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至浅黄色时,加入 1ml 淀粉指示剂,继续滴定至蓝色消失为止,记下体积 V_1 ,计算 POV 值^[69]。

9. 清除 ABTS⁺ 自由基法 用 ABTS 评价一些化合物的抗氧化能力方法,根据这些待测化合物清除预先生成的 ABTS⁺ 自由基的能力来评价其抗氧化活性。同时测定多个样品,可以使用酶标仪来评价物质的抗氧化活性^[70]。将 5ml 的 7mmol/L ABTS 和 88 μ l 的 140mmol/L 高硫酸钾混合,在室温、避光的条件下静置过夜,形成 ABTS⁺ 自由基储备液。该储备液在室温、避光的条件下稳定。使用前用无水乙醇稀释成工作液,要求当在 200 μ l 工作液中加入 50 μ l 无水乙醇时其在 30℃、734nm 波长下的吸光度为 0.51 ± 0.02 。在 96 孔酶标板的每孔中加入 50 μ l 的标准或样品,再加入 200 μ l 的 ABTS⁺ 工作液,以 250 μ l 的无水乙醇为空白,混合 10s,30℃ 静置 6min,在 734nm 波长下读取吸光度。以 Trolox 作为参照物,使用的标准系列为 20、40、60、80、100 和 120 μ mol/L。将待测物质清除自由基的能力与 Trolox 清除自由基的能力相对比,确定其相对抗氧化活性,单位为 TEAC(trolox equivalent antioxidant capacity, Trolox 抗氧化当量),即 1 μ mol/L 待测物质的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的微摩尔数。在实验中,标准曲线和 TEAC 值可由随机软件直接给出,也可以通过计算得出。为反映提取抗氧化活性物质的效率,其抗氧化活性表示为从 1g 样品中提取出的抗氧化物质的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的微摩尔数。

10. 清除 H₂O₂ 法 取 4.5ml 0.1mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液,加入 2ml 0.05% H₂O₂ 后加入 1ml 一定浓度的试样,立即混匀,在 340nm 处测定吸光度值 A_1 。实验中以不加试样的 H₂O₂ 吸光度为 A_0 以不加 H₂O₂ 的试样溶液的吸光度为 A_2 ,按如下公式计算其平均值: H_2O_2 的清除率(%) = $[A_0 - (A_1/A_2)] A_0 \times 100$ ^[71]。

11. 总多酚含量的测定(Folin-Ciocalteu 比色法) 样品总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 方法,结果表示为每克样品中含有相当没食子酸的毫克数。所用试剂称为 Folin-Ciocalteu's phenol reagent,商品一般为 2mol/L,用前一般稀释 2 或 4 倍。其基本原理是在碱性溶液中,多酚类化合物可以将钨钼酸还原(W^{6+} 变为 W^{5+})生成蓝色化合物,颜色的深浅

与多酚含量呈正相关,蓝色化合物在 765nm 处有最大吸收。

精密称取没食子酸,用水溶解并定容,配成不同浓度的没食子酸标准溶液,以浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标制作没食子酸标准曲线方程。吸取 0.2ml 一定浓度(使吸光值落在标准曲线上)的样品溶液,加入 1ml 0.5 N 的 Folin-Ciocalteu 试剂,再加入 0.8ml,7.5% 的碳酸钠溶液充分混合,室温下放置 0.5h,然后在 765nm 下测吸光值^[72]。

第四节 中药抗氧化成分的提取、分离及分析技术

中药化学成分复杂,根据目标化合物的性质,提取、分离及分析方法也多种多样。传统中药提取、分离方法有效成分得率低,杂质含量高,步骤繁琐,不仅浪费时间和样品,而且对于一些微量组分的分离和鉴定也十分困难。这使得一些新兴的现代提取分离以及分析技术受到越来越多的关注。这些新技术的出现,也给传统的中药研究注入了新的生机和活力。

一、提取方法

(一)传统提取方法

中药有效成分的传统提取方法主要有溶剂提取法、水蒸气蒸馏法、升华法和压榨法等。

1. 溶剂提取法 溶剂提取法是根据中药中各种成分在不同溶剂中溶解度不同、相似者相溶的原理,将药材中有效成分溶解出来的方法。溶剂分为亲水性及亲脂性有机溶剂。溶剂提取法常用浸渍法、渗漉法、煎煮法和回流法等。

2. 水蒸气蒸馏法 适用于难溶或不溶于水,而且与水不发生反应,能随水蒸气蒸馏而不被破坏的中药有效成分的提取。

3. 升华法 适用于具有升华性质的有效成分的提取。

4. 压榨法 一些中药中的有效成分含量较高,存在于植物的液汁中,可将新鲜原料直接压榨,再进行提取。

(二)现代提取新技术

1. 超临界流体萃取技术 超临界流体萃取技术(supercritical fluid extraction, SFE)的原理是利用接近临界状态下的流体作为萃取溶剂,而萃取溶剂在临界点兼有液体和气体的双重性质,可以通过控制温度和压力对不同极性的样品进行选择提取的一种新型提取技术。这种方法适合萃取亲脂性成分,对于极性较大成分的萃取还可以加入少量极性溶剂,如甲醇或乙醇作为夹带剂,以提高提取率。

可作为超临界流体的物质有二氧化碳、水、乙烷、二氧化氮等。其中二氧化碳因性质稳定,无色无味无毒,具有较低的临界温度 31.3℃,临界压力位 7.2 MPa,适用于热敏性成分提取,而备受青睐。与传统的中药提取方法相比,超临界流体萃取具有节省溶剂,无溶剂残留问题,有效成分提取效率高,适用于热敏性成分的提取,还可以实现选择性提取不同极性成分的样品。目前超临界 CO₂ 萃取技术已广泛用于中药中挥发油、生物碱、黄酮类、有机酚酸、萜类以及天然色素等成分的提取^[73~76]。

2. 超声波提取技术 超声提取技术是利用超声波辐射压强产生的骚动效应、空化效应和热效应引起机械搅拌,加速溶质扩散溶解的一种新型的提取方法。该方法能够加速所提取成分的扩散与溶剂充分混合,从而提高中药有效成分的提取率,并且可以瞬间稳定升高温度,对热不稳定成分影响较小,在中药提取中也有着极为广泛的应用^[77,78]。

3. 微波辅助提取技术 微波技术已广泛用于中药提取、干燥和灭菌等方面。其原理是通过微波的热效应,来加速物质的扩散溶解,进而提高有效成分提取的得率和含量。微波萃取与传统萃取法相比具有节省溶剂和能源、对萃取物具有高选择性、收率高、后处理方便、无污染等优点。这种技术非常适用于黄酮类成分的提取,如张梦军等利用微波技术提取了甘草中黄酮化合物^[79~81]。

4. 超高压提取法 超高压提取是一种较新颖的提取技术,提取过程中,较高的压力加快了浸润和溶质扩散速度,使提取物内部毛细孔内快速充满溶剂,在较短时间内提取物内部的溶液浓度与外面周围介质浓度即可达到平衡。细胞处于高渗透压的介质(提取溶剂)中,在泄压过程,介质压力急速降低,细胞内外渗透压差迅速增大,从而导致细胞破碎;同时在高压作用下,细胞骨架、细胞膜等结构以及化学键发生变化,使细胞内有效成分与提取溶剂充分接触,缩短了提取时间。与传统提取方法相比,超高压提取时间短、得率高、能耗较低,杂质含量少,超高压不会影响生物小分子的结构,但能够影响蛋白质、核酸、脂质、淀粉等生物大分子的立体结构,使蛋白质变性、淀粉糊化、酶失活、细菌等微生物灭活^[82],在常温下使用超高压可以快速、高效地提取人参皂苷,避免了皂苷因受热发生的结构变化。

此外,快速溶剂萃取以及一些加入酶的辅助提取等技术也越来越多地应用于中药的有效成分提取过程之中。

二、分离纯化方法

中药经过提取后,需进一步根据各种成分的性质来选择适宜的分离方法。

(一)传统分离方法

1. 溶剂分离法 采用从小到大极性不同的溶剂依次提取,或根据某些成分能在酸或碱中溶解,加碱或酸后又析出的性质达到分离。

2. 萃取法 利用提取样品中各成分在两种互不相混溶的两相溶剂中的分配系数的不同而达到分离。

3. 沉淀法 是在中药提取液中加入某些试剂使其析出某种成分或杂质,产生沉淀,以获得有效成分或除去杂质的方法,主要包括醇沉法、酸碱沉淀法、铅盐沉淀法等。

4. 盐析法 是在中药提取液中加入某些无机盐使达到一定浓度或饱和状态,其提取液中某种成分溶解度降低而沉淀析出的方法。

5. 透析法 利用小分子物质在溶液中可通过半透膜,大分子物质不能通过半透膜的性质达到分离纯化的一种方法。

6. 结晶法 利用中药中有效成分溶解度不同,用结晶法达到分离纯化的目的。实验中应先尽可能除去杂质,之后采用蒸发溶剂法或冷却热的饱和溶液法达到目标成分结晶的目的。

7. 柱层析法 其原理是利用同一吸附剂对混合物中不同成分吸附能力的差异,而使各成分达到分离目的的色谱法。整个过程中贯穿吸附与解吸附(在一定的溶剂系统中,溶剂与混合物里各组分争夺吸附剂活性表面)。

吸附剂包括极性吸附剂和非极性吸附剂两种。极性吸附剂对极性物质具有较强的亲和能力,故同为溶质,极性强者优先被吸附;溶剂极性越弱,则吸附剂对溶质将表现出较强的吸附能力,反之,吸附剂对溶质将表现出较弱的吸附能力;二氧化硅和三氧化二铝都属于极性吸附剂。非极性吸附剂,如活性炭极性小对非极性化合物的吸附力强,洗脱时洗脱力随洗脱剂的极性减弱而增强。

(1)硅胶、氧化铝柱层析:采用硅胶,氧化铝吸附色谱进行分离时,吸附剂的用量一般为样品量的 30~60 倍;应选择极性小的溶剂装柱和溶解样品,以利样品在吸附柱上形成较窄的原始谱带,若样品在所装柱溶剂中不易溶解,可将样品用少量极性稍大的溶剂溶解后,用少量吸附剂拌匀,并在 60℃ 下加热挥尽溶剂,研粉后铺在吸附剂上;洗脱用溶剂的极性应逐步加大,但跳跃不能太大;为避免化学吸附,酸性物质宜用硅胶,碱性物质宜用氧化铝;溶剂系统可通过薄层层析来筛选。

(2)聚酰胺柱层析:聚酰胺柱层析原理属于氢键吸附,聚酰胺分子中的酰氨羰基与酚类或黄酮类化合物的酚羟基,或酰胺键上的游离氨基与醌类上的羰基形成氢键缔合而产生吸附。影响吸附强弱的因素主要是化合物本身对聚酰胺的亲合力,如形成氢键基团数目越多,易形成分子内氢键者,分子中芳香化程度高等,则吸附性增强。各种溶剂在聚酰胺上的洗脱能力由弱到强为水、甲醇、丙酮、氢氧化钠水溶液、甲酰胺、二甲基甲酰胺、尿素水溶液。

(3)大孔吸附树脂柱层析:大孔吸附树脂柱层析的原理是吸附性和分子筛原理相结合的分,它的吸附性是由于范德华力或产生氢键的结果,分子筛是由于其本身多孔性的结构性质决定。其中比表面积、表面电性能否与化合物形成氢键等是重要的影响因素,一般非极性化合物在水中易被非极性树脂吸附,极性化合物在水中易被极性树脂吸附;此外,化合物的性质也是影响吸附的重要因素,如化合物的分子质量、极性、能否形成氢键等都影响其与大孔树脂的吸附。分子质量小、极性小的化合物与非极性树脂的吸附力强,能与大孔树脂形成氢键的化合物易被吸附。

此法采用特殊的吸附剂大孔树脂,利用其吸附性和分子筛相结合的原理,从中药中有选择地吸附其中的有效组分,除去无效组分,这是一种提取精制的新工艺,其吸附作用主要是通过表面吸附、表面电性或形成氢键等来实现。近年来,树脂法已广泛用于纯化皂苷,黄酮类等成分并大规模生产^[83]。

(4)葡聚糖凝胶柱层析法:葡聚糖凝胶是一种高度交联葡萄糖,在它上面可根据分子的大小使化合物分离,如 Sephadex LH-20 是通过葡萄糖与甘油聚合的一种葡聚糖。

(二)分离纯化新技术

1. 膜分离技术 膜分离技术(membrane separation technique, MST)是一种高效分离技术,包括超滤、微滤和反渗透等。原理近似于机械筛,以压力位推动力,实现溶质与溶剂的分离,当溶液进入滤器时,在滤器内的滤膜表面发生分离,溶剂分子和小分子质量的溶质透过具有不对称微孔结构的滤膜,大分子溶质和微粒被滤膜截留,从而达到分离提纯样品的目的。

膜分离技术的优点是可以在原生物体系环境下实现物质分离,有效膜面积大,滤速快,无二次污染,富集产物或滤除杂质效率高,无须加热浓缩,适用于热敏性成分的分离。

2. 泡沫分离法 泡沫分离法是一种利用不同的物质在气泡表面上的吸附性质的差异进行分离的技术。20 世纪初,泡沫浮选就已经广泛地应用于矿冶工业等领域^[84],近几十年来,针对于金属离子蛋白质酶和微生物细胞等的分离,发展了新型的泡沫吸附分离技术^[85]。泡沫分离法的必要前提是溶液中须含有表面活性成分,而中草药中的皂苷、蛋白质、树胶以及其他高分子化合物具有表面活性剂,这种特性能够在强烈搅拌或沸腾时产生稳定的泡沫^[86],同时泡沫反应也是皂苷类有效成分定性分析的常用方法之一^[87]。应用泡沫分离技术分离中药有效成分的报道比较少,修志龙等选用人参皂苷作为分离对象考察泡沫分离技术应用的可行性^[88]。

3. 高速逆流色谱分离技术 高速逆流色谱分离技术(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)是由美国国立卫生院 Ito 博士研制开发的新型色谱技术,可以在短时间内实现目标化合物的高效分离和制备,并且可以达到几千个理论塔板数。HSCCC 是一种新型的液液色谱技术,是基于一种特殊的流体动力学(单向流体动力学平衡)现象,使互不相溶的两个溶剂相在高速旋转的螺旋管中单向分布。其中一相作为固定相,另一相作为流动相,利用样品在两相溶剂中分配系数的不同实现目标化合物的分离。目前,较大的制备型 HSCCC 色谱仪,柱容积可达 530ml,一次进样可达 20g 粗品;而较小的分析型的 HSCCC 色谱仪柱容积仅为 8ml,进样量为几十微克,最大转速可达 4000r/min,分析能力可与 HPLC 相媲美^[89~91]。

在 20 世纪 80 年代后期,在世界范围内的“回归大自然”浪潮的席卷下,高速逆流色谱技术以其独特的性能和多样性的操作条件而被广泛用于中药中生物碱、多酚类、黄酮类、萜类、木脂素、香豆素和皂苷类等多种成分的分析 and 制备性分离^[92~107]。

(三) 分析技术

1. 紫外-可见分光光度法 紫外-可见分光光度法是药物分析最常用的方法之一,主要用于药物的鉴别和含量测定。其原理是通过被测物质在特定波长处或一定波长范围内的光吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法。可以通过测定最大吸收波长和最小吸收波长、吸收系数或测定最大吸收波长及不同波长的吸收值比值来鉴定化合物。

2. 红外分光光度法 红外光谱法是一种专属性很强、应用较广(固体、液体、气体样品)的鉴别方法。分子的振动和转动能级可由红外区的电磁辐射激发,产生红外吸收光谱。红外(infrared, IR)光谱吸收带的位置可用波长 λ (以微米为单位)或用波长的倒数波速(以 cm^{-1} 为单位)表示。

3. 薄层色谱法 薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)技术,也称薄层层析。将作为固定相的吸附剂均匀涂布到平面载板上,形成一薄层,干燥后,将样品点样于薄层上,借助于展开剂的移动,根据各组分的吸附性能、分配系数的差异达到分离。可用于定性或定量分析。常用吸附剂有硅胶、氧化铝、聚酰胺等。常用的显色方法有蒸气显色、喷雾显色等。薄层色谱具有以下优点:固定相一次使用,不会被污染,样品预处理简单;对被分离物质性质没有限制;具有多路柱效应,可同时分析大量样品;完成一次分离只需要少量展开剂;固定相和流动相选择范围;可定性,定量分析样品;可根据需要制备单一化合物。