

沉香茶提取物的体外抗氧化和体内降血脂作用评价

陈地灵¹, 吴祎², 林励², 帅欧², 汪科元³, 张鹤鸣¹, 刘颂豪¹

(1. 华南师范大学药物研究院, 广东广州 510631) (2. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006)

(3. 广东君元药业有限公司, 广东广州 510623)

摘要: 本文以广东大面积种植的白木香叶为原料制成的沉香茶为研究对象, 采用体外抗氧化法测定其水浸液的抗氧化能力, 体内高血脂小鼠模型评价其降血脂作用。实验结果显示沉香茶水浸液具有较强的体外抗氧化能力和体内降血脂能力。其水浸液具有清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)、DPPH 自由基(DPPH \cdot)以及络合亚铁离子(Fe^{2+})和还原磷酸的能力, IC_{50} 分别为 700.45 ± 38.04 、 58.03 ± 4.4 、 16.24 ± 2.4 、 70.69 ± 2.8 、 215.46 ± 14.27 mg/mL; 能明显降低高血脂症小鼠血清中 TC、TG 水平和升高 HDL-C 水平, 与模型组比较, 差异具有显著性 ($P<0.05$)。

关键词: 沉香茶; 自由基; 抗氧化活性; 降血脂; 保健功能

文章编号: 1673-9078(2013)6-1198-1201

Evaluation of the *in vitro* Antioxidant Activity and *in vivo* Blood Lipid-lowering Capability of *Chenxiang* Tea Extracts

CHEN Di-ling¹, WU Yi², LIN Li², SHUAI Ou², WANG Ke-yuan³, ZHANG He-ming¹, LIU Song-hao¹

(1. Southern Institute of Pharmaceutical Research, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

(2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

(3. Guangdong Jun Yuan Pharmaceutical Co., LTD, Guangzhou 510623, China)

Abstract: This experiment studied the *chengxiang* tea extracts from the raw materials of leaves of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Its radical scavenging activity, reducing power and metal chelating activity were determined to assays the *in vitro* antioxidant activity, and hyperlipidemia model mice were used to evaluate the blood lipid-reducing capacity of the water-extracts from *Chenxiang* tea. The results showed that the water extracts from *Chenxiang* tea have strong free radical scavenging activity, effective reducing power and chelating ability, with their IC_{50} values being of 700.45 ± 38.04 , 58.03 ± 4.4 , 16.24 ± 2.4 , 70.69 ± 2.8 and 215.46 ± 14.27 mg/mL, respectively. The tea extracts can reduce the levels of TG and TC and increase the level of HDL-C in hyperlipidemia model mice serum. Compared with the model group, the differences were significant ($P<0.05$).

Key words: *Chenxiang tea*; free radicals; antioxidant activity; reduce blood lipid; health function

沉香为瑞香科植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg] 含有树脂的木材, 为著名的行气止痛中药^[1]。目前广东省广为种植, 其面积已近 20 万亩。然而, 由于白木香需十年左右才能通过刺激逐步形成沉香, 产生经济效益的时间较长。为此, 人们开始对白木香其他部位进行综合利用研究。已发现白木香叶中含有多糖、氨基酸、黄酮及其苷类、酚类等, 这些化

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家发改委高新技术产业化项目(国办发 2011-56); 惠州市科技计划项目(2010B020010005)

作者简介: 陈地灵, 男, 博士后, 研究方向: 中药现代化研究; 合作导师, 刘颂豪, 中国科学院院士

通讯作者: 林励, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药资源开发与利用与新药研究

学成分具有多种生理活性^[2-8]。目前已有白木香叶制成的沉香茶问世^[9-11], 为更好地评价此类产品的功能性, 作者对沉香茶提取物的抗氧化活性和降血脂活性进行了研究, 以期对沉香叶的综合开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Sartorius BP211D 电子分析天平 ($d=0.00001$ g), 德国; XS 225A 型分析天平 ($d=0.0001$ g), 瑞士; DFY-200 型粉碎机, 浙江温岭市大德中药机械有限公司; HH-4 型数显恒温水浴锅 (上海浦东物理光学仪器厂); KQ-500 型超声波清洗器 (频率 40 KHz; 功率 500 W), 江苏省昆山市超声仪器有限公司; TDL-2B

离心机, Anke 公司; ELX808 多功能酶标仪 (Bio-tek), 美国; Agilent8453E 型紫外可见分光光度计, Agilent 公司, 美国。

1.2 试剂

三羟甲基氨基甲烷 (Trihydroxymethyl aminomethane, Tris, new probe 批号 PB110 711); 邻苯三酚 (Aladdin chemistry co. Ltd, 批号 C1207030); 抗坏血酸 (Sigma Aldrich Chemical Co.(USA), 批号 20100226); 三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA, 天津市福晨化学试剂厂, 批号 20100201); 硫代巴比妥酸 (2-Thiobarbituric acid, TBA, aladdin chemistry co. Ltd, 批号 49837)。沉香茶, 批号 20121027, 市售; 阳性对照药物辛伐他丁 (Merck sharp & Dohmepty. Ltd, 批号 H20080360); 总胆固醇 (Total cholesterol, TC) 单试剂型测定试剂盒, 浙江东欧诊断产品有限公司; 甘油三酯 (Triglyceride, TG) 单试剂型测定试剂盒, 浙江东欧诊断产品有限公司; 高密度脂蛋白胆固醇 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 测定试剂盒, 浙江东欧诊断产品有限公司; 其余试剂均为分析纯

1.3 动物

KM 小鼠, SPF 级, 合格证号: SCXK (粤) 2008-0020 购于广州中医药大学实验动物中心。

1.4 实验方法

1.4.1 体外抗氧化能力的测定

1.4.1.1 样品溶液的制备

取适量沉香茶, 加 10 倍量沸水浸泡 30 min, 滤过, 即得沉香茶供试品溶液。并取市售绿茶和红茶各适量, 同法制得对照样品溶液。

1.4.1.2 脱氧核糖法测定清除·OH 能力

参照文献^[12]方法, 在 532 nm 处测定吸光值 A_1 (以蒸馏水代替 TBA 作为空白调零), 同时用 1 mL 蒸馏水代替样本溶液时的吸光度 A_0 作为阴性对照, 按以下公式计算抑制率, 并计算 IC_{50} 。

$$\cdot OH \text{清除率} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

1.4.1.3 碱性邻苯三酚法测定清除超氧阴离子能力

参照文献^[12]方法, 在 420 nm 处测定光密度, 记录数据。按以下公式计算抑制率, 并计算 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = (A_2 - A_1)/(A_2 - A_0) \times 100\%$$

注: A_0 为对照, A_1 样品, A_2 样品空白。

1.4.1.4 清除 DPPH 能力测定^[13]

参照文献^[13]方法, 在 517 nm 波长处的吸光度, 按下公式计算 DPPH 清除率, 并计算 IC_{50} 。

$$DPPH \cdot \text{清除能力} = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})/A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

1.4.1.5 Fe^{2+} 络合能力测定^[13]

取 1 mL 不同质量浓度样品溶液 (0~40 mg/mL) 与 3.7 mL 甲醇和 2 mmol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 mL 混合, 反应 30 s 后, 加入 5 mmol/L 亚铁嗪 0.1 mL, 混合均匀后室温下反应 10 min, 在波长 562 nm 处测得样品吸光度。以样品本身溶剂为空白样本, 每个样品平行 3 次, 取平均值, 并计算 IC_{50} 。

$$\text{络合能力} \% = (A_{\text{样品}} - A_0)/A_0 \times 100\%$$

注: A_0 是空白样本吸光度, $A_{\text{样}}$ 是样品吸光度。

1.4.1.6 磷钼酸测定抗氧化能力

试管中加入 0.14 mL 不同浓度样品液, 4 mL 试剂液 (0.16 mol/L 硫酸 0.28 mmol/L 磷酸钠和 4 mmol/L 钼酸铵), 混匀后置于 95 °C 水浴中恒温 90 min, 在 695 nm 波长下测其吸光度 A。空白液用 0.14 mL 溶剂代替样品液。所有测定平行进行 3 次。

空白调零: 试管中依次加入 1 mL 3.00 mol/L H_2SO_4 溶液, 1.0 mL 0.14 mmol/L Na_3PO_4 溶液和 1.0 mL 0.02 mol/L 钼酸铵溶液。再用蒸馏水定容至 5.0 mL, 摇匀。加塞于 95 °C 水浴中加热 90 min。取出冷却后, 备用。

实验管: 试管中依次加入 1 mL 3.00 mol/L H_2SO_4 溶液, 1.0 mL 0.14 mmol/L Na_3PO_4 溶液和 1.0 mL 0.02 mol/L 钼酸铵溶液。再加入 1.0 mL 不同浓度的样品, 再用蒸馏水定容至 5.0 mL, 摇匀。加塞与 95 °C 水浴加热 90 min, 取出冷却后用空白调零在 695 nm 波长下测定。

$$\text{抑制率} = [(A_0 - A_{\text{样}})/A_0] \times 100\%$$

注: A_0 是对照吸光度, $A_{\text{样}}$ 是样品吸光度。

1.4.2 体内降血脂活性评价

取 KM 种小鼠 48 只, 18~22 g, 雌雄各半, 喂养普通饲料 10 d, 眼内眦取血测定其正常血清 TC, TG 和 HDL-C 含量, 根据 TC 水平, 采用分层随机抽样的方法将小鼠分为 4 组, 每组 12 只, 雌雄各半, 尽量保持体重和 TG 均衡。依次分组为普通饲料空白对照组、高脂饲料模型组、沉香茶水提物组、辛伐他丁阳性药物对照组。灌胃给予药物, 辛伐他丁剂量按照人体推荐用量折算, 沉香茶水浸提物剂量按生药量计 100 mg/d, 基础饲料空白组饲养普通饲料, 其他组均饲养高脂饲料 (由广东省实验动物中心研制)。实验至 15 d 和 36 d 分别采血测定血清 TC, TG 和 HDL-C 含量, 采血前禁食 16 h, 其测定方法均为按试剂盒检测说明严格进行。

2 结果与讨论

2.1 体外抗氧化能力测定结果

活性氧化群 (ROS) 随着细胞的有氧呼吸而产生,

它是生命体正常代谢的产物，具有信号转导作用，人体中含有非酶促的生物分子和蛋白质生物体，作为抗氧化剂和自由基清除剂，对机体起保护作用，而在各种辐射、有害化学物质（尤其是环境污染）暴露等条件下，身体中都会产生大量的内源性活性氧自由基，最终会引起机体扩散性疾病的发生如：恶性的肿瘤，风湿性关节炎，白内障，帕金森氏症和阿尔茨海默氏症，高血压，糖尿病，动脉粥样硬化等^[14-15]。因此除了机体自身抗氧化外，需日常多摄入的抗氧化补充剂如：抗坏血酸、胡萝卜素、维生素 E、黄酮类和酚类等天然生物活性化合物，这类活性成分能提供电子对，螯合金属催化剂，激活抗氧化酶，抑制氧化，同样能清除活性氧自由基，防止自由基引起的变异。基于上述天然抗氧化剂良好的作用效果，激发了人们从药用植物中提取的生物活性物质进行探索的兴趣。近年来，合成药物因副作用而受到限制，寻找代替合成药物的天然抗氧化活性物质日趋重要，黄酮类化合物具有降低心血管疾病风险，减少氧化应激大分子的氧化作用，其作为一种天然的抗氧化剂地位越来越重要。现代研究表明，黄酮类化合物、皂苷类化合物、蒽醌类化合物和某些多酚类化合物都对治疗高血脂症均有有一定的效果^[16-17]。白木香叶中含较丰富的黄酮和多酚类化合物^[2-8]，具有天然抗氧化剂的潜力。

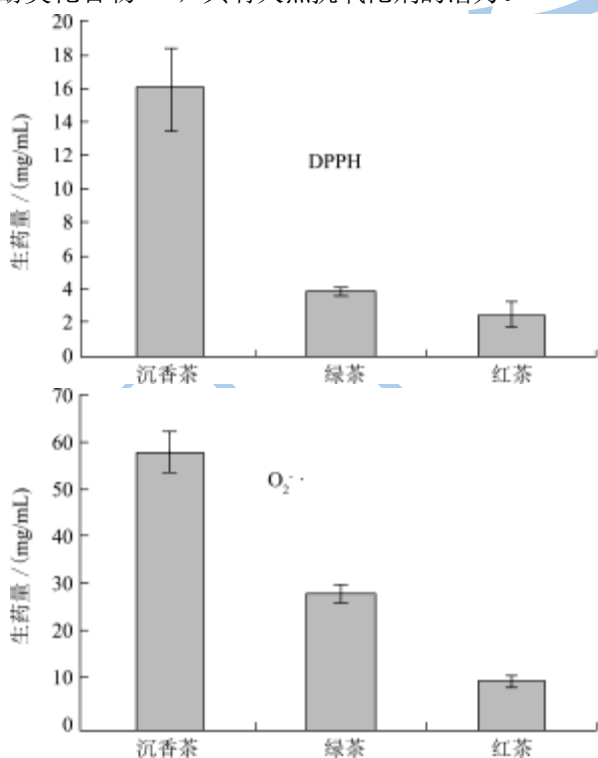


图1 沉香茶水提液清除 DPPH· 和超氧阴离子的 IC₅₀

Fig.1 The IC₅₀ values of Chenxiang tea extracts on clearing DPPH· and O₂^{·-}

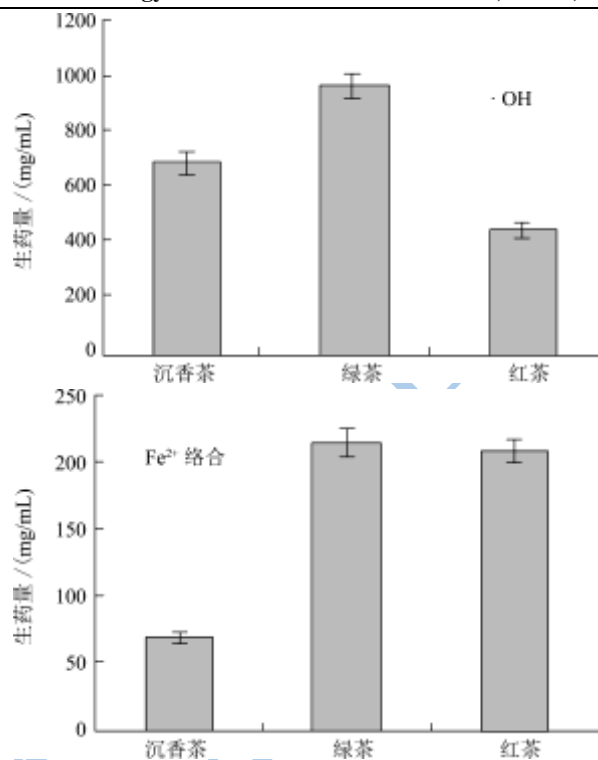


图2 沉香茶水提液清除·OH和络合亚铁离子的 IC₅₀

Fig.2 The IC₅₀ values of Chenxiang tea extracts on clearing ·OH and chelating Fe²⁺

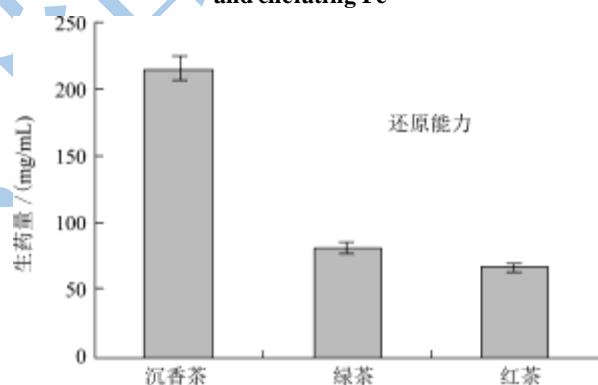


图3 沉香茶水提液清除·OH和络合亚铁离子的 IC₅₀

Fig.3 The IC₅₀ values of Chenxiang tea extracts on reducing phosphomolybdic acid

本实验结果显示，见图 1~3。沉香茶水提液清除 DPPH 自由基 IC₅₀ 为 (16.24±2.4) mg/mL，绿茶的为 (4.81±0.81) mg/mL，红茶的为 (3.47±0.24) mg/mL，沉香茶明显高于后两者，且差异具有统计学意义 (P<0.05)；沉香茶清除超氧阴离子 IC₅₀ 为 (58.03±4.4) mg/mL，绿茶的为 (27.41±1.71) mg/mL，红茶的为 (9.56±1.14) mg/mL，沉香茶明显高于后两者，且差异具有统计学意义 (P<0.05)；沉香茶清除羟自由基 IC₅₀ 为 (700.45±38.04) mg/mL，绿茶的为 (947.56±41.57) mg/mL，红茶的为 (455.94±24.91) mg/mL；沉香茶对 Fe²⁺ 络合能力 IC₅₀ 为 (70.69±2.8)

mg/mL, 绿茶的为 (214.81±10.5714) mg/mL, 红茶的为 (208.51±8.16) mg/mL; 沉香茶对磷酸还原合能力 IC₅₀ 为 (215.46±14.27) mg/mL, 绿茶的为 (82.97±1.41) mg/mL, 红茶的为 (67.37±2.45) mg/mL, 沉香茶明显高于后两者, 且差异具有统计学意义 (P<0.05)。

2.2 体内降血脂结果分析

2.2.1 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 TC 含量的影响

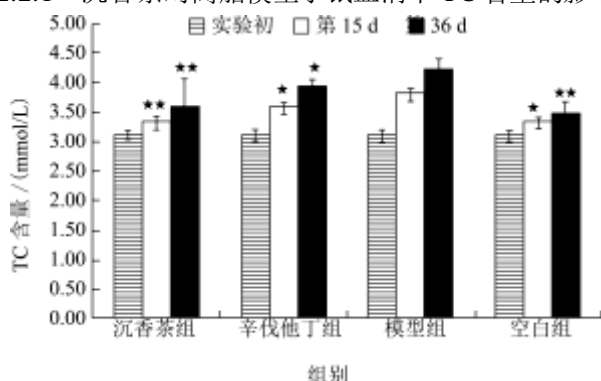


图4 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 TC 含量的影响

Fig.4 Effect of *Chenxiang* tea on the content of serum TC in hyperlipidemia model mouse

注: *和**分别表示与高脂对照组比较差异性显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。

结果见图4, 实验至第15、36 d时高脂对照组 TC 含量 (3.78±0.10、4.20±0.19 mmol/L) 均高于空白对照组 (3.30±0.10、3.46±0.21 mmol/L), 且差异有显著性 (p<0.05), 说明高脂模型成立。实验至第15、36 d时, 沉香茶组的 TC 含量 (3.29±0.11、3.56±0.47 mmol/L) 以及阳性药辛伐他丁组 (3.55±0.10、3.90±0.14 mmol/L) 低于高脂模型组, 且差异均具有显著性 (p<0.05), 表明沉香茶, 辛伐他丁均具有降低血清总胆固醇的作用。

2.2.2 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 TG 含量的影响

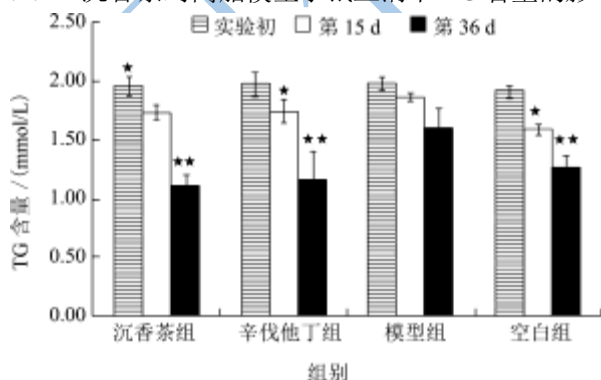


图5 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 TG 含量的影响

Fig.5 Effect of *Chenxiang* tea on the content of serum TG in hyperlipidemia model mouse

注: *和**分别表示与高脂对照组比较差异性显著(P<0.05)

和极显著(P<0.01)。

结果见图5, 实验至第15、36 d时高脂对照组 TG 含量 (1.87±0.03、1.62±0.16 mmol/L) 均高于空白对照组 (1.60±0.04、1.28±0.10 mmol/L), 且差异有显著性 (p<0.05), 说明高脂模型成立。实验至第15、36 d时, 沉香茶组 (1.74±0.06、1.12±0.10 mmol/L) 与阳性药辛伐他丁组 (1.75±0.10、1.17±0.25 mmol/L) 的 TG 含量均低于高脂模型组, 且差异均具有显著性 (p<0.05), 表明沉香茶, 辛伐他丁均具有降低血清甘油三酯的作用。

2.2.3 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 HDL-C 含量的影响

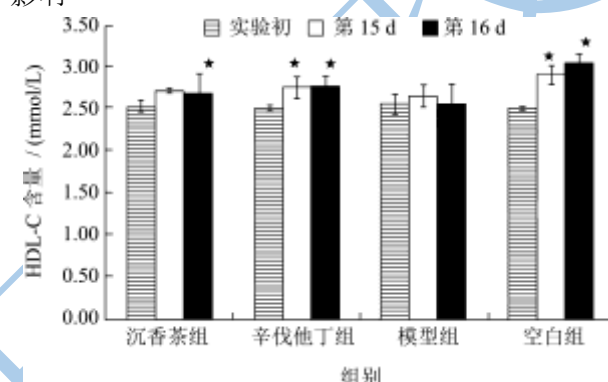


图6 沉香茶对高脂模型小鼠血清中 HDL-C 含量的影响

Fig.6 Effect of *Chenxiang* tea on the content of serum HDL-C in hyperlipidemia model mouse

注: *和**分别表示与高脂对照组比较差异性显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。

结果见图6, 实验至第15、36 d时高脂对照组 HDL-C 含量 (2.64±0.13、2.56±0.23 mmol/L) 均低于空白对照组 (2.90±0.11、3.04±0.10 mmol/L), 且差异有显著性 (p<0.05), 说明高脂模型成立。实验至第15、36 d时, 沉香茶组 (2.71±0.02、2.68±0.24 mmol/L) 与阳性药辛伐他丁组 (2.75±0.12、2.78±0.10 mmol/L) 的 HDL-C 含量均接近高脂模型组, 且差异均具有显著性, 表明沉香茶, 辛伐他丁均具有升高高密度脂蛋白胆固醇的作用。

3 结论

本研究结果显示, 沉香茶水提液具有清除羟自由基 (OH·)、超氧阴离子 (O₂⁻·)、DPPH 自由基 (DPPH·) 以及络合亚铁离子 (Fe²⁺) 和还原磷酸的能力; 对高脂模型小鼠具有一定的降血脂功能, 且其降低血清总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇能力强于辛伐他丁。由此可见, 以白木香叶制成的沉香茶具有抗氧化和降血脂功能, 可作为保健类茶饮。

参考文献

- [1] 梅全喜,李汉超,汪科元,等.南药沉香的药用历史与产地考证[J].今日药学,2011,21(1):3-5
- [2] 张雪梅,李力承,邓李安.云南产白木香叶化学成分初探[J].中外健康文摘,2009,6(24):266-267
- [3] 聂春晓,宋月林,陈东,等.白木香叶化学成分的研究[J].中国中药杂志,2009,34(7):858-860
- [4] 刘玉峰,杨秀伟,刘铜华,等.沉香叶挥发油化学成分的GC-MS分析[J].中国现代中药,2007,9(8):7-9
- [5] 梁永枢,刘军民,魏刚,等.沉香药材挥发油成分的气相色谱-质谱联用分析[J].时珍国医国药,2006,17(12): 2518
- [6] 王红刚.HPLC法测定香叶中茺花素含量研究[J].中医药导报,2008,14(3):69-70
- [7] 王红刚,周敏华,路晶,等.沉香叶抗肿瘤活性化学成分研究[J].林产化学与工业,2008,28(2):1-5
- [8] 路晶晶,戚进,朱丹妮,等.白木香叶中黄酮类成分结构与抗氧化功能的相关性研究[J].中国天然药物,2008, 6(6): 456-460
- [9] 余伯阳.一种沉香叶提取物及其医药和保健用途[P].中国专利:200710019969.3,2007-08-08
- [10] 汪科元.沉香茶及其制作[P].中国专利: 200710029195. 2, 2008-01-02
- [11] 王剑,金兆元.沉香肾茶袋泡茶及其制备工艺[P].中国专利: 200710065657.6,2007-08-08
- [12] 包玉威,罗兴武,江海艳,等.鸭跖草水溶性多糖的提取纯化即纯化前后抗氧化性能研究[J].现代食品科技, 2008, 24(9): 880-883
- [13] 朱会霞.覆盆子黄酮抗氧化活性研究[J].现代食品科技, 2012,28(10):1302-1305
- [14] Gardner A M, Xu F H, Fady C, et al. Apoptotic versus nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22: 73-83
- [15] Fiers W, Beyaert R, Declercq W, et al. More than one way to die: apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage [J]. *Oncogene*, 1999, 18:7719-7730
- [16] 瞿颖,蒋立勤,李喜,等.玉米须保健袋泡茶的研制[J].现代食品科技,2011,27(7):831-834
- [17] 刘北林,董继生,倪小虎,等.山楂黄酮提取及降血脂研究[J].食品科学,2007,28(5):324-327