

制何首乌抗氧化及对肾阴虚大鼠氧化应激影响

陈潮升 袁遂樑 蔡伟明 林泳冰

广东汇群中药饮片股份有限公司, 中国·广东 汕头 515000

摘要: 为探究炮制对何首乌抗氧化活性的影响及对肾阴虚大鼠氧化应激的调控作用, 本研究以维生素 C 为阳性对照, 采用 HPLC-DPPH 法测定何首乌炮制前后对 DPPH 自由基的清除率与 IC₅₀ 值; 同时采用甲状腺素诱导建立大鼠肾阴虚模型, 检测血清 SOD、MDA 指标变化。结果显示: 何首乌经炮制后体外抗氧化活性显著提升, 自由基抑制效价为 VC > 制何首乌 > 生何首乌, IC₅₀ 分别为 35.20、1260.10、1800.50 μg/mL; 最大清除率以制何首乌最高。动物实验表明, 肾阴虚模型大鼠 SOD 活性降低、MDA 含量升高, 何首乌可呈剂量依赖性上调 SOD、下调 MDA, 且制何首乌作用优于生何首乌。结论: 炮制可显著增强何首乌抗氧化能力, 有效改善肾阴虚大鼠氧化应激紊乱, 为何首乌炮制应用及药理研究提供实验依据。

关键词: 何首乌; 炮制加工; 抗氧化活性; 水提取物; HPLC-DPPH; 肾阴虚模型大鼠; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

Antioxidant Effect of Processed Polygoni Multiflori Radix and Its Regulation on Oxidative Stress in Kidney-Yin Deficient Rats

Chen Chaosheng, Yuan Suiliang, Cai Weiming, Lin Yongbing

Guangdong Huiqun Chinese Herbal Pieces Co., Ltd., China Guangdong Shantou 515000

Abstract: To explore the effect of processing on the antioxidant activity of Polygonum multiflorum and its intervention on oxidative stress in kidney-yin deficient rats, VC was used as positive control. The HPLC-DPPH method was adopted to compare the DPPH free radical scavenging ability and IC₅₀ of raw and processed Polygonum multiflorum water extracts. A rat kidney-yin deficiency model was established by thyroxine, and serum SOD and MDA levels were determined. The results showed that processing significantly enhanced its antioxidant capacity. The inhibitory potency was VC > processed product > raw product, with IC₅₀ of 35.20, 1260.10 and 1800.50 μg/mL, respectively. The maximum scavenging rate of processed Polygonum multiflorum was the highest. Animal experiments indicated that model rats had obvious oxidative stress damage. The extracts could up-regulate SOD and down-regulate MDA in a dose-dependent manner, and processed product performed better. Conclusion: Processing can remarkably strengthen the antioxidant activity of Polygonum multiflorum and relieve oxidative stress imbalance in kidney-yin deficient rats, which provides experimental support for its processing development and clinical application.

Keywords: Polygonum multiflorum; Processing technology; Antioxidant activity; Water extract; HPLC-DPPH; Kidney-Yin deficient rat; SOD; MDA

0 引言

何首乌所含二苯乙烯苷与多糖组分是其发挥抗氧化作用的核心物质, 不仅能够有效清除 DPPH 等活性自由基, 还可修复氧化损伤模型动物体内抗氧化酶活性, 降低机体脂质过氧化损伤程度。本实验采用 HPLC-DPPH 体外抗氧化评价体系, 结合肾阴虚大鼠氧化应激动物模型, 系统对比炮制前后何首乌的抗氧化药效差异, 为阐明何首乌炮制增效机制及临床合理应用提供实验参考依据。

1 实验材料

1.1 主要仪器设备

本实验所使用检测设备包括: 日本岛津公司生产的 2030 型高效液相色谱仪、UV-240 型紫外可见分光光度计。

1.2 试剂与实验药材

DPPH 试剂 (批号: STBH7099) 采购于美国 Sigma 公司; 分析纯维生素 C (批号: 20250912, 纯度 ≥ 99.8%) 由国药集团化学试剂有限公司提供; SOD 活性检测试剂盒 (批号: A001-3)、MDA 含量检测试剂盒 (批号: A003-1) 均购自南京建成生物工程研究所。

实验所用甲醇、乙腈均为色谱纯级别, 其余化学试剂为分析纯; 实验用水选用娃哈哈纯净水。何首乌原药材于 2025 年 12 月采集自兰州市辖区。

2 实验方法与结果

2.1 何首乌炮制工艺

参照 2025 年版《中国药典》标准方法炮制: 取净制何首乌饮片或块状药材, 加入黑豆汁充分拌匀, 置于非金

属容器内文火炖煮，直至黑豆汁液被药材完全吸收，即得制何首乌。炮制辅料配比：每 100 kg 何首乌原料搭配黑豆 10 kg。黑豆汁制备工艺：称取 10 kg 黑豆，加适量清水煎煮 4 h，收集初次药液约 15 kg；剩余药渣再次加水煎煮 3 h，收集二次药液约 10 kg，合并两次药液共得到黑豆汁 25 kg 备用。

2.2 生、制何首乌水提物制备

采用超声辅助提取法制备样品水提物：精确称取何首乌粉末 20 g，按照料液比 1 : 6 加入纯化水 120 mL，常温超声提取 40 min，重复提取 2 次；合并两次滤液，经减压浓缩、冷冻干燥处理后，获得干燥粉末状水提物，低温密封保存备用，后续用于含量测定与活性评价。

2.3 HPLC-DPPH 法抗氧化活性评价体系建立

2.3.1 DPPH 工作液配制

精确称量 4 mg DPPH 标准品，移入 10 mL 棕色容量瓶中，加入无水乙醇充分溶解并定容至刻度线，摇匀后配制成 0.4 mg/mL 的 DPPH 工作溶液，避光低温冷藏，现配现用避免降解。

2.3.2 对照品溶液配制

精密称取 10.0 mg 维生素 C 标准品，以稀甲醇溶解后定容至 10 mL 容量瓶，配制浓度为 1.0 mg/mL 的 VC 储备液，实验前按需稀释至所需梯度浓度。

2.3.3 色谱条件与系统适用性

选用 ODS C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈 - 水体系，体积比 60 : 40；检测波长设定 516 nm；流动相流速 1.0 mL/min；色谱柱恒温 40 °C；进样体积 10 μL。

检测结果显示，加入 VC 抗氧化体系后，DPPH 特征峰面积显著下降，同时还原产物 DPPH-H 峰面积同步升高，色谱分离效果良好 (见图 1)。

2.3.4 线性关系考察

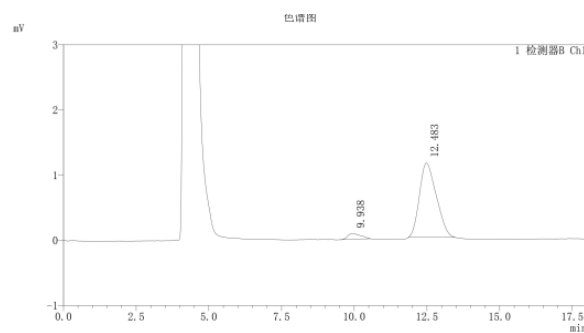
逐级稀释 VC 储备液，配置成一系列梯度浓度对照溶液。取 0.4 mg/mL DPPH 溶液 200 μL，分别与等体积不同浓度 VC 溶液混匀，避光静置 30 min 后进样检测，记录峰面积并计算自由基清除率。

清除率计算公式：

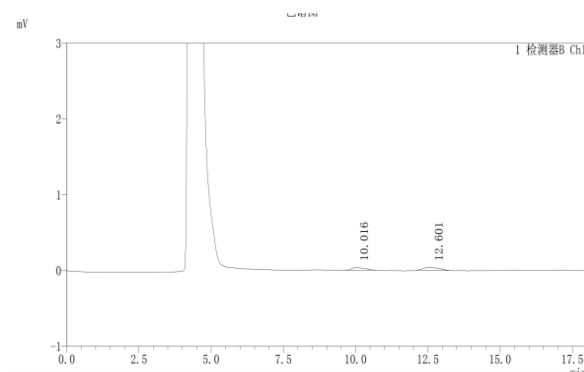
$$\text{清除率 (\%)} = (\text{空白峰面积} - \text{样品峰面积}) / \text{空白峰面积} \times 100\%$$

以自由基清除率为纵坐标 Y，溶液浓度为横坐标 X 进行线性回归分析，结果显示 VC 在 5 ~ 50.00 μg/mL 浓度区间内线性关系良好，回归方程：Y=1.5803X-2.8017，相

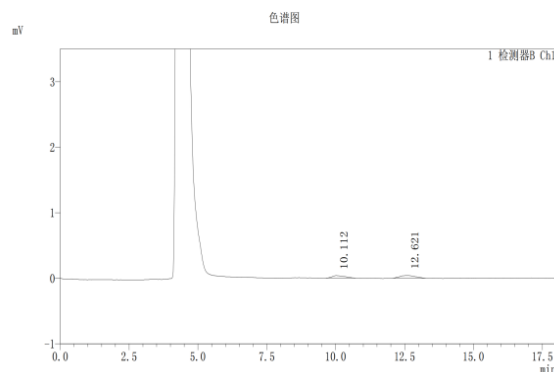
关系数 r=0.9932。根据回归方程计算得出 VC 的 IC₅₀ 值为 35.20 μg/mL。



A. DPPH 溶液 + 甲醇溶液



B. DPPH 溶液 + VC 对照品溶液



C. DPPH 溶液 + 制何首乌水提物溶液

图 1 各组体系 HPLC 色谱图

2.4 炮制前后何首乌体外抗氧化活性检测

2.4.1 供试品溶液配制

精确称取干燥至恒重的生、制何首乌水提物各 2.0 g，置于具塞锥形瓶中，加入 20 mL 稀乙醇超声充分溶解，过滤除去不溶杂质，配制成 100.0 mg/mL 的供试品溶液，即时配制即时使用。

2.4.2 DPPH 自由基清除能力测定

取 0.4 mg/mL DPPH 溶液 200 μL，分别加入等体积不同浓度生、制何首乌供试品溶液，混匀后避光静置 30 min，在既定色谱条件下进样测定峰面积，计算各组自由基清除率，每组实验平行重复 3 次。以浓度与清除率进行线性拟

合, 计算得到生何首乌、制何首乌及 VC 的 IC₅₀ 分别为 1800.50 μg/mL、1260.10 μg/mL、35.20 μg/mL。

结果表明, 生、制何首乌水提取物均具备良好的 DPPH 自由基清除作用; 从半数抑制浓度来看, 抗氧化效价排序为 VC> 制何首乌> 生何首乌; 从最大清除率来看, 排序为制何首乌 87.88%> 生何首乌 86.85%>VC 85.93%。

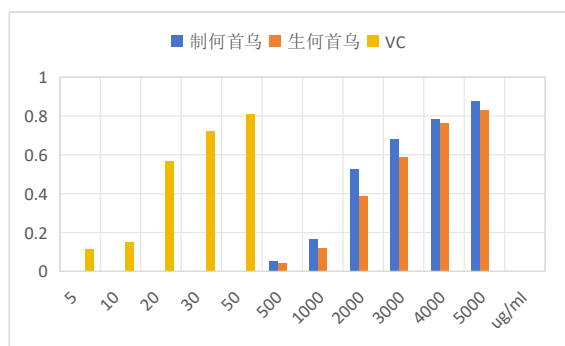


图2 对DPPH自由基的清除能力(n=3)

2.5 生、制何首乌对肾阴虚大鼠氧化应激的干预作用

2.5.1 动物分组与给药方案

选取 30 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 随机划分为 5 组, 每组 6 只, 分别为空白对照组、模型对照组、何首乌低 / 中 / 高剂量组。空白组每日按 10 mL/kg 灌胃生理盐水; 模型组采用甲状腺素片配制 10 mg/mL 混悬液, 按 150 mg/kg 剂量连续灌胃 7 d, 构建大鼠肾阴虚病理模型。

何首乌各给药组每日清晨定时灌胃给药, 高、中、低剂量分别设定为 300 mg/kg、200 mg/kg、100 mg/kg, 连续干预 7 d。末次给药后腹主动脉采血, 室温静置 1 h 后离心分离血清, 置于 -20 °C 冰箱冷冻保存待测。

所有实验数据采用 SPSS 21.0 统计软件处理, 计量资料以均数 ± 标准差表示; 多组间均值比较采用单因素方差分析, P ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2.5.2 大鼠血清 SOD、MDA 指标检测结果

表1 何首乌对肾阴虚大鼠血清 SOD、MDA的影响

| 组别 | n | SOD/(U/mg) | MDA/(nmol/mg) |
|---------|---|----------------|---------------|
| 正常 | 6 | 53.87 ± 2.89 | 6.49 ± 0.44 |
| 模型 | 6 | 30.08 ± 3.28* | 12.08 ± 1.86* |
| 生何首乌低剂量 | 6 | 30.19 ± 2.12 | 12.25 ± 0.52 |
| 生何首乌中剂量 | 6 | 35.19 ± 3.28△ | 8.47 ± 0.86△ |
| 生何首乌高剂量 | 6 | 50.86 ± 2.22△ | 7.09 ± 0.92△ |
| 制何首乌低剂量 | 6 | 30.39 ± 2.12 | 9.24 ± 0.28△ |
| 制何首乌中剂量 | 6 | 45.19 ± 3.28△ | 7.88 ± 0.63△ |
| 制何首乌高剂量 | 6 | 54.86 ± 2.22△# | 6.09 ± 0.86△# |

注: 与正常组比较, *: P<0.05; 与模型组比较, △: P<0.05; 与生何首乌高剂量组比较, #: P<0.05。

与空白组相比, 肾阴虚模型组大鼠血清 SOD 活性显

著降低 (P<0.05), MDA 含量明显升高 (P ≤ 0.05), 提示模型大鼠存在明显氧化应激损伤。与模型组相比, 何首乌中、高剂量干预可显著提升大鼠血清 SOD 活性、降低 MDA 水平 (P<0.05); 同等剂量条件下, 制何首乌对氧化应激指标的调控效果显著优于生何首乌 (表 1)。

3 讨论

抗氧化物质可与 DPPH 自由基发生电子配对反应, 使体系紫色逐步消退, 褪色程度与样品自由基清除能力呈显著相关性。该检测方法适合大批量评价中药提取物及单体成分的体外抗氧化活性。

本实验选用乙腈 - 水 60 : 40 流动相体系, 搭配 ODS C18 色谱柱, 可实现 DPPH 与还原产物 DPPH-H 的高效基线分离。为控制实验系统误差, 确定避光静置 30 min 为最佳反应时间。

本实验选用临床常用的水提工艺制备样品, 结果证实经规范炮制后的何首乌自由基清除能力更强, 抑制活性顺序为 VC> 制何首乌> 生何首乌, 最大清除率则以制何首乌最优。

SOD 是机体抗氧化防御系统的关键酶类, 在清除内源性自由基、减轻氧化损伤中发挥核心作用; MDA 是不饱和脂肪酸过氧化代谢终产物, 其含量高低可直接反映机体自由基损伤程度。本实验结果证实, 何首乌尤其是制何首乌, 可通过上调 SOD 活性、下调 MDA 含量改善肾阴虚大鼠氧化应激失衡, 推测该药效作用与制何首乌中多糖类活性组分密切相关。

参考文献:

- [1] 詹志来, 李文兰, 冯剑等. 经典名方中何首乌与首乌藤的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29.
 - [2] 王璐, 孙莉琼, 苏航等. 联用技术在自由基清除物筛选中的应用[J]. 中草药, 2012, 43(5): 1032-1036.
 - [3] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free Radicals in Biology and Medicine[M]. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.
 - [4] 王艳, 李丽, 陈勇. 制何首乌多糖的提取及抗氧化作用机制初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 156-160.
- 基金项目: 2023 年广东省科技创新战略专项市县科技创新支撑项目 (STKJ2023050)。

作者简介: 陈潮升 (1983.10-), 男, 汉族, 广东汕头, 大学本科, 主管中药师, 研究方向: 从事中药医药方向研究。