

鸢尾苷抗氧化活性的研究

段丽红^{1,2,3}, 李仲秋¹, 吴正治¹, 郭祀远², 陈利国³

¹暨南大学第二临床医学院 深圳老年医学研究所, 深圳 518020;

²华南理工大学食品学院, 广州 510641; ³暨南大学医学院, 广州 510632

摘要: 在成功从中草药射干中提取纯化得到鸢尾苷的基础上, 应用灵敏、简单易行有效的方法考察鸢尾苷的抗氧化能力。选择氧自由基清除、羟基自由基清除、二苯代苦味肼基自由基清除、烷基自由基清除和抗油脂氧化作用等实验体系进行抗氧化活性的试验。结果显示纯化得到的鸢尾苷的抗氧化作用比维生素 C 稍强, 但比 2,6-二叔丁基对甲酚稍弱, 表明其具有较显著的抗氧化作用。

关键词: 抗氧化活性; 鸢尾苷; 自由基; 2,6-二叔丁基对甲酚; 维生素 C

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

Investigation of Antioxidant Capacity of Tectoridin

DUAN Li-hong^{1,2,3}, LI Zhong-qiu¹, WU Zheng-zhi¹, GUO Si-yuan², CHEN Li-guo³

¹Shenzhen Institute of Gerontology of Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China;

²Food College of South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

³School of Medicine of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Tectoridin was successfully isolated from Rhizoma Belamcandae. The antioxidant capacity of isolated tectoridin was examined via some sensitive, simple, effective methods including oxygen radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, diphenyl bitterness hydrazine radical scavenging, alkyl radical scavenging and anti-lipid oxidation assays. The results showed that the antioxidant effects of tectoridins is weaker than 2,6-ditertiary butyl-p-cresol, but is stronger than vitamin C. It is suggested that the antioxidant capacity of Tectoridin is more significant.

Key words: antioxidant activity; tectoridin; radicals; 2,6-ditertiary butyl-peresol; vitamin C

射干中的活性成分鸢尾苷可选择性地治疗和预防血管疾病(例如:小动脉硬化)、骨质疏松和更年期综合症^[1], 尽早地预防小动脉硬化, 防止产生恶性循环, 以免形成不可逆性高血压。近年来, 日本的学者对射干中主要成分鸢尾苷及其鸢尾黄酮的抗炎作用进行了深入的研究, 发现射干中的鸢尾苷及鸢尾黄酮在体内外均具有抗透明质酸酶的作用, 且不为半胱氨酸所阻断^[2]。

自由基生物学和放射医学研究在不断进展, 机体内生成和清除之间动态平衡的破坏是引起衰老和多种疾病的重要原因也越来越广泛地被人们所认同^[3]。目前有不少研究发现, 中草药中某些有效成分具有清除自由基的作用^[4], 其中, 鸢尾苷可清除羟自由基和 DPPH 自由基^[5]。目前虽然已有诸如硫

氰酸盐法、ORAC 法(automated oxygen radical absorbance capacity assay)等方法用于评价植物的抗氧化能力, 但是这些方法存在着所需试剂或大型仪器的费用昂贵等不足^[6]。本文应用一些灵敏、简单易行的有效方法来测定了从中草药射干中提取分离得到的鸢尾苷的抗氧化能力。

1 材料与仪器

1.1 试剂

Vc(AR)、BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)(AR)、邻苯三酚(AR) 50 mmol/L、磷酸缓冲液(用磷酸氢二钠及磷酸二氢钠调配): 1 mol、pH = 8.44; pH = 7.40; pH = 8.0、邻菲罗啉(AR)、硫酸亚铁(AR)、过氧化氢(AR)、二苯代苦味酰基自由基 DPPH·(Sigma)、亚油酸(AR)、三氯乙酸(AR)、硫代巴比妥酸(AR)、三氯甲烷(AR)、冰乙酸(AR)、碘化钾(AR)、硫代硫酸钠(AR)、淀粉指示剂、猪油等。鸢尾苷, 自制^[5]。

收稿日期: 2013-10-16 接受日期: 2014-02-22

基金项目: 中国博士后科学基金(2013M531902); 深圳市科技研发资金项目(JSE201007190009A)

* 通讯作者 E-mail: szwzz001@163.com

1.2 仪器

紫外扫描分光光度计,UV2102PC,上海 Unico 公司;鼓风干燥箱,101A,苏州台华烘箱设备有限公司;恒温水浴锅,DK-S24,上海精宏实验设备有限公司;可调试移液管,Labnet Biopette plus,美国莱伯特(Labnet)公司。

2 实验方法

2.1 对氧自由基的清除作用

活性氧是一类化学性质活泼且具有强氧化的性自由基,是人体正常代谢中的中间产物。采用以下方法来研究对氧自由基的清除作用:取 10 mL 容量瓶加入磷酸缓冲液 200 μ L,依次加入 Vc 1 mL、样品液 1 mL、BHT 1 mL 放置 10 min 后,分别加 60 μ L 邻苯三酚(50 mmol/L),迅速混匀。分别以不同浓度的样品液,以 Vc、BHT 为参比(对照以磷酸缓冲液为参比)在 325 nm 处读反应 7 s 时的吸光度,得出被测物抑制氧自由基积累作用的能力^[7]。

表 1 Fenton 反应测定 \cdot OH 清除率的实验过程

Table 1 Experimental parameters of Fenton reaction (eliminating \cdot OH)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------|------------------------------------|----------|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| | H ₂ O ₂ (mL) | PBS (mL) | 邻菲罗啉 1,10-Phenanthroline monohydrate (mL) | 去离子水 Deionized water (mL) | 硫酸亚铁 Ferrous sulfate (mL) | 样品 Sample (mL) |
| Group 1 A ₀ | 1.00 | 1.00 | 0.90 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| Group 2 A ₁ | 1.00 | 1.00 | 0.40 | 1.00 | 0.00 | 0.50 |
| Group 3 A ₂ | 1.00 | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.40 | 0.50 |

反应在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中进行,准确反应 15 h 后,快速记录 536 nm 处吸光度(以 A₁ 作对照测定 A₀ 和 A₂)。

按下式计算待测物对的清除率(I%):

$$I(\%) = \frac{(A_2 - A_1)}{(A_0 - A_1)} \times 100 \quad (2)$$

式中,I:清除率,%;A₀:不含待测物和不含 H₂O₂ 时的吸光值;A₁:不含待测物和含 H₂O₂ 时的吸光值;A₂:含待测物和含 H₂O₂ 时的吸光值。

2.3 对 DPPH \cdot 的清除作用

二苯代苦味肼基自由基(DPPH \cdot)是少数化学性质十分稳定的自由基之一。主要因为共振稳定作用及三个苯环的空间障碍,使夹在其中的间氮原子上的不成对电子不能发挥其应有的电子成对作用;DPPH \cdot 分光测定法的测定原理是依据 DPPH \cdot 在 517 nm 处有一强吸收,其乙醇溶液呈深紫色,当自

$$S(\%) = \frac{(A_{\text{空}} - A_{\text{样}})}{A_{\text{空}}} \times 100 \quad (1)$$

式中,S:清除率,%;A_空:空白对照在 325 nm 反应时的吸光值;A_样:样品在 325 nm 反应时的吸光值。

2.2 对羟基自由基的清除作用

生命体进行氧化代谢过程时会不断产生各种自由基, \cdot OH 是体内最活泼的活性氧之一,会介导许多病理变化,如引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,并损伤膜结构及功能,因此测定鸢尾苷对 \cdot OH 的清除作用具有重要的生物学意义。

本实验利用比色法测定了 Fenton 反应中产生的 \cdot OH^[8]。

磷酸缓冲液(PBS):pH=7.40,c=400 mmol/L;邻菲罗啉水溶液:c=2.5 mmol/L;硫酸亚铁水溶液:c=2.5 mmol/L;过氧化氢(H₂O₂)水溶液:c=20 mmol/L。

按表 1 分组,试剂从表左至表右依次加入试管。

由基有存在时,由于与其单电子配对而使吸收逐渐消失,其程度与其接受电子数量成定量关系^[6]。因而可用分光法进行定量分析。

用无水乙醇定容 4 mg DPPH \cdot 于 50 mL 容量瓶中,得到浓度为 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH \cdot 溶液。利用 DPPH \cdot 溶液的特征深紫色团 517 nm 的吸收峰,用紫外-可见分光光度计测定 A₅₁₇ 吸收的下降表示其对有机自由基的清除能力。反应总体积 5 mL。按照加样表 2 进行加样,混合均匀后 25 $^{\circ}$ C 反应 15 min,测定 517 nm 波长下吸光值的变化^[9]。按照公式(3)进行计算氧化物质的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \left(\frac{A_j - A_i}{A_j} \right) \times 100 \quad (3)$$

式中,A_i:加抗氧化剂后二苯代苦味肼基自由基的溶液的吸光值;A_j:未加抗氧化剂时二苯代苦味肼基自由基的溶液的吸光值。

表2 DPPH·清除试验加样表

Table 2 Sampling amounts of DPPH· scavenging assay

| Group | DPPH· (mL) | Sample (mg/L) | Solvent (mL) |
|-------------|------------|---------------|--------------|
| 1 (Control) | 2.0 | 0 | 1.0 |
| 2 | 2.0 | 100 | 1.0 |
| 3 | 2.0 | 200 | 1.0 |
| 4 | 2.0 | 300 | 1.0 |
| 5 | 2.0 | 400 | 1.0 |
| 6 | 2.0 | 500 | 1.0 |
| 7 | 2.0 | 600 | 1.0 |

2.4 对烷基自由基的清除作用

将5 mL乙醇、5 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH = 8.0)、1 mL试样与0.1 mL亚油酸(81%)混合,用10 W紫外灯紫外光照射60 min,然后加入4 mL三氯乙酸(20%, W/V),1 mL硫代硫酸钠(3%, W/V),95 °C水浴反应90 min,冰浴冷却,离心,于532 nm处测吸光度,以相同体积蒸馏水代替试样作为空白对照^[10]。

清除烷基自由基活性计算公式:

$$P(\%) = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中,P:清除率,%;A₀:空白的吸光值;A_i:试样的吸光值。

2.5 抗油脂氧化作用

各种脂肪酸甘油脂的混合物组成了油脂的主要成分,储藏过程中油脂会发生变质;含有不饱和的脂肪酸甘油脂尤为容易变质,因为其结构上有不饱和键,很容易与空气中的氧气发生自动氧化反应,生成过氧化物,产生具有臭味的醛或碳链较短的羧酸;同时,过氧化的脂质可破坏生物膜,引起细胞功能衰退直至组织坏死,透发各种生理异常而导致疾病^[8]。油脂的自动氧化,一种自由基反应,首先发生在不饱和和双键邻近的次甲基上,生成自由基;在反应中,无异味的氢过氧化物(ROOH)是自动氧化的第一中间产物,过氧化值(POV)的提高已标志油脂已开始酸败^[8]。所以,POV值是油脂自动氧化的主要指标之一。

称30.0 g猪油,分别加入0.20%、0.40%的样品液、0.02% BHT、0.02% Vc,搅匀,另做空白对照,在(60 ± 1) °C烘箱中保存,并定时搅拌,于一定时间后测定猪油中的POV值,并以此衡量物质的抗氧化性。

过氧化值的测定:按GB5009.37-1985方法进行。

称2~3 g猪油,置于250 mL碘瓶中,加入30 mL三氯甲烷冰乙酸混合液,使样品完全溶解。加入1 mL饱和碘化钾溶液,盖紧,摇匀30秒,于暗处3 min,取出,加水100 mL,立即用0.002 M硫代硫酸钠滴定,至淡黄色时加入1 mL淀粉指示剂,继续滴定至兰色消失为终点。取相同量三氯甲烷冰乙酸混合液、碘化钾溶液、水按上述同样方法做空白实验^[11]。样品的过氧化值为:

$$POV = \frac{(V_1 - V_2) \times M}{m} \times 1000 \quad (5)$$

式中,POV:样品过氧化值,mmol/kg;V₁:试样消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,mL;V₂:空白消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,mL;M:硫代硫酸钠标准溶液的浓度,mol/L;m:样品质量,g。

3 结果与分析

3.1 对氧自由基的清除作用

该体系中邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化反应,生成氧自由基和中间产物。当将氧自由基清除剂加入到缓冲液中时,氧自由基的生成受到抑制,邻苯三酚自氧化过程受阻,因此可通过测定某物质对邻苯三酚自氧化抑制作用,即325 nm处吸光值来推断清除剂对氧自由基的清除作用,并比较不同清除剂及不同浓度清除剂作用的相对大小。

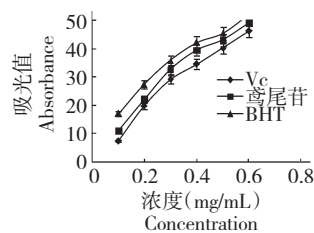


图1 鸢尾苷、Vc及BHT对氧自由基的清除效果

Fig. 1 The scavenging effect of tectoridin, Vc and BHT on oxygen radical

如图1所示:在所选浓度范围内,三种物质的清

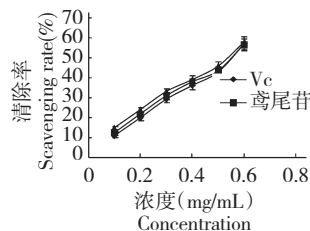


图2 鸢尾苷、Vc及BHT对羟基自由基的清除效果

Fig. 2 The scavenging effect of tectoridin, Vc and BHT on ·OH

除率随浓度增加而升高,其中同一浓度下 BHT 的清除率最大,其次是鸢尾苷, Vc 的最小,但变化不明显,几乎均低于 50%。

3.2 对羟基自由基的清除作用

Fenton 反应是生物体内产生羟基自由基的主要反应,其反应式可表示为: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} \cdot + \cdot\text{OH}$,其中该反应中常见的氧化还原指示剂邻菲罗啉- Fe^{2+} 的颜色变化可敏锐地反应溶液氧化还原状态的改变,因此可以采用比色分析法来测定体系产生的羟基自由基;如果将清除剂加入到反应溶液中,则 $\cdot\text{OH}$ 减少,同时 Fe^{2+} 增多,溶液颜色变红,由此推算羟基自由基的清除剂对羟基自由基的清除效果。利用 Fenton 反应,检测 Vc、鸢尾苷、BHT 三种物质对羟基自由基清除作用,其结果如图 2 所示:在所选浓度范围内,随浓度的升高,三种物质的清除作用显著;清除率达到 50% 所需浓度, Vc、鸢尾苷、BHT 都约是 0.54 mg/mL,说明在所选浓度范围内鸢尾苷对羟基自由基清除作用与 Vc、BHT 相当。

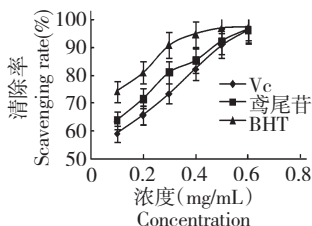


图 3 鸢尾苷、Vc 及 BHT 对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 3 The scavenging effect of tectoridin, Vc and BHT on DPPH ·

3.3 对 DPPH · 的清除作用

图 3 所示的是 Vc、鸢尾苷、BHT 三种物质对 DPPH · 的清除作用:(1)三种物质均有显著的抗氧化、清除自由基能力;(2)所选浓度范围内,各物质自由基的清除能力与物质的浓度呈现正相关,即浓度越高,自由基的清除能力越强;(3)实验浓度范围内,三种物质的清除率都较高,几乎都在 60% 以上;(4)同一浓度下的清除率的高低次序是: BHT > 鸢

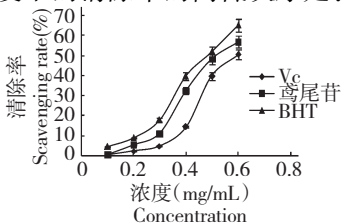


图 4 鸢尾苷、Vc 及 BHT 对烷基自由基的清除效果

Fig. 4 The scavenging effect of tectoridin, Vc and BHT on $\text{CH}_3 \cdot$

尾苷 > Vc,而且在浓度较大时鸢尾苷与 Vc 相当。

3.4 对烷基自由基的清除作用

对烷基自由基的清除作用如图 4 所示:(1)在所选浓度范围内,浓度越高,自由基的清除能力越强;(2)同一浓度下, Vc 的清除作用最弱,鸢尾苷居中, BHT 最强,而且在浓度较小时鸢尾苷与 Vc 相当。

3.5 抗油脂氧化作用

采用烘炉储存试验测定油脂过氧化值。由图 5 可看出结果:(1)三种物质对猪油均有显著的抗氧化作用;(2)同一浓度下,对猪油的抗氧化作用 BHT 比 Vc 的要强很多。

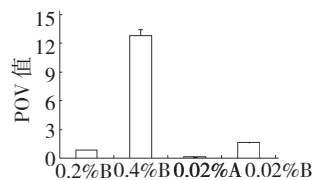


图 5 烘箱强制氧化 72 h 测鸢尾苷、Vc 及 BHT 的 POV 值
Fig. 5 POV values of tectoridin, Vc and BHT by baking 72 h

4 结论

物质抗氧化活性的测定手段有许多,物质的抗氧化活性不能单从对一两种自由基的清除来断定。因此本文关于活性方面的试验,选择的实验体系有氧自由基清除、羟基自由基清除、二苯代苦味肼基自由基清除、烷基自由基清除和抗油脂氧化作用。由实验结果,可以得出结论:(1)纯化得到的鸢尾苷有较显著的抗氧化作用;(2)纯化得到的鸢尾苷的抗氧化作用比 BHT 的稍弱,但比维生素 C 的要强一些;(3)本文仅对纯化得到的鸢尾苷体外抗氧化活性进行了初步研究,有待对体内的抗氧化活性及其它的活性进行考察。

参考文献

- 1 Wang HW (王红武), Zhang MF (张明发), Shen YQ (沈雅琴), et al. Effects of *Rhizoma Belamcandae* on the digestive system and experimental thrombosis. *Res Tradi Chinese Med* (中医药研究), 1997, 13(5): 43-45.
- 2 Zhong M (钟鸣), Guan XJ (关旭俊), Huang BS (黄炳生), et al. Research progress of *Rhizoma Belamcandae*. *J Chinese Med Mater* (中药材), 2001, 24: 904-907.
- 3 Meydani SN. Antioxidants Nutrients and Immune Functions. New York and London: Plenum Press, 1990.

(下转第 2081 页)