

天然植物抗氧化剂清除氧自由基特性研究

田云¹, 卢向阳¹, 何小解²

(1.湖南农业大学生化与发酵工程实验室, 湖南 长沙 410128;

2.中南大学湘雅二医院小儿肾病研究室, 湖南 长沙 410011)

摘 要: 目的: 比较不同天然植物抗氧化剂清除氧自由基能力。方法: 生物化学发光法。结果: 儿茶素、甘草提取物、迷迭香提取物、葡萄籽提取物、虎杖提取物和银杏叶提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力 IC_{50} 分别为 6.16、42.13、184.29、15.86、25.48 和 33.47 $\mu g/ml$; 清除 $\cdot OH$ 的能力 IC_{50} 分别为 0.59、5.59、39.89、2.93、7.15 和 10.44 $\mu g/ml$; 清除 H_2O_2 的能力 IC_{50} 分别为 0.69、24.02、16.80、1.34、27.27 和 6.09 $\mu g/ml$ 。结论: 儿茶素对 3 种主要氧自由基的清除能力均最强。

关键词: 抗氧化剂; 氧自由基; 化学发光

Scavenging Capacities on Oxygen Radicals of Natural Plant Antioxidants

TIAN Yun¹, LU Xiang-yang¹, HE Xiao-jie²

(1.The Lab of Biochemistry and Fermentation Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. The Second Hospital of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective: To compare the scavenging capacities on oxygen radicals of natural plant antioxidants. Methods: Chemiluminescence. Results: The IC_{50} of scavenging $O_2^{\cdot-}$ for catechin, the extraction from licorice, rosemary, grape seed, *polygonum cuspidatum* and ginkgo leaf was respectively 6.16, 42.13, 184.29, 15.86, 25.48 and 33.47 $\mu g/ml$. The IC_{50} of scavenging $\cdot OH$ was respectively 0.59, 5.59, 39.89, 2.93, 7.15 and 10.44 $\mu g/ml$. The IC_{50} of scavenging H_2O_2 was respectively 0.69, 24.02, 16.80, 1.34, 27.27 and 6.09 $\mu g/ml$. Conclusion: The scavenging capacities of catechin was the strongest.

Key words: antioxidant; oxygen radicals; chemiluminescence

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)05-0123-03

自由基是生物机体在生命活动过程中通过生物化学反应所产生的中间产物。在正常的生理情况下, 机体内自由基的产生和消除处于一个动态平衡之中, 其浓度也维持在较低水平, 此时, 自由基不仅不会损伤机体, 还可显示出独特的生理作用; 而在某些病理情况下, 机体自由基的产生和消除功能将失去平衡, 由于自由基具有很高的反应活性, 因此它将在分子、细胞乃至器官水平给机体造成损伤, 从而加快机体的衰老过程, 并可诱导癌症、心血管疾病等诸多疾病的发生^[1~4]。自 20 世纪 80 年代以来, 随着自由基生物学的迅猛发展, 在全世界范围内掀起了一股规模空前的开发、研究和利用

天然植物抗氧化剂的热潮^[5~6]。本试验主要通过化学发光法系统研究几种重要的天然植物抗氧化剂——儿茶素、甘草提取物、迷迭香提取物、葡萄籽提取物、虎杖提取物和银杏叶提取物清除氧自由基的能力, 为进一步合理开发新型专一型或复合型天然抗氧化剂产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 儿茶素、甘草提取物、葡萄籽提取物和虎杖提取物均购自湖南金农生物资源股份有限公司, 迷迭香提取物购自云南玉溪绿健生物工程有限公司, 银杏叶

收稿日期: 2004-05-20

基金项目: 湖南省教育厅重点资助项目(02A015)

作者简介: 田云(1979-), 男, 硕士, 主要从事天然产物的开发与研究。

提取物购自邳州富伟生化制品有限公司。

1.2 主要试剂 鲁米诺(色谱纯) Sigma 公司; 焦性没食子酸、 H_2O_2 、 CuSO_4 、1,10-菲啰啉、抗坏血酸均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 BPCL-2-GC 微弱发光测量仪、BPCL App 1.8.0 数据工作站 中国科学院北京生物物理研究所。

1.4 方法

1.4.1 清除能力^[7]

在样品池内依次加入一定浓度梯度的样品溶液 50 μl (以蒸馏水做空白对照), 然后加入 1 mmol/L 邻苯三酚 10 μl 、鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 10.2) 940 μl , 充分混匀后, 立即启动化学发光, 记录 30 s 内化学发光动力学曲线。

1.4.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力^[8]

在样品池内依次加入一定浓度梯度的样品溶液 50 μl (以蒸馏水做空白对照), 然后加入 1 mmol/L CuSO_4 溶液 50 μl 、1 mmol/L 1,10-菲啰啉溶液 50 μl 、硼酸-硼砂缓冲液 700 μl (pH 9.0), 充分混匀, 然后再加入 100 μl 1 mmol/L 抗坏血酸溶液和 50 μl 0.15% H_2O_2 溶液, 立即启动化学发光, 记录 240 s 内化学发光动力学曲线。

1.4.3 清除 H_2O_2 能力^[7]

在样品池内依次加入一定浓度梯度的样品溶液 50 μl (以蒸馏水做空白对照), 然后加入 15% H_2O_2 溶液 50 μl 、鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 9.5) 900 μl , 充分混匀后, 立即启动化学发光, 记录 60 s 内化学发光动力学曲线。

1.4.4 清除氧自由基能力评价^[9]

生物化学发光法测定氧自由基清除作用时, 一定浓度范围内发光强度(CL)与氧自由基数量呈量效关系, 因此可以用 CL 表示氧自由基的相对产生量。而清除氧自由基的物质则可以降低 CL, 根据 CL 的下降则可以判断某物质清除氧自由基的能力。

发光抑制率(%) = $(\text{CL}(\text{空白对照}) - \text{CL}(\text{样品})) / \text{CL}(\text{空白对照}) \times 100\%$

以发光抑制率为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘出发光抑制曲线。一般用发光抑制率为 50% 时的浓度 IC_{50} 来衡量样品对氧自由基的清除能力。 IC_{50} 越小, 表明样品清除氧自由基的能力越强, 反之, IC_{50} 越大, 表明样品清除氧自由基的能力越弱。

2 结果与分析

2.1 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力比较

以发光强度为纵坐标, 发光时间为横坐标记录不同浓度抗氧化剂清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的发光动力学曲线(以图 1 不同浓度儿茶素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的发光动力学曲线为代表, 其它抗氧化剂清除超氧阴离子的发光动力学曲线与此类似)。从图中可以看出: 不同浓度儿茶素均可以使发光动力学曲

线发生明显的变化, 表现为发光峰值和发光曲线面积的降低, 且降低程度与浓度相关。从表 1 中看出: 儿茶素、甘草提取物、迷迭香提取物、葡萄籽提取物、虎杖提取物和银杏叶提取物对的清除能力 IC_{50} 分别为 6.16、42.13、184.29、15.86、25.48 和 33.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因此, 它们清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力大小依次为: 儿茶素、葡萄籽提取物、虎杖提取物、银杏叶提取物、甘草提取物和迷迭香提取物。并且儿茶素对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力明显强于其它抗氧化剂, 大约是葡萄籽提取物的 2 倍, 是迷迭香提取物的 30 余倍, 迷迭香提取物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力最弱。

2.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力比较

以发光强度为纵坐标, 发光时间为横坐标记录不同浓度抗氧化剂清除 $\cdot\text{OH}$ 的发光动力学曲线(以图 2 不同浓度儿茶素清除 $\cdot\text{OH}$ 的发光动力学曲线为代表, 其它抗氧化剂清除超氧阴离子的发光动力学曲线与此类似)。从图中同样可以看出: 各种浓度的儿茶素均能使发光动力学曲线的发光峰值和发光曲线面积发生降低, 降低程度与浓度相关。从表 1 中看出: 儿茶素、甘草提取物、迷迭香提取物、葡萄籽提取物、虎杖提取物和银杏叶提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力 IC_{50} 分别为 0.59、5.59、39.89、2.93、7.15 和 10.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因此, 它们清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力大小依次为: 儿茶素、葡萄籽提取物、虎杖提取物、甘草提取物、银杏提取物和迷迭香提取物。儿茶素清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力同样普遍高于其它抗氧化剂, 是葡萄籽提取物的 5 倍之多, 迷迭香提取物的 60 倍之多, 迷迭香提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力同样最弱。

2.3 清除 H_2O_2 能力比较

以发光强度为纵坐标, 发光时间为横坐标记录不同浓度抗氧化剂清除 H_2O_2 的发光动力学曲线(以图 3 不同浓度儿茶素清除 H_2O_2 的发光动力学曲线为代表, 其它抗氧化剂清除 H_2O_2 的发光动力学曲线与此类似)。图中显示: 不同浓度儿茶素都可以使发光动力学曲线的发光峰值和发光曲线面积发生降低, 降低程度与浓度相关。从表 1 中看出: 儿茶素、甘草提取物、迷迭香提取物、葡萄籽提取物、虎杖提取物和银杏叶提取物对 H_2O_2 的清除能力 IC_{50} 分别为 0.69、24.02、16.80、1.34、27.27 和 6.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因此, 它们清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力大小依次为: 儿茶素、葡萄籽提取物、银杏提取物、迷迭香提取物、甘草提取物和虎杖提取物。儿茶素清除 H_2O_2 的能力普遍比其它抗氧化剂强, 约为葡萄籽提取物的 2 倍, 为虎杖提取物的 40 倍, 虎杖提取物对 H_2O_2 的清除能力最弱。

3 讨论

本试验结果表明: 同一植物抗氧化剂对不同氧自由基具有不同的清除能力, 不同植物抗氧化剂对相同的氧自由基也具有不同的清除能力。儿茶素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和

表1 不同植物抗氧化剂清除氧自由基能力比较
Table 1 The ability of scavenging oxygen radicals

抗氧化剂	IC ₅₀ (μg/ml)		
	O ₂ ^{•-}	•OH	H ₂ O ₂
儿茶素	6.16	0.59	0.69
甘草提取物	42.13	5.59	24.02
迷迭香提取物	184.29	39.89	16.80
葡萄籽提取物	15.86	2.93	1.34
虎杖提取物	25.48	7.15	27.27
银杏叶提取物	33.47	10.44	6.09

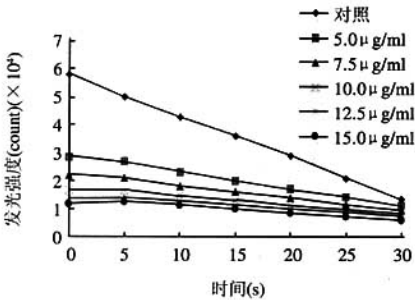


图1 不同浓度儿茶素抑制O₂^{•-}发光曲线
Fig.1 Luminous curves of inhibited by different content catechin

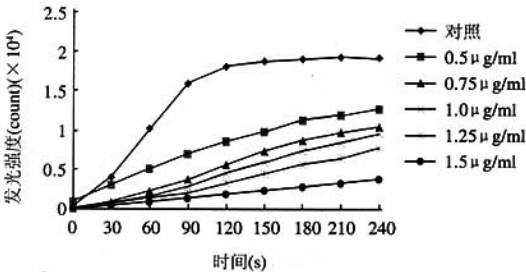


图2 不同浓度儿茶素抑制•OH发光曲线
Fig.2 Luminous curves of •OH inhibited by different content catechin

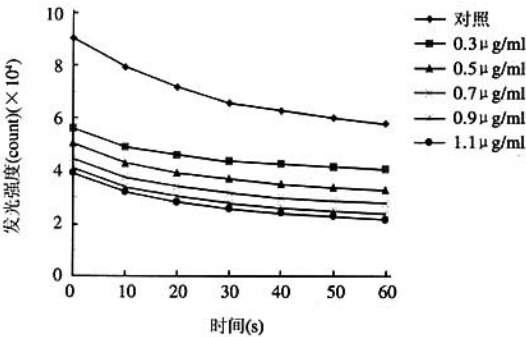


图3 不同浓度儿茶素抑制H₂O₂发光曲线
Fig.3 Luminous curves of H₂O₂ inhibited by different content catechin

稍弱；甘草提取物清除O₂^{•-}、•OH和H₂O₂的能力IC₅₀分别为42.13、5.59和24.02μg/ml，其清除•OH的能力最强，清除H₂O₂的能力次之，清除O₂^{•-}的能力最弱；迷迭香提取物清除O₂^{•-}、•OH和H₂O₂的能力IC₅₀分别为184.29、39.89和16.80μg/ml，其清除H₂O₂的能力最强，清除•OH的能力次之，清除O₂^{•-}的能力最弱；葡萄籽提取物清除O₂^{•-}、•OH和H₂O₂的能力IC₅₀分别为15.86、2.93和1.34μg/ml，和迷迭香提取物的清除效果类似，其清除H₂O₂的能力最强，清除•OH的能力次之，清除O₂^{•-}的能力最弱，只是其清除能力均比对应的迷迭香提取物要强得多；虎杖提取物清除O₂^{•-}、•OH和H₂O₂的能力IC₅₀分别为25.48、7.15和27.27μg/ml，其清除•OH的能力最强，清除O₂^{•-}的能力次之，清除H₂O₂的能力最弱，但对O₂^{•-}和H₂O₂的清除能力相差不大；银杏叶提取物清除O₂^{•-}、•OH和H₂O₂的能力IC₅₀分别为33.47、10.44和6.09μg/ml，其清除H₂O₂的能力最强，清除•OH的能力次之，清除O₂^{•-}的能力最弱。目前，虽然报道的植物抗氧化剂种类繁多，但系统研究它们对各种氧自由基的专一清除能力较少，因此，人们对各种抗氧化剂的作用机理也缺乏正确的认识，同时对复合抗氧化剂协同增效抗氧化机理的研究尚处于初步研究阶段。本试验通过研究各种植物抗氧化剂对3种主要氧自由基的专一清除能力，为进一步进行复合抗氧化剂的优化配方设计及其协同增效抗氧化作用机理提供实验基础和科学依据。

参考文献：

[1] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基医学与农学基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 2001.

[2] 赵保路. 氧自由基与天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[3] Gutteridge J M C. Free radicals in medicine[J]. BMJ, 1994, 6955(309): 678.

[4] Tabatabaie T, Vasquez-Weldon A, Moore D R, et al. Free radicals and the pathogenesis of yype 1 diabetes: β -cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2 [J]. Diabetes, 2003, 52(8): 1994-1999.

[5] Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 71(1-2): 23-43.

[6] Seifried H E, McDonald S S, Anderson D E, et al. The anti-oxidant conundrum in cancer[J]. Cancer Research, 2003, 63 (15): 4295-4298.

[7] 徐红, 刘峻, 王峰涛, 等. 5种石斛及其组织培养物对活性氧的清除作用[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(2): 35-37.

[8] 范小兵, 李慈娟, 沙大年, 等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(6): 68-71.

[9] 王少敏, 李萍, 赵明强. 生物化学发光法测定酸枣仁的抗氧化活性[J]. 中草药, 2003, 34(5): 417-419.

H₂O₂的能力IC₅₀分别为6.16、0.59和0.69μg/ml，因此，其清除•OH和H₂O₂的能力相差不大，而清除O₂^{•-}的能力