



光谱法研究硒代大蒜新素与大蒜新素对DPPH自由基的清除作用

周美云, 李毅群, 陈填烽, 郑文杰*
(暨南大学化学系, 广东 广州 510632)

摘要: 通过化学合成手段, 制备富硒大蒜中的特征化合物——硒代大蒜新素, 以大蒜新素为对照, 采用光谱法研究两者清除DPPH自由基的能力。采用分光光度法测定DPPH自由基体系, 确定其检测波长为517nm, 稳定时间为30min。结果表明: 在优化的反应体系中, 硒代大蒜新素与大蒜新素对DPPH自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为15.3、387μmol/mL, 说明硒代大蒜新素具有良好的抗氧化活性, 能有效、快速地抑制溶液中DPPH自由基的形成。
关键词: 硒代大蒜新素; 大蒜新素; 大蒜; 抗氧化活性; DPPH自由基

Spectrophotometric Study of DPPH Radical Scavenging Activity of Allicin and Se-Allicin

ZHOU Mei-yun, LI Yi-qun, CHEN Tian-feng, ZHENG Wen-jie*
(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Se-allicin was synthesized chemically as a characteristic compound in Se-enriched garlic. The DPPH free radical activity of allicin and Se-allicin was evaluated by means of spectrophotometric measurement. The results showed that the detection wavelength and stabilization time for DPPH free radical system were 517 nm and 30 min, respectively. Se-allicin and allicin could effectively inhibit the formation of DPPH free radicals in a dose- or time-dependent manner. In the optimal system, the IC₅₀ values of Se-allicin and allicin were 15.3 μmol/mL and 387 μmol/mL, respectively, indicating better radical scavenging activity of Se-allicin.

Key words: Se-allicin; allicin; antioxidant activity; DPPH free radical

中图分类号: O627.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)03-0007-04

大蒜是人体循环及神经系统的天然强健剂^[1-5]。数千年来在中国、埃及、印度等国, 大蒜既作为食物又作为传统药物而广泛应用。在美国, 大蒜新素制剂已排在人参、银杏等保健药物中的首位, 它的保健功能可谓妇孺皆知。一般认为, 大蒜的营养保健作用与所含硫化化合物的抗氧化作用密切相关^[6-9]。

富硒大蒜是指含硒量较高的大蒜^[10-12], 其具有比普通大蒜更强的生物活性, 可强化大蒜抑制人体白血病、胃癌、肝癌、卵巢癌、口腔癌的作用^[13-15]。其原因自然与硒元素有关。硒与硫同属一主族, 其能够取代硫直接插入蒜氨酸的代谢途径, 生成硒代蒜氨酸, 进一步产生各类含硒化合物^[11], 硒代大蒜新素是富硒大蒜中含量最高的含硒化合物, 与大蒜新素互为同系物(用硒取代了大蒜新素中的硫元素), 结构相似。硒代大蒜新素在大蒜中的含量, 是区别普通大蒜与富硒大蒜的主要指标, 通过对硒代大蒜新素与大蒜新素的生物活性比较, 可以为普通大蒜与富硒大蒜在

生物活性上的差异提供有力的解释。遗憾的是, 即使是富硒大蒜中含量最大的含硒化合物——硒代大蒜新素^[16-18], 其含量依然很低, 无法纯化得到单体化合物, 所以人们尚未准确认识到该类化合物在生物活性中所扮演的关键角色。本实验采用化学合成法, 合成了大蒜新素与硒代大蒜新素, 用比色法测定其清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基能力、动力学特性以及IC₅₀, 并比较两者在抗氧化活性方面的差异, 初步揭示富硒大蒜中硒代大蒜新素的抗氧化功能, 为富硒大蒜具有比普通大蒜更好的抗氧化活性提供了新的解释, 亦为富硒大蒜的推广提供了新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

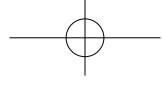
硒粉、硼氢化钠、溴丙烯、高纯硫、硫化钠 阿拉丁试剂(上海)有限公司。

收稿日期: 2011-12-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000816; 21071062)

作者简介: 周美云(1978—), 女, 实验师, 博士研究生, 研究方向为富硒食品。E-mail: tzhoumy@jnu.edu.cn

*通信作者: 郑文杰(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为硒化学。E-mail: tzhwj@jnu.edu.cn



UV3600紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司；电子天平Acculab ALC210 德国Sartorius公司。

1.2 方法

1.2.1 大蒜新素与硒代大蒜新素的合成

1.2.1.1 合成大蒜新素

首先按文献[19]方法合成二硫化钠，然后在搅拌条件下小心缓慢滴入化学计量的溴丙烯，滴加完毕后加热回流3h。而后用石油醚萃取，用硅胶柱纯化得到大蒜新素样品，结构如图1所示。

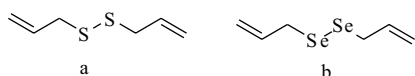


图1 大蒜新素(a)与硒代大蒜新素(b)的化学结构

Fig.1 Chemical structures of allicin (a) and Se-allicin (b)

1.2.1.2 硒代大蒜新素的合成^[20]

取4g(0.1mol)氢氧化钠固体溶于50mL水中，然后加入7.9g(0.1mol)硒粉和0.001g四乙基溴化铵。另取0.5g(0.0132mol)硼氢化钠固体和0.4g(0.01mol)氢氧化钠固体，并于冰水浴中加入10mL水溶解，而后于氮气保护和强烈搅拌下将硼氢化钠碱液滴入上述的硒溶液中，室温条件下反应1h后，升温至90℃反应30min，得到具有特征棕红色0.05mol的碱性二硒化钠水溶液。将制得的上述溶液与烯丙基溴搅拌3h，生成黄色溶液，过滤分离，即得硒代大蒜新素。

1.2.2 DPPH自由基清除实验

取无水乙醇配制成的 5×10^{-5} mol/L 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基溶液2mL加入10mL比色管中，再加入一定量抗氧化剂溶液，无水乙醇补充体积至10mL刻度，充分混匀30min后在520nm左右波长处检测其吸光度，并按下式计算其清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_s}{A_0}) \times 100$$

式中： A_0 为无抗氧化剂空白的吸光度； A_s 为加抗氧化剂时吸光度。

1.2.3 半数抑制率(IC₅₀)的计算

以样品的浓度对自由基清除率作图并进行线性拟合，并计算IC₅₀值，其中IC₅₀值定义为清除率为50%时所需抗氧化剂的浓度。

2 结果与分析

2.1 DPPH反应体系的吸收光谱及测定波长的确定

DPPH自由基其醇溶液呈紫色，当有自由基清除剂存在时，由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失，其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系，因而可用分光光度计进行快速的定量分析。本研究对DPPH自由基、

大蒜新素及硒代大蒜新素的乙醇溶液进行UV-Vis光谱扫描，结果如图2所示。DPPH溶液在517nm波长处出现特征吸收峰，而大蒜新素以及硒代大蒜新素在450nm波长以上范围没有吸收峰，说明这两种物质本身不会对反应测定造成干扰。

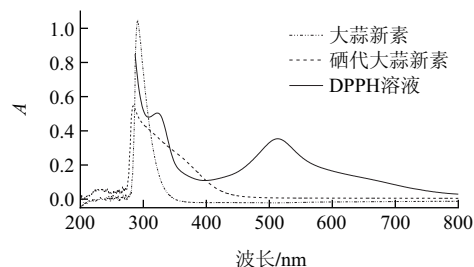


图2 DPPH溶液、大蒜新素、硒代大蒜新素的UV-Vis光谱吸收曲线

Fig.2 Absorption spectra of DPPH, Se-allicin and allicin

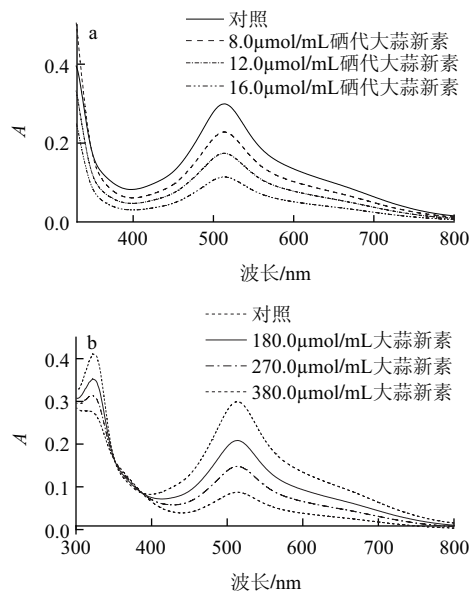


图3 添加硒代大蒜新素(a)与大蒜新素(b)后DPPH溶液UV-Vis光谱吸收曲线的变化

Fig.3 Effect of the presence of Se-allicin (a) or allicin (b) on absorption spectrum of DPPH

由图3可知，加入上述两物质后，DPPH溶液在517nm波长处的吸收峰呈剂量效应，具有较好的线性关系，因此本实验选择517nm波长作为DPPH自由基清除实验的检测波长。

2.2 DPPH体系的反应动力学

在DPPH自由基清除实验中，体系反应稳定时间是关键影响因素。为了解所采用的DPPH体系的反应动力学特性，研究DPPH溶液在加入大蒜新素和硒代大蒜新素后吸光度随时间变化的规律，如图4所示，在 5×10^{-5} mol/L DPPH乙醇溶液中分别加入硒代大蒜新素(终浓度分别为4.6、12μmol/mL)和大蒜新素(终浓度为180、370μmol/mL)

样品后,体系的特征吸收峰 $A_{517\text{nm}}$ 在4min内显著下降,在4min后,体系基本趋于平衡,至30min时, $A_{517\text{nm}}$ 达到完全稳定状态,说明对于不同的抗氧化剂,30min是合适、稳定的反应时间点,可进一步用于剂量效应研究。

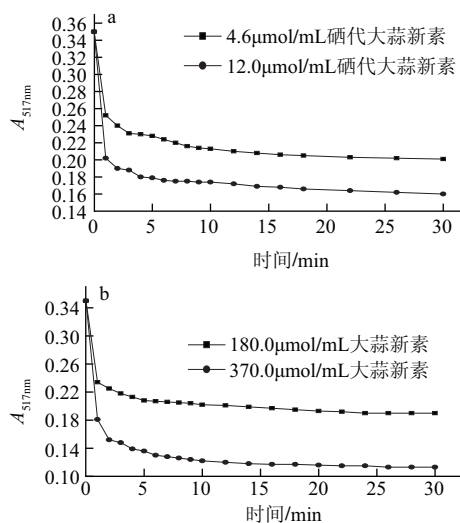


图4 添加硒代大蒜新素(a)与大蒜新素(b)后DPPH溶液在517nm波长处的吸光度随时间的变化规律

Fig.4 Changes over time in absorbance at 517 nm of DPPH with added Se-allyl (a) or allyl (b)

2.3 抗氧化剂清除DPPH自由基的剂量效应及其对比评价

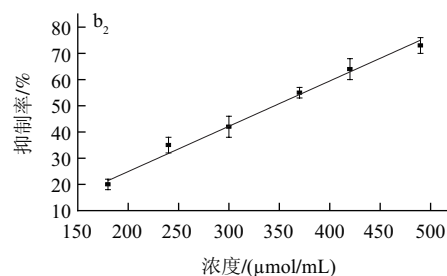
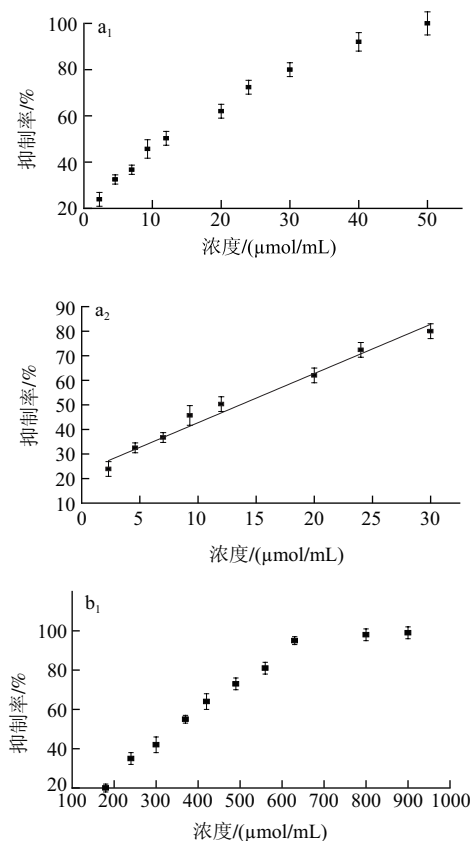


图5 硒代大蒜新素(a)与大蒜新素(b)对DPPH自由基抑制作用的剂量与线性关系

Fig.5 Linear dose-dependent DPPH free radical scavenging activity of Se-allyl (a) and allyl (b)

根据以上选定的测定波长和反应时间,测定一系列浓度(倍比稀释)的大蒜新素和硒代大蒜新素对DPPH自由基的清除率,计算相应抗氧化剂的 IC_{50} 值,并对其抗氧化活性进行对比评价。由图5可知,对于DPPH反应体系,硒代大蒜新素和大蒜新素分别在2.5~30 $\mu\text{mol/mL}$ 和180~500 $\mu\text{mol/mL}$ 的浓度范围内对自由基清除率有良好的线性关系,据此可计算硒代大蒜新素、大蒜新素的 IC_{50} 值分别为15.3、385 $\mu\text{mol/mL}$ 。结果提示,富硒大蒜中硒元素插入蒜氨酸的代谢途径后,产生的含硒化合物比对应的含硫化合物的抗氧化活性大幅增加,这在一定程度上说明了富硒大蒜具有更高生物活性和营养价值的原因,也预示着富硒大蒜具备良好的市场前景和开发潜力。

3 结论

通过化学合成手段,制备了大蒜中最具代表性的含硫化合物——大蒜新素,以及富硒大蒜中的特征化合物——硒代大蒜新素,研究并比较了两者清除DPPH自由基的能力及其光谱学特征。结果表明:采用分光光度法测定两者清除DPPH自由基能力,确定其测定波长为517nm,稳定时间为30min。在优化的反应体系中,硒代大蒜新素与大蒜新素对DPPH自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为15.3、385 $\mu\text{mol/mL}$,硒代大蒜新素的抗氧化活性明显强于大蒜新素,为富硒大蒜比普通大蒜具有更强的生物活性这一实验现象的解释提供了一定的依据,预示着富硒大蒜具备良好的市场前景和开发潜力。

参考文献:

- [1] 殷永新. 大蒜素抗肿瘤的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007(17): 50-51.
- [2] 傅乃武, 黄磊. 大蒜油和大蒜素的抗氧化作用[J]. 中国医学科学院学报, 1993, 15(4): 295-301.
- [3] 张庭廷, 刘爱民, 刘锡云. 大蒜素口服液抗氧化及延缓衰老作用的试验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 64-64.
- [4] 尹春晖, 霍诗然. 大蒜素抗癌作用及其机制研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 270-272.



- [5] 闫淼森, 许真, 徐蝉. 大蒜功能成分研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 312-318.
- [6] NIKOLIC V, STANKOVIC M, NIKOLIC L, et al. Mechanism and kinetics of synthesis of allicin[J]. Pharmazie, 2004, 59(1): 10-14.
- [7] OKADA Y, TANAKA K, FUJITA I, et al. Antioxidant activity of thiosulfonates derived from garlic[J]. Redox Report, 2005, 10(2): 96-102.
- [8] 李莉华, 吕慧, 杨立刚, 等. 大蒜油和洋葱油对四氧嘧啶致糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 344-348.
- [9] OKADA Y, TANAKA K, SATO E, et al. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2006, 4(22): 4113-4117.
- [10] IP C, LISK D J. Enrichment of selenium in *Allium* vegetables for cancer prevention[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(9): 1881-1885.
- [11] SEO T C, SPALLHOLZ J E, YUN H K, et al. Selenium-enriched garlic and cabbage as a dietary selenium source for broilers[J]. J Med, 2008, 11(4): 687-692.
- [12] 段永新, 唐志刚, 曹幼琴. 富硒大蒜对抑菌的增效作用[J]. 生物学杂志, 1995(4): 30-47.
- [13] 段永新. 富硒大蒜的抑菌增效作用[J]. 食品科学, 1995, 26(4): 76-76.
- [14] 方勇, 罗佩竹, 胡勇, 等. 大蒜的生物富硒作用及其硒的形态分析[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 1-5.
- [15] AUGER J, YANG W, ARNAULT I, et al. High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“allicins” in garlic and onion grown in Se-rich soil[J]. Journal of Chromatography, 2004, 1032: 103-107.
- [16] CAI X J, UDEN P C, BLOCK E, et al. *Allium* chemistry: identification of natural abundance organoselenium volatiles from garlic, elephant garlic, onion, and Chinese chive using headspace gas chromatography with atomic emission detection[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(10): 2081-2084.
- [17] GE H, CAI Z J, TYSON J F, et al. Identification of selenium species in selenium-enriched garlic, onion and broccoli using high-performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection[J]. Anal Commun, 1996, 33(8): 279-281.
- [18] 王卫真, 唐家骏, 彭安. 富硒大蒜含硒蛋白的分离、鉴定和生物活性研究[J]. 生物化学, 1989, 5(3): 229-234.
- [19] VAIDYA V, INGOLD K U, PRATT D A. Garlic: source of the ultimate antioxidants-sulfenic acids[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2009, 48(1): 157-160.
- [20] DERYAGINA E N, KORCHEVIN N A, RUSSAVSKAYA N V, et al. A mechanism for the hydrogenation of the double bond in the synthesis of allyl chalcogenides in the hydrazine hydrate-potassium hydroxide system[J]. Russ Chem Bull, 1998, 47(9): 1827-1829.