

用化学发光法研究黄酮化合物 对 $O_2^- \cdot$ 和 $\cdot OH$ 的清除

胡 春¹⁾ 丁霄霖

(食品学院)

摘要 在对化学发光法的产生体系进行改良的基础上,研究了黄酮化合物对超氧阴离子及羟基自由基的清除作用,结果表明黄酮化合物的结构同自由基的清除作用密切相关,对自由基的清除机理可能是作为氢供体以及稳定基中间体而阻断自由基的链式反应。

主题词 化学发光法;黄酮化合物;超氧阴离子;羟基自由基;清除

中图分类号 TQ460.1

0 引言

黄酮类化合物在自然界中分布极其广泛,尤其以芸香料、石南科、唇形科、玄参科、豆科、杜鹃科、菊科等植物中较多,以游离的甙元或与糖等结合的甙的形式存在。

黄酮类化合物具有各种不同取代情况的酚羟基,分子中心的 α, β 不饱和吡喃酮使其表现出一定抗氧化活性,60年代 Latten^[1,2] 对黄酮化合物在亚油酸及亚油酸甲酯体系中的抗氧化能力作了研究^[1,2]。对天然化合物的生物活性需要用多种体系相互补充来研究,从而搞清每种天然或合成的化合物在不同的体系中的真实效应。

活性氧自由基是一些处于激发状态的含氧基团,如超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$),羟基自由基($\cdot OH$),烷氧基($RO \cdot$),单线态氧(1O_2)等,它们具有高度的反应活性,可以导致食品体系中油脂的自动氧化,从而引起食品物理和化学特性的破坏,以及某些毒效应;更为严重的是,若不及时清除体内过多的氧自由基,将导致机体的组织损伤。近年来不少功能性食品(特别是老年食品)或多或少地与清除活性氧自由基有一些关系,但研究手段的局限性束缚了对它们的研究,因而需要一种简单易行的方法进行研究。初期的研究表明黄酮类化合物具有清除超氧阴离子的能力。

发光现象是由于高能级的激发态分子向基态跃迁时由发射光子所产生的。处于激发态的分子带有较高能量,因而不稳定的,会以某种形式释放出激发能。自由基基本上处于一种受激状态,是存在跃回基态的可能的,而它回复基态的过程也正是化学发光的过程。基于

1) 作者现地址:广州大学轻化系,广州,510091
收稿日期:1995 03 24

此,以某一时刻的发光强度或发光总量的变化来表征反应中相应的自由基的变化就成为一种可能。

1 实验材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

黄嘌呤氧化酶 上海东风试剂公司(自牛乳中提取)

黄嘌呤,鲁米诺(3-氨基苯二甲酰肼) Sigma 产品

槲皮素,芦丁,桑色素,橙皮甙 国产试剂级

SHG-1 生物化学发光测量仪 上海市技术监督局实验工厂(联计算机)

1.2 实验方法

1.2.1 黄酮清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的研究 将 4 种黄酮化合物溶于乙醇溶液,并用 pH7.8 的磷酸缓冲液配成不同稀释度的样品应用液,用化学发光法检测黄酮类化合物对发光强度的抑制,记录每 6s 的发光强度积分 Cp_{6s} ,根据对发光强度的抑制率来比较清除能力的强弱。

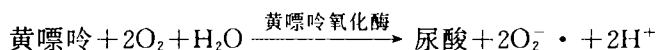
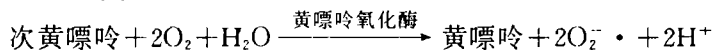
$$\text{抑制率}(\%) = \frac{Cp_{6s\text{空白}} \cdot Cp_{6s\text{样品}}}{Cp_{6s\text{空白}}} \times 100\%$$

比较抑制能力是以半抑制浓度作为指标的,即在每种物质的发光抑制率-浓度曲线上达到抑制率 50% 时的样品浓度,记为半抑制浓度 IC_{50} 。

发光杯中依次加入 $10\mu\text{l}$ 的 0.1u/ml 的黄嘌呤氧化酶, $100\mu\text{l}$ 的样品应用液,预恒温 30°C ,用同样温育的 $900\mu\text{l}$ 的黄嘌呤-鲁米诺(9:1)启动化学发光反应,立即开始记录。本底不加黄嘌呤氧化酶,样品应用液用 $100\mu\text{l}$ 的磷酸缓冲液代替;空白对照组加黄嘌呤氧化酶,样品应用液用 $100\mu\text{l}$ 的磷酸缓冲液代替。测量室温度 30°C ,高压 550V,甄别电压 0.2V。

1.2.2 黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 的研究 抑制能力以 IC_{50} 进行比较。体系中依次加 2mmol/L 的新鲜抗坏血酸 $200\mu\text{l}$, 2mmol/L 的 CuSO_4 $400\mu\text{l}$, 75mg/ml 的调理酵母的磷酸缓冲溶液 $200\mu\text{l}$, 10^{-4}mol/L 的鲁米诺 $50\mu\text{l}$, pH7.8 的磷酸缓冲液 $600\mu\text{l}$ 以及 $100\mu\text{l}$ 的样品液,用 68mmol/L 的 H_2O_2 的磷酸缓冲液 $600\mu\text{l}$ 启动反应,同时开始记录 Cp_{6s} 。本底不加 H_2O_2 ,空白对照组用磷酸缓冲液代替样品。测量室温度 30°C ,高压 550V,甄别电压 0.2V。

2 结果与分析



在碱性条件下,鲁米诺可以被一些氧化剂如 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 氧化产生化学发光,反应中吸收化学能而跃迁到激发态,然后通过能级跃迁释放出光子^[1],产生最大发射波长为 $425\sim 430\text{nm}$ 的化学发光^[2],实验中发现黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤-鲁米诺体系产生的发光强度随 pH 的变化而变化,如图 1。Fridovich 曾指出,在黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤氧化为尿酸的过程中,单电子与双电子反应的比值并不固定,而是随着 pH, O_2 分压和黄嘌呤浓度的变化而改变,如提高 pH 与 O_2 的分压,可显著提高超氧阴离子的产生,但增加黄嘌呤浓度则降低超氧阴离子的产额,显然对于日常的实验条件,改变氧气分压较为麻烦,因此提高超氧阴离子的产额主要应通过提高 pH 的方法来获得。同时这对鲁米诺的发光也是有帮助的,因为鲁米诺发光也是

在碱性条件下最大。

超氧化物歧化酶(SOD)是催化 $O_2^{\cdot -}$ 歧化的唯一的酶,反应体系中,随着 SOD 的加入,反应体系中的超氧阴离子自由基逐渐被清除,图 2 中的曲线明显反映了这一点。SOD 加入的量越大,体系中的发光强度降低得越多,相对而言碱性条件下超氧阴离子自由基比较稳定^[3],不易发生歧化而生成 H_2O_2 ,因此在碱性条件下该 $O_2^{\cdot -}$ 发生体系才能有一个相对较长的发光稳定期,加入 SOD 则产生酶促歧化反应,即时的发光强度降低,这一结果佐证了体系中超氧阴离子自由基的产生。

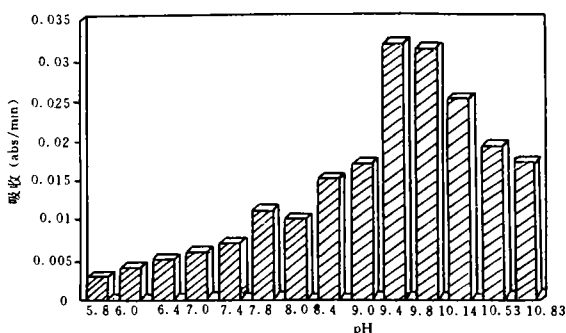


图1 pH对黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤-鲁米诺体系生成 $O_2^{\cdot -}$ 的速度的影响

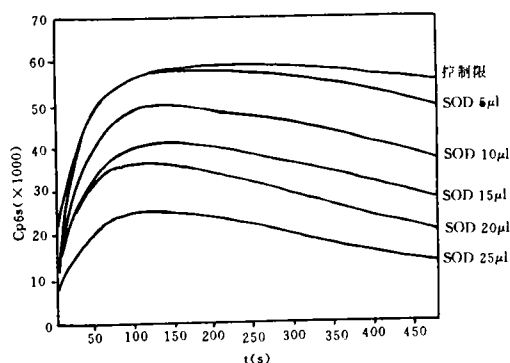


图2 SOD对黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤-鲁米诺体系的发光强度的影响

羟基自由基是几种自由基中反应活性最高的,羟基自由基的产生主要是通过 Fenton 反应形成的,本体系中是通过铜离子催化的 Haber-Weiss 反应产生羟基自由基的。

在对自由基进行清除时,反应体系中同一时刻,发光强度越大,意味着体系中产生的自由基越多;发光强度降低,表明一部分自由基已被清除。在发光体系中随着黄酮化合物的加入,发光强度下降,对氧自由基的抑制率上升,说明黄酮化合物是有作用的。体系中,抑制率与样品的浓度有关,添加的黄酮化合物浓度越大,发光强度下降得越厉害,表明 4 个黄酮化合物可以有效清除 $O_2^{\cdot -}$,并且其作用是呈量效关系的。然而不同的化合物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力是不一样的,如图 3~5 所示。

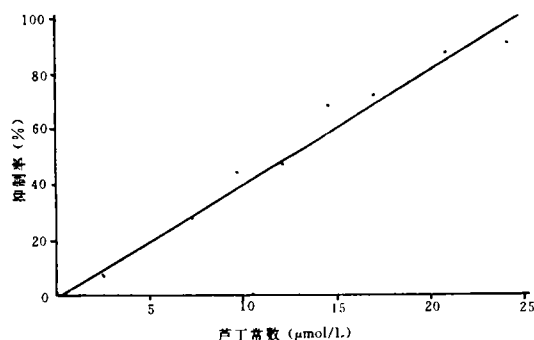


图3 芦丁对 $O_2^{\cdot -}$ 清除作用

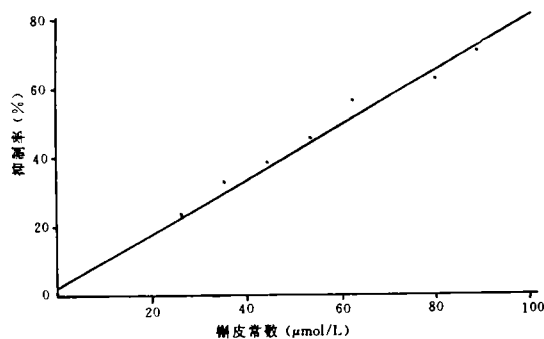


图4 槲皮素对 $O_2^{\cdot -}$ 清除作用

在同一体系中,清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力以半抑制浓度比较,芦丁的 IC_{50} 为 $12.4\mu mol/L$,槲皮素的 IC_{50} 为 $60.6\mu mol/L$,桑色素 IC_{50} 为 $770\mu mol/L$,橙皮苷 IC_{50} 为 $813\mu mol/L$,因此,4 种黄酮清除超氧阴离子自由基的能力按如下顺序:

芦丁>槲皮素>桑色素>橙皮苷

4 种黄酮化合物清除 $\cdot OH$ 的结果如图 6~9(图中所注浓度均为化合物在体系中的最终浓度),它们的共同点均为浓度增加清除作用加强,反映在图上的是抑制率的增加,其中达到相同的抑制率,比方说抑制率 50% 时,芦丁和槲皮素之间的差别似乎不大,至少在数量级上是相同的,但是如果以全部清除的浓度进行比较的话,很显然槲皮素所需浓度最低,其次是芦丁,桑色素再次之,与清除超氧阴离子的作用类似,橙皮苷的作用最差。总的来说清除 $\cdot OH$ 和清除 $O_2^{\cdot -}$ 的顺序是一致的。

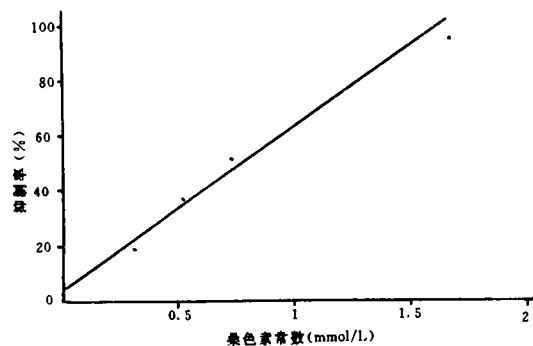


图 5 桑色素对 $O_2^{\cdot -}$ 清除作用

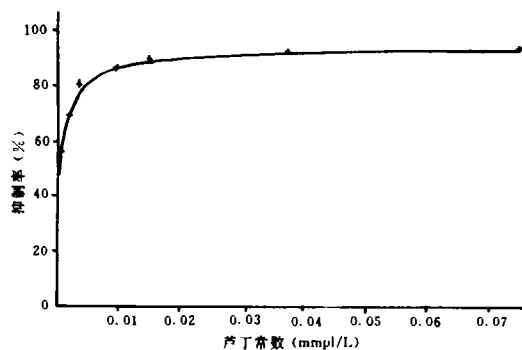


图 6 芦丁在 Cu^{2+} -抗坏血酸-酵母-鲁米诺- H_2O_2 体系中对 $\cdot OH$ 的清除作用

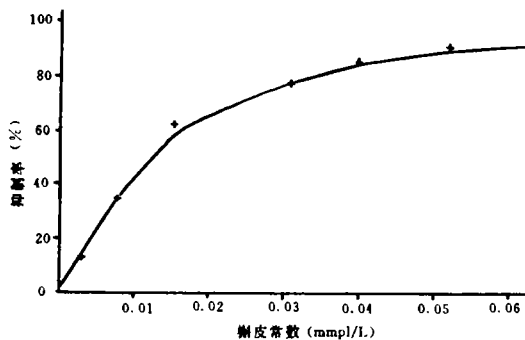


图 7 槲皮素在 Cu^{2+} -抗坏血酸-酵母-鲁米诺- H_2O_2 体系中对 $\cdot OH$ 的清除作用

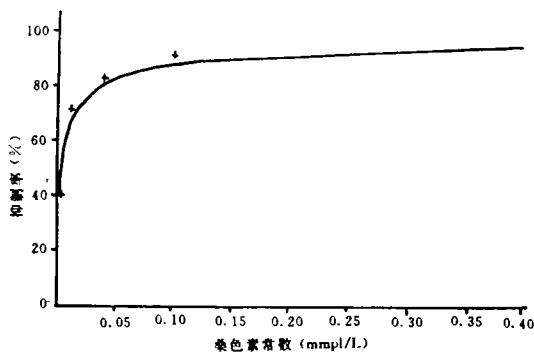


图 8 桑色素在 Cu^{2+} -抗坏血酸-酵母-鲁米诺- H_2O_2 体系中对 $\cdot OH$ 的清除作用

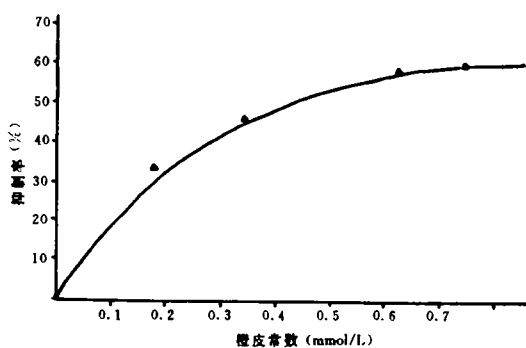
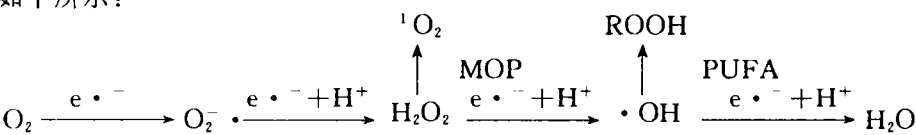


图 9 橙皮苷在 Cu^{2+} -抗坏血酸-酵母-鲁米诺- H_2O_2 体系中对 $\cdot OH$ 的清除作用

3 讨 论

从实验结果中我们可以发现,如果黄酮化合物具有游离的 *B* 环邻二羟基则对以上的两种氧自由基的清除作用特别明显,提示了黄酮化合物对该两种自由基的清除首先是作为氢供体参与的, C_4 , -OH 容易供氢;供氢以后还可以形成分子内的氢键,则自由基中间体稳定,自由基的链式反应被抑制。这一结果对从天然植物中提取黄酮类化合物作为氧自由基的清除剂具有指导性的意义。

以上结果证明,黄酮化合物确实具有清除 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的能力,其中对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除显得更重要。虽然 $\cdot OH$ 反应活性高于 $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ 一旦形成即可以与周围的物质迅速起反应。但是人体内 $\cdot OH$ 的形成的前提是先形成 $O_2^{\cdot -}$, 其它种类的活性氧的形成也和 $O_2^{\cdot -}$ 有关^[4], 如下所示:



在上面的示意式中, $O_2^{\cdot -}$ 形成最早,而 $\cdot OH$ 的作用最强,ROOH 的链锁反应循环最持久,因此,一旦清除了 $O_2^{\cdot -}$ 则使 $\cdot OH$ 等的生成变为无源之水,可以从根本上预防体内形成过多的不必要的 $\cdot OH$ 和其它相应的活性氧自由基,从而达到防止老年性的退行性变化、预防和延缓衰老的目的。

参 考 文 献

- 1 Latten A. J. Food Sci. 1966,31:518~528
- 2 Latten A. J. Food Sci. 1966,31:395~401
- 3 White E M. J. Am. Chem. Soc. 1966,86(5):941
- 4 Paul D B. Talanta 1978,25:377~382
- 5 郑荣梁. 自由基生物学. 北京:高等教育出版社,1992
- 6 Fridovich I. Science. 1978,201:875

Research of the Scavenging Capacities of Flavonoid on Superoxide Radical and Hydroxy Radical by Chemiluminescent Method

Hu Chun Ding Xiaolin
(School of Food Science & Technology)

Abstract Based on the achievement of the chemiluminescent method, the scavenging capacity of flavonoid on superoxide radcal($O_2^{\cdot -}$ and hydroxy radical ($\cdot OH$) was studied. The results showed that the scavenging capacities of flavonoids were closely related to their structure. The mechanism was proposed that flavanoids acted as hydrogen donor and then as a stablizer of radical intermediate terminate free radical chain reaction.

Subject-words Chemiluminescent method; Flavonoid; Superoxide; Hydroxy radical; Scavenge