

文章编号: 1009-038X(2000)06-0574-05

六月霜中提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 自由基

张虹, 许钢, 张辉

(杭州商学院食品科学与工程系, 浙江杭州 310035)

摘要: 应用氮蓝四唑(NBT)光还原法, 对六月霜中提取物清除超氧离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的效果进行了测定. 结果显示, 六月霜提取物对超氧离子自由基有较强的清除效果, 清除效果与提取物中黄酮质量浓度有关, 当黄酮质量浓度达到一定值时, 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果可高达 88.41%. 提取物与抗坏血酸(Vc)进行了对照实验, 结果显示其对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力比 Vc 高. 六月霜提取物在 $Vc-Cu^{2+}-H_2O_2$ 体系中, 对 $OH^{\cdot}$ 自由基的清除效果的研究显示, 最高清除率为 84.02%.

关键词: 六月霜; 提取物; 清除; 超氧离子自由基 $O_2^{\cdot-}$; $OH^{\cdot}$ 自由基

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

Scavenging Capacity of *Artemisia anomala* S. Moore on Superoxide Free Radical and Hydroxyl Free Radical

ZHANG Hong, XU Gang, ZHANG Hui

(Department of Food Science and Engineering, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035)

Abstract: The scavenging superoxide free radical ($O_2^{\cdot-}$) capacity of *Artemisia anomala* S. Moore was studied by nitro blue tetrazolium (NBT) photo-reduction. The result showed that the extract from *Artemisia anomala* S. Moore has strong scavenging effect on superoxide free radical. The scavenging effect has relation to the content of the flavonoids. When the concentration of the flavonoids in extract is high enough, it has strong scavenging rate which is 88.41%. Using the models of $Vc-Cu^{2+}-H_2O_2$ for hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), the scavenging capacity of the extract of *Artemisia anomala* S. Moore on $OH^{\cdot}$ was investigated. The maximum scavenging capacity on hydroxyl radical is 84.02%.

Key words: *Artemisia anomala* S. Moore; extract; scavenge; superoxide free radical; hydroxyl free radical

六月霜又名奇蒿或刘寄奴, 是常用中草药之一, 夏季江、浙一带民间有取其全草泡水饮用的习俗. 此茶不仅有解暑、清凉之作用, 且口感良好, 是暑天不可多得的饮料. 而且六月霜提取物对抵抗侵害人体细胞的自由基有显著效果, 若是能加以开

发利用, 制成保健饮料, 定能取得较好的经济和社会效益. 六月霜主要化学成分有 5, 7-二羟基-6, 3', 4'-三甲基黄酮、西米杜鹃醇、生物碱、其它黄酮类化合物及其衍生物和酚类等^[1]. 有文献报道, 多种黄酮类化合物具有抗氧化作用, 并认为此类化合物的

收稿日期: 2000-02-19; 修订日期: 2000-09-26.

作者简介: 张虹(1962-), 女, 北京人, 在职博士研究生, 讲师.

药理作用与其抗氧化作用有关^[2]. 但目前对六月霜的研究还不够深入, 国内外文献对六月霜提取物清除 O₂^{·-}和 OH[·]自由基的能力更未见报道. 因此, 本研究的目的是探讨六月霜提取物对 O₂^{·-}和 OH[·]自由基的清除能力, 在研究中除关注提取物中粗黄酮含量对清除能力的影响外, 还将提取物中的固含量作为参考数据进行比较, 以期找出其规律性, 为进一步研究打下基础.

自由基为细胞代谢过程中连续不断产生的具有高度活性的物质, 它对细胞具有损伤作用. 自由基及其诱导的氧化反应会引起膜损伤和交联键的形成, 其结果是降低了酶的活性, 使核酸代谢产生误差, 溶酶体内衰老色素堆积致使细胞衰老^[3]. 超氧离子自由基(O₂^{·-})、羟自由基(OH[·])和脂自由基(ROO[·])是 3 种具有代表性的自由基, O₂^{·-}形成最早, OH[·]的作用最强.

本研究采用氮蓝四唑(NBT)光还原法对六月霜提取物清除超氧离子自由基 O₂^{·-}的能力进行了测定, 并且用 Vc 进行对照实验. 同时利用抗坏血酸-Cu²⁺-H₂O₂ 体系产生的 OH[·]自由基, 对提取物清除 OH[·]能力进行了测定.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

日产岛津 UV-1601 型紫外分光光度计及其配套设备 日本岛津公司制造; 日产岛津 AEL-160 型电子天平 日本岛津公司制造; 国产 DGB12-002 型台式干燥箱 重庆试验设备厂制造; 国产 JD-3 型光照度计 上海市嘉定学联仪表厂制造. 自制反应箱.

pH 7.5 的磷酸钠缓冲溶液(PBS), 浓度为 5×10⁻² mol/L; pH 7.4 的磷酸钠缓冲溶液, 浓度为 0.1 mol/L; 1.5×10⁻⁵ mol/L 的核黄素; 2×10⁻² mol/L 的甲硫氨酸(核黄素、甲硫氨酸均为生化试剂); 5.1×10⁻³ mol/L 的氮蓝四唑(NBT)(生化试剂); 抗坏血酸(Vc)1 mol/L; CuSO₄ 100 μmol/L; H₂O₂ 0.97 mmol/L, 以上试剂均为分析纯.

细胞色素 C, 作者所在系的生化实验室提供; 六月霜, 购于浙江省临安市中药店.

1.2 粗黄酮含量的测定方法

加入 10 mL 30%的乙醇于 25 mL 容量瓶中, 然后取 2 mL 已定容的提取物于 25 mL 容量瓶; 再加 0.7 mL NaNO₂ (1: 20), 摇匀, 放置 5 min 后, 加入 0.7 mL Al(NO₃)₃ (1: 10); 6 min 后, 再加入 5 mL NaOH (1 mol/L) 混匀, 用 30%乙醇稀释至 25 mL,

10 min 后于波长 510 nm 处比色测定吸光度. 以芦丁为标准对照品(中国药典规定: 总黄酮测定以芦丁计), 计算浸提液中黄酮含量(ug/mL)^[4]. 芦丁在 12.032~96.256 ug/g 范围内线性回归方程为 y=0.0909A+0.00064, 相关系数 γ=0.9999.

1.3 超氧离子自由基 O₂^{·-}的检测

1.3.1 超氧离子自由基 O₂^{·-}的产生

甲硫氨酸作用于核黄素时可产生 O₂^{·-}, 其可还原氮蓝四唑(NBT), 使之转化为 CN₄H₄, 而黄酮类化合物可以抑制该反应, 故可依据抑制率来研究六月霜提取物对 O₂^{·-}的清除效果.

参照 Beauchamp 等的方法^[5], 并对其加以改进. 反应在反应箱中进行. 反应箱中装有 1 支 10 W 的节能日光灯, 箱的四周衬有铝箔, 调节反应物离灯的距离, 用光照度计测定, 使其受光强度为 4 000 Lux. 在 5 mL 反应液中, 使核黄素浓度为 3×10⁻⁶ mol/L, 甲硫氨酸浓度为 1×10⁻² mol/L. 25 °C光照 20 min, 光化反应产生 O₂^{·-}.

1.3.2 超氧离子自由基 O₂^{·-}清除率的测定

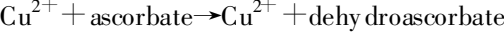
在 1.3.1 的体系中加入 NBT, 使其浓度为 1.0×10⁻⁴ mol/L, 光照核黄素产生的 O₂^{·-}能将 NBT 还原为蓝色的产物, 以不光照的试液作校正. 在 560 nm 处测得吸光度为 A, 表示 O₂^{·-}的含量. 加入六月霜的提取物后能清除 O₂^{·-}, 抑制 NBT 的还原, 测得吸光度为 A₁, A-A₁ 表示 O₂^{·-}的减少量, 则清除率计算如下:

清除率= $\frac{A-A_1}{A}$

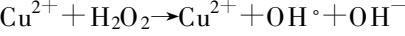
1.4 OH[·]自由基的检测

1.4.1 OH[·]自由基的产生

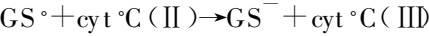
在生理浓度下, Cu²⁺ 存在时, 用抗坏血酸作为还原剂, 能与中间生成的 H₂O₂ 反应, 使 Cu²⁺ 还原为 Cu⁺, 生成 OH[·]^[6], 反应机理如下:



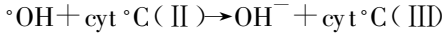
随后, Cu²⁺ 与抗坏血酸中间产生的 H₂O₂ 反应



根据巯基自由基能使还原型的细胞色素 C[cyt[·]C(II)]氧化的原理^[7]



推测 OH[·]自由基同样能使 cyt[·]C(II) 转化为氧化型(III).



还原型细胞色素 C(II) 呈浅红色, 而氧化型呈浅黄色. 前者在 550 nm 处有尖锐的吸收峰, 而后者没有明显的吸收峰. 因此, 可用比色分析法, 通过测

定还原型细胞色素 C (Ⅱ) 含量的变化了解 OH[·] 的生成.

在抗坏血酸—Cu²⁺—H₂O₂ 体系中, Vc 与 O₂ 缓慢反应生成 H₂O₂, H₂O₂ 与被抗坏血酸还原了的 Cu²⁺ 反应产生 OH[·], 一般这一系列反应要在 25 ℃ 条件下作用 90 min 才进行完毕. 经过大胆改进和多次实验, 本实验在反应液中加入 H₂O₂ 后马上进行测定, 使 Vc 与 O₂ 缓慢产生的 H₂O₂ 这一反应提前完成, 使反应的时间大大地缩短了, 又不会对结果产生影响.

1.4.2 OH[·] 自由基清除率的测定

以 6 mL 细胞色素 C、抗坏血酸、磷酸钠缓冲溶液为空白, 用紫外分光光度计在 550 nm 处测得吸光值为 A. 当在 6 mL 反应液中加入 H₂O₂、CuSO₄, 宏观可见反应体系从浅红色立即转变为浅黄色, 在

550 nm 处测得吸光值为 A₁, A—A₁ 表示 OH[·] 生成的量. 加入六月霜提取物后能清除 OH[·] 自由基, 在 550 nm 处测得吸光值为 A₂, A—A₂ 表示反应体系中最后剩余 OH[·] 自由基的含量, 则清除率可计算为:

清除率=
$$\frac{(A-A_1)-(A-A_2)}{A-A_1}=\frac{A_2-A_1}{A-A_1}$$

2 结果与讨论

2.1 提取方法选择

采用四因素三水平正交试验^[8], 用不同的提取工艺和方法(水浴、超声波)对六月霜进行提取, 以提取物中的黄酮含量为指标(测定方法见 1.2), 选择最佳提取条件, 结果见表 1, 2.

表 1 水浴提取法清除效果

Tab. 1 Effect of scavenging superoxide free radical (extraction by water bath)						
序号	提取液	提取液体积分数/ %	水浴温度/ ℃	水浴时间/ h	吸光度值	粗黄酮质量浓度/ (μg/ mL)
1	甲醇	85	55	1.5	0.350	1.62
2	甲醇	75	65	0.5	0.540	2.49
3	甲醇	55	75	2.5	0.706	3.24
4	乙醇	85	65	2.5	0.367	1.70
5	乙醇	75	75	1.5	0.599	2.75
6	乙醇	55	55	0.5	0.651	2.99
7	丙酮	85	75	0.5	0.635	2.92
8	丙酮	75	55	2.5	0.729	3.35
9	丙酮	55	65	1.5	0.871	3.99

表 2 超声提取法清除效果

Tab. 2 Effect of scavenging superoxide free radical (extraction by supersonic)						
序号	提取液	提取液体积分数/ %	超声时间/ min	液固比	吸光度值	粗黄酮质量浓度/ (μg/ mL)
1	甲醇	85	20	12∶1	0.490	2.26
2	甲醇	75	40	9∶1	0.7632	3.50
3	甲醇	55	30	15∶1	0.432	2.00
4	乙醇	85	40	15∶1	0.598	2.75
5	乙醇	75	30	12∶1	0.776	3.56
6	乙醇	55	20	9∶1	0.333	1.55
7	丙酮	85	30	9∶1	0.775	3.55
8	丙酮	75	20	15∶1	0.859	3.94
9	丙酮	55	40	15.1	0.552	2.54

经方差分析和显著性检验(计算过程略), 得出两种方法的最佳提取条件如下. 水浴提取: 提取液为丙酮, 提取液体积分数为 55%, 温度为 75 ℃, 时间为 1.5 h(预先浸泡过夜); 超声提取: 提取液为丙酮, 提取液体积分数为 55%, 时间为 30 min, 液固比为 15∶1.

本实验研究使用的六月霜提取物, 均为在上述

最佳条件下提取的.

2.2 清除超氧离子自由基 O₂^{·-} 的效果

利用水浴法最佳条件得到的六月霜提取液, 其固形物质量浓度为 14.78%, 黄酮质量浓度为 4.30%. 黄酮与固形物含量之比为 0.29. 将此六月霜提取液干燥, 配成相应浓度进行 O₂^{·-} 清除实验, 结果见表 3. 从表 3 可以看出, 随着黄酮在反应液中

质量浓度的增加,对超氧离子自由基清除率呈上升趋势.质量浓度较低时,清除率增长较快,随着质量浓度的增高,增长幅度逐渐平缓,当黄酮质量浓度达到 30.00 μg/mL 时,清除率可达 80.69%.

表 3 水浴提取法清除 O₂^{·-}效果

Tab. 3 Effect of scavenging superoxide free radical (extraction by water bath)

黄酮质量浓度 /(μg/mL)	固形物质量浓度 /(μg/mL)	清除率/%
0.10	0.34	4.05
0.40	1.38	9.82
2.90	10.00	37.01
4.35	15.00	62.81
10.00	34.48	65.45
15.00	51.72	66.46
20.00	68.97	69.92
30.00	103.45	80.69

注:表中的浓度均指黄酮或固形物在反应液中的质量浓度.

以超声进行提取,提取液进行 O₂^{·-}自由基清除实验.用超声波法得到的六月霜提取液,固形物质量浓度为 15.93%,黄酮质量浓度为 4.00%,黄酮与固形物质量浓度之比为 0.25.将此六月霜提取液干燥,配成相应浓度进行 O₂^{·-}清除实验,结果见表 4.从表 4 中还可以看出,随着黄酮质量浓度的增加,清除率逐渐升高.当黄酮质量浓度达到 18.04 μg/mL 时,清除率最高,为 88.41%.

表 4 超声提取法清除 O₂^{·-}效果

Tab. 4 Effect of scavenging superoxide free radical (extraction by supersonic)

黄酮质量浓度 /(μg/mL)	固形物质量浓度 /(μg/mL)	清除率/%
0.10	0.40	4.52
2.00	8.00	28.43
3.75	15.00	51.51
10.00	40.00	65.07
15.00	60.00	65.51
18.04	72.16	88.41

从表 3~4 可看出,无论是以水浴还是超声波法得到的六月霜提取物,对 O₂^{·-}的清除效果均较好.当黄酮质量浓度达到 0.1 μg/mL 时,已有一定的清除率,水浴清除率为 4.05%,超声波消除率为 4.52%.当达到最高清除率 80.69%、88.41%时,黄酮质量浓度分别为 30.00、18.04 μg/mL.如果以最高清除率相比较,以超声波法得到的六月霜提取物,对 O₂^{·-}的清除效果更好.此外,直接水浴法和超声波提取法两者提取物的组成有差异,水浴法的

黄酮与固形物含量之比为 0.29,而超声波法黄酮与固形物含量之比为 0.25.同时也表明,除黄酮外,六月霜提取物的其他成分对清除 O₂^{·-}的效果也产生影响.

2.3 清除超氧离子 O₂^{·-}能力的比较

许多文献都曾报道过抗坏血酸对 O₂^{·-}有清除作用.因此,以抗坏血酸为对照,比较六月霜提取物对 O₂^{·-}的清除能力.根据表 3,取中间浓度点(15 μg/mL)作为对照浓度,即使六月霜提取物中黄酮质量浓度、抗坏血酸质量浓度均为 15 μg/mL 时进行比较,结果见表 5.

表 5 不同方法清除 O₂^{·-}能力的比较

Tab. 5 Comparative capability of scavenging superoxide free radical

方法	清除率/%
水浴	66.5
超声	65.1
抗坏血酸	43.2

抗坏血酸对 O₂^{·-}的清除效果和文献报道的相接近,说明了用 NBT 还原体系测定 O₂^{·-}清除率是可行的.从表中可看出,不管用什么方法(水浴、超声)对六月霜进行提取,提取物对 O₂^{·-}的清除效果都比抗坏血酸效果好.

2.4 清除 OH[·]自由基的效果

用水浴法六月霜提取物对 OH[·]自由基的抑制实验表明,六月霜提取物对 OH[·]清除效果,结果见表 6.从表中可看出,六月霜提取物对 OH[·]自由基也有较高的清除效果.随着黄酮(或固形物)质量浓度的增大,清除率也不断上升.当黄酮质量浓度达 66.82 μg/mL 时,清除率最高为 84.02%.与苯甲酸的清除效果相比:苯甲酸对 OH[·]自由基的最大清除率为 80.30%,反应液中质量浓度高达 4 880 μg/mL.而六月霜提取物对 OH[·]的最大清除率达 84.02%时,质量浓度仅为 66.82 μg/mL(固形物质量浓度为 230.41 μg/mL),可见其对 OH[·]清除效果远比苯甲酸好.

表 6 对 OH[·]自由基的清除效果

Tab. 6 Effect of scavenging hydroxyl free radical

黄酮质量浓度 /(μg/mL)	固形物质量浓度 /(μg/mL)	清除率/%
1.47	5.07	5.94
2.68	9.24	15.98
16.70	57.59	35.62
33.41	115.21	43.84
50.11	172.79	75.34
66.82	230.41	84.02

3 结 论

生物体在需氧代谢中的氧化还原反应产生的 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 自由基可以引发生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化物反应, 损伤膜结构及功能; 自由基还可以损伤糖、蛋白质及核酸等生物大分子, 导致功能和代谢紊乱. 活性氧的上述毒性反应被认为与炎症、自身免疫病、肿瘤、心肌及脑缺血、衰老

和肺气肿等疾病的成因直接有关. 用六月霜提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 自由基清除进行研究, 结果显示: 六月霜对 $O_2^{\cdot-}$ 最高清除率高达 88.41%, 对 $OH^{\cdot}$ 的最大清除率为 84.02%, 清除效果分别比抗坏血酸和苯甲酸好. 由此可见, 六月霜提取物对清除超氧离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 有明显作用, 对 $OH^{\cdot}$ 自由基的清除也有较好作用, 其对人体健康具有非常积极的作用. 如果将其进一步开发成为保健食品或饮料, 将具有极为广泛的应用前景.

参考文献

[1] 全国中草药药典委员会编. 全国中草药汇编[M] . 北京: 人民卫生出版社, 1990.

[2] GRYGLEWSHI R J, KORBUT R, ROBAK J, *et al.* On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids[J] . **Ibid.** 1987, 36: 317.

[3] 李八方. 功能食品与保健食品[M] . 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1997.

[4] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M] . 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 112

[5] BEAUCHAMP C, FRIDOVICHET I. Superoxide dismutase: improved assays and an say applicable to acrylamid gels[J] . **Anal Biochem.** 1971, 44: 276~ 287.

[6] ROWLEY D A, HALLIWELL B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation or hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction[J] . **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 1983, 225(1): 279~ 284.

[7] 王成莲, 刘莉. 闭塞法测定抗坏血酸体系产生的 $OH^{\cdot}$ 自由基[J] . 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6): 473~ 475.

[8] 郑用熙. 分析化学中的数理统计方法[M] . 北京: 科学出版社, 1986. 180~ 195

(责任编辑: 李春丽)