

黔产艾纳香黄酮抗氧自由基的研究

李琴山¹, 刘洋² (1. 贵阳医学院检验系, 贵州贵阳 550004; 2. 北京工业大学生命科学与生物工程系, 北京 100029)

摘要 [目的]研究黔产艾纳香黄酮对氧自由基的清除能力。[方法]以黔产艾纳香为研究对象,提取其黄酮;采用邻二氮菲-Fe(II)/H₂O₂体系产生羟自由基(\cdot OH),用联苯三酚法在碱性溶液中自氧化反应产生超氧阴离子自由基(O²⁻ \cdot),并采用分光光度法测定黔产艾纳香黄酮对O²⁻ \cdot 和 \cdot OH的清除作用。[结果]高剂量组的黔产艾纳香黄酮对O²⁻ \cdot 具有明显的清除及抑制作用,对 \cdot OH也有一定的清除作用,清除率为(19.82% ± 0.17%)。[结论]黔产艾纳香黄酮对O²⁻ \cdot 具有明显清除及抑制作用,对 \cdot OH也有一定的清除作用。

关键词 艾纳香;分光光度法;超氧阴离子自由基

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)19-08449-02

Study on Scavenging Action of *Blumea flavanones* on Oxygen Free Radical

LI Qin-shan et al (Department of Laboratory of Guigang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004)

Abstract [Objective] To study the scavenging action of *Blumea flavanones* on oxygen free radical. [Method] Auto-oxidation in alkaline solution with the help of pyrogallol can produce O²⁻ \cdot and the system of 1,10-phenanthroline-Fe(II)/H₂O₂ can generate \cdot OH. Spectrophotometry was used to observe the effects of *Blumea flavanones* upon O²⁻ \cdot and \cdot OH in vitro. [Result] High dosage *Blumea flavanones* has obvious scavenging and inhibiting effect on O²⁻ \cdot , and can reduce the level of \cdot OH by (19.82% ± 0.17%). [Conclusion] Guizhou's *Blumea flavanones* could scavenge and inhibit O²⁻ \cdot significantly and could scavenge \cdot OH as well.

Key words *Blumea flavanones*; Spectrophotometry; Superoxide anion radical

艾纳香(*Blumea flavanones*)为菊科艾纳香属(*Blumea*)植物,苗药名档窝凯,其性味温辛,有温中活血和祛风除湿之功效,可用于治疗淤血阻滞、寒湿泻痢和高血压等病症。现代药理学研究发现,黄酮类物质是艾纳香主成分之一,具有降压和抗凝血等功效。因此,富含黄酮类物质的艾纳香对O²⁻ \cdot 和 \cdot OH清除率及其抗氧化活性的研究受到国内外学者的广泛关注,并且这些研究亦将为艾纳香的临床开发和应用提供理论依据^[1-6]。笔者对黔产艾纳香黄酮对氧自由基清除能力进行研究,以期对艾纳香的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。黔产艾纳香,购自遵义市药材公司,经鉴定为*Blumea Flavanones*的干燥全草。

1.1.2 主要仪器。721紫外-分光光度计,购自上海光电研究所。

1.1.3 主要试剂。连苯三酚、过氧化氢、硫酸亚铁铵、磷酸氢钾、邻二氮菲、磷酸二氢钾及氢氧化钠均为国产分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 艾纳香黄酮的制备^[7]。精密称取10.000 g艾纳香药材粗粉,加入100 ml乙醇,冷浸24 h,滤过,加热回流1 h,抽滤,滤液加适量的水使含醇量为70%后,在分液漏斗中加石油醚70℃萃取除去叶绿素,浓缩至浓度为1 g/ml;取浓缩液1.0 ml加水稀释至5 ml,于1000 r/min离心5 min,上清液用0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液作为供试品(浓度为2.0 g/L),分别取供试品用水稀释使其含艾纳香黄酮量分别为50、100和200 mg/ml。

1.2.2 O²⁻ \cdot 的生成及清除率的测定。利用O²⁻ \cdot 清除剂可使连苯三酚自氧化产物在322 nm波长处吸收峰受到抑制的特点,进行光化学法测定,可间接测得O²⁻ \cdot 生成及O²⁻ \cdot 的清除率。试验方法如下^[8]:在总容积9 ml浓度50 mmol/L的PBS(pH8.34)溶液、浓度0.2 mmol/L连苯三酚,温度25℃,加入一定量艾纳香黄酮提取物,测得反应开始后第10 s的A₃₂₂值(以相同浓度艾纳香黄酮作对比,消除试样本身在322 nm处的吸收)。另取试剂同上,不加艾纳香黄酮以作对照,测反应开始后第10 s的A₃₂₂值。清除率按式(1)计算:

$$O^{2-} \cdot \text{清除率}(\%) = (A_{\text{空}} - A_{\text{样}}) / A_{\text{空}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.3 O²⁻ \cdot 的生成及抑制率的测定。反应体系同上,用动态方法测定O²⁻ \cdot 生成的反应初速率V₀(A/min),反应启动后每30 s测定相应A₃₂₂值,至4.5 min止。将所得A₃₂₂值与时间T(min)进行回归分析,其斜率为V₀。抑制率按式(2)计算:

$$O^{2-} \cdot \text{抑制率}(\%) = (V_{0\text{空}} - V_{0\text{样}}) / V_{0\text{空}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.4 \cdot OH的生成及清除率的测定。试验方法如下^[9]:在浓度9.75 mmol/L的FeSO₄、浓度0.75 mmol/L的邻二氮菲、浓度150 μmol/L的PBS(pH7.34)体系中,加浓度0.01%的H₂O₂(损)或不加H₂O₂(未损),于37℃作用60 min,分别测定λ_{536nm}的A值,得A_损与A_{未损}。然后在浓度0.75 mmol/L邻二氮菲、浓度9.75 mmol/L FeSO₄、浓度150 μmol/L PBS(pH 7.34)体系中,加浓度0.01%的H₂O₂,再加入一定量的艾纳香黄酮;以同浓度艾纳香黄酮作参比,测定A₃₃₆即得A_样; \cdot OH清除率按式(3)计算:

$$\cdot \text{OH 清除率}(\%) = (A_{\text{样}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}) \times 100 \quad (3)$$

1.2.5 统计学方法。所有数据均用SPSS13进行统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、线性相关和回归分析。

2 结果与分析

2.1 艾纳香黄酮对O²⁻ \cdot 的清除作用 连苯三酚自氧化过程中O²⁻ \cdot 和有色中间产物在322 nm处有特征性吸收,因此

基金项目 贵州省中医药管理局基金 QZYY2010-2。

作者简介 李琴山(1976-),男,贵州遵义人,副教授,博士,从事分子遗传学研究, E-mail: qinshanli@gmail.com。

收稿日期 2013-04-11

根据 A_{322} 值的变化可观察艾纳香对 O^{2-} 的清除作用。试验发现加入艾纳香黄酮后, A_{322} 减少(见表1), 表明艾纳香黄酮对 O^{2-} 具有清除作用, 对连苯三酚自氧化过程有抑制作用。

表1 艾纳香黄酮对 O^{2-} 的清除作用

组别	A_{322}	O^{2-} 清除率//%
空白组	0.615 ± 0.052	0
艾纳香低剂量组	0.607 ± 0.032	2.57a
艾纳香中剂量组	0.593 ± 0.027	3.89a
艾纳香高剂量组	0.561 ± 0.016	10.28b

注:与空白组比较, a 指差异不显著, b 指差异显著。

2.2 艾纳香黄酮对 O^{2-} 生成的抑制作用 用动态方法测定反应初速率 V_0 (A/min), 其回归相关系数在 0.992 5 ~ 0.999 0。加艾纳香黄酮后 O^{2-} 生成速率 V_0 明显减小(见表2), 表明艾纳香黄酮能明显抑制 O^{2-} 的生成。

表2 艾纳香黄酮对 O^{2-} 生成的抑制作用

组别	V_0 // A/min	O^{2-} 清除率//%
空白组	0.327 ± 0.022	0
艾纳香低剂量组	0.319 ± 0.016	1.6a
艾纳香中剂量组	0.275 ± 0.013	12.5b
艾纳香高剂量组	0.224 ± 0.007	27.1b

注:与空白组比较, a 指差异不显著, b 指差异显著。

2.3 艾纳香黄酮对 $\cdot OH$ 的清除作用 根据试验方法测定对照组(损)、空白组(未损)和艾纳香高剂量组的 V_{563} 值, 观察高剂量艾纳香黄酮对 $\cdot OH$ 的清除作用。结果表明, 对照组(损)的 V_{563} 值为(0.256 3 ± 0.023 0), 空白组(未损)的 V_{563} 值为(0.708 9 ± 0.062 0), 艾纳香高剂量组的 V_{563} 值为(0.346 2 ± 0.024 0), 与对照组差异明显。计算得艾纳香高剂量组对 $\cdot OH$ 的清除率为(19.82% ± 0.17%)。

3 讨论

自由基又称游离基, 是指化合物的分子在光热等外界条件下, 共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团。研究表明, 自由基从产生到衰亡的过程就是电子转移的

过程。在生命体系中, 电子的转移是一种最基本的运动, 而氧的得电子能力很强。因此, 生物体内许多化学反映都与氧有关。科学家们发现损害人体健康的自由基几乎都与那些活性较强的含氧物质有关, 他们把与这些物质相结合的自由基叫作活性氧自由基。活性氧自由基对人体的损害实际上是一种氧化过程。因此, 要降低自由基的损害, 就要从抗氧化做起, 从而对衰老、动脉粥样硬化、脑的缺血再灌注损伤进行保护^[10-12]。试验通过体外产生氧自由基系统, 体外氧自由基的清除作用试验证明, 艾纳香黄酮可明显的清除及抑制 O^{2-} 的产生, 对 $\cdot OH$ 也有一定的清除作用, 说明艾纳香黄酮是通过对自由基(特别是羟自由基)的清除作用以达到抗氧化的作用, 为黔产艾纳香的临床应用及贵州中药的开发利用提供了依据。

参考文献

- [1] 贵州省中药研究所. 贵州中药资源[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992: 262.
- [2] OSAKI N, KOYANO T, KOWITHAYAKORN T, et al. Sesquiterpenoids and plasmin-inhibitory flavonoids from *Blumea balsamifera* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(4): 447-449.
- [3] HASEGAWA H, YAMADA Y, KOMIYAMA K, et al. Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells [J]. Blood, 2006, 26(4): 679-688.
- [4] 黄永林, 赵志国, 文永新. 不同部位艾纳香中总黄酮的含量测定[J]. 广西植物, 2006, (26)4: 453-455.
- [5] 朱廷春, 文永新, 王恒山, 等. 艾纳香的化学成分研究[J]. 广西植物, 2008, 28(1): 139-141.
- [6] TOSHIO NORIKURA, AKIKO KOJIMA-YUASA, MIKI SHIMIZU, et al. Mechanism of growth inhibitory effect of *Blumea balsamifera* extract in hepatocellular carcinoma [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(5): 1183-1189.
- [7] 安晓娇, 康勇, 范福洲. 壳聚糖用于山茶黄水提液除鞣质工艺的探讨[J]. 中草药, 2008, 39(5): 706-708.
- [8] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 13(4): 71-73.
- [9] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $-H_2O_2/Fe^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [10] LEE H C, WEI Y H. Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging [J]. Experimental Biology and Medicine, 2007, 232: 592-606.
- [11] AUBERT G, LANSDORP P M. Telomeres and Aging [J]. Physiol Rev, 2008, 88: 557-579.
- [12] HARMAN D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1067: 10-21.

(上接第 8429 页)

- [2] 庞奇. 新型旋风分离清选系统内部气流及物料状态研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2009.
- [3] 吴守一. 谷物联合收割机[M]/吴守一. 农业机械学(下册). 北京: 机械工业出版社, 1987: 161-192.
- [4] 魏宏安. 我国小麦收获机械的发展与研究现状[J]. 甘肃农业大学学报, 2001(6): 195-200.

- [5] 农牧渔业部农业机械化管理局, 北京农业工程大学. 中国农业机械化重要文献资料[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1988: 50-65.
- [6] 胡伟. 我国联合收割机技术与市场发展分析[J]. 农村机械化, 1998(4): 38-39.
- [7] 王志. 谷物联合收割机发展前景展望[J]. 农业机械, 1998(2): 10-11.
- [8] 刘清, 杨宝善, 陈东耀, 等. 小型谷物联合收割机的发展趋势及其设计要求初探[J]. 农机化研究, 1995(8): 24-26.