

文章编号: 1005 - 8893 (2004) 03 - 0028 - 03

# 两种天然抗氧化剂清除自由基作用的研究<sup>\*</sup>

杨广花

(江苏工业学院 化学工程系, 江苏 常州 213016)

**摘要:** 利用生物化学发光法 ( $\text{CuSO}_4$  -  $\text{VC}$  -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - 酵母悬浮液体系化学发光检测法和次黄嘌呤 - 黄嘌呤氧化酶 - 鲁米诺体系化学发光检测法) 研究了两种天然抗氧化剂 (茶多酚和银杏提取物) 对自由基的清除作用。实验表明, 茶多酚、银杏提取物均具有清除  $\text{OH}^\cdot$ 、 $\text{O}_2^\cdot$  自由基的作用。两者相比较, 以茶多酚清除  $\text{OH}^\cdot$  和  $\text{O}_2^\cdot$  的能力较强, 银杏提取物相对较弱。

**关键词:** 天然抗氧化剂; 自由基; 化学发光

**中图分类号:** R 285.5

**文献标识码:** A

自由基是带有未成对电子的分子或离子。由于具有很高的反应活性, 它们一旦产生将很快与周围分子发生反应, 由此导致各种破坏作用。自由基氧化及其中间产物严重伤害生物膜、酶、维生素、蛋白质及活细胞功能, 其中一些还是公认的致癌物<sup>[1]</sup>, 现已明确许多疾病, 如: 肿瘤、炎症、心脑血管缺血、动脉粥样硬化等等, 都与自由基有关; 而自由基在食品和化工产品氧化中的作用更是众所周知, 因此有关抗氧化剂清除自由基的研究得到普遍关注, 然而合成抗氧化剂往往有毒副作用。为了减轻自由基的危害, 目前寻找高效、价廉、低毒甚至无毒的抗氧化剂的工作倍受关注<sup>[2~6]</sup>。

在天然、营养、回归大自然的热潮中, 人们越来越趋向于使用天然抗氧化剂。因此, 寻找天然的抗氧化剂, 特别是在我们中华民族的中草药宝库中, 筛选出具有抗自由基损伤, 保护 DNA 的物质, 具有极其重要的意义。茶多酚和银杏提取物对自由基有一定的清除作用, 但是它们的清除能力的综合比较研究未见报道。本文主要研究上述 2 种天然抗氧化剂对自由基清除能力的比较。

## 1.1 实验材料

实验材料为茶多酚 (纯度 99%, 批号: 991227, 茶多酚总量采用没食子酸乙酯标准曲线法测定, 其中, EGCG 的含量为 75.2%。浙江大学农业与生物技术学院杨贤强教授馈赠)、银杏提取物 (纯度 97%, 其中黄酮含 24.0% 内酯含 6.0%, 宁波市中药制药厂; 批号: 20000041); 小牛胸腺 DNA、次黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶和鲁米诺均为 Sigma 公司产品, 其它试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器

BPCL - G - 2 微弱发光测量仪及 BPCL App2.6 数据处理工作站 (中国科学院北京生物物理研究所), 工作电压 890 V, 温度为  $25 \pm 0.5$ , pH S - 25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), 涡旋混合器 (上海环宇仪器厂), 离心沉淀机 (上海医用分析仪器厂), 自动超纯水蒸馏器 1810B (上海玻璃仪器一厂)。

## 2 实验方法

### 2.1 抗氧化剂清除 $\text{OH}^\cdot$ 的测定方法

采用  $\text{CuSO}_4$  -  $\text{VC}$  -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - 酵母悬浮液体系化

## 1 材料与仪器

\* 收稿日期: 2004 - 03 - 10

作者简介: 杨广花 (1973 - ), 女, 江苏新沂人, 实验员, 主要从事天然抗氧化剂的研究。

学发光检测法<sup>[5]</sup>，仪器预备：BPCL - 超微弱发光仪每次使用前预热约 30 min，启动 BPCL 测量程序，C- 14 标准光源校正，调节“Hv - V Adj”旋钮直到计数维持在 5 000 ±100 左右，然后测量噪声本底值，计数一般应在 100 以下，此时，仪器准备完毕。以下实验仪器预备同。

向测量管中加入 1.8 mmol/L 的 V<sub>C</sub> 0.2 mL，1.8 mmol/L CuSO<sub>4</sub> 0.4 mL，75 mg/mL 的酵母 0.2 mL（加入时摇匀），含某一抗氧化剂一定质量浓度（分别为 0、0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL）的 pH 6.2 的 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液（PBS）0.6 mL，置入化学发光仪的测量室，再注入 33.3 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.6 mL，启动测量程序，取 15 s ~ 60 s 积分的发光强度（6 s 一个积分段），用于计算，3 次平行样品重复。比较样品的清除 OH<sup>-</sup> 的活性能力。

2.2 抗氧化剂清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的测定方法

采用次黄嘌呤 - 黄嘌呤氧化酶 - 鲁米诺体系化学发光检测法<sup>[5]</sup>，在测量管中加入 1 mL 反应混合液，其含 0.1 mL 的鲁米诺原液，0.1 mL 次黄嘌呤原液，0.6 mL Tris - HCL，0.2 mL 黄嘌呤氧化酶工作液，（恒温 30℃），置入化学发光仪的测量室，向反应混合液中注入 0.2 mL 一定质量浓度（分别为 0、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、16 μg/mL）的各种抗氧化剂溶液，启动测量程序，以发光峰值为标准进行计算，3 次平行样品重复。比较不同抗氧化剂样品清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的活性能力

$$\left[ \text{清除率} = \frac{X_0 - X_n}{X_0} \right]。$$

3 结果与讨论

3.1 清除 OH<sup>-</sup> 中天然抗氧化剂质量浓度

用 CuSO<sub>4</sub> - VC - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 酵母悬浮液化学发光体系研究清除 OH<sup>-</sup> 中两种天然抗氧化剂质量浓度与抑制率的关系见表 1。

表 1 表明，在本论文实验的质量浓度范围内（0 ~ 2 mg/mL），两种抗氧化剂都具有清除 OH<sup>-</sup> 的能力。清除率与质量浓度之间存在较好的线性相关（ $R_{TP}=0.983\ 6$ ， $R_{EGb}=0.978\ 0$ ）；两种抗氧化剂对 OH<sup>-</sup> 清除能力有所区别。比较相同质量浓度下清除率及半抑制率质量浓度（ $IC_{50}$ ）， $IC_{50}$  就是清除率为 50 % 时的抗氧化剂质量浓度，单位

mg/mL），茶多酚的清除 OH<sup>-</sup> 的能力较强，其（ $IC_{50}$ ）相对最小，为 1.049 mg/ml；银杏提取物相对较弱，其（ $IC_{50}$ ）相对较大，（ $IC_{50}$ ）为 1.433 mg/mL。

表 1 两种抗氧化剂清除 OH<sup>-</sup> 质量浓度与清除率的关系

Table 1 Relationship between the concentration and inhibition rate on the scavenging of hydroxyl radical

抗氧化剂质量浓度 / (mg/mL)	相对发光强度 $X \pm S, n=5$	清除率 / %	( $IC_{50}$ ) / (mg/mL)
茶多酚质量浓度			
0	14 562 ±1 123	0	
0.5	10 126 ±1 042	30.5	
1.0	7 154 ±814	50.9	1.049
1.5	5 269 ±651	63.8	
2.0	4 239 ±346	70.9	
银杏提取物质量浓度			
0	14 189 ±1 211	0	
0.5	11 365 ±908	20.0	
1.0	8 259 ±1 047	41.8	1.425
1.5	6 678 ±371	52.9	
2.0	4 987 ±556	64.9	

3.2 清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 中天然抗氧化剂质量浓度

用次黄嘌呤 - 黄嘌呤氧化酶 - 鲁米诺化学发光体系研究清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 两种抗氧化剂质量浓度与清除率的关系见表 2。

表 2 两种抗氧化剂清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 质量浓度与清除率的关系

Table 2 Relation between concentration and inhibition rate of scavenging superoxide anino radical

抗氧化剂质量浓度 / (μg/mL)	相对发光强度 $X \pm S, n=5$	清除率 / %	( $IC_{50}$ ) / (μg/mL)
茶多酚质量浓度			
0	2 026 ±65	0	
1	1 650 ±81	18.6	
2	1 287 ±76	36.5	3.079
4	760 ±65	62.5	
8	325 ±31	84.0	
16	210 ±33	90.0	
银杏提取物质量浓度			
0	2 108 ±103	0	
1	1 821 ±108	13.6	
2	1 487 ±84	29.5	3.425
4	876 ±56	58.4	
8	406 ±51	80.7	
16	289 ±34	86.3	

表 2 表明，在本实验质量浓度范围内（0 ~ 16 μg/mL），两种抗氧化剂都具有清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的能力。对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除率与抗氧化剂质量浓度之间存在较好的线性相关（ $R_{TP}=0.991\ 0$ ， $R_{EGb}=0.999\ 6$ ）；两种抗氧化剂对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除能力也有所区别。比较同等质量浓度下清除率及半抑制率质量浓度（

( $IC_{50}$ )), 茶多酚的清除  $O_2^-$  的能力较强, 其 ( $IC_{50}$ ) 相对较小, 为  $3.079 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 银杏提取物较弱, ( $IC_{50}$ ) 为  $3.425 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 4 结 论

上述表明, 在本实验质量浓度范围内, 茶多酚、银杏提取物均具有清除  $OH^-$ 、 $O_2^-$  自由基的作用。两种抗氧化剂对  $OH^-$ 、 $O_2^-$  清除率与质量浓度之间存在较好的线性相关。两者相比较, 以茶多酚清除  $OH^-$  的能力最强, 其 ( $IC_{50}$ ) 为  $1.049 \text{ mg}/\text{mL}$ ; 银杏提取物较弱, ( $IC_{50}$ ) 为  $1.433 \text{ mg}/\text{mL}$ ; 清除  $O_2^-$  能力也以茶多酚为最强, 其 ( $IC_{50}$ ) 为  $3.079 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 银杏提取物较弱, 为  $3.425 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 两种抗氧化剂清除  $O_2^-$  的能力要

大于清除  $OH^-$  的能力。

## 参考文献:

- [1] Marx J L. Oxygen Free Radicals Linked to Many Diseases [J]. Science, 1987, 235 (4 788): 529 - 531.
- [2] Scott G. Antioxidants [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1988, 61 (4): 165 - 170.
- [3] Graf E. Antioxidant Potential of Ferulic Acid [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1992, 13 (10): 435 - 448.
- [4] 曹国锋, 翁新楚. 鱼油氧化稳定性的研究 ( ) [J]. 中国油脂, 1995, 20 (5): 44 - 46.
- [5] 郑荣梁. 自由基生命科学进展 [M]. 第五集. 北京: 原子能出版社, 1997. 65 - 67.
- [6] 蔡志强, 韩金多, 李亮, 等. 茶多酚与 DNA 相互作用的初步探讨 [J]. 江苏石油化工学院学报, 2002, 14 (3): 25 - 28.

## Effect of Two Kinds of Natural Antioxidants Scavenging Free Radicals

YANG Guang - hua

(Department of Chemical Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213016, China)

Abstract: The author uses the chemiluminescence determination of  $\text{CuSO}_4 - \text{V}_C - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{Yeast suspension system}$  and hypoxanthine - xanthine oxidase - Luminol system to study the effect of two kinds of natural antioxidants scavenging free radicals. The result shows that Tea Polyphenols (TP) and Extract of ginkgo biloba (EGB) had effects on clearing away  $OH^-$  and  $O_2^-$ . When these two antioxidants were compared, the order of clearing away both  $OH^-$  and  $O_2^-$  was  $R_{\text{TP}} > R_{\text{Egb}}$ .

Key words: natural antioxidant; free radical; chemiluminescence