

毛白杨雄花序的抗氧化作用*

李福伟^{1 2} 王 晓² 邓煜光² 杜金华¹

1(山东农业大学食品工程学院, 泰安, 271018) 2(山东省科学院分析测试中心, 济南, 250014)

摘 要 利用化学发光法、比色法研究了毛白杨雄花序黄酮的抗氧化作用, 结果表明, 其对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 , DPPH \cdot 具有较强的清除作用, IC_{50} 分别为 0.217、0.606、0.061、0.068 mg/mL。

关键词 毛白杨 雄花序 黄酮 抗氧化

活性氧自由基包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、多种有机氧自由基($RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$)、单线态氧(1O_2)、无机和有机过氧化物(H_2O_2 、 $ROOH$)等, 它们有很强的生物活性^[1], 可与生物体内的许多物质如脂肪酸、蛋白质等作用, 夺走它们的氢原子, 造成细胞结构与功能的破坏, 它不仅使油脂本身受破坏失去营养, 更重要的是其氧化产物包括中间产物会损害生物膜、酶、蛋白质及活细胞的结构, 使其失去生物活性或导致功能异常, 其中一些是公认的致癌物^[1 2]。鉴于上述原因, 有关抗氧化剂清除自由基的研究得到普遍关注。抗氧化剂可以减弱一些疾病引起的组织损伤, 因此合成抗氧化剂被广泛用于食品添加剂, 但是它们可能有毒性以及在降解过程中形成致癌物质促使人们近些年来一直努力寻找天然抗氧化剂。毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.) 系杨柳科杨属植物, 主要分布于辽宁、华北、西北、华东等地, 资源极为丰富。其雄花序含有丰富的黄酮类化合物, 约为 2.81%^[3], 主要有乔松素、白杨素、乔松酮等^[4]。研究中利用化学发光法、比色法研究了毛白杨雄花序黄酮对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 , DPPH \cdot 的清除作用, 初步评价了毛白杨雄花序黄酮的抗氧化活性, 为深度研究利用毛白杨雄花序奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

722 型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), SHG-D 型生物化学发光测定仪(上海上立检测仪器厂), KT-300Y 型超声波药品处理机(济宁科特超声电子有限责任公司), BUCH 旋转蒸发仪(BUCH 公司)。

1.2 原料与试剂

1.2.1 原 料

毛白杨雄花序, 于 2003 年 3 月采自济南市植物园。

1.2.2 主要试剂

DPPH \cdot (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)、槲皮素、鲁米诺(luminol)均购自 Sigma 公司, 核黄素(V_{B_2}), L-甲硫氨酸(Met), 氯化硝基四氮唑蓝(NBT), 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 体积分数 30% H_2O_2 , 硫酸亚铁($FeSO_4$)等试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的制作^[5]

称取 0.050 g 槲皮素标准品, 以甲醇定容至 100 mL 容量瓶中。准确移取标准品溶液 2、4、6、8、10 mL 分别定容至 50 mL 容量瓶中。取不同浓度的标准溶液 0.5 mL 分别与 2.5 mL 重蒸水混匀, 加 0.15 mL 质量分数 5% 亚硝酸钠溶液, 摇匀, 放置 5 min, 加 0.3 mL 质量分数 10% $AlCl_3$ 溶液, 摇匀。放置 6 min 后, 再先后加入 1 mL 1 mol/L NaOH 溶液与 0.55 mL 重蒸水, 混匀, 立即于 510 nm 处测 A。根据标准槲

第一作者: 硕士研究生(杜金华教授为通讯作者)。

* 山东省自然科学基金资助项目(No. Q2002b04)

收稿时间 2004-07-19, 改回时间 2004-10-13

皮素样品的含量与 A_{510} 值可绘制标准曲线,用最小二乘法作线性回归,得槲皮素含量 y 与吸光度 A 的关系曲线的回归方程式:

$$y = 0.995A + 0.0013, R^2 = 0.9995.$$

以浓度(y)与吸光度(A)进行线形回归。结果如图 1:

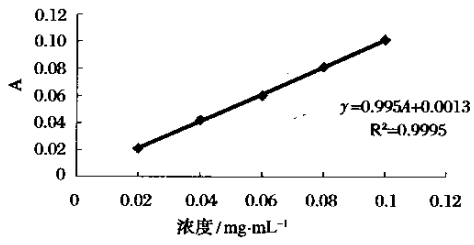


图 1 标准曲线

1.3.2 毛白杨雄花序总黄酮的提取及含量测定

称取 10.0 g 杨雄花序加入 200 mL 甲醇,于 25 kHz 超声波处理 30 min,提取液浓缩为浸膏。称取一定量的浸膏溶解并定容,按照 1.3.1 方法测出吸光度 A 并计算黄酮的含量。

1.3.3 氧自由基($O_2\cdot^-$)的清除活性的测定

参考文献[6],分别在样品管中加入不同浓度的样品 3 mL,在 5 mL 反应液中,加入 Met 溶液 1 mL,NBT 溶液 0.5 mL,最后加入 0.5 mL V_{B_2} 溶液,混匀,使核黄素浓度为 3×10^{-6} mol/L,甲硫氨酸浓度为 1×10^{-2} mol/L,NBT 浓度为 1.0×10^{-4} mol/L。在 20 W 日光灯下,距离 40 cm,光照 20 min,立即在 722 分光光度计上,以不光照的试液作校正,于 560 nm 处测定吸光度为 A ,加入样品的溶液测得的吸光度为 A_1 ,则清除率可计算为:

$$\text{清除率}(\%) = (A - A_1) / A \times 100\%.$$

1.3.4 羟自由基($\cdot OH$)清除活性的测定

参考文献[7],采用邻菲罗啉- Cu^+ - Vc - H_2O_2 体系检测 $\cdot OH$ 清除能力。向测量管中依次加入 50 μL 待测样品(或 50 μL 甲醇作空白),50 μL 1×10^{-3} mol/L $CuCl_2$ 溶液,20 μL 1×10^{-3} mol/L Vc 溶液,50 μL 1×10^{-3} mol/L 邻菲罗啉溶液,800 μL 0.05 mol/L pH 10.5 的 H_2CO_3 缓冲液,放入反应池中。最后注入体积

分数 1% 的 H_2O_2 50.0 μL ,摇匀,启动发光反应,连续测定发光强度 6 s,至出现峰值,记录发光强度(CL,单位 cd),清除自由基的物质可以降低发光强度,根据发光强度的下降可以判断物质清除自由基的能力。

$$\text{发光抑制率}(\%) = (\text{对照 CL} - \text{样品 CL}) / \text{对照 CL} \times 100$$

1.3.5 H_2O_2 清除活性的测定

参考文献[8],采用 H_2O_2 -鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 9.5)体系检测 H_2O_2 。向测量管中加入 50 μL 待测样品(或 50 μL 甲醇作空白),50 μL 1×10^{-3} mol/L 鲁米诺溶液,放入反应池中。800 μL pH 9.5 的碳酸缓冲液,最后加体积分数 0.15% H_2O_2 50 μL (反应总体积为 1 mL),启动发光反应,连续测定反应强度 6 s,至出现峰值,记录发光强度(CL),发光抑制率计算同上。

1.3.6 DPPH \cdot 的清除活性的测定

参照文献[9]的方法操作,向 3.0 mL 60 $\mu mol/L$ DPPH \cdot 溶液中加入 0.5 mL 试样(空白对照用等量甲醇代替),总体积 3.5 mL。摇匀,于室温下放置 30 min 后于 1 cm 比色皿中测定 DPPH \cdot 混合溶液在 517 nm 处吸光值(A_{517})的降低,用 3.0 mL 甲醇与 0.5 mL 试样混合液调仪器零点,以扣除试样本身颜色的影响。抑制率($\%$) = $(A_0 - A_{\text{样}}) / A_0 \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 毛白杨雄花序黄酮对 $O_2\cdot^-$ 的清除和抑制作用

甲硫氨酸作用于 V_{B_2} 时可产生超氧自由基($O_2\cdot^-$), $O_2\cdot^-$ 可还原氮蓝四唑(NBT),使之转化为 CN_4H_4 ,黄酮类化合物可以抑制该反应的发生,故可依据抑制率高低来评价各物质对 $O_2\cdot^-$ 的清除效果。毛白杨雄花序黄酮对 $O_2\cdot^-$ 自由基的清除作用如表 1 所示。由表 1 可见,随着毛白杨雄花序黄酮浓度提高,对 $O_2\cdot^-$ 清除率呈不断上升趋势。其 IC_{50} 为 0.217 mg/mL,而对照实验槲皮素在本体系中 IC_{50} 为 0.014 mg/mL(见表 5)。

表 1 毛白杨雄花序黄酮对 O₂⁻ 的清除作用¹ (n = 2)

编 号	1	2	3	4	5	6	7
浓度/mg·mL ⁻¹	0.050	0.100	0.200	0.400	0.601	0.801	1.001
清除率/%	18.05	38.55	49.40	58.43	68.05	75.90	85.54

1)y = 20.378Lx(x) + 81.177 ,R² = 0.979 ,IC₅₀ = 0.217 mg/mL。

2.2 毛白杨雄花序黄酮对·OH 的清除作用

羟自由基(·OH)是最活泼也最具危害性的自由基,具有极强的反应性,寿命极短,它几乎可以攻击所有的邻近细胞,同细胞中的所有成分发生发应,对机体危害最大,也更难清除,已发现许多抗氧化物质能清除 O₂⁻,但却不能显著地清除·OH 自由基。毛白杨雄花序富含黄酮

化合物,具有较多的酚羟基,因此,可以有效的还原·OH,从而达到对·OH 清除的目的。毛白杨雄花序黄酮对·OH 的清除作用见表 2。结果表明,毛白杨雄花序黄酮对·OH 有一定的清除作用,其浓度与清除率之间也呈量效关系,其 IC₅₀为 0.606 mg/mL,与 0.100 mg/mL 的槲皮素相当(见表 5)。

表 2 毛白杨雄花序黄酮对·OH 的清除作用¹ (n = 8)

编 号	1	2	3	4	5	6	7
浓度/mg·mL ⁻¹	0.037	0.091	0.183	0.365	0.548	0.731	1.095
清除率/%	7.96	12.62	21.85	33.86	48.77	60.49	81.20

1)y = 69.72x + 7.7293 ,R² = 0.9932 ,IC₅₀ = 0.606 mg/mL。

2.3 毛白杨雄花序黄酮对 H₂O₂ 的清除作用

H₂O₂ 能在有氧和碱性条件下氧化鲁米诺产生化学发光。如表 3 所示,毛白杨雄花序黄酮能够明显抑制该体系的化学发光,并且随着黄酮浓度的增大发光值明显下降,其 IC₅₀为

0.061 mg/mL,说明毛白杨雄花序提取物对 H₂O₂ 具有较大的清除作用,或能竞争性的夺取 H₂O₂ 的能量,或者兼有这两种作用。槲皮素在该体系中的 IC₅₀为 0.014 单位,0.061 mg 提取物相当于 0.014 单位槲皮素(表 5)。

表 3 毛白杨雄花序黄酮对 H₂O₂ 的清除作用¹ (n = 8)

编 号	1	2	3	4	5	6	7
浓度/mg·mL ⁻¹	0.016	0.037	0.091	0.183	0.365	0.548	0.731
清除率/%	25.0	49.03	57.24	64.83	73.96	82.89	95.23

1)y = 15.909Ln(x) + 94.593 ,R² = 0.9605 ,IC₅₀ = 0.061 mg/mL。

2.4 毛白杨雄花序黄酮对 DPPH·的清除作用

DPPH·在有机溶液中是一种稳定的自由基,其孤电子在 517 nm 附近有强吸收(呈深紫色),当自由基清除剂存在时,孤电子被配对,吸收消失或减弱,因此通过测定吸收减弱的程度,可评价该自由基清除剂的活性。抗氧化清除剂清除自由基的清除率越高,其抗氧化性越强。如表 4 所示,随着黄酮浓度的增加,对 DPPH·的清除率也随之增加,并呈现一定的量效关系。

其 IC₅₀为 0.068 mg/mL,与 0.015 mg/mL 的槲皮素相当(表 5)。

表 5 毛白杨雄花序黄酮、槲皮素清除自由基的

	能力(IC ₅₀)	mg/mL
	毛白杨雄花序 黄酮(mg/mL)	槲皮素 (mg/mL)
氧阴离子(O ₂ ⁻)	0.217	0.014
羟自由基(·OH)	0.606	0.100
过氧化氢(H ₂ O ₂)	0.061	0.014
DPPH·	0.068	0.015

表 4 毛白杨雄花序黄酮对 DPPH·的清除作用¹ (n = 2)

编号	1	2	3	4	5	6
浓度 mg/mL	0.015	0.037	0.059	0.081	0.104	0.126
清除率/%	14.83	30.69	46.74	59.40	73.18	85.08

1)y = 631.42x + 7.2432 , R² = 0.9963 , IC₅₀ = 0.068 mg/mL。

3 讨 论

近年来愈来愈多的研究资料表明,活性氧与机体细胞的许多功能活动和疾病(如衰老、肿瘤、心脑血管等)密切相关^[10],此外活性氧也是导致食品变质——肉及肉制品的褪色、水果和

蔬菜的褐变、油脂酸败的主要因素。长期以来，国内外许多合成的具有防腐、抗氧化功能的药物与食品添加剂得到广泛应用，但是这些药物和添加剂作为化学合成品，人若长期食用对人体带来副作用，现在日本及一些西方国家已开始限量使用。为了降低活性氧自由基的危害、提高人群的生活质量，寻求高效、价廉、低毒的能够阻断自由基反应的天然抗氧化剂已成为当今研究的热点。

毛白杨雄花序黄酮是一种天然植物中提取的活性成分，具有较强的抗氧化活性，而且具有抗菌、抗病毒的功能，如把它开发为一种纯天然的预防和治疗由活性氧引起的各种疾病如衰老、心脑血管、高血脂、老年性痴呆症甚至癌症的药物以及新型的天然食品抗氧化剂具有广泛的应用前景，从而也为将来毛白杨雄花序的开发利用提供了一种思路。

参 考 文 献

1 郑荣梁，黄中洋主编. 自由基医学与农学基础 [M].

北京：高等教育出版社，2001

2 孟洁，杭瑚. 诃子抗氧化作用的研究 [J]. 食品科学，2000，21(2)：9~13

3 杜小丽. 毛白杨药用研究概述 [J]. 西北药学杂志，1996，11(2)：86~89

4 王欣，汪红，王强. 9种杨属植物雄花序中黄酮类含量的HPLC法测定 [J]. 植物资源与环境学报，2000，9(1)：61~62

5 Kelly W，Wu X Z，Liu R H. Antioxidant activity of apple Peels [J]. J Agric Food Chem，2003，51：609~614

6 张虹，许钢，张辉等. 六月霜提取物清除O₂^{-·}和·OH自由基的体外实验研究 [J]. 食品科学，2000，21(7)：31~34

7 胡天喜. 自由基生命科学进展(第5集) [M]. 北京：原子能出版社，1997，65~71

8 Maria P G，Rita D P，Valeria D A. Evaluation of extracts and isolated fraction from capparispinosa L. buds as an antioxidant source [J]. J Agric Food Chem，2002，50：1168~1171

10 胡天喜，陈杞，陈克明等. 发光分析与医学 [M]. 上海：华东师范大学出版社，1990，62~67

Antioxidant Effects of Chinese White Poplar Male Anthotaxy

Li Fuwei^{1 2} Wang Xiao² Deng Yuguang² Du Jinhua¹

1 (College of Food Science of Shandong Augricultural University，Taian，271018)

2 (Test Center，Shandong Academy of science，Jinan，250014)

ABSTRACT The effects of the extract of male anthotaxy of *Populus tomentosa* Carr. on eliminating active oxygen species in some modified chemical systems were investigated by chemiluminescence and spectrophotometry. The results show that the extract could efficiently eliminated O₂^{-·}，·OH，H₂O₂，DPPH· and the 50% inhibition concentration (IC₅₀) was 0.217 0.606 0.061 and 0.068 mg/mL，respectively.

Key words Chinese White Poplar (*Populus tomentosa* Carr.)，male anthotaxy，flavonoids，antioxidant

政策
法规
标准

我国蜂蜜出口实行预核签章管理制度

近日，从中国食品进出口商会蜂产品分会获悉，蜂蜜出口开始实行出口预核签章管理。蜂蜜出口企业到海关办理蜂蜜出口报关手续时，须持经商会签章后的“签章表”正本及出口合同，未经签章的出口合同海关不接受申报出口。各出口企业必须如实填写“签章申请表”，内容与出口合同内容一致；“签章申请表”中出口数量即为实际发货量，实际发货数量不得超过合同出口数量。