

化橘红多糖对超氧阴离子自由基的清除作用*

程荷凤 李小凤(湛江 524023 广东医学院化学教研室)

摘要 以抗坏血酸为阳性对照,应用邻苯三酚自氧化法检测多糖对超氧阴离子自由基(superoxide anion free radical, SAFR)的清除作用。实验结果表明,对SAFR的清除作用以清除50%SAFR所需药量(EC_{50})表示,抗坏血酸和化橘红多糖的 EC_{50} 分别为120.8 μ g和280.0 μ g。结果显示,化橘红多糖对邻苯三酚自氧化过程中产生的超氧阴离子自由基具有清除作用,且呈剂量依赖关系,但作用比抗坏血酸稍弱。

关键词 化橘红多糖;超氧阴离子自由基;清除作用

Scavenging action to superoxide anion free radical of polysaccharide of *Exocarpium citri grandis*

Cheng Hefeng(Cheng HF), Li Xiaofeng(Li XF) (Department of chemistry, Guangdong Medical college, zhanjiang 524023)

ABSTRACT : Abstract to study the effect of polysaccharide of *Exocarpium citri grandis* scavenging superoxide anion free radical(SAFR). the scavenging action of polysaccharide of *Exocarpium citri grandis* to SAFR was tested by assay of the autoxidation of pyrogallol contrasting with special elimination for SAFR (e. g. ascorbic acid). It was shown that the scavenging action to SAFR(EC_{50}) and the EC_{50} of ascorbic acid and polysaccharide of *Exocarpium citri grandis* was 120.8 μ g and 280.0 μ g respectively. The results suggested that polysaccharide of *Exocarpium citri grandis* can scavenge SAFR connecting with its content, but its effect was weaker than ascorbic acid.

KEY WORDS polysaccharide of *Exocarpium citri grandis*, superoxide anion free radical, scavenging action

化橘红多糖(polysaccharide of *Exocarpium citri grandis*)是芸香科植物化州柚外层果皮中提取的天然多糖类物质。有关多糖类物质的抗氧化作用已有报道^[1]。我们以前的工作曾对化橘红多糖的提取、分离及其化学组成进行过研究^[2]。周博文等人对该多糖的药用研究进行过报道^[3],药理试验证明它具有明显的祛痰作用;临床疗效观察还发现它对慢性支气管炎、慢性阻塞性肺气肿具有良好疗效,未见毒副作用,但至今尚未见生物活性方面的其它报道。本文探讨了化橘红多糖对邻苯三酚自氧化体系中产生的超氧阴离子自由基(superoxide anion free radical, SAFR)的清除作用,以期从天然物质中找到一种高效低毒的天然抗氧化剂。现将实验结果报道如下。

1 材料与仪器

1.1 材料:①化橘红多糖的提取、分离和纯化见文献^[2];②pH8.2, 0.1mol/L Tris - HCl 缓冲液的配制:0.2mol/L Tris 溶液(含4mmol/L EDTA)100ml 及0.2mol/L HCl 45ml 混合,加去离子水至200ml;③3mmol/L 邻苯三酚由10mmol/L HCl 配制,4℃保存;④实验用水均为去离子水。

1.2 仪器 UV - VIS - NIR 扫描分光光度计为日本 SHIMADZU 公司产品,UV - 3101PC 型。

2 实验方法

2.1 邻苯三酚自氧化产物吸收曲线

邻苯三酚在酸性环境中相当稳定,而在碱性条件下能迅速自氧化,实验对0.1mmol/L 邻苯三酚在pH8.2, 0.05mmol/L Tris - HCl 缓冲液中的自氧化产物进行扫描(扫描范围280~600nm),从吸收曲线上即可选定测试波长。

2.2 邻苯三酚的自氧化速率

取pH8.2, 0.05mmol/L Tris - HCl 缓冲液4.5ml,去离子水4.2ml,混匀后置298K水浴保温10min,然后加入298K预温的邻苯三酚0.3ml(空白管用0.1mol/L HCl 溶液),迅速摇匀,倒入比色杯中,在320nm处,每隔半分钟测一次吸光度值,反应体系总体积为9ml。据此可作出不同浓度邻苯三酚自氧化曲线,计算线性范围内每分钟A的增值,即为邻苯三酚的自氧化速率。

2.3 超氧阴离子自由基(SAFR)的生成与清除实验

*省高教厅重点科研项目资助

邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,自氧化过程中产生 SAFR,此 SAFR 继而加速其自氧化反应。如果及时清除 SAFR,就会抑制其自氧化反应速率,借此可以观察化橘红多糖对 SAFR 的影响。基本参考文献^[4]的方法,但测试波长改用 320nm,反应体系总体积为 9ml。取 pH8.2,0.05mol/L Tris - HCl 缓冲液 4.5ml,适量去离子水混匀后置 298k 水浴保温 10min,再加入一定量供试品(化橘红多糖/抗坏血酸),最后加入 3mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.3ml 至终浓度为 0.1mol/L,混匀后在 298k 保温 4min,立即用 8mol/L 的 HCl 溶液 5 滴终止其反应,并在 320nm 处测定吸光度值 A(用去离子水调零)。空白组以去离子水代供试品,并按下式计算清除率(E%)。

$$E\% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

3 结果与讨论

3.1 测试波长的选定。邻苯三酚自氧化机理十分复杂,至今还不十分清楚,从实验来看,邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化,放出 SAFR(O₂⁻),生成有色中间产物。初始溶液呈黄棕色,几分钟后变绿色,几小时后转为黄色,这是因为生成的中间产物不断氧化的结果。测试波长文献^[5]用 420nm,本文结果见图 1。

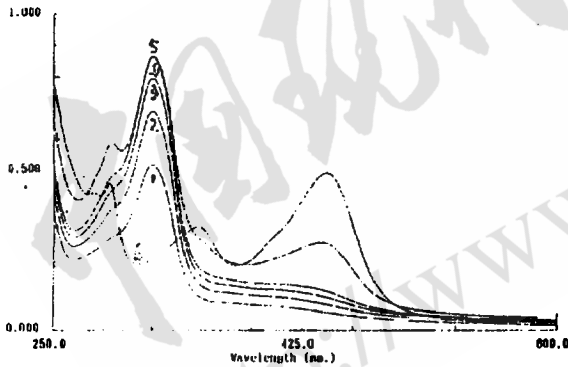


图 1 邻苯三酚自氧化产生吸收曲线

1,2,3,4,5,6,分别为 1,6,11,15min 及 1h,6h 末的扫描

从图 1 可知,邻苯三酚自氧化积累的初始中间产物在 320nm 处有一明显的吸收峰,而且在十几分钟内只看到这个明显的中间产物峰。后随自氧化的继续,中间产物的积累,几小时后此峰转移到 440nm 附近,与文献^[6,7]一致。本实验选择自氧化的初始阶段,所以选定 320nm 作为测试波长。

3.2 邻苯三酚浓度对自氧化的影响。由图 2 可见,初始中间产物的积累在滞后 30s 起,其量与时间成线性关系,线性时间维持 4min 左右。还可见到,不同的邻苯三酚浓度对自氧化速率有影响,在一定范围内,线性速率

随邻苯三酚浓度的增加而增加,同时线性范围则随之缩小。据此推测,适当降低邻苯三酚浓度可提高清除 SAFR 的灵敏度。

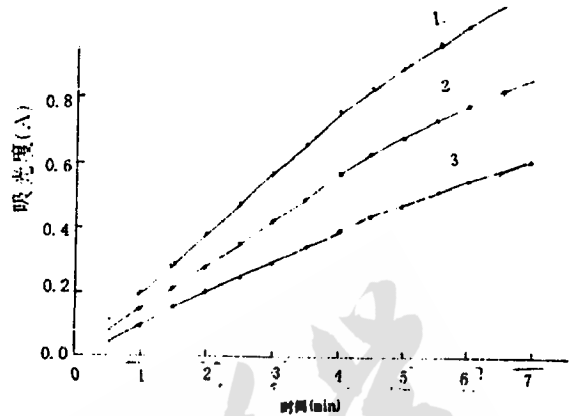


图 2 不同浓度的邻苯三酚自氧化曲线

pH8.2,0.05mol/L Tris - HCl 缓冲液;1 - 0.3mmol/L;2 - 0.2mmol/L;3 - 0.1mol/L

3.3 机体在代谢过程中可以产生 O₂⁻, OH, 过氧化氢 (H₂O₂), 单线态氧 (¹O₂), 它们统称为活性氧自由基。在正常生理状态下,这些活性氧的产生和清除处在生理低水平的平衡状态,对人体是必需的、有利的^[8];当体内自由基产生过多或消除能力下降,就会导致各种炎症,变态性疾病,癌症发生,脏器损伤及衰老等一系列病变。业已证明,适当补充外源性抗氧化剂或给予能促使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物可使上述损伤与病变有所改善。化橘红多糖对 SAFR 的清除作用结果见图 3。

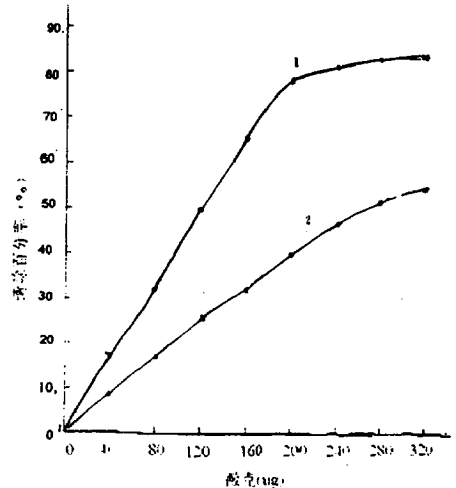


图 3 化橘红多糖对 SAFR 的清除作用

1 - 抗坏血酸;2 - 化橘红多糖

图中显示,该多糖对 SAFR 有清除作用,且呈剂量依赖关系。对 SAFR 产生 50% 清除效应所需的量

(EC₅₀)为 280.0 μ g。实验中以对 SAFR 有较强清除作用的坏血酸作阳性对照,结果表明,抗坏血酸的 EC₅₀为 120.8g。由此可见,化橘红多糖对 SAFR 的清除作用略小于抗坏血酸,但它的这种作用提示它仍然有希望成为一种抗氧化剂或者用作食品添加剂,用作抗衰老及许多与自由基有关疾病防治的药物。

作者认为,评价化橘红多糖上述作用强度尚需要多种实验方法加以证明,例如用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应体系作为产生 SAFR 的体系等。有关上述作用的机理尚待进一步探讨。

参考文献

- 1 宋洪涛,郭涛,宓鹤鸣.天然药物中的抗氧化剂.中草药,1991,22(7):331.
- 2 程荷凤,李小凤.化橘红多糖的分离纯化及组成的气相色谱

谱分析.广东医学院学报,1998,16(1-2):15.

- 3 周博文,胡雅文,吴俊景.化州橘红多糖的药用研究.中国药理学杂志,1993,28(4):135.
- 4 王巨存,邢国胜,胡文铎,等.有机锗 Ge-132 对氧自由基诱导的脂质过氧化的影响.中国药理学杂志,1994,29(1):23.
- 5 袁勤生,王志友,翁清清,等.邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶的活性.医药工业,1983,(1):16.
- 6 黄维嘉,陈宏础,黄天禄.邻苯三酚自氧化抑制法测定人红细胞超氧化物歧化酶.中华医学检验杂志,1989,12(4):206.
- 7 邹国林,桂兴芬,钟晓凌.一种 SOD 的测活方法.生物化学与生物物理进展,1986,(4):71.
- 8 Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys, 1990,280:1.