

# 唐古特白刺果实花色苷体外清除自由基的活性

白新明<sup>1</sup>, 丁晨旭<sup>2,3</sup>, 郭延清<sup>1</sup>, 王凌云<sup>2,3</sup>, 索有瑞<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州 730070;

<sup>2</sup>中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; <sup>3</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:**为探讨唐古特白刺 (*Nitraria tangutorun* Bobr.) 果实花色苷体外清除自由基活性, 研究了其对超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 体系、羟基自由基 ( $\cdot OH$ ) 体系和二苯代苦味酰基自由基 (DPPH  $\cdot$ ) 体系的清除效果, 并与抗坏血酸 (Vc) 进行了比较。结果表明, 该花色苷对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH  $\cdot$  均具有清除作用, 且与浓度呈量效关系。对  $\cdot OH$  和 DPPH  $\cdot$  清除效果相对较好, 优于 Vc。

**关键词:**唐古特白刺; 花色苷; 超氧阴离子; 羟自由基; 二苯代苦味酰基自由基; 自由基清除

中图分类号: R285; Q946.91; TS202.3

文献标识码: A

## Free Radical Scavenging Effects of Anthocyanins from the Fruits of *Nitraria tangutorun*

BAI Xin-ming<sup>1</sup>, DING Chen-xu<sup>2,3</sup>, GUO Yan-qing<sup>1</sup>, WANG Ling-yun<sup>2,3</sup>, SUO You-rui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

<sup>2</sup>Northeast Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

<sup>3</sup>Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The free radical scavenging activities of anthocyanins from the fruits of *Nitraria tangutorun* Bobr. *in vitro* were studied in superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) and DPPH  $\cdot$  systems. The results showed that the anthocyanins possessed remarkable scavenging effects against  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  and DPPH  $\cdot$  in a dose dependent manner. The scavenging capacities of anthocyanins for  $\cdot OH$  and DPPH  $\cdot$  were comparable to those of Vitamin C.

**Key words:** *Nitraria tangutorun* Bobr.; anthocyanins; superoxide anions; hydroxyl radical; DPPH  $\cdot$ ; free radical scavenging

自由基是生物体内在生命活动过程中生物化学反应产生的中间产物。由各种氧自由基所引发的氧化作用, 是导致身体中各组分和器官损伤、病变的重要原因之一<sup>[1]</sup>。随着自由基研究的不断深入, 人们认识到:  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  等自由基和过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 与衰老、癌症、心脑血管疾病和炎症的发生与发展密切相关。因此, 开发高效、无毒、价廉的天然自由基清除剂对养生保健、疾病治疗等具有重要意义。

柴达木盆地的唐古特白刺 (*Nitraria tangutorun* Bobr.) 资源丰富, 分布广, 由于抗逆性强、根系发达, 其再生能力强。研究表明, 柴达木盆地的唐古特白刺果实具有抗氧化作用<sup>[2]</sup>。从其果实中提取的

色素属于花色苷类物质<sup>[3]</sup>, Kano 等已证明紫心甘薯中含有的花色苷在体内都具有抗氧化活性<sup>[4]</sup>。研究表明, 一些天然色素具有抗氧化和清除自由基的作用<sup>[5]</sup>。而对唐古特白刺果实花色苷体外清除自由基能力的研究未见报道, 为明确唐古特白刺果实中的抗氧化成分, 本研究从其中提取花色苷, 探讨了其对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  及 DPPH  $\cdot$  的清除效果, 旨在为开发天然、无毒自由基清除剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

二苯代苦味酰基自由基 (DPPH  $\cdot$ , Sigma 公司); 邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、邻二氮菲、七水合硫酸亚铁、抗坏血酸等均为国产分析纯试剂; X-5 大孔吸附树脂 (南开大学树脂厂); FD-1C 型冷冻干燥机 (郑州长城科工贸有限公司); Cary 300 型紫外可见分光光度计 (美国 Varian 公司)。

收稿日期: 2007-08-21 接受日期: 2007-12-04

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划 (110040321)

\*通讯作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn

## 1.2 花色苷提取

唐古特白刺果实于 2006 年 9 月下旬采自柴达木盆地腹地的诺木洪农场,将白刺果实 40 ℃ 烘干,去除种子,取其果皮、果肉,粉碎过 40 目筛;参考文献<sup>[3]</sup>方法,1%盐酸 + 60%乙醇作为提取剂,料液比 1:4,温度 40 ℃ 的条件下回流提取 3 次,每次 2 h,减压浓缩提取液后,用 X-5 大孔吸附树脂静态吸附纯化白刺花色苷(80%乙醇解析),解析液浓缩,冷冻干燥,得到纯化的花色苷避光保存,备用(7.5 kg 白刺干果经大孔吸附树脂纯化后得到 93 g 紫红色花色苷粉末,得率为 1.24%)。

## 1.3 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·产生及清除

### 1.3.1 邻苯三酚自氧化产物测定波长的选择

邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化、释放出 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·,生成有色的中间产物,关于中间产物的最大吸收波长,所参考的文献报道不一致<sup>[5-8]</sup>,这与实验方法和条件有关,为此对其最大吸收波长进行了测定。

取 0.05 mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,置于 25 ℃ 水浴中预热 20 min,加入 1 mL 蒸馏水和 0.4 mL 25 mmol/L 的邻苯三酚溶液,混匀后于 25 ℃ 水浴中反应 5 min,加入 8 mol/L HCl 1.0 mL 终止反应,以 Tris-HCl 缓冲溶液作参比,紫外可见分光光度计扫描,得吸收光谱图<sup>[6]</sup>,结果见图 1。从图中可见,邻苯三酚自氧化的中间产物在 268 nm 处有最大吸收峰,故确定 268 nm 为测定波长。

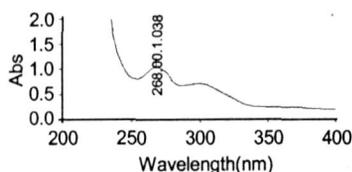


图 1 邻苯三酚自氧化产物的最大吸收峰

Fig. 1 UV spectrum of autooxidative products of pyrogallol

### 1.3.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除试验

空白对照组为上面扫描波长时的溶液,样品组以 1 mL 试样代替蒸馏水,另外设本底组(只用 0.4 mL 10 mmol/L 盐酸代替邻苯三酚),在 268 nm 处测定吸光值,每个处理均做三个重复。同浓度 V<sub>c</sub> 作对比试验。清除率的计算公式:

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率} (\%) = 100 [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_1$$

其中, A<sub>0</sub> 为空白的平均吸光度, A<sub>1</sub> 为试样的平均吸光值, A<sub>2</sub> 为本底的平均吸光值。

## 1.4 ·OH 自由基产生及清除

通过 Fenton 反应所产生的 HO·,可使邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>水溶液氧化为邻二氮菲-Fe<sup>3+</sup>,从而使邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>在 536 nm 处的最大吸收峰消失,据此可推知系统中 HO· 的量的变化。

取 0.75 mmol/L 邻二氮菲溶液 1 mL 于试管中,依次加入 0.2 mmol/mL 的磷酸盐 (pH = 7.4) 缓冲溶液 2 mL 和蒸馏水 1 mL,充分混匀后,加 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL,混匀,加 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL,于 37 ℃ 下水浴 60 min,于 536 nm 处测吸光度 (A<sub>P</sub>)。

同上,只将 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用 1 mL 蒸馏水代替,测吸光度 (A<sub>B</sub>);用试样溶液 1 mL 代替上面的 1 mL 蒸馏水,测吸光度 (A<sub>S</sub>)。同浓度 V<sub>c</sub> 作对照试验。清除率的计算公式如下:

$$HO \cdot \text{自由基清除率} : d (\%) = \frac{A_S - A_P}{A_B - A_P} \times 100$$

## 1.5 清除 DPPH·能力的测定<sup>[11]</sup>

### 1.5.1 DPPH·自由基标准曲线的制作

准确称取 DPPH·标准品 25 mg,用甲醇溶解并定容至 500 mL。得浓度为 0.5 mg/mL 的标准母液,再用甲醇稀释成不同浓度的溶液,分别测 515 nm 处的吸光值,制作标准曲线,见图 2。表明在 0.005 ~ 0.050 mg/mL 范围内 DPPH·自由基的含量与吸光值呈良好线性关系。

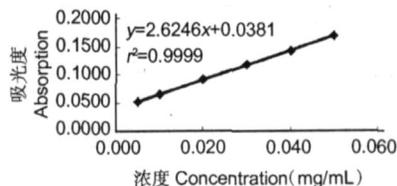


图 2 DPPH·自由基的标准曲线

Fig. 2 Standard calibration curve of DPPH· radical

### 1.5.2 清除 DPPH·自由基活力

取 0.2 mL 不同浓度样品的甲醇溶液,加入 7.8 mL 浓度为 0.025 mg/mL DPPH·甲醇溶液,立即混匀,避光室温放置 30 min,以原溶剂甲醇调零,测定在 515 nm 处吸光度(重复 3 次)。用同浓度 V<sub>c</sub> 作对比试验。按下式计算 DPPH·清除率(将吸光度依标准曲线换算成浓度):

$$\text{清除率} (\%) = \left[ 1 - \frac{(DPPH \cdot)_t}{(DPPH \cdot)_{t=0}} \right] \times 100$$

其中, (DPPH·)<sub>t=0</sub> 表示 0 时刻体系中 DPPH· 的起始浓度; (DPPH·)<sub>t</sub> 表示 30 min 时体系中 DP-

PH·的浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 对碱性邻苯三酚体系产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

邻苯三酚在自氧化反应中产生  $O_2^{\cdot-}$ , 生成有色中间产物, 可用分光光度法测定。自氧化初始阶段中间产物累积, 当加入清除剂时, 可清除  $O_2^{\cdot-}$ , 阻止产物积累。故可通过测定加入抑制剂前后其吸光值的变化来判断花色苷对  $O_2^{\cdot-}$  的清除效果。

不同浓度白刺果实花色苷溶液及对照物 Vc 加入到  $O_2^{\cdot-}$  发生体系后, 其对  $O_2^{\cdot-}$  的清除能力见图 3。白刺果实花色苷与 Vc 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除效果均随其质量浓度的增大而增大。白刺果实花色苷在 0.5 ~ 3.5 mg/mL 范围内, 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除率随着浓度的增加呈平缓上升关系, 最大清除率不到 50%; 而 Vc 在 0.5 ~ 1.5 mg/mL 的范围内, 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除率上升很快, 在浓度达到 1.5 mg/mL 以后, 其清除率趋于平缓, 3.5 mg/mL 时清除率为 95.25%, 其  $IC_{50}$  值低于 0.5 mg/mL。说明唐古特白刺花色苷对  $O_2^{\cdot-}$  有一定的清除能力。

花色苷清除自由基的活性与其自身的结构有一定的关系。A 环上的邻二羟基是清除  $O_2^{\cdot-}$  的活性基团, 而试验中唐古特白刺果实花色苷对  $O_2^{\cdot-}$  的清除能力较低, 可以推测出其花色苷 A 环上可能有邻二酚羟基, 且含量低。

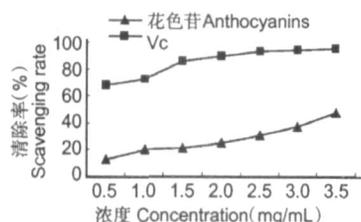


图 3 唐古特白刺果实花色苷和 Vc 对  $O_2^{\cdot-}$  清除能力的比较

Fig. 3  $O_2^{\cdot-}$  radical scavenging of anthocyanins from fruits of *Nitraria tangutorum* Bobr

### 2.2 对 $\cdot OH$ 清除作用

在所有氧自由基中,  $\cdot OH$  是最活泼也是最具危害性的自由基, 往往更难消除, 已发现许多抗氧化剂清除  $O_2^{\cdot-}$ , 但却不能清除  $\cdot OH$ <sup>[9]</sup>, 本试验研究表明, 有机溶剂提取的白刺果实花色苷对  $\cdot OH$  有很强的清除作用。如图 4 可知, 白刺果实花色苷和 Vc

对由 Fenton 反应所产生的  $\cdot OH$  的清除效果均与浓度呈量效关系。在 0.01 ~ 0.22 mg/mL, 白刺果实花色苷与 Vc 对羟自由基的清除率分别为 22.82% ~ 83.97% 和 4.38% ~ 67.28%。花色苷清除  $\cdot OH$  的  $IC_{50}$  值为 0.12 mg/mL 左右, Vc 的  $IC_{50}$  值 0.20 mg/mL 左右, 这说明白刺果实花色苷对  $\cdot OH$  有很强的清除能力, 且稍强于同浓度的 Vc。

花色苷清除自由基时, 一般在 B 环上有邻羟基结构 (B 环上的邻二羟基对  $\cdot OH$  的清除至关重要, 不单促进了电子的离域化, 有助于在供氢后形成相对稳定的自由基中间体), 且羟基数目越多 (羟基的供氢或供电子能力越强), 捕获自由基的能力越强。在试验中表明唐古特白刺果实花色苷对  $\cdot OH$  有显著的清除效果, 可以推测唐古特白刺果实中含有 B 环上具有邻二酚羟基的花色苷, 这类化合物含量较高。

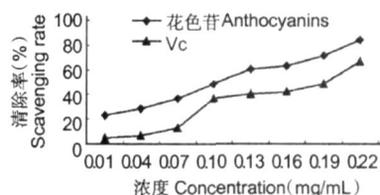


图 4 唐古特白刺果实花色苷和 Vc 对  $\cdot OH$  清除能力的比较

Fig. 4  $\cdot OH$  radical scavenging of anthocyanins from fruits of *Nitraria tangutorum* Bobr

### 2.3 对 DPPH·自由基的清除作用

二苯代苦味酰基自由基 (DPPH·) 是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 若受试物能将其清除, 则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧化氢自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用。DPPH·有个单电子, 其乙醇水溶液呈紫色, 加入受试物后, 可以动态监测其对 DPPH·的清除效果。

不同浓度白刺果实花色苷溶液及对照物 Vc 加入到 0.025 mg/mL DPPH·甲醇溶液, 反应 30 min 后, 其清除能力如图 5 所示。白刺果实花色苷与 Vc 对 DPPH·的清除效果与浓度呈量效关系。白刺果实花色苷在极低浓度时就能显著清除 DPPH·, 浓度为 0.005 mg/mL 时, 清除率为 76.43%, 浓度为 0.030 mg/mL 时, 清除率为 89.15%; 在 0.005 ~ 0.030 mg/mL 范围内, 同浓度的白刺果实花色苷清除效果显著高于 Vc, 此后再提高二者的浓度, 清除

率相当且变化不大。在所选浓度范围内白刺果实花色苷对 DPPH·表现出很强的清除效果。

若受试物将 DPPH·清除,则其对·OH、烷基自由基及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等也有一定的抑制作用。本试验结果证明了唐古特白刺果实花色苷对 DPPH·和·OH 的清除效果是一致的,同样可以推测唐古特白刺果实中含有 B 环上具有邻二酚羟基的花色苷。而关于唐古特白刺果实花色苷清除不同自由基的机理和其花色苷配基的具体种类及糖基的类型、数量还有结合位置等均有待于进一步研究。

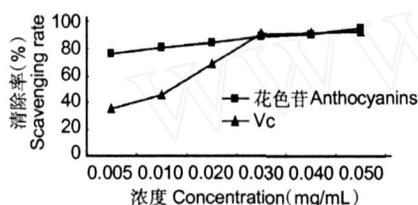


图 5 唐古特白刺果实花色苷和 Vc 对 DPPH·清除能力的比较

Fig. 5 DPPH· radical scavenging of anthocyanins from fruits of *Nitraria tangutonun* Bobr

### 3 结论

本研究表明,唐古特白刺果实花色苷是一种良好的天然自由基清除剂。它不仅是天然食品着色剂,同时也是一种具有显著抗活性氧功能的花色苷。

#### 参考文献

- Ling GT (凌关庭). Antioxidation Food and Health (抗氧化食品与健康). Beijing: Chemical Industry Press, 2004. 344-345.
- Suo YR (索有瑞), Wang HL (王洪伦), Wang HQ (汪汉卿). Research on decreasing blood lipid and anti-oxidation effect of fruit of *Nitraria tangutonun* Bobr from Qaudan Basin *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 54-58.
- Wang LY (王凌云), Ding CX (丁晨旭), Che GD (车国冬), et al Study on extraction process and stability of red pigment from *Nutraria tangutonun* Bobr *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18 (suppl): 112-117.
- Kano M, Takayanagi T, Harala K, et al Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar *Ayan urasaki* *B ioscience B iochan istry*, 2005, 69: 979-988.
- Cui WX (崔文新). Studies on the antioxidation of natural edible pigments Jinan: Shandong Normal University (山东师范大学), Master 2006.
- Xu JG (徐建国), Hu PQ (胡平青). Study on free radical scavenging capacity by cassia seed water extract *in vitro* *Food Sci*(食品科学), 2006, 27(6): 73-76.
- Wang HB (汪河滨), Bai HJ (白红进), Wang JL (王金磊), et al Study on scavenging free radical activity of pigment in *Lycium rethenicin* Murr *Food Dev Res*(食品研究与开发), 2006, 27(11): 8-10.
- He LL (何玲玲), Wang X (王新), Shi ZL (石中亮), et al The scavenging effects of pigment extracted with water from chestnut shell on superoxide anion radicals and hydroxyl radicals *Food and Machinery*(食品与机械), 2006, 22(6): 56-58.
- Wiel AVD, Golde PHMV, Hart HC Blessings of the grape *Eur J Int Med*, 2001, 12: 484-489.
- Tran VH, Roufogalis BD, Duke CC. An efficient synthesis of 5, 5 -(tetradecane-1, 14-diyl) bis (2-methylbenzene-1, 3-diol) and related substances *Australian Journal of Chemistry*, 1997, 50: 747-750.
- Zhao XY (赵晓亚), Zhou XF (周雪峰), Ruan HL (阮汉利), et al Chemical constituents of *Impatiens pritzellii* *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2005, 3: 354-356.
- Catherine L, Georges M, Jose B, et al Triterpene saponins from *Mysis pellucida* *Phytochemistry*, 1994, 37: 1671-1677.
- Masatoshi T, Seiichi Y, Michio K, et al Isolation of norbergenin from *Saxifraga stolonifera* *Phytochemistry*, 1983, 22: 1053-1054.
- Lee YY, Jang DS, Jin JL, et al Anti-platelet aggregating and anti-oxidative activities of 11-O-(4-O-methylgalloyl)-berberin, a new compound isolated from *Crassula* cv 'Hinaturi' *Planta Med*, 2005, 71: 776-777.
- Li ZP (李作平), Zhang ML (张嫚丽), Liu WN (刘伟娜), et al Chemical studies on the flower of *Albizia julibrissin* Durazz (II). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 585-587.

(上接第 826 页)