

荷叶水提物清除自由基的 ESR 研究

余以刚,陈海光,曾庆孝

(华南理工大学食品与生物工程学院,广东 广州 510641)

摘要:目的 研究了荷叶水提物 (LLE)对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除效果。方法 采用电子自旋共振法自旋捕集技术。结果 $26.95\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LLE对次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率达 65.6%,LLE浓度大于 $8.98\text{mg}/\text{mL}$ 时可以全部清除由 Fenton 反应体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 。结论 LLE对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有很强的清除能力。

关键词: 荷叶;自由基;ESR

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)08-0693-03

Action of lotus leaf extract in scavenging free radicals as studied by electronspin resonance

YU Yi-gang, CHEN Hai-guang, ZENG Qing-xiao

(College of Food and Bio-engineering, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong 510641, China)

Abstract **Object** To study the action of lotus leaf extract (LLE) in scavengings hydroxyl and superoxide anion radical. **Methods** By spin trapping with electron spin resonance. **Results** $26.94\mu\text{g}/\text{mL}$ LLE can scavenge 65.60% superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) produced by Hypoxanthine-Xanthine oxidase system, while at concentrations over $8.98\text{mg}/\text{mL}$ a complete eradication of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) produced from Fenton reaction system was achieved. **Conclusion** LLE is highly effective in scavenging $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals.

Key words lotus leaf; free radical; electronspin resonance (ESR)

荷叶为常用中草药,属睡莲科植物莲的叶。荷叶味苦涩,性平。荷叶含多种生物碱:荷叶碱、N-去甲荷叶碱、O-去甲荷叶碱、牛心果碱、绕袂碱、亚美帕碱、N-甲基衡州乌药碱、原荷叶碱、鹅掌楸碱及去氧绕袂碱。另外,荷叶中还含荷叶苷、槲皮素、异槲皮苷以及维生素 G、酒石酸、枸橼酸、苹果酸、草酸、琥珀鞣质及含有抗有丝分裂作用的碱性成分^[1]。

从荷叶中提取的生物碱及黄酮类物质,可用于降血脂和胆固醇以及用于治疗肥胖病^[2,3]。很多药品和功能食品中都含有荷叶或荷叶水提物(简称为 LLE)。

一般研究一种药物对氧自由基的清除效果主要是研究其对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除效果。有采用化学发光方法研究荷叶对体外氧自由基的清除作用的报道^[4]。但电子自旋共振 (ESR)是目前直接测定自由基最有效并用得最多的方法。本实验采用国家生物医学分析中心自由基与顺磁专业实验室的 ESR300型电子顺磁共振波

谱仪来检测 LLE对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果,进一步从自由基的角度来研究荷叶的功能,从而为荷叶的深度开发利用提供理论基础。

1 材料

1.1 实验材料:荷叶于 2000年 8月采自湖北洪湖。荷叶用 100°C 热水提取,过滤,真空浓缩至干物质含量为 $44.8\text{mg}/\text{mL}$,即为 LLE。

1.2 主要仪器:德国 Bruker ESR 300型电子顺磁共振波谱仪。

1.3 主要试剂:二甲基吡咯啉氮氧化物 (DMPO) (Sigma公司)、EDTA(分析纯)、pH7.4, 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS)、次黄嘌呤 (HX)、黄嘌呤氧化酶 (XO)、二乙烯三胺乙酸 (DTPCA)。试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 $\cdot\text{OH}$ 检测方法:在 Fenton 反应体系中,即 H_2O_2 和 Fe^{2+} 的反应体系中,取配好的 $6\text{mmol}/\text{L}$ H_2O_2 $5\mu\text{L}$, $2\text{mmol}/\text{L}$ Fe^{2+} $5\mu\text{L}$, $50\text{mmol}/\text{L}$ ED-

收稿日期:20001-11-20

基金项目:本项目由广东省博士后基金资助

作者简介:余以刚(1968-),男,2000年毕业于无锡轻工业大学食品学院,获工学博士学位。2000年 3月至今在华南理工大学食品与生物工程学院做博士后研究。研究方向:粮油及植物蛋白工程。

TA $5\mu\text{L}$, 0.8 mmol/L DMPO $5\mu\text{L}$ 和 PBS $30\mu\text{L}$, 实验组分别加入不同量的 LLE, 相应减少 PBS 的量, 使反应的最终体积仍为 $50\mu\text{L}$ 混合均匀后立即吸入毛细管中, 一端封口后放入谐振腔, 于 1 min 20 s 后测量其 ESR 波谱

测试条件: 微波功率 5 mW , 增益 3.2×10^4 , 扫描时间 41.94 s , 调制幅度 1 G , 调制频率 25 kHz , 中心磁场 3470 G , 扫场宽度 100 G

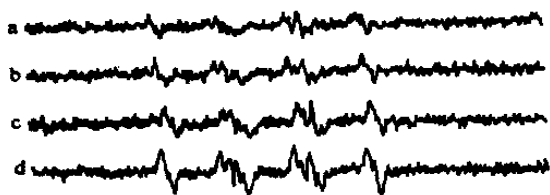
2.2 O_2^- 检测方法: 在 HX-XO 产生 O_2^- 的体系中, 取配好的 4.4 mmol/L HX $5\mu\text{L}$, 0.7 U/mL XO $5\mu\text{L}$, 1 mmol/L DTPCA $5\mu\text{L}$, 0.8 mmol/L DMPO $5\mu\text{L}$ 和 PBS $30\mu\text{L}$ 实验组加入不同量的已稀释 1000 倍的 LLE, 相应减少 PBS 的量, 使反应的最终体积为 $50\mu\text{L}$ 充分混匀后吸入毛细管中, 一端封口, 立即测试

测试条件: 微波功率 10 mW , 增益 2×10^5 , 扫描时间 84 s , 其它条件同检测 $^\circ\text{OH}$ 的条件。

3 结果

3.1 荷叶水提取物 O_2^- 的清除效果: 在 HX-XO 体系中产生的 O_2^- , 经 DMPO 捕集后在 ESR 上得到典型的 4 组 DMPO- O_2^- 自旋加合物波谱, 以波谱第一组峰的峰高 (或峰面积) 来表示信号的相对强度 用下列公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{本底第一组峰峰高} - \text{样品第一组峰峰高}}{\text{本底第一组峰峰高}} \times 100\%$$

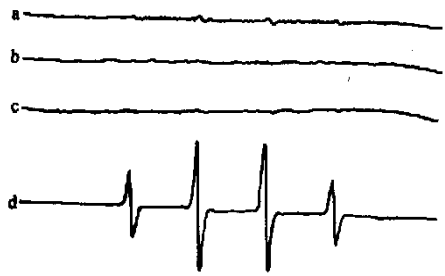


a-26.94 $\mu\text{g/mL}$ b-13.47 $\mu\text{g/mL}$ c-8.98 $\mu\text{g/mL}$ d对照

图 1 LLE 对 HX-XO 产生 O_2^- 的清除作用

由图可见 LLE 能显著清除该体系产生的 O_2^- , 且呈明显量效关系 $26.94, 13.47, 8.98\mu\text{g/mL}$ 的 LLE 对 O_2^- 的清除率分别为: 65.60% , 38.53% , 35.10% 。在相同条件下与之相对照, $2\mu\text{g/mL}$ 的 Vc 对 O_2^- 清除率为 50% 。

3.2 LLE 对 $^\circ\text{OH}$ 的清除作用: 在 Fenten 反应体系中, Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应后产生的 $^\circ\text{OH}$, 与捕捉剂 DMPO 形成自旋加合物 DMPO- OH , 在 ESR 波谱仪上呈现特征的 $1:2:2:1$ 的波谱 (见图 2) 以波谱第二峰峰高值 (mm) 表示信号的相对强度。用下列公式计算清除率:



a-4.49 $\mu\text{g/mL}$ b-8.98 $\mu\text{g/mL}$ c-13.47 $\mu\text{g/mL}$

d对照

图 2 LLE 对 Fenten 体系产生的 $^\circ\text{OH}$ 的清除作用

$$\text{清除率} = \frac{\text{本底第二峰峰高} - \text{样品第二峰峰高}}{\text{本底第二峰峰高}} \times 100\%$$

图 2 a b c 分别是加入 $13.47, 8.98, 4.49\text{ mg/mL}$ LLE 对体系产生的 $^\circ\text{OH}$ 清除作用 清除率分别为: 全清, 97.1% , 95.4% 。在相同条件下与之相对照, $6\mu\text{g/mL}$ 的 Vc 对 $^\circ\text{OH}$ 清除率为 40% 。由于所选 LLE 浓对 $^\circ\text{OH}$ 自由基的清除率太高, 难以计算浓度梯度对清除效果的影响

4 讨论

现代医学研究表明: 肿瘤发生、辐射致癌、心脑血管疾病、器官的缺血再灌注、药物中毒、人体衰老等过程都与活性氧有关^[5]。活性氧包括 O_2^- 、 $^\circ\text{OH}$ 多种有机自由基 (R° 、 RO° 、 ROO°)、单线态氧 ($^1\text{O}_2$)、无机和有机过氧化氢 (H_2O_2 、 ROOH) 等等, 它们有很强的生物活性。机体中适量的自由基对细胞的分裂、分化、生长、消炎解毒起着积极的作用; 而过量则会引起蛋白质变性、酶失活、多糖降解、DNA 断裂、生物膜结构损伤、细胞解体乃至机体病变和死亡。因此对体内过剩自由基的清除就非常有必要。

从实验结果可以看出, LLE 对 $^\circ\text{OH}$ 和 O_2^- 有很强的清除能力, 而且 LLE 对 O_2^- 的清除能力比对 $^\circ\text{OH}$ 的清除能力要大很多。 $26.94\mu\text{g/mL}$ 的 LLE 对 O_2^- 的清除率达 65.60% , 大约 $40\mu\text{g/mL}$ 的 LLE 就可以全部清除 O_2^- , 而 LLE 浓度大于 8.98 mg/mL 时才可以全部清除 $^\circ\text{OH}$ 。

荷叶具有调节血脂的功能, 主要活性部位在黄酮和生物碱, 作用特点主要是促进胆固醇的代谢^[6]。

由此可以得出一个结论: 荷叶水提取物是一种非常优良的抗氧化剂, 在较低浓度和不需要特别的精制的情况下即可显示出非常强的抗氧化能力。

荷叶具有如此卓越的性能, 在医药和功能食品行业应该得到更为广泛的重视。

参考文献:

[1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志 [M]. 第五

- 册. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [2] 许腊英, 毛维伦, 江向东, 等. 荷叶降血脂的开发研究 [J]. 湖北中医杂志, 1996, 4: 42-43.
- [3] 龚康敏, 魏克民, 厉兰娜, 等. 荷叶饮对高脂血大鼠血脂及血流变学的影响 [J]. 河南中医, 1999, 19(2): 28-29.
- [4] 肖华山, 黄代青, 傅文庆, 等. 荷叶对体外氧自由基的清除作用

- 及其对果蝇寿命的影响 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(6): 374-378.
- [5] 胡天喜, 陈季武, 许建营, 等. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(5): 465-470.
- [6] 杜力军, 孙虹, 李敏, 等. 荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(7): 526-528.

何首乌毛状根培养及大黄酚的含量测定

王振华, 杜勤, 刘浩, 许晓峰, 张俊荣, 简慧兰*, 李莉*, 曾绍培
(广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510407)

摘要: 目的 测定何首乌毛状根中大黄酚的含量。方法 用发根农杆菌 Ri 15834 菌株感染何首乌茎、叶外植体, 均可诱导出毛状根, 并能合成大黄酚, 采用薄层扫描法测定毛状根中大黄酚。结果 毛状根中大黄酚的含量为 0.0164%。结论 该毛状根具有典型的毛状根形态特征, 大黄酚含量低于何首乌药材。

关键词: 何首乌; 毛状根; 大黄酚

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)08-0695-02

Culturing of hairy root of *Polygonum multiflorum* and determination of its chrysophanol content

WANG Zhen-hua, DU Qin, LIU Hao, XU Xiao-feng, ZHANG Jun-rong,
JIAN Hui-lan, LI Li, ZENG Shao-pei

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou Guangdong 510407, China)

Abstract Object To determine the content of chrysophanol in the cultured hairy root of *Polygonum multiflorum* Thunb.

Methods Hairy root of *P. multiflorum* was induced from stem and leaf explant with agrobacterium rhizogens Ri 15834, and its chrysophanol content determined by TLCs. **Results** The transferred root showed typical hairy characteristics and could synthesize chrysophanol to a content of 0.0164% as determined by TLCs. **Conclusion** Content of chrysophanol in the cultured hairy root was lower than that of the crude medicinal material.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb; hairy root; chrysophanol

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 是著名的常用传统中药, 药用块根, 具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功能。何首乌的化学成分主要有蒽醌类化合物、卵磷脂以及微量元素等。

毛状根培养是植物细胞培养一种新技术。毛状根培养系统具有生长迅速、不需要外源生长激素、产生次生代谢产物稳定等优点。目前已开展毛状根培养药用植物^[1,2]。但关于何首乌毛状根及其有效成分方面的研究未见报道。本研究采用发根农杆菌 Ri 15834 菌株感染何首乌茎、叶外植体, 诱导出毛状根, 并对毛状根中大黄酚进行含量测定。

1 材料与方法

1.1 细菌培养: 取发根农杆菌 Ri 15834 菌株, 接种到 YEB 固体培养基中活化, 然后转移至 YEB 液体

培养基中振荡培养, 使处于指数生长期, 用于转化何首乌。

1.2 外植体制备: 取何首乌茎、叶, 在 75% 乙醇中浸泡 0.5 min, 再用 0.1% 升汞消毒 15 min。无菌水冲洗干净后, 茎切成 1 cm 长的小段, 叶切成 1 cm×1 cm 的小块, 接种于无激素的 MS 培养基上预培养 48 h 后用于转化。

1.3 毛状根的诱导: 将上述外植体浸入用 MS 培养液稀释 1 倍的农杆菌菌液中 10 min, 取出, 吸干多余液体, 置 MS₀ 为培养基上培养两天后取出, 转入含 500 mg/L 羧苄氨基青霉素的 MS 培养基中, 21℃ 暗箱培养。

1.4 毛状根的培养: 将长度超过 3 cm 的毛状根转移到 MS 固体培养基上继代培养, 以后每 21 d 继代

收稿日期: 2000-09-17

基金项目: 本研究为广东省中医药管理局课题 B96-31 的一部分研究内容

作者简介: 王振华 (1966-), 男, 硕士研究生毕业, 讲师。研究方向: 中药制剂研究、中药质量、标准制订、中药新资源的开发利用。

* 广州中医药大学 98 级中药资源专业本科生