

References

- [1] Mei M Z, Zhuang Q Q, Liu G Z, *et al.* Study on rapid sieving method for hypocholesterol agents [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1979, 14(1): 8-10.
- [2] Su W, Guo Q. Summary of modern pharmaceutical study about *Radix Polygoni Multiflori* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(2): 119-121.
- [3] Yao G G, Sun X P. Determination of anthraquinone in *Radix Polygoni Multiflori* and its preparations by magnesium acetate-methanol colorimetry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1983, 14(6): 15-17.
- [4] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II .
- [5] Vioria L, Yang R. Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments [J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 1097-1106.
- [6] Craveiro A A, Matos F J. Microwave oven extraction of essential oil [J]. *Flavor Fragrance*, 1989, 4(1): 43-44.

褐藻中高相对分子质量褐藻多酚的抗氧化活性研究

魏玉西,徐祖洪*

(中国科学院海洋研究所,山东 青岛 266071)

摘要:目的 评价鼠尾藻和海黍子两种褐藻中高相对分子质量褐藻多酚的抗氧化活性。方法 分别利用 3 种体系,通过对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子(O_2^-)和 1,1-二苯基-2-苦味肼基自由基(DPPH \cdot)清除效率来评价其抗氧化活性。结果 两种褐藻中高相对分子质量褐藻多酚对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和 DPPH \cdot 均有很高的清除效率,且效果相近。结论 鼠尾藻和海黍子两种褐藻中高相对分子质量褐藻多酚具有较强的抗氧化活性,是一类潜在的海洋生物天然抗氧化剂。

关键词:鼠尾藻;海黍子;褐藻多酚;自由基;抗氧化

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)04-0317-03

Studies on antioxidative activity of high molecular weight polyphenols from two kinds of brown algae

WEI Yu-xi, XU Zu-hong

(Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China)

Abstract Object To evaluate the antioxidative activity of the high molecular weight polyphenols from *Sargassum thunbergii* Kuntze and *Sargassum kjellmanianum* Yendo. **Methods** Three kinds of evaluation systems for antioxidative activity were adopted to test their efficiency to scavenge radicals (including hydroxyl free radical $\cdot\text{OH}$, superoxide radical O_2^- and DPPH \cdot free radical). **Results** The high molecular weight polyphenols from the two kinds of brown algae had strong activity to scavenge the radicals above. Furthermore, they acted almost as the same level. **Conclusion** The high molecular weight polyphenols from the two kinds of brown algae had strong antioxidative activity, thus they are the potential, natural and marine antioxidants.

Key words *Sargassum kjellmanianum* Yendo; *Sargassum thunbergii* Kuntze; brown algae polyphenol; free radical; antioxidation

我国沿海自然生长着大量的褐藻,资源十分丰富。其中,海黍子 *Sargassum kjellmanianum* Yendo 与鼠尾藻 *S. thunbergii* Kuntze 具有软坚散结、利尿消肿、清热化痰之功效,已被收载于《中国海洋药物辞典》^[1]。褐藻多酚亦称间苯三酚鞣质(phlorotannin),是一类来自褐藻,以间苯三酚为结构单元的聚

合物,具有许多独特的生物活性和医药价值^[2]。从泡叶藻 *Ascophyllum nodosum* 和墨角藻 *Fucus vesiculosus* 分离出的高相对分子质量褐藻多酚具有多种生物活性,如裂解质粒 DNA^[3]、抑制某些酶的活性^[4]等。海黍子提取物对不饱和脂质具抗氧化^[5]、抑菌活性^[6],海黍子多酚对亚油酸甲酯的氧化^[7]、鱼油

* 收稿日期: 2002-08-21

基金项目: 山东省教委资助项目(J01C11)

作者简介: 魏玉西(1964-),男,山东青岛人,1990年毕业于青岛海洋大学水产学院,获硕士学位;1990年至1995年工作于青岛市卫生防疫站,主管医师;1995年至今工作于青岛大学,现为青岛大学生物系副教授,在职攻读中国科学院海洋研究所博士学位,研究方向为海藻化学与海洋药物。Tel (0532)5953227 Fax (0532)5953138 E-mail weiyuxi@sohu.com

的酸败具有较强的抑制作用^[8]。

本实验以青岛海域最常见的两种褐藻——鼠尾藻和海黍子为原料分离并部分纯化出高相对分子质量褐藻多酚,利用 3种体系来评价两种褐藻中高相对分子质量褐藻多酚的抗氧化活性

1 材料、试剂与仪器

海黍子 *S. kjellmanianum* Yendo 与鼠尾藻 *S. thunbergii* Kuntze 于 2001年 7月从青岛太平角潮间带定点采样,除去附生生物,淡水冲净后 - 20℃ 冷冻保存。

1, 10-邻二氮杂菲 (phen)系 Fluka 公司产品,鲁米诺 (3-氨基邻苯二甲酰肼)系 Merk 公司产品, 1, 1-二苯基-2-苦味肼基自由基 (DPPH[•])系日本东京化成工业株式会社产品,三羟甲基氨基甲烷 (Tris)系 Amresco 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

RE-52A型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产品; S54型紫外-可见分光光度计,上海棱光技术有限公司产品; Ox-7型化学发光分析仪,日本东京进口产品。

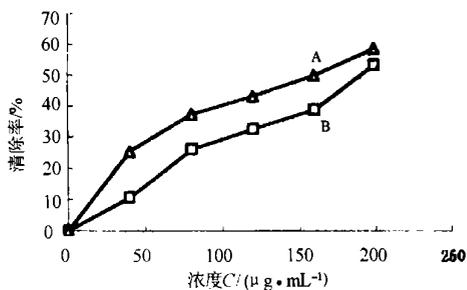
2 方法与结果

2.1 样品处理及高相对分子质量褐藻多酚的提取分离及部分纯化:将冷冻样品解冻,滤纸拭干藻体,取藻体顶部,称量后用组织捣碎机破碎。加入 85% 乙醇溶液振荡提取 12 h,粗提液用乙醚、氯仿各萃取 3次,合并水相,在 35℃ 下减压蒸馏除去乙醇后,置于透析袋中对蒸馏水透析 48 h,以聚乙二醇 (PEG)浓缩,分别得海黍子高相对分子质量褐藻多酚 (SKH)和鼠尾藻高相对分子质量褐藻多酚 (STH)。

2.2 多酚含量测定:以 AOAC (1970)的标准分析方法测定,即用 Folin-Denis 试剂在碱性条件下与多酚类物质形成蓝色复合物后,用紫外-可见分光光度计作比色分析^[9]。

2.3 对羟自由基 (•OH)的清除作用:•OH 的产生和清除参照文献^[10]的方法进行。取 7.5 mmol/L 邻二氮菲溶液 0.75 mL,加 pH= 7.4 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 2.5 mL 充分混匀后,加 7.5 mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.75 mL,每加一管立即混匀,加 0.1% H₂O₂ 1.0 mL,最后以水补充体积至 5 mL。反应液 37℃ 保温 1 h,测 536 nm 处吸光度 $A_{\text{损伤}}$ 。实验组先加样品液后加 H₂O₂,测 $A_{\text{加样}}$;未损伤管不加 H₂O₂ 和样品液,测 $A_{\text{空白}}$ 。结果见图 1。

$$\text{•OH清除率} = (A_{\text{加样}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\%$$



A-STH B-SKH

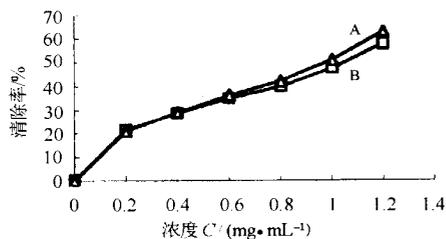
图 1 STH 和 SKH 对 •OH 的清除作用

Fig. 1 Scavenging activities of STH and SKH to •OH

由图 1 可见,随着 STH SKH 浓度的增加,对 •OH 的清除效率也随之增加,说明他们有一定清除 •OH 作用。在该实验条件下,当 STH 浓度达 200 μg/mL 时,对 •OH 的清除效率高达 58.45%,而加入相同浓度的 SKH 对 •OH 的清除效率亦达 53.04%。

2.4 对超氧阴离子 (O₂⁻) 的清除作用: O₂⁻ 的产生与清除参照文献^[11]的方法进行。在测定管中加入 5 mmol/L 鲁米诺 (3-氨基邻苯二甲酰肼) 溶液 800 μL (用 pH= 10.16 0.1 mol/L 的 NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液配制),加入不同量的供试样品,混匀后,加入 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 50 μL (用 10 mmol/L HCl 配制),迅速置于发光仪测定室中,启动反应,测定 15 s 内发光强度平均值,同时用二次去离子水做空白对照。结果见图 2。

$$\text{清除率} = (\text{空白对照值} - \text{样品值}) / \text{空白对照值} \times 100\%$$



A-STH B-SKH

图 2 STH 和 SKH 对 O₂⁻ 的清除作用

Fig. 2 Scavenging activities of STH and SKH to O₂⁻

由图 2 可见,STH, SKH 均有较强清除 O₂⁻ 能力,且随加入的 STH, SKH 浓度的增加,清除率随之提高。在 STH 浓度为 1.2 mg/mL 时对 O₂⁻ 的清除率达 63.12%,相同浓度的 SKH 为 58.02%,SKH 和 STH 对 O₂⁻ 的清除效果相近。

2.5 对 DPPH[•] 的清除作用:参照 Larrauri^[12]和 Yokozave^[13]方法进行。向 3.5 mL DPPH[•] 溶液 (浓度为 5.0 × 10⁻⁵ mol/L) 中加入样品溶液及溶剂使

总体积达 4.0 mL 混匀后在 517 nm 处测吸光度值, 平行测试 3 次, 计算清除效率, 并将 STH, SKH 与合成抗氧化剂 BHT, TBHQ, 茶多酚 (TP) 分别配制成浓度为 30.00 mg/L 的溶液, 按上述方法测定吸光度值, 计算清除效率。结果见图 3, 4

$$\text{DPPH}^\circ \text{ 清除效率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0$$

式中 A_0 : 3.5 mL DPPH[°] 溶液 + 0.5 mL 溶剂的吸光度;
 A_1 : 3.5 mL DPPH[°] 溶液 + 0.5 mL 抗氧化剂溶液的吸光度;
 A_2 : 3.5 mL 溶剂 + 0.5 mL 抗氧化剂溶液的吸光度。

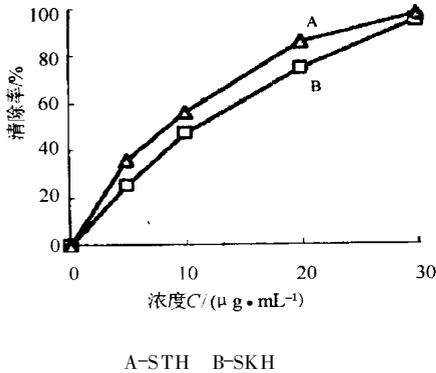


图 3 STH 和 SKH 对 DPPH[°] 的清除作用

Fig. 3 Scavenging activities of STH and SKH to DPPH[°]

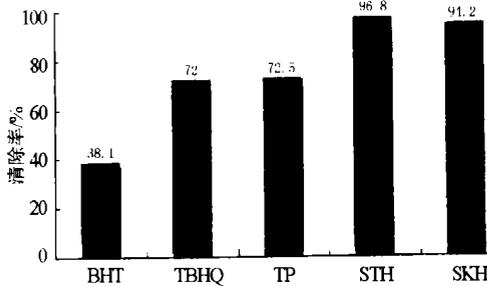


图 4 5 种抗氧化活性物对 DPPH[°] 清除效率比较

Fig. 4 Comparison among five kinds of antioxidants with activity of scavenging DPPH[°] radical

由图 3 可见, 在极低浓度 (20 μg/mL) 下, STH, SKH 对 DPPH[°] 清除效率均达 70% 以上; 由图 4 可见, 在相同浓度 (30 μg/mL) 作用时间及其他外界条件相同的条件下, STH, SKH 对 DPPH[°] 具有更强清除活性。其中 STH 和 SKH 对 DPPH[°] 的清除率分别高达 96.8% 和 94.2%, 而 TBHQ 和 TP 相近且在 73.0% 以下, BHT 最低, 仅 38.1%。

3 讨论

自由基衰老学说认为, 在生物体中形成的活性氧 (O₂^{·-}, ·OH, H₂O₂, 过氧化物等) 能氧化类脂、蛋白质、酶和 DNA 等生物体各组成部分, 从而导致生物膜损伤、蛋白质变性、酶失活和 DNA 复制错误, 从

而引起疾病 (肿瘤、炎症、辐射损伤等) 和生物体的衰老^[14]。因此, 清除体内过量自由基, 生理意义重大。

近年来, 随着对褐藻深加工和综合利用研究的日益深入, 褐藻多酚以其独特的生物活性和药理活性正在受到愈来愈多的关注。本实验结果表明, STH 和 SKH 均具有较强的自由基清除活性, 且效果相近。特别值得提出的是, 在极低浓度 (30 μg/mL) 下, STH 和 SKH 对 DPPH[°] 的清除率远高于茶多酚和人工合成抗氧化剂 BHT, TBHQ。而且, 鼠尾藻和海黍子是沿海的常见海藻, 生物量巨大, 至今未得到充分合理的利用。因此, 鼠尾藻和海黍子高相对分子质量褐藻多酚作为海洋天然抗氧化活性物质, 其应用前景十分广阔。

References

- [1] Jiang F W, Zhang Y S. *Dictionary of Chinese Marine Drugs* (中国海洋药物辞典) [M]. Beijing: China Ocean Press, 1993.
- [2] Round F E, Chapman D J. *Progress in the Phycological Research* [M]. Vol 4. Bristol: Biopress Ltd., 1986.
- [3] Blunden G, Currie J, Thurston D E. Cleavage of DNA by brown algal polyphenols [J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6: 281-284.
- [4] Barwell C J, Blunden G, Manandhar P D. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of α-amylase, lipase, and trypsin [J]. *J Appl Phycol*, 1989, 1: 319-323.
- [5] Yu G L, Lu Z H, Wang S G, et al. Antioxidative activity of alga (*Sargassum kjllmanianum*) extracts to unsaturated lipids. [J]. *J Ocean Univ Qingdao* (青岛海洋大学学报), 2000, 30(1): 75-80.
- [6] Shi R X, Xu Z H. Antimicrobial activities of nine seaweeds in Qingdao coast [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1997, 4: 16-19.
- [7] Lü Z H, Yu G L, Chi L L, et al. Antioxidation of *Sargassum kjllmanianum* phlorotannins to methyl linolenat [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2001, 6: 25-28.
- [8] Yan X J, Li X C, Zhou C X, et al. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjllmanianum* [J]. *J Appl Phycol*, 1996, 8: 201-203.
- [9] Yan X J. Detection of polyphenyls from normal brown algae in China. [J]. *Stud Mar Sin* (海洋科学集刊), 1996, 37: 61-65.
- [10] Chen J W, Hu T X. A chemiluminescence system for producing and scavenging ·OH radical. [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1992, 19(2): 136-140.
- [11] Hu B L, Hang H. Study on the antioxidative activity of *Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *crispa* (Thunb.) Decne. [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2001, 27(11): 9-11.
- [12] Larrauri J A, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Effects of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(7): 2694-2697.
- [13] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(6): 2143-2150.
- [14] Chen A, Zhou M. *Free Radicals in Medicine* (自由基医学) [M]. Beijing: People's Military Surgeon Press, 1991.