

- [3] Li J, Liu Y Q, Sun G Z, *et al.* The experimental studies on adriamycin induced human hepatoma cells apoptosis [J]. *Chin J Clin Oncology Rehabilitation* (中国肿瘤临床与康复), 1999, 6(6): 14.
- [4] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing University of Medical Science and Peking Union Medical College United Press, 1997.
- [5] Zhuo L F, Qi G Y, Zhang X H, *et al.* *Flow Cytometry and Biomedicine* (流式细胞术与生物医学) [M]. Shenyang: Liaoning Science Press, 1996.
- [6] Ji Y B. *Pharmacological Action and Application of Marine Medicine and Limnology Medicine* (海洋湖沼药物药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2003.
- [7] Ji Y B, Yang S L, Gu C S. Effects of SFPS on content of LPO and activities of GSH-PX, CAT, SOD in L615 Tumor-burdened mice [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 1994, (2): 20-30.
- [8] Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and adanomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumor cells [J]. *Biochemical Pharmacol*, 1993, 469: 375.

射干中异黄酮成分清除自由基的作用

秦民坚, 吉文亮, 刘峻, 赵俊, 余国奠*
(中国药科大学中药学院, 江苏南京 210038)

摘要:目的 研究射干 *Belamcanda chinensis* 中分离的 4 种异黄酮类成分清除 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 自由基的能力。方法 采用生物化学发光法测定。结果 射干根茎中分离得到的异黄酮成分野鸢尾苷元 (irgenin, I), 鸢尾苷元 (tectorigenin, II), 鸢尾苷 (tectoridin, III), 5, 6, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基异黄酮 (5, 6, 7, 4'-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone, IV) 均具有清除自由基的作用, 其中鸢尾苷元对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 氧自由基清除作用的能力最强。结论 射干根茎中的 4 种异黄酮类成分具有清除自由基的作用。

关键词: 射干; 异黄酮; 自由基; 生物化学发光法

中图分类号: R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0640-02

Scavenging effects on radicals of isoflavones from rhizome of *Belamcandae chinensis*

QIN Min-jian, JI Wen-liang, LIU Jun, ZHAO Jun, YU Guo-dian

(College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Key words rhizome of *Belamcandae chinensis* (L.) DC.; isoflavones, radical; biochemiluminescence

近年研究发现, 中草药中某些有效成分具有清除自由基的作用。例如甘草中甘草酸和甘草次酸具有不同程度的抑制 $O_2^{\cdot-}$ 的作用^[1], 云芝糖肽和灵芝多糖具有清除活性氧的作用, 与其提高机体免疫能力和防癌抗癌机制有关^[2]。不同的天然产物对不同类型的自由基清除效果各异, 机制各不相同, 所以应建立不同的自由基模型来评价药物的抗氧化自由基活性。本实验采用邻苯三酚-鲁米诺 (luminol) 碳酸缓冲液 (pH 10.2), 邻菲罗啉-Cu²⁺ 抗坏血酸-H₂O₂, H₂O₂-鲁米诺 (luminol) 碳酸缓冲液 (pH 9.5) 3 个产生活性氧和化学发光体系, 检测射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 中 4 种异黄酮单体成分清除 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的作用, 为射干类中药筛选自由基清除剂提供一条有效的途径。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: SHG-C 生物化学发光测量仪 (上海上立检测仪器厂), 分析天平 (上海天平仪器厂), PHS-25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), 旋涡混合器 (上海环宇仪器厂)

1.2 试剂: 无水碳酸钠 (天津化学试剂厂, 优级纯), 碳酸氢钠 (上海虹光化工厂, 分析纯), 乙二醇四乙酸二钠 (EDTA) (上海化学试剂总厂, 标准纯), 焦性没食子酸 (邻苯三酚) (遵义第二化工厂, 分析纯), 3-氨基邻苯二甲酰肼 (鲁米诺, luminol, Sigma 公司), NaH₂PO₄·2H₂O (南京化学试剂厂, 分析纯), Na₂HPO₄·12H₂O (上海试剂二厂, 分析纯), 四硼酸钠 (硼砂) (太仓化工二厂, 分析纯), 1, 10-菲罗啉 (邻菲罗啉) (上海试剂三厂, 分析纯), CuSO₄·5H₂O (合肥工大化学试剂厂, 分析纯), 30% 过氧化氢 (上海桃浦化工厂, 分析纯)。

* 收稿日期: 2002-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170103); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK97085)

2 实验方法

2.1 样品准备: 实验所用异黄酮野鸢尾苷元 (irgenin, I), 鸢尾苷元 (tectorigenin, II), 鸢尾苷 (tectoridin, III), 5, 6, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基异黄酮 (5, 6, 7, 4'-tetrahydroxy-8-menthoxylisoflavone, IV) 均从射干 *B. chinensis* (L.) DC. 根茎中分离, 并经质谱、核磁共振、红外光谱等确定结构, HPLC 法测定纯度均在 98% 以上

2.2 邻苯三酚-鲁米诺-碳酸缓冲液 (pH 10.2) 体系检测 $O_2^{\cdot -}$ 清除能力: 向测量管中加入 $10\mu\text{L}$ 待测样品 (或 $10\mu\text{L}$ 甲醇作空白), 再加入 $\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 邻苯三酚溶液 $20\mu\text{L}$, 放入反应池中。原位注入 $970\mu\text{L}$ 鲁米诺-pH 10.2 碳酸缓冲液混合液 (1: 2) 启动发光 (反应总体积为 1mL), 记录发光强度

2.3 邻菲罗啉- Cu^{2+} -抗坏血酸- H_2O_2 体系检测 $\cdot\text{OH}$ 清除能力: 向测量管中依次加入 $50\mu\text{L}$ 待测样品 (或 $50\mu\text{L}$ 甲醇作空白), $\times 10^{-3}\text{mol/L}$ $\text{Cu}-\text{SO}_4$ 溶液 $50\mu\text{L}$, $\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 抗坏血酸溶液 $20\mu\text{L}$, $\times 10^{-3}\text{mol/L}$ 邻菲罗啉溶液 $50\mu\text{L}$, 0.15mol/L H_2O_2 溶液 $50\mu\text{L}$, 放入反应池中。原位注入 $780\mu\text{L}$ pH 9.24, 0.05mol/L 硼砂溶液启动发光 (反应总体积为 1mL), 记录发光强度

2.4 H_2O_2 -鲁米诺-碳酸缓冲液 (pH 9.5) 体系检测 H_2O_2 清除能力: 向测量管中加入 $50\mu\text{L}$ 待测样品 (或 $50\mu\text{L}$ 甲醇作空白), 0.15% H_2O_2 溶液 $50\mu\text{L}$, 放入反应池中。原位注入 $900\mu\text{L}$ 鲁米诺-(pH 9.5) 碳酸缓冲液混合液 (1: 7) 启动发光 (反应总体积为 1mL), 记录发光强度

2.5 发光抑制率的计算: 生物化学发光法测定自由基时, 一定浓度范围内发光强度 (CL) 与自由基的数量呈相关关系, 故可用 CL 表示自由基的产生量。清除自由基的物质可以降低 CL, 根据 CL 下降可以判断物质清除自由基的能力。

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

以发光抑制率为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘出发光抑制曲线。一般用发光抑制率为 50% 时的浓度 (IC_{50}) 来衡量样品对自由基的清除能力。 IC_{50} 值越小, 表明样品清除自由基的能力越强

3 结果

射干根茎中分离得到的单体化合物清除自由基作用见表 1, 其中以 II 对 $O_2^{\cdot -}$, $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 清除效果最好, 活性最强, I 对 H_2O_2 清除能力很好, III 对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力也较强, IV 对 $\cdot\text{OH}$ 也有清除作用。

4 讨论

从表 1 图 1 和表 2 可以看出, 射干中分离出的异黄酮类化合物清除自由基的能力和其结构相关, A 环 8 位碳上的甲氧基化和 7 位碳上的 O 糖苷化降低了 $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 自由基的清除能力, B 环 4' 和 5' 位碳上的甲氧基化降低了 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用。

表 1 射干中异黄酮类化合物清除自由基的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Table 1 Scavenging effects of isoflavones in *B. chinensis* on radicals ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

化合物	自由基清除能力 $\text{IC}_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	$O_2^{\cdot -}$	$\cdot\text{OH}$	H_2O_2
野鸢尾苷元	2.18 ± 0.007	-	0.365 ± 0.121
鸢尾苷元	0.380 ± 0.021	0.184 ± 0.009	0.263 ± 0.032
鸢尾苷	-	0.239 ± 0.057	1.687 ± 0.135
5, 6, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基异黄酮	-	1.259 ± 0.036	-

“-”表示该化合物无清除此类自由基的作用

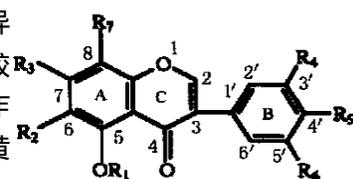
“-” indicate that the compound has no effect on the radical

表 2 射干中 4 种异黄酮的结构

Table 2 Structure of four isoflavones in *B. chinensis*

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
野鸢尾苷元	H	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H
鸢尾苷元	H	OCH ₃	OH	H	OH	H	H
鸢尾苷	H	OCH ₃	Oglu	H	OH	H	H
5, 6, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基异黄酮	H	H	OH	OH	OH	H	OCH ₃

实验中发现, 异黄酮类化合物具有较好的清除自由基作用。已有研究表明, 异黄酮类化合物具有抗自由基^[3,4]、抗氧化、抗



菌、抗病毒、抗炎症等多种生理活性及药理作用, 而射干类药物相对于文献报道的其他一些含有黄酮类化合物的中药, 其整体清除自由基能力更强, 其中鸢尾苷元 (tectorigenin) 为很有开发前景的抗氧化剂

References

[1] Gao D Y, Fang Y Z. *Advances in Free Radical Life Science* (自由基生命科学进展) [M]. Vol 1. Beijing: Atomic Energy Publisher, 1993.

[2] Hu T X, Chen J W, Xu J Y, et al. Effects of polysaccharide peptide of *Coriolus* and polysaccharide of *Ganoderma* on scavenging active oxygen species [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1992, 24(5): 465-470.

[3] Zheng X Q, Hu C. The scavenging effect of rutin etc. on superoxide radicals with chemiluminescent method [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1997, 32(3): 140-142.

[4] Zhang Y, Wu X Q, Ding X L. Studies on the relationship between the structure of flavonoids and their scavenging capacity on active oxygen radicals by means of chemiluminescence [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10(4): 26-33.