

姜黄素体外清除活性氧自由基 及抗氧化作用研究

王雪梅, 张建胜, 高云涛*, 戴云

(云南民族大学化学与生物技术学院, 云南昆明 650031)

摘要:利用 Fenton 反应产生羟自由基·OH, 光照核黄素产生超氧阴离子自由基 $O_2^- \cdot$, 用分光光度法研究了姜黄素体外清除活性氧自由基的作用, 用硫代巴比妥酸(TBA)分光光度法研究姜黄素对·OH 诱发卵磷脂脂质过氧化和 DNA 氧化损伤的抑制作用。实验结果表明, 姜黄素能有效清除活性氧自由基, 对卵磷脂脂质过氧化和 DNA 氧化损伤有显著抑制作用。

关键词:姜黄素, 活性氧自由基, 抗氧化

Scavenging effects of curcumin on active oxygens and its antioxidation in vitro

WANG Xue-mei, ZHANG Jian-sheng, GAO Yun-tao*, DAI Yun

(School of Chemistry and Bio-Science, Yunnan Nationalities University, Kunming 650031, China)

Abstract: Scavenging effects of curcumin on active oxygen species ·OH and $O_2^- \cdot$ generated by Fenton reaction and riboflavine photosensitization in vitro were investigated by the means of spectrophotometry. The inhibition effects of curcumin on the lecithin lipid peroxidation and oxidation damage of DNA chain induced by hydroxyl radical were observed by thiobarbit uric acid spectrophotometry. The results showed that curcumin could scavenge active oxygen efficiently. It could also significantly inhibit lipid peroxidation and oxidation damage of DNA by hydroxyl radical.

Key words: curcumin; active oxygen; antioxidation

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)07-0094-03

姜黄素(curcumin)是姜黄科植物的地下根部所含的主要色素, 又叫姜黄色素。现代研究表明, 姜黄色素可药用, 具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、防止衰老和延年益寿等诸多功效, 成为近年来天然药物中的研究热点^[1]。姜黄素属于多酚类物质, 由于含有酚羟基, 在细胞膜发生脂质过氧化反应时, 本身可脱 H 氧化, 提供电子给自由基, 从而有效地终止自由基的连锁反应^[2]。实验主要研究姜黄素对活性氧自由基的清除作用及对卵磷脂和 DNA 体外脂质过氧化抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

姜黄素 国药集团化学试剂有限公司; 氯化硝基四氮唑兰(NBT) ChemBase 公司; 芦丁标准品、蛋氨酸、鲱鱼精 DNA Sigma 公司; 所用试剂 均为分

析纯; 实验用水 为二次蒸馏水; 核黄素(VB₂), 番红花红(Safranin T), 2-硫代巴比妥酸(TBA), 三氯乙酸(TCA)。

9200 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; 光照箱 自制, 35cm × 30cm × 25cm, 光源为纯稀土节能灯, 灯功率 45W; 数显恒温水浴锅, 低温超速离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 超氧阴离子自由基的产生及清除活性测定 采用光照核黄素^[3]的方法, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH = 7.4 的 PBS 缓冲液为溶剂, 配制 $3.3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋氨酸, $4.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化硝基四氮唑兰(NBT)。分别取上述三种溶液各 2.0mL, 加入各种浓度的姜黄素(样品)溶液 1.0mL, 空白管以 1.0mL 缓冲液代替样品溶液。置于光照箱中光照 30min, 取出后以缓冲溶液为参比, 于 560nm 处测定溶液的吸光度。清除率按下式计算: A_0 为空白管的吸光度, $A_{\text{样}}$ 为样品管的吸光度。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 100\%$$

收稿日期: 2007-11-20 * 通讯联系人

作者简介: 王雪梅(1982-), 女, 硕士研究生, 从事天然产物研究分析。

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(06Y195C); 云南省社会发展科技计划资助项目(2007B148M)。

1.2.2 羟自由基的产生及清除活性测定^[4] 采用亚铁离子催化过氧化氢产生羟自由基(Fenton反应),该反应产生的羟自由基可使番红花红褪色,针对这一特点来研究姜黄素对羟自由基的清除能力。取 $0.15\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸缓冲溶液1.0mL, $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 番红花红1.0mL, $0.945\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-Fe(II)(新鲜配制)1.0mL,姜黄素(样品)0.5mL,3% H_2O_2 1.0mL(新鲜配制),混合后在 37°C 水浴中反应30min,在520nm处测定吸光度 A_s 。空白组以0.5mL蒸馏水代替样品,测定吸光度 A_0 ,对照组以1.5mL蒸馏水代替 H_2O_2 和样品,测定吸光度 A ,用3.5mL蒸馏水代替番红花红、EDTA-Fe(II)、 H_2O_2 、样品,用1.0mL磷酸盐缓冲溶液调零。按下式计算清除率:

$$D\% = \frac{A_s - A_0}{A - A_0} \times 100\%$$

1.2.3 对脂质过氧化抑制活性的测定^[5] 取0.2mL卵磷脂溶液(300mg卵磷脂溶解于30mL $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的PBS中,冰浴震荡),加入pH7.4的PBS缓冲液1.0mL,不同浓度的样品溶液0.5mL, $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-Fe(II)1.0mL,混匀后于 37°C 水浴中反应45min,再加入28%(W/V)的TCA 2.0mL,1%(W/V)的TBA 1.0mL,混匀后置于 100°C 沸水浴中加热10min,冷却后在532nm处测定吸光度 A 样,用PBS缓冲液调零,空白管用PBS缓冲液代替样品,测吸光度 A_0 。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 100\%$$

1.2.4 $\cdot\text{OH}$ 引发DNA损伤抑制TBA法^[6-8] 取pH7.0的Tris-HCl缓冲溶液1.0mL, $4.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNA 0.2mL,不同浓度的姜黄素溶液0.5mL, $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-Fe(II)1.0mL,3% H_2O_2 1.0mL(新鲜配制),在 37°C 水浴中恒温1.5h后,取出加入28%(W/V)的TCA 2.0mL,1%(W/V)的TBA 1.0mL,混匀后置于 100°C 沸水中加热10min,冷却后于波长532nm处测吸光度 $A_{\text{样}}$ 。空白管以0.5mL蒸馏水代替样品测 A_0 ,用缓冲溶液作参比。抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 对超氧阴离子自由基的清除作用

姜黄素与芦丁进行对照研究,对光照核黄素产生超氧阴离子的清除作用见图1,姜黄素 $\text{IC}_{50} =$

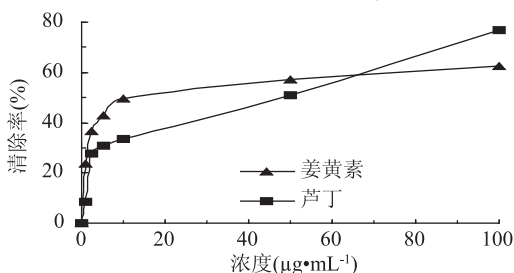


图1 光照核黄素产生超氧阴离子自由基的清除作用

$10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,当质量浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,清除率可达62.38%;芦丁 $\text{IC}_{50} = 50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,当质量浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,清除率可达76.92%。当质量浓度在 $0\sim 50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,姜黄素对超氧阴离子自由基的清除较好,优于芦丁。

2.2 对Fenton反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

以芦丁为对照,姜黄素对Fenton反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用见图2,姜黄素 $\text{IC}_{50} = 0.6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,质量浓度 $\geq 3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,清除率达最大,最大清除率为97.9%;而芦丁 $\text{IC}_{50} = 2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,与姜黄素相同浓度下的最大清除率为56.3%,这说明姜黄素对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用优于芦丁。

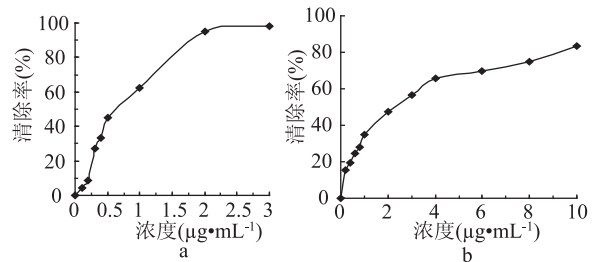


图2 姜黄素(a)与芦丁(b)对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

2.3 对脂质过氧化的抑制作用

在532nm下测定姜黄素对卵磷脂脂质过氧化的抑制作用,结果见图3,由图可知,姜黄素的 $\text{IC}_{50} = 0.01\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,样品浓度和抑制率成正比。当姜黄素的质量浓度为 $0.4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑制率高达72.05%,由此可见,姜黄素对卵磷脂脂质过氧化表现出较好的抑制作用。

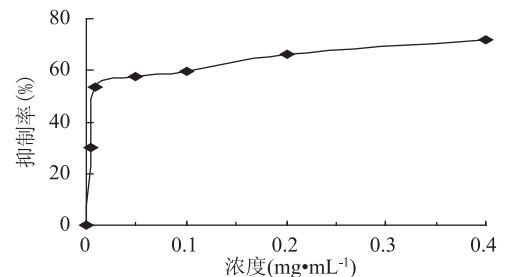


图3 对脂质过氧化的抑制作用

2.4 对 $\cdot\text{OH}$ 引发DNA损伤的抑制作用

硫代巴比妥酸(TBA)可与丙二醛(MDA)类似物反应,生成粉红色物质,该物质在532nm处有最大光吸收,采用TBA反应可定量检测脱氧核糖或DNA上脱氧核糖环受 $\cdot\text{OH}$ 攻击,氧化断裂产生的丙二醛类似物^[9,10]。姜黄素对 $\cdot\text{OH}$ 引发DNA损伤的抑制作用结果见图4,加入姜黄素后,DNA氧化损伤被抑制,抑制率随姜黄素浓度的增加而增加,姜黄素 $\text{IC}_{50} = 3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,当姜黄素的质量浓度为 $8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑制率高达90.45%;芦丁 $\text{IC}_{50} = 0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,当质量浓度为 $0.6\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,抑制率为72.1%,说明姜黄素能有效抑制MDA生成,对DNA上脱氧核糖的氧化损伤抑制作用较好。

3 结论

姜黄素属于多酚类物质,其结构式如图5,有人(下转第98页)

表3 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A 葡萄糖氧化酶 (mg/kg)	B α -淀粉酶 (mg/kg)	C 乳化剂 (%)
1	20	160	0.1
2	25	180	0.2
3	30	200	0.3

从正交实验结果可知,乳化剂对基础粉的品质改良有非常显著的影响,葡萄糖氧化酶有较显著的影响,而 α -淀粉酶的影响不是很显著,为次要因素。经过计算分析,得到基础粉品质改良的最佳配比是 $A_2B_3C_1$,但实验中面包评分都比较低,原因有:品评人员不是专业的人员;对比的标准可能有点低;面包生产工艺过程中可能有地方需要改善等^[8]。

3 结论

3.1 由本实验分析得出,配制基础粉的最适配比范围为:陕优225:郑麦9023=10~7:0~3。

3.2 改良基础粉品质的添加剂,其添加量并非越多越好。实验中的食品添加剂的添加量都有一个量化标准,超过这个标准,反而降低面包品质,如 α -淀粉酶的添加量在本次实验中若超过240mg/kg,面包心黏湿、有大气泡、结构差、质地不均等。实验得出 α -淀粉酶的最适添加量应为200mg/kg,葡萄糖氧化酶的最适添加量为25mg/kg,乳化剂(CSL-SSL)的最适添加量为0.1%。

(上接第95页)

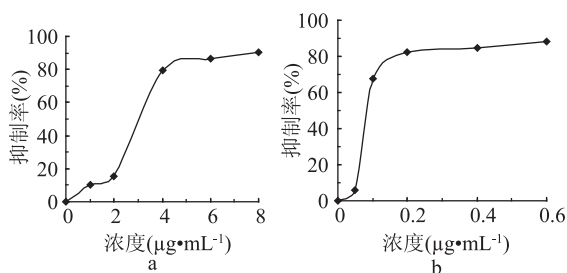


图4 姜黄素(a)与芦丁(b)对

·OH 引发 DNA 损伤的抑制作用

认为,姜黄素有两个活性部位,一个是苯环上的羟基氢,另一个是 β -二酮中间的亚甲基氢,大多数人认为姜黄素的抗氧化活性主要是由苯环上的羟基氢来承担的,其活性的大小不仅与羟基的数目有关,更体现在邻甲氧基苯酚的结构特点上^[11]。通过本实验,说明姜黄素有很好的清除活性氧自由基能力,并对卵磷脂脂质过氧化及·OH 诱发 DNA 氧化损伤有显著的抑制作用。

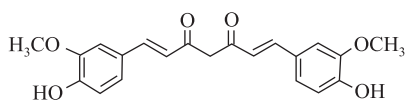


图5 姜黄素结构式

参考文献:

[1] 韩婷, 宓鹤鸣. 姜黄的化学成分及药理活性研究进展

3.3 本实验得出的配制面包专用粉的最佳配比方案,有利于面包生产企业降低生产成本,扩展了面包企业的利润空间;其次,我省是小麦种植大省,小麦产量一直很大,面包专用粉的配制为我省小麦的深加工又找到一个新途径,有利于农民增收,同时又解决了面包粉主要靠进口的问题,进而促进经济的发展。

参考文献:

- [1] 周惠明, 陈正行编著. 小麦粉与综合利用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 342~359.
- [2] 刘汉江主编. 焙烤工业实用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 164~177.
- [3] 马涛. 焙烤食品工艺[M]. 北京: 化学出版社, 2007. 16~17, 94~98.
- [4] 刘钟栋主编. 面粉品质改良技术与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005. 49~138.
- [5] 杨其林, 杨刚. 面包改良剂中酶制剂的优化设计[J]. 粮食与饲料工业, 2006(9): 19~20.
- [6] 赵选民编. 实验设计分析[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 66~100.
- [7] 冯新胜, 王克林. 面包专用粉实验方法的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2005(8): 9~10.
- [8] Sandsted R M. The Function of starch in Baking of Bread [J]. Baker Dig, 1996, 35(3): 36.
- [9] 解放军药学报, 2001, 11(2): 95~97.
- [2] 魏朝良, 于德红, 安利住. 黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨[J]. 中成药, 2005, 27(2): 230~241.
- [3] 刘杰超, 王思新, 焦中高, 等. 苹果多酚提取物抗氧化活性的体外试验[J]. 果树学报, 2005, 22(2): 106~110.
- [4] 王巨存, 邢国胜, 胡文铎, 等. 有机锗 Ge-132 对氧自由基和由羟自由基诱导的脂质过氧化的影响[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(1): 23~24.
- [5] 吕晓玲, 朱惠丽, 姜平平, 等. 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2003(5): 22~25.
- [6] 王爱国, 罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的 TBA 反应[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 150~152.
- [7] Zou Guo-lin, Zhang Fan, Ou Rong. DNA damage in the system containing phenanthroline. Cu²⁺ and reductant in vitro [J]. Wuhan Univ (Natural Science Edition), 1999, 45(6): 865~868.
- [8] 高云涛, 杨益林, 王雪梅. 重楼提取物体外清除活性氧及抗氧化作用研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 195~198.
- [9] Davis C. Oxygen radical and human disease [C]. Ann Int Med, 1987. 107~126.
- [10] N C Cook, et al. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources [J]. J Nutr Biochem, 1996(7): 66~76.
- [11] 陈巍峰. 姜黄素及其类似物的抗氧化活性研究[D]. 兰州大学博士研究生学位论文, 2006.