

蒲公英黄酮类物质的抗氧化活性

陈景耀¹, 吴国荣¹, 王习达^{1, 2}, 刘华¹, 王建安¹, 沈奇¹

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097, 江苏 南京)

(2. 江苏省海洋环境监测中心 210036, 江苏 南京)

[摘要] 为研究蒲公英中黄酮类物质的抗氧化活性, 分别应用 NBT 法测定去除超氧阴离子活性 $Vc - Cu^{2+} - Cyt \cdot C$ 反应体系研究清除羟自由基的能力, 采取 H_2O_2 及 UV 诱导的红细胞溶血实验研究总黄酮、芦丁和槲皮素的抗 H_2O_2 、UV 破坏膜结构的能力. 结果表明在清除 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 及抗 H_2O_2 诱导的红细胞溶血实验中总黄酮的活性都比芦丁和槲皮素及阳性对照组 VitE 较强, 在 UV 诱导的红细胞溶血实验中略弱于 VitE. 说明蒲公英黄酮类物质具有较强的清除活性氧(ROS)的活性.

[关键词] 蒲公英总黄酮, 清除活性氧, 抗溶血

[中图分类号] R282.71, S567, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)01-0084-04

Anti-oxidation of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz Flavonoids

Chen Jingyao¹, Wu Guorong¹, Wang Xida^{1, 2}, Liu Hua¹, Wang Jian'an¹, Shen Qi¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Ocean Environment Monitoring Center of Jiangsu Province, 210036, Nanjing, China)

Abstract To study the anti-oxidation activities of total flavonoids in *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz., We study their ability to scavenge $O_2^{\cdot -}$ by NBT-way and their ability to scavenge $\cdot OH$ by $Vc - Cu^{2+} - CytC$ system, besides we also study their anti-hemolysis activity by H_2O_2 -induced and UV-induced hemolysis test. The anti-oxidation activities of total flavonoids are obviously more than that of Rutin, Quercetin and VitE. Total flavonoids in *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz. have very high activity in scavenging ROS.

Key words Total flavonoids of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz, Scavenger of ROS, Anti-hemolysis

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz.)为菊科多年生草本植物, 是传统的药用植物, 其全草具有很高的药用价值, 含有多钟活性成分, 如蒲公英甾醇、蒲公英苦素和黄酮类等^[1, 2]. 除了具有利胆保肝、抗菌消炎、利尿、抗癌及增强机体免疫等之外, 并且有报道其水提物能降低糖尿病的并发症^[3]. 近来的研究表明蒲公英的药用价值与其所含黄酮类物质有着极大的关系^[4], 引起了人们的关注. 自由基生物学的研究表明, 黄酮类物质的许多生物学效应均与清除活性氧自由基的作用密切相关^[5]. 本文报告从蒲公英中提取的黄酮类物质具有清除活性氧的作用, 旨在为蒲公英的开发应用积累有价值的资料.

1 材料和方法

1.1 材料

蒲公英全草由南京野生植物综合利用研究院提供, 经鉴定为碱地蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz.)烘干, 磨成粉末称取 50 g 备用.

1.2 仪器和试剂

LC-10AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-10A 多波长紫外检测器. TGLL-18G 高速冷冻离

收稿日期: 2004-09-16.

基金项目: 国家科技部科研院所科技开发专项资金资助项目(2002EG163191).

作者简介: 陈景耀, 1974—, 硕士研究生, 主要从事植物化学的学习与研究. E-mail: jmusiclike@163.com

通讯联系人: 吴国荣, 1947—, 教授, 主要从事植物学的教学与研究. E-mail: njwuguorong@126.com

离心机,RE-52 旋转蒸发器,754-UV 分光光度计。细胞色素 C 为 Sigma 公司进口分装,VitE 为 Merck 公司产品,芦丁和槲皮素标准品由南京野生植物综合利用研究院提供。

1.3 方法

1.3.1 蒲公英总黄酮提取纯化

称取 50 g 备用原料,75% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,离心,过滤,取上清液浓缩,蒸馏水稀释后上处理过的聚酰胺柱充分吸附,经蒸馏水充分洗涤后,再用 95% 的酒精洗脱至洗脱液无色,洗脱速度为 1.5 mL/min。收集醇洗脱液,旋转蒸发仪浓缩,水浴蒸干得蒲公英总黄酮,呈黄褐色粉状物。

1.3.2 总黄酮含量测定 参照张雪辉等人的方法^[6,7]。

1.3.3 芦丁、槲皮素含量测定

外标法测定,参考王弘与苑可武等的方法^[8,9]。色谱条件:Shim-pac lc、CLC-ODS、 $\phi 6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$,柱温 45℃。甲醇:1% 冰醋酸水溶液 = 50:50(*v/v*) ,流速 1.0 mL/min,检测波长 280 nm。

1.3.4 体外去除超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)作用

参照 Stewart R C, Bewley J D 的方法^[10]。采用抑制 3 mL 反应液中 NBT 光化学还原作用 50% 的样品量作为一个类 SOD 活性单位。

1.3.5 体外去除羟自由基($\cdot\text{OH}$)作用

参照王爱莲等的方法^[11]。采用下式计算样品对羟自由基的清除率:
清除率 = (样品组 A_{550} - 阴性对照组 A_{550}) $\times 100\%$ / (本底 A_{550} - 阴性对照组 A_{550})

1.3.6 抗过氧化氢(H_2O_2)诱导红细胞溶血的作用

参照蒋建伟等的方法^[12-14]。抗氧化活性以溶血抑制率表示:
抑制率 = (对照管 A_{540} - 样品管 A_{540}) $\times 100\%$ / 对照管 A_{540}

1.3.7 抗紫外线(UV)诱导红细胞溶血的作用

参照何文珊等的方法^[13]。抗 UV 活性用溶血抑制率表示,公式同 1.3.6。

2 结果与分析

2.1 蒲公英总黄酮提取纯化及含量测定

蒲公英乙醇提取物经聚酰胺柱吸附,洗脱,干燥得黄褐色的粗总黄酮提取物 0.647 g,经以芦丁为对照品测得总黄酮 0.436 g,总黄酮的含量达 67.41%,可见聚酰胺柱对蒲公英黄酮类物质有较好的富集作用和较高的分离效率,适于黄酮类物质的分离纯化。

2.2 总黄酮中芦丁、槲皮素含量的测定

待仪器稳定后,将芦丁、槲皮素的对照品和样品均进样 20 μL 测定,计算得样品中芦丁的含量为 5.49%,槲皮素的含量为 1.22%。尚有部分未确定的黄酮类及其它含酚羟基的物质。

2.3 体外去除超氧阴离子的作用

用 NBT 方法可以测得 1 mg 蒲公英粗总黄酮相当于 21.41 个类 SOD 活力单位,1 mg 芦丁相当于 13.89 个类 SOD 活力单位,1 mg 槲皮素相当于 9.47 个类 SOD 活力单位。表明所提取的蒲公英粗总黄酮及其中的芦丁和槲皮素均具有体外直接去除超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的作用,其中蒲公英总黄酮的作用强于芦丁和槲皮素,芦丁又比槲皮素略强。

2.4 体外去除羟自由基的作用

由表 1 可见,四种样品均有显著的清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用,并具有较显著的浓度依赖关系。其中蒲公英总黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用最为显著,较阳性对照 VitE 强,VitE 与槲皮素的作用相差不大,槲皮素的作用较之总黄酮提取物略弱。

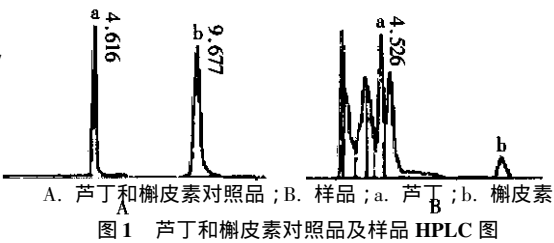


表 1 几种样品对 ·OH 的清除率($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

样品	浓度/(mg/L)	A_{550}	清除率/%	样品	浓度/(mg/L)	A_{550}	清除率/%
本底	—	0. 213 ± 0. 002	—	对照	—	0. 161 ± 0. 003	—
总黄酮	1	0. 170 ± 0. 003 *	17. 3%	槲皮素	1	0. 165 ± 0. 004 *	7. 7%
	4	0. 189 ± 0. 005 * * ##	53. 8%		4	0. 172 ± 0. 003 * * #	21. 2%
	16	0. 200 ± 0. 007 * * ##	75. 0%		16	0. 194 ± 0. 005 * * ##	63. 5%
芦丁	1	0. 162 ± 0. 004 #	1. 9%	VitE	1	0. 168 ± 0. 004 *	13. 5%
	4	0. 168 ± 0. 002 * * #	12. 5%		4	0. 174 ± 0. 003 * *	25. 0%
	16	0. 186 ± 0. 004 * * ##	47. 5%		16	0. 189 ± 0. 002 * *	55. 0%

与对照组相比 , * $p < 0. 01$, * $p < 0. 05$;与 4 mg/LVitE 相比 , ## $p < 0. 01$, # $p < 0. 05$.

2.5 抗 H₂O₂ 诱导红细胞溶血作用

如表 2 所示 ,四种样品在低浓度下即具有很强的抗 H₂O₂ 诱导的红细胞溶血作用 ,其中以总黄酮和 VitE 为最 ,并且两者效果非常近似 ,比较而言 ,芦丁和槲皮素的作用稍弱.

表 2 几种样品对 H₂O₂ 诱导的红细胞溶血的抑制率($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

样品	浓度/(mg/L)	A_{540}	抑制率/%	样品	浓度/(mg/L)	A_{540}	抑制率/%
对照	—	0. 910 ± 0. 082	—	—	—	—	—
总黄酮	1	0. 113 ± 0. 00 8 * * ##	87. 6%	槲皮素	1	0. 184 ± 0. 006 * * ##	79. 8%
	2	0. 085 ± 0. 005 * * ##	90. 7%		2	0. 162 ± 0. 005 * * ##	82. 2%
	4	0. 059 ± 0. 005 * * ##	93. 5%		4	0. 150 ± 0. 007 * *	83. 5%
芦丁	1	0. 195 ± 0. 005 * * ##	78. 6%	VitE	1	0. 136 ± 0. 004 * *	85. 1%
	2	0. 142 ± 0. 005 * * ##	84. 4%		2	0. 097 ± 0. 006 * *	89. 3%
	4	0. 088 ± 0. 008 * * ##	90. 3%		4	0. 061 ± 0. 004 * *	93. 3%

与对照组相比 , * $p < 0. 01$;与 2 mg/LVitE 相比 ## $p < 0. 01$.

2.6 抗 UV 诱导红细胞溶血作用

从表 3 可见 ,四种样品在本实验范围内都有比较明显的抗 UV 诱导的红细胞溶血作用 ,并且具有浓度依赖关系. 其中芦丁作用最强 ,VitE 与之相仿 ,槲皮素的作用略低 ,但总黄酮在低浓度时作用较其他三者略强.

表 3 几种样品对 UV 诱导的红细胞溶血的抑制率($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

样品	浓度/(mg/L)	A_{540}	抑制率/%	样品	浓度/(mg/L)	A_{540}	抑制率/%
对照	—	0. 531 ± 0. 027	—	—	—	—	—
总黄酮	0. 2	0. 464 ± 0. 048 * #	12. 54%	槲皮素	0. 2	0. 504 ± 0. 014 * #	5. 09%
	1	0. 394 ± 0. 011 * *	25. 83%		1	0. 370 ± 0. 022 * *	30. 25%
	5	0. 351 ± 0. 027 * * #	33. 93%		5	0. 333 ± 0. 030 * * #	37. 23%
芦丁	0. 2	0. 510 ± 0. 048 #	3. 86%	VitE	0. 2	0. 489 ± 0. 038 *	7. 92%
	1	0. 401 ± 0. 025 *	24. 41%		1	0. 401 ± 0. 020 * *	24. 51%
	5	0. 287 ± 0. 033 * * #	45. 9%		5	0. 303 ± 0. 042 * *	42. 98%

与对照组相比 , * $p < 0. 01$, * $p < 0. 05$;与 1 mg/LVitE 相比 # $p < 0. 05$.

3 讨论

随着自由基生物学和放射医学研究的进展 ,人们对机体内自由基生成和清除之间动态平衡的破坏是引起衰老和多种疾病的重要原因的认同也愈趋广泛^[15] ,对于植物药的研究 ,其抗氧化作用及其抗氧化的药用成分已经成为热点之一. 传统植物药蒲公英常用来清热解毒、消肿止痛和治疗胃病等等. 近来逐渐明确其消炎机理之一即是其所具有的抗氧化活性 ,蒲公英中含有很多的抗氧化成份^[4] ,本实验的结果表明黄酮类物质是其中重要的组分.

黄酮类物质的提取分离方法有多种 ,由于黄酮类和其它含酚羟基的化合物和聚酰胺之间有较强的氢键吸附作用 ,其中鞣质基本上是不可逆的吸附 ,而黄酮类及其它一些多酚类易洗脱下来. 本实验采取乙醇热提取 ,聚酰胺柱层析分离黄酮 ,提取得率较高 ,提取物中总黄酮含量达 67. 4% ,其中含有芦丁和槲皮素等成分. 可以认为这种方法提取分离效果较好 ,含量较高 ,适用于蒲公英黄酮类物质的提取与纯化.

黄酮类物质属于一类天然抗氧化剂 ,和 VitE 都具有活泼的酚羟基 ,在遇到活性氧自由基时 ,易失去酚羟基上的氢 ,具有直接清除或淬灭 O₂⁻、·OH、H₂O₂ 等活性氧、自由基的作用^[16] . 我们用 Stewert 和 Bewley

产生 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的反应系统和 $\text{Vc} - \text{Cu}^{2+} - \text{Cyt} \cdot \text{C}$ 产生 $\cdot \text{OH}$ 体系探讨了蒲公英总黄酮提取物清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot \text{OH}$ 的效应,实验结果表明,较一些抗氧化酶促反应更加快捷。结果还发现总黄酮提取物清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的类 SOD 活性要明显高于单一的芦丁和槲皮素,淬灭 $\cdot \text{OH}$ 的作用也有类似的现象,提示清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 或 $\cdot \text{OH}$ 的过程不是单一的,蒲公英总黄酮提取物中的成分包括黄酮和其它含酚羟基的化合物在内,在这个过程中可能起着互补或者协同的作用。在 H_2O_2 或 UV 诱导红细胞溶血的模型实验中,也有这样的现象,使得植物药的研究者必须注意其药用成份之间的协同和强化作用。中医中药强调“配伍”,其精华可能就在于此。蒲公英黄酮提取物、芦丁、槲皮素和 VitE 抗红细胞溶血的作用显著,与试管反应清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot \text{OH}$ 的结果相互印证:即红细胞膜的破坏与活性氧、自由基引起的膜脂过氧化等作用直接相关^[17,18]。相信蒲公英和蒲公英总黄酮提取物作为一种资源广、提取方便、抗氧化作用显著的药用资源一定会有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 徐祝封,主编. 中药理化鉴定[M]. 北京:中国中医药出版社,1997. 237.
- [2] 凌云,鲍燕燕,张永林,等. 兴安蒲公英的化学成分研究[J]. 中草药,2000,31(1):10—11.
- [3] Cho SooYeul. Alteration of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract[J]. Clinica Chimica Acta,2002,317(1—2):109—110.
- [4] 孟志云,徐绥绪. 蒲公英的化学与药理[J]. 沈阳药科大学学报,1997,14(2):137—143.
- [5] 张红雨,陈德展. 酚类抗氧化剂清除自由基活性的理论表征与应用[J]. 生物物理学报,2000,16(1):1—9.
- [6] 张雪辉,赵元芬,陈建民. 甘草中总黄酮的含量测定[J]. 中国中药杂志,2001,26(11):746—747.
- [7] 林启寿主编. 中草药成分化学[M]. 北京:科学出版社,1977. 311.
- [8] 王弘,赵国斌,刘叔倩,等. 不同产地栽培银杏叶中黄酮类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):408—410.
- [9] 苑可武,孟宪惠,徐文豪,等. 银杏叶中黄酮含量的季节性变化[J]. 中草药,1997,28(4):211—212.
- [10] Stewert R C. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol,1980,65(2):245—246.
- [11] 王成莲,刘莉. 比色法测定抗坏血酸体系产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1989,16(6):473—474.
- [12] 蒋建伟,何文珊,严玉霞,等. 茶多酚的离体抗氧化作用[J]. 中国病理生理杂志,1999,15(6):522—524.
- [13] 何文珊. 香辛料的抗氧化及其活性成分研究[工学博士论文][D]. 广州:华南理工大学,1999.
- [14] 马兰萍,刘在群,周波,等. 绿茶多酚对自由基诱导的红细胞氧化性溶血的抑制作用[J]. 科学通报,2000,45(12):1271—1275.
- [15] Meydani S N. Antioxidants and aging immune response. In Bendich A,Phillips M and Tengerdy R P eds Antioxidants Nutrients and Immune Functions[M]. New York and London:Plenum Press,1990.
- [16] Van Acker SABE. Molecular pharmacology of vitamin E:Structural aspects of antioxidant activity[J]. Free Radic Biol Med,1993,15(1):311—312.
- [17] Madsen Helle Lindberg. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies[J]. European Food Research & Technology,2000,211(4):240—241.
- [18] Saija A. Flavonoids as antioxidant agents:Importance of their interaction with biomembranes[J]. Free Radic Biol Med,1995,19(6):481—482.

[责任编辑:孙德泉]