

高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究*

范 晓 严小军 房国明 陈予敏 娄清香

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 采用 DPPH 体系、羟基自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系、超氧阴离子自由基体系对海黍子高分子量褐藻多酚抗氧化性质进行了研究, 发现其清除 DPPH 活性、清除羟基自由基活性、抑制烷基自由基引发的亚油酸氧化的活性分别为 77%、27% 和 21%, 但它不具有清除超氧阴离子自由基的能力。褐藻多酚具有供氢能力, 其连三羟基的供氢能力大于间三羟基, 清除羟基自由基与其苯环提供的羟基自由基加成位点的数量有关。

关键词 褐藻多酚, 抗氧化, 自由基

褐藻多酚是仅存于褐藻中的一类天然产物。它含量丰富, 占藻体干重的 1—10%, 还具有多种化学及生物活性: 络合金属离子, 切割质粒 PBR22 的环状 DNA, 抑制淀粉酶、酯酶活性, 抑制微生物生长, 抑制附生藻类生长, 抑制植食动物摄食, 凝集血红细胞, 抑制抗血纤维蛋白溶酶^[1]。褐藻多酚具有较强的抗氧化作用, 在高度不饱和脂肪酸的抗氧化实验中发现, 它比目前常用的抗氧化剂 BHT 的活性高 2.5 倍^[2]。为了进一步了解其抗氧化机理, 我们立足现有条件, 建立抗氧化剂分光光度法研究体系:DPPH 体系、羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系, 研究了高分子褐藻多酚在这些自由基体系中的作用。

1 材料和方法

1.1 高分子褐藻多酚 使用的褐藻多酚均为经透析纯化的高分子量海黍子多酚, 制备方法参见文献^[3]。待测溶液的浓度分别为褐藻多酚(100 μg/mL)、市售食品级茶多酚(100 μg/mL)没食子酸丙酯(100 μg/mL)、间苯三酚(100 μg/mL), 采用试剂为分析纯。

1.2 褐藻多酚羟基的测定 褐藻多酚总羟基数量的测定方法采用 F-D 法, 连三羟基的测定数量采用 FAS 法^[1]。

1.3 DPPH 体系 将 50L 待测物质的溶液加入 5mL 0.16mmol/L DPPH 溶液, 于 25(C 水浴中反应 15min 后, 测量其在 540nm 的吸光度(A_i)。清除 DPPH 活性的计算公式, $P = (A_0 - A_i)/A_0$, 其中 A_0 为空白的吸光度^[4]。

1.4 羟基自由基体系 在 10mL 试管中依次加入饱和水杨酸溶液 0.5mL, 磷酸缓冲液

* 国家九五攻关项目 96-916-04-01 资助, 中国科学院海洋研究所研究报告 3793 号

¹⁾ 陈予敏, 中国科学院海洋研究所硕士学位论文

1999-09-11 收到; 1999-09-20 修回

($\text{pH}=7.4$) 3mL, 3.8mmol/L Fe^{2+} - EDTA(1:1)溶液 0.5mL, 待测液 1mL, 最后加入 1mL 4mmol/L H_2O_2 启动反应, 于 25℃ 水浴中反应 90min. 之后, 加入 1mL 6mol/L HCl 终止反应. 再加入 0.5g NaCl, 4mL 冷的重蒸乙醚, 充分混匀, 静置后移取上层乙醚 3mL 于 10mL 的离心管内. 于 40℃ 恒温水浴中蒸干乙醚, 然后依次加入 10% 三氯乙酸 0.15mL, 10% 钨酸钠 0.25mL, 0.5% NaNO_2 0.25mL, 放置 5min 后, 加入 1mol/L NaOH 0.25mL, 滴加去离子水至 4mL, 混匀. 用三氯乙酸、钨酸钠、 NaNO_2 、NaOH、去离子水配制空白, 于 510nm 处测定吸光度 A. 清除羟基自由基活性的计算公式, $P = (A_0 - A_i)/A_0$, 其中 A_0 为空白的吸光度^[5].

1.5 烷基自由基引发的亚油酸氧化体系 将 5mL 乙醇、5mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液($\text{pH}=8.0$)、1mL 试样与 0.1mL 亚油酸混合, 用 30W 紫外灯的紫外光照射 60min. 然后加入 4mL 三氯乙酸(20%, w/w), 1mL 硫代巴比妥酸(3%), 95℃ 反应 90min, 冰浴, 离心, 于 532nm 处比色. 以 1mL 蒸馏水代替试样作为空白对照. 清除烷基自由基活性的计算公式, $P = (A_0 - A_i)/A_0$, 其中 A_0 为空白的吸光度^[6].

1.6 超氧阴离子自由基体系 取 0.05mol/L Tris - HCl 缓冲液($\text{pH}=8.2$) 4.5mL, 置于 25℃ 水浴中预热 20min, 分别加入 1mL 试样和 0.4mL 25mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀后于 25℃ 水浴中反应 4min, 加入 8mol/L HCl 终止反应, 299nm 处测定吸光度(A). 空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样品. 清除率计算公式, $P = (A_0 - A_i)/A_0$, 其中 A_0 为空白的吸光度^[7].

2 结果和讨论

2.1 褐藻多酚清除 DPPH 的性质 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)筛选自由基清除剂是一个被广泛采用的方法. 表 1 结果表明, 褐藻多酚、间苯三酚、没食子酸丙酯、茶多酚在相同浓度下, DPPH 自由基的能力分别为 77%, 69%, 61% 和 61%. 图 1 显示, 它们清除 DPPH 的能力与浓度基本成正比关系, 因此, DPPH 的反应活性是与抗氧化剂所提供的氢以 1:1 的化学计量学关系进行反应.

表 1 中 P/H 化学意义是不同物质的酚羟基结构中羟基清除 DPPH 自由基的平均能力(供氢能力), 可以用它来描述不同的酚羟基结构清除 DPPH 自由基能力(供氢能力)的差别. 就 P/H 而言, 没食子酸丙酯供氢能力最大, 褐藻多酚次之, 间苯三酚最小; 就供氢基团而言, 没食子酸丙酯中为连三酚羟基, 褐藻多酚中既有连三酚羟基又有间三酚羟基, 间苯三酚中只有间三酚羟基, 所以这说明连三酚羟基供氢能力大于间三酚羟基.

表 1 几种多酚物质清除 DPPH 的活性及与羟基结构的关系

Tab. 1 DPPH scavenging activities related with phenolic hydroxyl groups

	空白	褐藻多酚	间苯三酚	没食子酸丙酯	茶多酚
A	0.450	0.100	0.140	0.176	0.175
P	-	77%	69%	61%	61%
H*	-	0.79	0.79	0.47	-
P/H**	-	0.97	0.87	1.30	-

*H 为羟基的量, 以上述物质的结构单元的摩尔浓度(10-6mol/mL)描述.

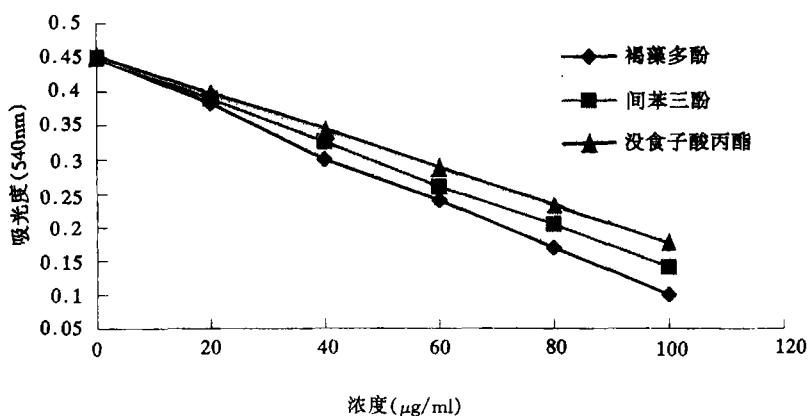
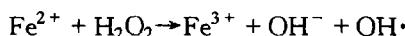


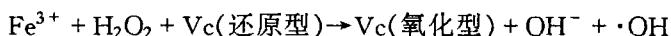
图 1 多酚清除 DPPH 自由基的能力

Fig. 1 DPPH scavenging activities of polyphenols

2.2 羟基自由基体系及褐藻多酚清除羟基自由基的性质 Fenton 反应是最常用的产生羟基自由基的化学反应, 可由下式表示:



为保持羟基自由基以恒定速率产生, 上述反应可改进为



水杨酸 (Salicylic acid) 法检测羟基及物质清除羟基自由基的能力. 在此法中, 羟基自由基进攻水杨酸分子的苯环, 产生能用分光光度法测量羟基化产物 2, 3-二羟基苯甲酸. 于是, 可用该产物生成的多少来描述羟基的量及待测物质清除羟基自由基的能力.

褐藻多酚、没食子酸丙酯具有较强的清除羟基自由基的能力, 它们清除羟基自由基的能力与浓度成正比(图 2). 褐藻多酚、没食子酸丙酯中羟基清除羟基自由基平均能力的表征 p/h 分别为 0.34、0.42(表 2), 约为表征它们清除 DPPH 自由基能力(供氢能力)的 P/H (0.97、1.30)的三分之一, 这表明上述物质清除羟基自由基能力与清除 DPPH 自由基能力(即清除这两种自由基的机制)并不相同; 因为从上述物质结构来看其主要官能团为羟基和苯环, 故可认为上述物质清除羟基自由基能力主要与它们分子中苯环所能提供的羟基自由基加成位点数有关. 由于褐藻多酚的结构单元只有一个苯环, 且没食子酸丙酯分子中也只有一个苯环, 所以 p/h 也可以作为苯环所能提供的羟基自由基加成位点数对上述物质清除羟基自由基能力贡献的表征.

表 2 几种多酚物质清除羟基自由基的活性

Tab. 2 Hydroxyl radical scavenging activities related with phenolic hydroxyl groups

	空白	褐藻多酚	没食子酸丙酯	茶多酚
A	0.232	0.17	0.185	0.265
P	-	0.27	0.20	-0.14
h^*	-	0.79	0.47	-
p/h^{**}	-	0.34	0.42	-

* H 为羟基的量, 以上述物质的结构单元的摩尔浓度(10^{-6}mol/mL)描述.

** 为方便起见, 计算时将百分数化为小数

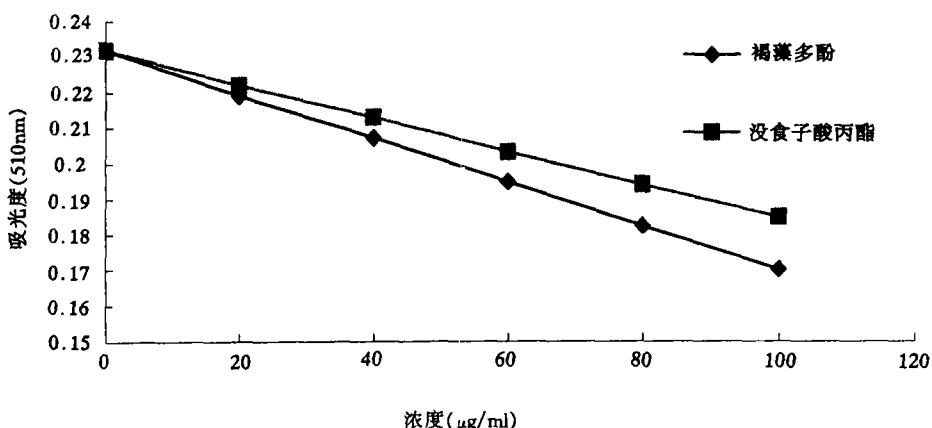


图2 浓度与清除羟基自由基能力的关系

Fig. 2 Relationship of Concentration and hydroxyl radical scavenging activities of polyphenols

在本实验的羟基自由基体系里,茶多酚促羟基自由基产生,这与 Hagerman 的结果相符。作者认为这是因为茶多酚的还原性较强,它将反应 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ 中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,从而促进了羟基自由基的产生。

由上所述,可以认为理想的芳香类羟基自由基清除剂应具备两个性质:较低的还原性和较多的羟基自由基加成位点。

2.3 烷基自由基引发的亚油酸氧化体系及褐藻多酚对其的抑制作用

浓乙醇在碱性有氧环境中,于强紫外线照射下光解产生 $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$, $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$ 作为自由基引发剂直接作用于亚油酸产生 $\text{R}\cdot$,然后 $\text{R}\cdot$ 氧化形成脂过氧自由基 ($\text{ROO}\cdot$),再分解为丙二醛(MDA)。从图 3 可知,褐藻多酚、没食子酸丙酯、茶多酚都具有较强的抑制本体系中亚油酸氧化的能力,它们的抑制能力与浓度成正比。因为本体系涉及“强紫外线光解产生 $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$ ”、“ $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$ 作用于亚油酸形成 $\text{R}\cdot$ ”和“ $\text{R}\cdot$ 氧化形成 $\text{ROO}\cdot$ ”,“ $\text{ROO}\cdot$ 分解为 MDA”等多个过程,所以对本体系中亚油酸氧化有抑制效果的物质的作用机理可能涉及吸收紫外线,淬灭 $\text{CH}_3(\text{OH})\text{CH}\cdot$ 、 $\text{R}\cdot$ 与 $\text{ROO}\cdot$ 和与 MDA 反应;故表 3 中的数据不足以对本体系中亚油酸氧化所涉及的各个过程进行描述,只能从整体上描述褐藻多酚、没食子酸丙酯、茶多酚抑制本体系中亚油酸氧化的能力。表 3 中 P/S 可作为物质结构单元的特征结构对其抑制本体系中亚油酸氧化贡献的描述,故就结构而言没食子酸丙酯抑制本体系中亚油酸氧化的能力大于褐藻多酚。

表3 几种多酚物质对由烷基自由基引发的亚油酸的氧化的抑制能力

Tab. 3 Alkyl radical scavenging activities related with phenolic hydroxyl groups

	空白	褐藻多酚	没食子酸丙酯	茶多酚
A	0.170	0.134	0.136	0.115
P	-	21%	20%	32%
S*	-	0.79	0.47	-
P/S**	-	0.26	0.42	-

*S 为上述以物质的结构单元计的摩尔浓度(10^{-6}mol/mL)。

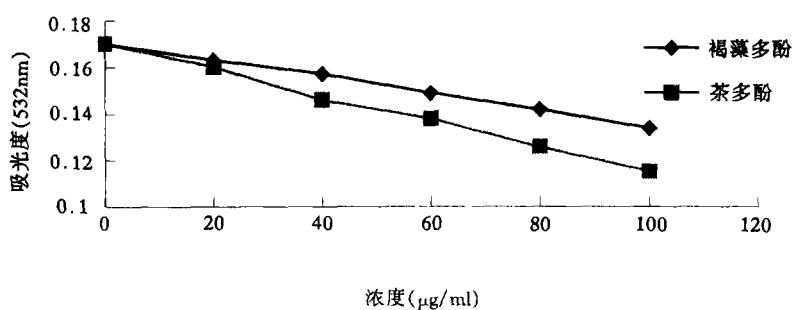


图 3 多酚抑制由烷基自由基引发的亚油酸氧化能力

Fig. 3 Alkyl radical scavenging activities of polyphenols

2.3 超氧阴离子自由基体系及褐藻多酚的清除超氧自由基的性质

在邻苯三酚的自氧化过程中有超氧阴离子自由基产生, 它既是邻苯三酚氧化的中间产物, 又能加速邻苯三酚的自氧化进程。因此, 一种物质对邻苯三酚自氧化的抑制率可作为它对超氧阴离子自由基的清除率的表征。

表 4 几种多酚物质清除超氧阴离子自由基的活性

Tab. 4 Effects of polyphenols on superoxide radical

	空白	褐藻多酚	没食子酸丙酯	茶多酚
A	0.2363	0.2402	0.3941	0.3068
P	-	-1.6%	-67%	-30%

褐藻多酚、没食子酸丙酯、茶多酚不具有清除超氧阴离子自由基的能力, 它们反而能够促进其产生。这可能是因为上述三种物质结构与本体系中使用的超氧阴离子自由基发生物质邻苯三酚相似, 分子中都有连羟基结构。超氧阴离子自由基在加速邻苯三酚的自氧化的同时, 也加速褐藻多酚、没食子酸丙酯、茶多酚的自氧化, 从而产生更多的超氧阴离子自由基。

2.4 褐藻多酚的抗氧化机理

褐藻多酚的抗氧化机理比较复杂:(1)褐藻多酚能够吸收引发氧化反应的紫外光和可见光, 可激发食品中的分子, 产生活泼的自由基, 自由基的产生是氧化作用的起始步骤。如能抑制此步反应, 即可有效的阻止食品氧化。紫外吸收图谱表明, 褐藻多酚对210—400nm的紫外光均有较强烈的吸收, 对400—800nm的可见光也有一定吸收。因此, 可有效抑制氧化起始步骤中自由基的产生, 从而抑制和延缓食品氧化;(2)褐藻多酚能够络合有催化作用的金属离子。食品中含有的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 对食品氧化具有催化作用。褐藻多酚分子中具有包括连三羟基在内的大量羟基, 有这样的结构的分子能够与金属离子反应, 形成稳定的络合物。褐藻多酚将金属离子络合, 消除了氧化反应的催化剂, 从而抑制和延缓食品氧化。(3)褐藻多酚能够提供游离 $H\cdot$ 。褐藻多酚分子中具有为数众多的羟基, 这些羟基可释放出 $H\cdot$, 本身形成苯氧自由基。由于苯环的存在, 苯氧自由基上的自由电子可以参加苯环的电子共振而稳定。 $H\cdot$ 则可与氧化过程中产生的过氧化物自由基、羟基自由基反应, 形成稳定的羧酸或水, 以切断氧化的链式反应, 从而抑制和延缓食品氧化。

参 考 文 献

- [1] 范晓、严小军. 海藻化学研究进展. 海洋科学, 1996, 2:24 ~ 25
- [2] Yan X., Li X., Zhou C, Fan X. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J. Appl. Phycol.* 1996, 8: 201 ~ 203
- [3] Yan X., Li X., Fan X., Zhou C. Studies on extraction procedure and antioxidative activity of phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*, *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 1996, 15(1): 42 ~ 45
- [5] 贾之慎, 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基, 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2):184 ~ 186
- [6] 周志刚. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究, 植物学报, 1997, 39(1):77 ~ 81
- [7] 王春波、贺孟泉、秦守哲. 海洋肽的体外抗氧化作用, 中国海洋药物, 1998, 3(67): 15 ~ 17

ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF HIGH MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS FROM BROWN SEAWEED

Fan Xiao, Yan Xiaojun, Fang Guoming, Chen Yumin and Lou Qingxiang

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Using the assay systems of DPPH, hydroxyl radical, oxidation of linolic acid induced by alkane radical, antioxidant activity of high-weight phlorotannins from *S. kjellmanianum* was studied. The results showed that hydroxyls in phlorotannins are hydrogen donors and the vicinal trihydroxyl is a more active hydrogen donor than meta-trihydroxyl. The hydroxyl radical scavenging capacity is closely related to the number of sites in phlorotannins' benzene rings for the addition of hydrogen radicals. Phlorotannins can inhibit linolic acid oxidation induced by alkane radicals and cannot scavenge superoxide radicals.

Key words Phlorotannins, Antioxidant activity, Radical