

角叉菜不同溶剂提取物抗氧化活性

周革非^{1,2}, 邢荣莲¹, 王长海^{*1}

(1. 大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024;

2. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、石油醚、丙酮 6 种溶剂分别对角叉菜进行冷浸提取. 对提取物进行超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)、羟自由基($\cdot OH$)、 H_2O_2 诱导的小鼠红细胞氧化溶血和小鼠肝匀浆脂质过氧化的清除作用实验. 结果表明, 角叉菜不同溶剂提取物对各种自由基均具有一定的清除作用, 而且溶剂对提取物活性有一定的影响. 在相同的浓度下, 对自由基的清除作用最大的分别为乙醚、丙酮、乙醚和乙酸乙酯提取物.

关键词: 角叉菜; 溶剂; 提取物; 抗氧化活性

中图分类号: O64 **文献标志码:** A

0 引言

Cuzzocrea 等^[1]的研究证实肿瘤、炎症、衰老等的起因和发展与自由基和脂质过氧化作用有关. 因此, 寻找抑制自由基和脂质过氧化的物质越来越受到广泛关注. 确切证据表明, 很多天然产物具有显著的抗氧化活性^[2]. 海藻是一类具有独特生理活性的天然产物, 这是由其特殊的生存环境造成的. 很多学者对海藻提取物的抗氧化活性进行了深入的研究和探讨. Duan 等^[3]对海藻 *Polysiphonia urceolata* 的提取物进行了抗氧化活性检测, 证明对 DPPH 具有很显著的抑制作用; Yuan 等^[4]的研究结果表明红藻 *Palmaria palmata* 的正丁醇提取物对 AAPH 诱导的脂质过氧化有一定的抑制作用, 但是对 AMVN 诱导的脂质过氧化的抑制作用不明显.

角叉菜 (*Chondrus ocellatus*), 属于红藻门 (*Rhodophyta*)、杉藻科 (*Gigartinales*)、角叉菜属, 自然分布于大西洋沿岸和我国东南沿海以及青岛、大连等海域, 是我国的一种重要经济海藻. 国内外学者曾对角叉菜生理、生态、化学结构及组成等方面进行过较深入的研究^[5~7]. 角叉菜具有多方面的生理活性. 从古至今, 我国沿海居民就有食用角叉菜的习惯. 据《中国海洋药物辞典》^[8]记

载: 该藻全体均可食、入药, 具有润肠通便、止血消肿、止痛生肌之功效, 主治慢性便秘、骨折、跌打损伤等症. 现代药理实验证明, 角叉菜具有收敛、消炎、保湿的功效. 近年来角叉菜开始应用于医药领域. 日本科学家最近发现, 角叉菜可以促进皮肤的角化细胞分化, 改善因干燥和紫外线造成的皮肤粗糙现象. 但是到目前为止, 对角叉菜不同溶剂提取物的抗氧化活性尚未见报道. 本文采用不同溶剂对角叉菜进行提取, 并对提取物进行抗氧化活性检测, 以期活性成分的进一步分离提供实验依据, 并为海藻药物的综合开发利用提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

角叉菜 2002 年 4 月采于青岛太平角, 由中科院海洋研究所徐祖洪、李智恩研究员鉴定为角叉菜属植物 *Chondrus ocellatus*, 自来水清洗, 除去泥沙和杂藻, 样品自然阴干, 塑料袋封口, 室温保存.

昆明种小鼠, 雄性, 体质量 32.0 g, 购自山东省实验动物中心.

1.2 仪器和试剂

电热恒温水浴锅 HH.SY21-Ni (北京市长风仪器仪表公司); 循环水式多用真空泵 (郑州长城

科工贸有限公司); YP202N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); UV-2102PC 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

实验中所用试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 海藻的提取 取烘干、粉碎的角叉菜 15 g,室温下分别用乙醇、甲醇、乙酸乙酯、乙醚、丙酮和石油醚各浸提 3 次,每次 250 mL 浸泡 4 d,合并 3 次提取液,在 42 ℃ 水浴下减压蒸干溶剂,得深绿色油状物,称量,用 4 mL 二甲基亚砷溶解,配成 0.1 g/mL 溶液,进行抗氧化活性检测。

1.3.2 抗氧化活性检测

(1)对超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)的清除作用:采用邻苯三酚体系^[9]

在 Tris-HCl 缓冲液中加入适量提取物溶液,混匀后在 25 ℃ 水浴保温 20 min,取出后立即加入 25 ℃ 预热的 3 mmol/L 邻苯三酚 2 mL(以 10 mmol/L HCl 配制,空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液),迅速摇匀倒入比色杯,在 25 ℃ 条件下测定 325 nm 的比色值(以 Tris-HCl 缓冲液为空白测定)。

(2)对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用:按照 Smirnoff 等^[10]的方法改进

在 3 mL 150 mmol/L 的磷酸缓冲液中含有 0.15 mmol/L FeSO_4 -EDTA、2 mmol/L 水杨酸钠、6 mmol/L H_2O_2 以及不同浓度的提取物。37 ℃ 恒温水浴中准确反应 1 h 后,快速测定 510 nm 处的吸光值。

(3)对 H_2O_2 诱导的小鼠红细胞氧化溶血实验^[11]

健康昆明种小鼠,雄性,体质量 32 g,断头取血,加适量肝素溶液制成抗凝血,2 000 r/min 离心 10 min,移弃血浆和白细胞,往沉淀的红细胞

中加入等渗的生理盐水,混匀,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,如此反复 2 次洗涤红细胞,将红细胞制成 0.5% 的悬浮液。取红细胞悬浮液 1 mL,加不同浓度的提取物,最后加 100 mmol/L 的 H_2O_2 ,混匀,37 ℃ 温浴 60 min,用生理盐水稀释 5 倍,2 500 r/min 离心 10 min,上清液于 415 nm 比色。

(4)对小鼠肝匀浆脂质过氧化作用的测定^[11]

健康昆明种小鼠,雄性,体质量 32 g,断头取血后,迅速分离肝组织,用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L)制成 20% 的匀浆,于 5 000 r/min 离心 20 min,沉淀再洗 1 次并离心,合并上清液。在 0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)中含肝匀浆液 0.2 mL、 FeSO_4 10 $\mu\text{mol/L}$ 、维生素 C 0.1 mmol/L 及不同浓度的提取物,在 37 ℃ 温浴 1 h,保温结束后加入 20% 三氯乙酸(TCA)1.0 mL 终止反应,混匀,再加入 0.67% 硫代巴比妥酸(TBA)1.5 mL,沸水浴加热 15 min。离心去除蛋白质沉淀后,于 532 nm 测定吸光值。

1.4 数据处理

计算对各自自由基的清除率(I)

$$I=[1-(A_3-A_2)/A_1]\times 100\%$$

式中: A_1 为对照组吸光值, A_2 为提取物本身的吸光值, A_3 为测定值。每组测定值重复 3 次,结果以 $x\pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 对超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化,生成有机中间体和超氧阴离子自由基,而超氧阴离子自由基对自氧化有催化作用。角叉菜不同溶剂提取物对邻苯三酚自氧化体系产生的自由基的清除作用见表 1。

表 1 各角叉菜提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

Tab.1 Scavenging effect of extracts from *Chondrus ocellatus* on superoxide free radical

$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$I/\%$					
	甲醇	乙醇	乙醚	乙酸乙酯	石油醚	丙酮
3.30	61.0	58.7	71.0	61.7	55.0	59.8
1.70	58.0	57.9	67.9	59.2	54.4	58.2
0.85	53.8	54.4	64.7	57.3	51.1	55.5

注:表中浓度为提取物在反应体系中的浓度,各提取物起始浓度均为 0.1 g/mL

由表 1 可见,6 种不同溶剂的提取物对超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)都具有一定的清除作用,并

且呈明显的量效关系。提取物在体系中的最终浓度为 3.30 mg/mL 时,乙醚提取物对超氧阴离子

自由基的清除作用最大,清除率为 71.0%,其他溶剂的提取物在此浓度下的清除率基本在 60%左右,差别不大.

2.2 对羟自由基(·OH⁻)的清除作用

角叉菜不同溶剂提取物对羟自由基的清除作用见表 2.

表 2 各角叉菜提取物对羟自由基的清除作用
Tab.2 Scavenging effect of extracts from *Chondrus ocellatus* on hydroxyl free radical

溶剂	I/%	溶剂	I/%
甲醇	22.5	乙醇	72.9
乙酸乙酯	33.6	乙醚	—
丙酮	75.8	石油醚	—

注:提取物在反应体系中的浓度为 10 mg/mL

表 2 结果表明,6 种溶剂的提取物对羟自由基的清除作用相差很大,在浓度为 10 mg/mL 时,丙酮提取物的清除作用最大,清除率为 75.8%;其次是乙醇提取物,清除率为 72.9%;乙酸乙酯和甲醇提取物的抑制活性较低,清除率分别为 33.6%和 22.5%.而乙醚提取物和石油醚提取物对羟自由基没有清除活性,可能是由于醚类溶剂的极性较低,提取出较多的非极性物质,而通常的抗氧化剂多为极性较强的不饱和物质.

2.3 对 H₂O₂ 诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用

H₂O₂ 与 Fe²⁺ 结合产生羟自由基(·OH⁻)引发氧化作用,使红细胞膜损伤,物质外流;H₂O₂ 自身也可引发氧化反应,从而引起脂质过氧化作用而破坏细胞膜,导致红细胞溶血.表 3 列出了角叉菜不同溶剂提取物对 H₂O₂ 诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用.

表 3 各角叉菜提取物对小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用

Tab.3 Effect of extracts from *Chondrus ocellatus* on hemolysis of rat erythrocytes

溶剂	I/%	溶剂	I/%
甲醇	60.9	乙醇	50.0
乙酸乙酯	59.8	乙醚	82.6
丙酮	—	石油醚	67.4

注:提取物在反应体系中的浓度为 2.7 mg/mL

表 3 结果表明,在样品浓度为 2.7 mg/mL 时,除丙酮提取物外,甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、

石油醚 5 种有机溶剂的提取物都具有对 H₂O₂ 诱导的小鼠红细胞氧化溶血的抑制作用.乙醚提取物的抑制作用最大,抑制率为 82.6%,其次分别为石油醚、甲醇、乙酸乙酯提取物,抑制率分别为 67.4%、60.9%、59.8%.对于丙酮提取物没有抑制作用的原因还需进一步探讨.

2.4 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用

·OH⁻ 生成系统(Fe²⁺ + H₂O₂ → ·OH⁻)可诱导机体组织的脂质过氧化反应,生成丙二醛.表 4 为角叉菜不同溶剂提取物对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用实验结果.

表 4 各角叉菜提取物对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用

Tab.4 Effect of extracts from *Chondrus ocellatus* on lipid peroxide of rat liver homogenate

溶剂	I/%	溶剂	I/%
甲醇	72.4	乙醇	69.9
乙酸乙酯	77.9	乙醚	73.6
丙酮	71.9	石油醚	75.6

注:提取物在反应体系中的浓度为 4 mg/mL

结果表明:6 种有机溶剂的提取物对小鼠肝匀浆脂质过氧化都有较强的抑制作用,提取物浓度为 4 mg/mL 时的抑制率均超过 50%,抑制率最大的是乙酸乙酯提取物,为 77.9%,其余提取物抑制率基本也在 70%左右.

3 结 语

角叉菜提取物具有较强的抗氧化活性,是一种有效的自由基清除剂,但是不同溶剂的提取物对各种自由基的清除作用有较大的差别,这可能是因为溶剂的极性差异导致提取的化学成分有一定的差别,从而导致对不同自由基的抑制作用的不同,其作用机理还需进一步的探讨.

近年来,寻找天然无毒的抗氧化剂已成为药品和食品添加剂的一个重要研究方向,而从藻类提取物中寻找天然、高效抗氧化剂是其中一个重要方向.随着人们对海洋藻类生物活性的关注,藻类提取物的研究已经得到很大进展,然而其结构、生物活性、作用机理以及它们的相互关系还不明确,也缺乏有效的检测手段,仍需作进一步的探索.

参考文献:

- [1] CUZZOCREA S, RILEY D, CAPUTI A P, *et al.* Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury [J]. **Pharmacological Reviews**, 2001, **53**(1):135-159
- [2] 韩 强,林惠芬,朱玲莉. 一些天然提取物对超氧自由基和羟基自由基的清除作用[J]. 日用化学工业, 2000, **30**(3):14-17
- [3] DUAN Xiao-juan, ZHANG Wei-wei, LI Xiao-ming, *et al.* Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata* [J]. **Food Chemistry**, 2006, **95**(1):37-43
- [4] YUAN Y V, CARRINGTON M F, WALSH N A. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro [J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2005, **43** (7): 1073-1081
- [5] 曾呈奎,严小军,秦 松. 藻类分子生物技术两年评——与藻类活性物质研究有关的生物技术[J]. 海洋与湖沼, 1997, **28**(4):440-445
- [6] 栾日孝,张淑梅. 大连角叉菜属(杉藻科)的研究[J]. 植物分类学报, 1998, **36**(3):268-272
- [7] GEPPTSCH W, GARSSSEN J, HURKS M H, *et al.* Effects of in vitro exposure to ultraviolet radiation on the functional activity of lymphocytes, with emphasis on susceptibility of different species [J]. **Photochemistry and Photobiology**, 1994, **60**(4): 373-378
- [8] 姜凤梧. 中国海洋药物辞典[M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [9] 邹国林,桂兴芳,钟晓凌,等. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, **4**(4):71-73
- [10] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. **Phytochemistry**, 1989, **28**(4):1057-1060
- [11] 张全斌,于鹏展,周革非,等. 海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性的研究[J]. 中草药, 2003, **34**(9): 11-13

Antioxidant activities of extracts by different solvents from *Chondrus ocellatus*

ZHOU Ge-fei^{1, 2}, XING Rong-lian¹, WANG Chang-hai^{*1}

(1. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: *Chondrus ocellatus* was extracted by methanol, ethanol, ethyl ether, ethyl acetate, petroleum ether and acetone, respectively. Antioxidant activities of these extracts were determined by scavenging effect on superoxide free radicals, hydroxide free radicals, H₂O₂ induced hemolysis of rat erythrocytes and lipid peroxide of rat liver microsome. The results indicate that different extracts of *Chondrus ocellatus* all show some antioxidant activities on different free radicals, and solvents have some effects of extracts on these activities. At the same concentration, extracts show the highest scavenging rate on the four different free radicals extracted by ethyl ether, acetone, ethyl ether and ethyl acetate, respectively.

Key words: *Chondrus ocellatus*; solvents; extract; antioxidant activities