

# 基于 DPPH 自由基清除能力的蝉蜕成分抗氧化活性研究

徐明哲 (延边大学农学院农业资源与环境系, 吉林延吉 133000)

**摘要** [目的]研究蝉蜕多巴胺成分在体外试验中自由基 DPPH 清除的效果。[方法]利用 DPPH 法测定蝉蜕成分的抗自由基活性。[结果]蝉蜕中分离得到 2 种 N-乙酰基多巴胺聚合物(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-苯并二氧六环(1)和(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-苯并二氧六环(2),化合物 1 和 2 在 DPPH 自由基清除试验中表现出抗自由基活性(1:  $EC_{50} = 8.9 \mu\text{mol/L}$  和 2:  $EC_{50} = 7.8 \mu\text{mol/L}$ )。[结论]蝉蜕多巴胺成分具有较强的抗自由基活性。

**关键词** 蝉蜕; DPPH; N-乙酰基多巴胺聚合物

中图分类号 S186 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)24-10017-02

## Study of the Antioxidant Activity of Periostracum Cicadae Extracts Based on DPPH Free Radical Scavenging Capability

XU Ming-zhe (Department of Agricultural Resources and Environment, College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000)

**Abstract** [Objective] To evaluate the antiradical effect of N-acetyldopamine dimer from periostracum cicadae *in vitro*. [Method] DPPH free radical scavenging assay method was used to observe the antioxidant activity of periostracum cicadae extracts. [Result] N-acetyldopamine dimer, (2R, 3S)-2-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-7-(N-acetyl-2"-aminoethyl)-1,4-benzodioxane (1), and (2R, 3S)-2-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-3-acetylamino-7-(N-acetyl-2"-aminoethylene)-1,4-enzodioxane(2), were isolated from the ethylacet-ate extracts of Periostracum Cicadae. Compounds 1 and 2 exhibited antiradical activities in the DPPH scavenging assay (1:  $EC_{50} = 8.9 \mu\text{mol/L}$  and 2:  $EC_{50} = 7.8 \mu\text{mol/L}$ ). [Conclusion] N-Acetyl-dopamine dimers from periostracum cicadae have strong DPPH scavenging activities.

**Key words** Periostracum cicadae; DPPH; N-acetyldopamine dimers

人体内由自由基引起的氧化反应在动脉硬化、神经系统疾病、衰老和各种癌症等一系列疾病中起到关键性作用<sup>[1]</sup>。常见的自由基反应类型可以分为 2 类: 氧自由基反应(Radical oxygen species, ROS)和氮自由基反应(Reactive nitrogen species, RNS)。二者统称为活性粒子(Reactive species, RSs)。活性粒子 RSs 在细胞内破坏各种蛋白质、类脂和 DNA。RSs 改变细胞内的各种氧化还原平衡和氧化各种生化反应的中间物质<sup>[2]</sup>。

目前,天然的抗氧化剂主要来源包括谷类、水果、蔬菜、真菌和天然植物等。来源于水果和蔬菜的  $V_C$ 、 $V_E$ 、胡萝卜素和芳香醇类化合物等天然物可以有效清除氧自由基 ROS, 而氧自由基可以破坏磷脂蛋白。芳香醇类化合物可以提供 1 个电子或氢质子给自由基化合物,因此是典型的抗自由基化合物<sup>[3]</sup>。此外,含有这类化合物的各种天然物提取物表现出抗自由基活性<sup>[4]</sup>。食品中的各种抗自由基成分会抑制体内各种自由基氧化过程,在临床上表现出抗衰老活性<sup>[5]</sup>。

有人从各种植物的花、果实、叶子、茎及根中寻找和人工合成了各种各样的抗氧化物质来抑制自由基氧化,其中某些抗氧化效果极好的成分被开发成各种药物<sup>[6]</sup>。然而,关注昆虫资源(占 75% 以上生物种的生物点群)的研究者甚少。蝉蜕是一种传统中药材,常被用于镇痛、消炎、解热药,但蝉蜕具有抗自由基活性以及蝉蜕的抗自由基活性成分的化合物组成尚未见报道。笔者通过抗自由基活性检测系统对各种昆虫进行了活性检测,发现蝉蜕的乙醇溶液具有强烈的抗自由基活性。

## 1 材料与方

### 1.1 药用昆虫原料

蝉蜕是传统中药材,购自延吉市中药

材市场。

**1.2 化合物的提取与分离** 取 300 g 蝉蜕粉末浸泡在 2 L 乙醇液中,2 d 后过滤得乙醇液体并用旋转蒸发器蒸发至干,得到提取物 25.8 g。再用乙酸乙酯对该提取物进行萃取,得到乙酸乙酯提取物 12.0 g。乙酸乙酯浓缩物进行二次柱层析分离和高效液相柱层析分离,得到化合物 1 和 2。

**1.3 自由基 DPPH 的清除试验** 化合物对 DPPH 自由基的清除试验通过 Lu 等的方法进行部分修改后进行的<sup>[7]</sup>。在 4 个 3.0 ml 的比色皿中,分别加入 2.0 ml 新制备的自由基 DPPH 的乙醇溶液(100  $\mu\text{mol/L}$ ),保持恒定室温。在每个比色皿中分别加入同样保持恒定室温的 1.0 ml(100  $\mu\text{mol/L}$ )的化合物 1、2 和参照物乙醇溶液,立即开始测定,最后 1 个比色皿作为空白。利用紫外分光光度计在波长 517 nm 处每隔 2 min 测定反应液,绘制相应化合物的吸收曲线。测定过程在黑暗中进行。按照以下公式计算自由基清除活性(%): 自由基清除活性(E) =  $[(\text{ABS}_{\text{control}} - \text{ABS}_{\text{sample}}) / \text{ABS}_{\text{control}}] \times 100$ 。

**1.4 测定化合物的半数有效浓度  $EC_{50}$**  采用 Sigma Plot 软件进行计算化合物的半数有效浓度  $EC_{50}$ 。

## 2 结果与分析

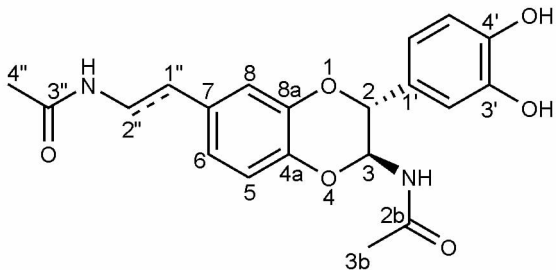
**2.1 确定化合物 1 和 2 的分子结构** 化合物 1 是黄色粉末状固体。在高分辨质谱中显示它的分子离子峰  $[M]^+$  在 386 处,结合其氢谱和碳谱,可以说明其分子式是  $C_{20}H_{22}N_2O_6$ 。为了分析它的结构,分析了 COSY、HMQC 和 HMBC 等核磁共振谱图,得到其化学结构。通过查阅文献,发现此化合物是已知化合物,并且已经确定了立体结构,通过谱图对比进一步证实是同一个分子。因此,化合物 1 的结构最终确定为(2R, 3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2"-氨基乙基)-1,4-苯并二氧六环(1)。

化合物 2 是白色粉末状固体。通过高分辨飞行质谱分析,得到分子离子峰数值是 407.122 4,而计算值是

作者简介 徐明哲(1969-),男,吉林琿春人,副教授,博士,从事农业昆虫学研究, E-mail: xzm95@163.com。

收稿日期 2013-07-21

407.121 9,二者误差在允许范围内(HRFAB-MS data ( $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup>, 407.122 4, calcd. 407.121 9 for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>), 与氢谱和碳谱进行联合谱图分析,可以确认化合物2的分子式是C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>。它的比旋光度是+33.8°(c 0.1, 甲醇)。化合物2的最大紫外吸收峰在282 nm( $\lambda_{\max}$  = 282 nm,  $\log \epsilon$  = 4.32, 甲醇)。在傅里叶变换红外谱图中,可以看到在3 428 cm<sup>-1</sup>处有强烈的羟基红外吸收峰,在1 715 nm处有明显的酰胺羰基吸收峰。通过核磁共振谱图联合谱图分析(1H, 13C, COSY, HMQC, 和 HMBC),可以初步分析出化学结构。经查阅文献发现,化合物2是新的化合物,与化合物1的相关谱图进行对比,发现化合物2的结构比化合物1多了1个双键,分子量相差为2,甚至化合物2的立体化学结构是通过比较化合物1的结构进行确定。最后,化合物2的结构确认为(2R,3S)-2-(3',4'-二羟基苯基)-3-乙酰氨基-7-(N-乙酰基-2'-氨基乙烯基)-1,4-苯并二氧六环(2)(图1)。



注: 化合物1中1'和2'之间为单键; 化合物2中1'和2'之间为双键。

图1 从蝉蜕中分离的化合物1和2的化学结构

**2.2 自由基 DPPH 的清除试验** 化合物对自由基的清除能力测试是通过自由基 DPPH 的清除反应进行的(图2)。反应开始后,溶液的自由基含量急速下降,反应1 min 后化合物1和化合物2 猝灭 DPPH 自由基达51%和52%,2 min 以后反应液中只剩下5%和16%的自由基。同样浓度的参照物(ProbucoI),同样的反应时间内则剩余72%的自由基。反应4 min 后化合物1和2与DPPH反应进行完全,此时参照物反应液中仍存在58%的DPPH自由基,直至反应40 min后,反应液中还存在20%的DPPH自由基。化合物1和2表现出强烈的抗自由基活性(毫摩尔级别)。

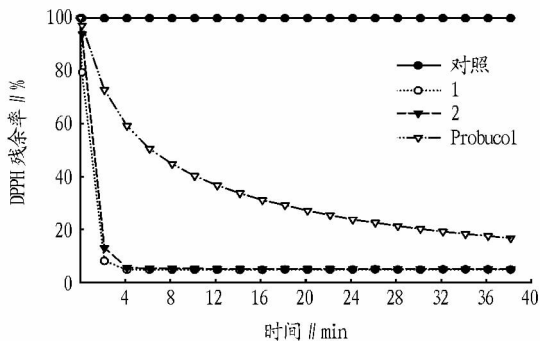


图2 自由基 DPPH 的猝灭试验中化合物1和2的活性

**2.3 测定化合物的半数有效浓度 EC<sub>50</sub>** 测得化合物1的 EC<sub>50</sub>是8.9 μmol/L,化合物2的 EC<sub>50</sub>是7.8 μmol/L。它们的

抗自由基活性都达到微摩尔级别。相应的参照物 ProbucoI 虽然是非常典型的药物,但它的 EC<sub>50</sub>是25.5 μmol/L,大于化合物1和2。

### 3 讨论

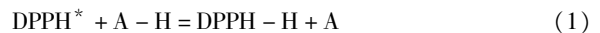
为了测定抗自由基化合物的总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, TAC),研究者开发了很多种测定方法(如比色法、荧光法和化学发光法),其中比色法是基于带有颜色的自由基和抗自由基化合物的反应。带有颜色的化合物有利于可见光区测定。带有颜色的自由基化合物 ABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)<sup>[8]</sup>和 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)成为常用的自由基化合物。DPPH方法有许多优点,常温下形成稳定的自由基和简单容易的试验操作条件是最大的优点,因此 DPPH 自由基检测法是目前最有效、最广泛的测定方法<sup>[9]</sup>。该方法的基本原理是 DPPH 在溶液中生成一个稳定的含氮自由基且该溶液呈紫色,在紫外-可见(UV-Vis)光区具有较强的吸收光谱。当 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时,由于其自由基清除作用使 DPPH 紫色消退,产物带有黄色,导致吸收光谱强度随加入的抗氧化剂的量的增加而减小,通过加入抗氧化剂前后吸光度的变化计算自由基清除率<sup>[10]</sup>。DPPH 紫色溶液在320~325 nm和515~520 nm 波长处有2个特征的吸收峰<sup>[11]</sup>。抗氧化剂对 DPPH 自由基清除率是通过测定加入抗氧化剂前后 DPPH 在515~520 nm 波长处吸光度的变化来计算的<sup>[12]</sup>。

对某些抗氧化剂而言,DPPH 自由基溶液在517 nm 波长处的吸光度变化并非随加入的抗氧化剂的量的变化呈线性关系<sup>[13]</sup>。研究表明,二者不是线性关系<sup>[14-15]</sup>,因此以前的 DPPH 试验使用线性方程进行结果分析存在较大的系统误差。该试验结果也同样证明这一点。

DPPH 活性检测试验在室温条件下进行,这是因为 DPPH 自由基在常温下比较稳定,但并不能证明与温度无关,温度的改变同样会改变试验平衡条件,会影响试验结果,特别是在反应过程中要保持恒温条件。

DPPH 自由基易受光照条件的影响,光子可以活化空气和水中的氧等较易活化的成分,产生新的自由基,给试验带来不良的副反应,因此试验过程要在黑暗中进行。

DPPH 自由基反应有2种反应类型,1种是与供氢化合物(AH)反应,另1种是与其他自由基化合物(R<sup>\*</sup>)反应。



化合物1和2在以前文中已有报道<sup>[16]</sup>。化合物1和2是典型的抗动脉硬化药物,对低密度脂蛋白的氧化变异有优良的抗氧化效果,该试验中化合物1和2表现出优良的抗自由基活性,分析它们的化学结构可以推测是按照反应(1)进行的。

低密度脂蛋白的氧化机理可以分为自由基氧化机理和金属离子氧化机理。化合物1和2与自由基 DPPH 有强烈的猝灭作用,因此表明分离化合物抗氧化机理可能是通过减少自由基来进行的。

(下转第10062页)

市委农村工作领导小组为总牵头,以郊区党委、政府为责任主体,以镇街党委、政府为实施主体,充分发挥农民群众的主体作用,鼓励和引导社会力量积极参与,形成推进美丽乡村建设的合力。同时,需要完善推进机制,将新农村项目的建设任务具体分解到试点镇街、美丽乡村示范片区、土地整治等载体,建立项目实施与督查机制,构建各级责任体系,确保美丽乡村的建设进度。

**5.3 加强镇村集体能力建设** 美丽乡村的主要实施主体在村镇,因此应当将镇村能力建设作为美丽乡村建设的重要保障,紧扣郊区与全市同步基本实现现代化目标,通过分类指导、分类考核以及村级“四有一责”建设,推动镇村特色发展、差异化竞争。一是开展分类考核,将郊区镇街划分为现代农业、先进制造业、现代服务业等主导类型,实施分类考核,鼓励错位竞争差异发展。二是加大帮促力度,组织市级机关部门开展与经济欠发达镇结对帮促工作,由相关责任部门参与,以培养“造血”功能为重点,促进帮促地区经济社会协调发展。三是加强村级能力建设,开展以发展村工业设施为重点的“村级能力建设”,提高集体资产增量,实行“村级所有、集中经营、收益保底、逐年增长”。

**5.4 深化农村综合改革** 在探索美丽乡村建设路径的过程中,也存在一些制约因素和亟需解决的问题,这需要进一步深化农村综合改革,以土地使用制度改革、农村户籍制度改革和城乡社会保障制度并轨为重点,促进美丽乡村建设<sup>[8]</sup>。

一方面需要进一步加大资源整合力度,促进不同的责任单位和实施主体共同推进,从国家层面强化顶层设计,明确由农村综改办和党委农村工作部门牵头,整合资源、形成合力。另一方面是需要进一步拓宽资金渠道,解决美丽乡村建设项目资金需求问题,将涉农专项资金安排向美丽乡村示范区倾斜;通过进一步加大财政投入,放宽社会资本进入,协调金融机构扩大农村有效抵押物范围,建立健全政府引导、社会投入、农民参与的美丽乡村建设多元投资渠道。美丽乡村本质上是对农村传统发展模式的反思与扬弃,需要以农村综合改革为切入口,进一步创新农业农村发展体制机制。

#### 参考文献

- [1] 张伟. 美丽中国战略的内涵、缘起及实施路径探讨[J]. 济南大学学报: 社会科学版, 2013(3): 1-7.
- [2] 赵洪祝. 全面推进美丽乡村建设[J]. 今日浙江, 2012(21): 8-9.
- [3] 安吉县委县政府. 打造中国美丽乡村推进生态文明建设[J]. 政策瞭望, 2010(6): 26-28.
- [4] 车娜, 李倩, 黄薇. 建设“美丽乡村”的新支点[J]. 中国土地, 2013(1): 21-23.
- [5] 赖瑞洪. “四级联创”开辟美丽乡村新天地[J]. 农村工作通讯, 2012(2): 32-33.
- [6] 帅丽芳. 做好“美丽”文章 打造魅力乡村[J]. 丽水学院学报, 2013(1): 12-17.
- [7] 汪彩琼. 新时期浙江美丽乡村建设的探讨[J]. 浙江农业科学, 2012(8): 1204-1207.
- [8] 马以. 美丽乡村建设的实践[J]. 农村工作通讯, 2011(1): 33-35.
- [9] 陈奕猛, 林敏莉, 梅明清, 等. 浅析建设新农村的目标任务和具体措施[J]. 内蒙古农业科技, 2013(2): 9-10.

(上接第 10018 页)

#### 参考文献

- [1] CHEN Z, BERTIN R, FROLDI G.  $EC_{50}$  estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs[J]. Food Chem, 2013, 138: 414-420.
- [2] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The Inter J Biochem & Cell Biology, 2007, 39: 44-84.
- [3] BANDONIENE D, MURKOVIC M. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method[J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 53: 45-49.
- [4] WETTASINGE M, SHAHIDI F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds[J]. Food Chem, 1999, 67: 399-414.
- [5] AMATATONGCHAI M, LAOSING S, CHAILAPAKUL O, et al. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode[J]. Talanta, 2012, 97: 267-272.
- [6] SHEN L. Mechanistic insight into the DPPH radical-scavenging activity of hydroxystilbene derivatives[J]. Comput and Theoret Chem, 2011, 974: 159-162.
- [7] LU H F, LOU H Q, ZHENG H, et al. Nondestructive evaluation of quality changes and the optimum time for harvesting during jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Changhong) fruits development[J]. Food Biop Tech, 2011, 10: 11947-119650.
- [8] MILLER N J, RICE-EVANS C, DAVIES M J, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. Clin Sci, 1993, 84(4): 407-412.
- [9] OSMAN A M. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH<sub>•</sub>) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH<sub>•</sub> and the oxidized form of the polyphenol[J]. Biochem Biophys Res Comm, 2011, 412: 473-478.
- [10] 李铨军, 崔胜云. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 86-90.
- [11] AKINMOLADUN A C, IBUKUN E O, DANOLOGE I A. Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*[J]. J Sci Res Essays, 2007, 2(6): 191-194.
- [12] KRISHNAIAH D, SARBATLY R, NITHYANANDAM R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species[J]. Food Bioprocess, 2011, 89(3): 217-233.
- [13] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1578-1582.
- [14] EKLUND P C, LÅNGVIK O K, WÄRNÄ J P, et al. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans[J]. Org Biomol Chem, 2005, 3(18): 3336-3347.
- [15] VILLANO D, FERNÁNDEZ-PACHON M S, TRONCOSO A M, et al. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro[J]. Anal Chim Acta, 2005, 538: 391-398.
- [16] 徐明哲, 崔惠兰, 朴桂花. 农业昆虫蝉蛻的抗动脉活性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16801-16802.