

柞蚕雌蛾体外抗氧化活性研究

穆静^{1,2}, 刘志^{1,3}, 李伟², 张金秋^{1,2}, 邵玺文^{1,3}, 阮长春^{1,3*}

(1. 吉林农业大学 农业现代化综合技术研究所, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118;
3. 吉林农业大学 天敌昆虫应用技术工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要: 为探明柞蚕雌蛾的体外抗氧化活性, 为其抗氧化药物的研制提供理论依据, 将柞蚕雌蛾粉经 80% 乙醇超声提取后, 测定柞蚕雌蛾提取液中总黄酮、总酚酸的含量, 及其对超氧阴离子自由基、羟基自由基、1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)自由基和 2,2-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基的清除作用。结果显示, 柞蚕雌蛾中总黄酮含量为 2.36 mg/g, 总酚酸含量为 2.44 mg/g; 其具有较强的清除自由基能力, 对超氧阴离子自由基、羟基自由基、DPPH 自由基和 ABTS 自由基的半数抑制质量浓度(IC₅₀)分别为 23.525 8、27.998 4、0.648 9、6.755 7 mg/mL。表明柞蚕雌蛾体外具有较强的抗氧化活性。

关键词: 柞蚕雌蛾; 抗氧化活性; 黄酮; 酚酸

中图分类号: S88.2⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)04-0133-04

Antioxidant Activities of *Antheraea pernyi* Female Moth *in Vitro*

MU Jing^{1,2}, LIU Zhi^{1,3}, LI Wei², ZHANG Jin-qiu^{1,2}, SHAO Xi-wen^{1,3}, RUAN Chang-chun^{1,3*}

(1. Institute of Agricultural Modernization, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Engineering Research Center of Natural Enemy Insects, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To investigate antioxidant activities of *Antheraea pernyi* female moth *in vitro*, and reveal the theoretic basis for exploitation of *Antheraea pernyi* female moth in antioxidant drugs, the contents of total flavonoids, total phenols and the removal effect on oxygen free radical, hydroxyl free radical, DPPH free radical and ABTS free radical of 80% ethanol extraction from *Antheraea pernyi* female moth by ultrasonics were detected with UV-visible spectrophotometer. The results showed that the contents of flavonoid and total phenolic acid were 2.36 and 2.44 mg/g; *Antheraea pernyi* female moth had certain ability of scavenging free radicals, the 50% elimination values to oxygen free radical, hydroxyl free radical, DPPH free radical and ABTS free radical were 23.525 8, 27.998 4, 0.648 9, 6.755 7 mg/mL, respectively. *Antheraea pernyi* female moth has strong anti-oxidation activity.

Key words: *Antheraea pernyi* female moth; antioxidant activity; flavonoids; phenolic acid

生物体内的自由基主要有氧自由基、羟自由基、脂氧自由基、二氧化氮和一氧化氮自由基。许多疾病与自由基导致的生物大分子氧化损伤有关。抗氧化剂是一类能帮助捕获并中和自由基, 从而祛除自由基对动物机体损害的物质。但是当前许多工业合成的抗氧化剂具有很多副作用。因此, 开发低毒、高效的

天然抗氧化剂已成为当前研究的热点之一。

雄蚕蛾为节肢动物门昆虫纲鳞翅目天蚕蛾科柞蚕及同属多种昆虫的雄性成虫。郭郭^[1]研究发现, 雄蚕蛾体内富含具有延缓人体细胞衰老、抗生殖细胞衰老的生物活性物质, 主要包括雄性激素、蜕皮激素、保幼激素、脑激素等。另有研究^[2-3]发现, 柞蚕雄蛾浓缩液

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371991)

作者简介: 穆静(1989-), 女, 辽宁锦州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然产物研究及新药开发。

E-mail: sdhstu1989@163.com

* 通讯作者: 阮长春(1965-), 男, 吉林敦化人, 研究员, 硕士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: jlnydcyf@126.com

中具有抗氧化作用的维生素 A 含量为 0.015 2 IU/g, 维生素 E、维生素 B₁、维生素 B₂ 总量为 0.009 92 mg/g。艾永循等^[4]对柞蚕雄蛾口服液进行药理研究,发现其能增强机体免疫功能、降低过氧脂质含量。印玉萍等^[5]对雄蚕蛾酒中黄酮和总酚进行测定分析,认为黄酮和总酚是雄蚕蛾酒中起抗氧化、清除自由基作用的主要物质。柞蚕雌蛾与柞蚕雄蛾具有很多相似的活性成分^[6],但有关柞蚕雌蛾体外抗氧化活性研究尚未见报道。为此,研究了柞蚕雌蛾清除自由基的活性,并对其总黄酮和总酚酸的含量进行测定,以期为开发利用柞蚕蛾天然抗氧化药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

柞蚕雌蛾由吉林农业大学生物防治研究所提供;1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)购于美国 Sigma 公司;硫酸亚铁、水杨酸、芦丁、没食子酸、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、钨酸钠、钼酸钠等,均为国产分析纯。

紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司;KQ-250B 型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;SENCOR 系列旋转蒸发器购自上海申生有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 称取烘干粉碎后的柞蚕雌蛾粉 50 mg,用 50 mL 80%的乙醇超声提取 20 min,提取 3 次后,合并提取液,减压浓缩。

1.2.2 总黄酮含量测定 参照文献^[7]的方法,称取 10 mg 芦丁标准品,用 60%的乙醇溶于 50 mL 容量瓶中,其质量浓度为 0.2 mg/mL。向 25 mL 容量瓶中分别准确加入 2.5 mL 样品和 1 mL 5%的 NaNO₂ 溶液,摇匀后,静置 6 min,再加 1 mL 10%的 Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,静置 6 min,加 10 mL 4%的 NaOH 溶液,最后加水定容至刻度,摇匀,静置 15 min,测定 510 nm 处吸光度。分别准确吸取芦丁标准品 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,按照上述方法加样,测定吸光度。以芦丁标准品的质量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。样品中总黄酮的含量以芦丁的相对值表示。

1.2.3 总酚酸含量测定 参照文献^[8]的方法。配制 Folin-Ciocalteu 显色剂,向磨口圆底烧瓶中加入钨酸钠 2.5 g、钼酸钠 0.625 g、蒸馏水 17.5 mL、浓磷酸 1.25 mL、浓盐酸 2.5 mL,摇匀,水浴回流 10 h,再分

别加硫酸锂 3.75 g、蒸馏水 1.25 mL、双氧水 5.0 mL,开口沸腾 15 min,直到溶液呈亮黄色,冷却后定容至 50 mL,将其置于棕色瓶中保存,使用时用蒸馏水稀释 2 倍。

准确吸取样品溶液 2.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,向瓶中加入 10 mL 蒸馏水,再加 2.0 mL Folin-Ciocalteu 显色剂,摇匀后静置 8 min,再加 2.0 mL 15%的 Na₂CO₃ 溶液,最后用蒸馏水定容,摇匀,室温避光反应 2 h,测定 765 nm 处吸光度。配制 0.2 mg/mL 的没食子酸标准品,精确吸取标准品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,按上述方法加样,测定吸光度。以没食子酸的质量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。样品中总酚酸的含量以没食子酸的相对值表示。

1.2.4 样品对超氧阴离子自由基的清除作用测定

参照文献^[9],采用邻苯三酚自氧化法。邻苯三酚在弱碱性条件下产生超氧阴离子自由基和有色中间产物,加入清除剂后会加速反应的进行。向反应系统中加入 4.2 mL 的蒸馏水、4.5 mL pH 值为 8.2 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液,混匀后 25 °C 水浴 20 min,立即加入 0.3 mL 3 mmol/L 邻苯三酚(用 10 mmol/L HCl 作空白),混匀后立即倒入比色杯,在 325 nm 处每隔 10 s 测定吸光度。向 5 支试管中分别加入 3.95、3.70、3.20、2.20、0.20 mL 蒸馏水和 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液,25 °C 水浴 20 min,依次加入 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL 样品,再分别加入 0.3 mL 邻苯三酚,测定吸光度。根据邻苯三酚自氧化曲线在线性范围内每 10 s 吸光度的增加(可用线性回归法求得)即反应速率,计算清除率(scavenging activity, SA)。

$$SA = (V - V_0) / V_0 \times 100\%$$

其中, V 为邻苯三酚自氧化反应速率; V₀ 为加入样品后邻苯三酚自氧化反应速率。

1.2.5 样品对羟基自由基的清除作用测定 参照文献^[10]的方法,将 H₂O₂ 与 Fe²⁺ 混合产生羟基自由基,在体系内加入水杨酸捕捉羟基自由基并产生有色物质,该物质在 510 nm 处有最大吸收峰。在试管中分别加入 2 mL 9 mmol/L FeSO₄、9 mmol/L 水杨酸-乙醇及不同质量浓度的样品溶液,最后加 2 mL 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 启动反应,37 °C 水浴反应 30 min,以蒸馏水为参比,测定 510 nm 处吸光度,计算清除率。

$$SA = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

其中, A₀ 为空白对照液的吸光度, A₁ 为加入样品后的吸光度, A₂ 为不加样品本底吸光度。

1.2.6 样品对 DPPH 自由基的清除作用测定 参

照文献[11]的方法,配制 DPPH 自由基溶液:精密称取 DPPH 0.012 8 g(避光),用无水乙醇定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀,作为 DPPH 自由基储备液(2.56×10^{-4} g/mL),4 °C 避光保存。

吸取 10 mL DPPH 自由基储备液,定容于 100 mL 容量瓶中摇匀待测。利用 DPPH 自由基的溶液特征紫红色团的吸收峰,用紫外分光光度计测定加入样品后其在 517 nm 处吸光度,以吸光度变化表示其清除自由基的能力。

将 A(2 mL 70% 的乙醇溶液+2 mL DPPH 自由基溶液)、B(2 mL 样品溶液+2 mL DPPH 自由基溶液)、C(2 mL 样品溶液+2 mL 无水乙醇)在室温下避光静置 30 min 后,在 5 min 内测定吸光度。计算样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$SA = [A - (B - C)] / A \times 100\%$$

其中,A 表示 DPPH 自由基与溶剂混合液的吸光度;B 表示样品与 DPPH 自由基混合后的吸光度;C 表示样品与溶剂混合后的吸光度。

1.2.7 样品对 ABTS 自由基的清除作用测定 参照文献[12]的方法,将 10 mL 7 mmol/L 的 ABTS 与 176 μ L 140 mmol/L 的高硫酸钾溶液混合,室温避光条件下静置过夜,形成 ABTS 自由基储备液,该储备液使用时应避光,使用前用无水乙醇稀释成工作液(要求 4 mL 的工作液中加入 1 mL 的无水乙醇,在 30 °C、734 nm 处吸光度为 0.49~0.53)。反应系统包括 1 mL 样品和 4 mL ABTS 自由基工作液,无水乙醇作空白,混合 10 s,30 °C 静置 6 min,测定 734 nm 处吸光度,计算清除率,同 1.2.5。

2 结果与分析

2.1 柞蚕雌蛾提取液总酚和总黄酮测定结果

以芦丁和没食子酸为标准品,绘制标准曲线,其回归方程分别为 $Y = 0.6439X + 0.1091$ ($R^2 = 0.9997$); $Y = 80.617X + 0.0977$ ($R^2 = 0.9988$)。测定柞蚕雌蛾中总黄酮的含量为 2.36 mg/g,总酚酸含量为 2.44 mg/g。

2.2 柞蚕雌蛾提取液对超氧阴离子自由基的清除作用

超氧阴离子自由基性质活泼,具有很强的氧化性和还原性,既是氧化剂,又是还原剂,过量生成可致组织损伤。由图 1 可以看出,柞蚕雌蛾提取液质量浓度在 8.0~128.0 mg/mL 时,对超氧阴离子自由基的清除有较好的量效关系,且随质量浓度的增加,清除率增加。128.0 mg/mL 的柞蚕雌蛾提取液清除率达到 95.24%。半数抑制质量浓度(IC_{50})值

为 23.525 8 mg/mL。

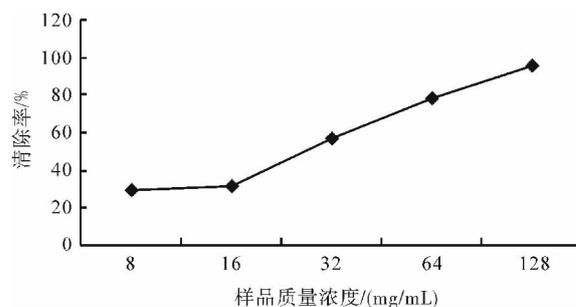


图 1 柞蚕雌蛾提取液对超氧阴离子自由基的清除率

2.3 柞蚕雌蛾提取液对羟基自由基的清除作用

羟基自由基化学性质活泼,是毒性最大的自由基,几乎与细胞内各类有机物反应,是造成组织脂质过氧化、蛋白质解聚与聚合、多糖解聚的重要活性氧,而羟基自由基清除率是反映抗氧化作用的重要指标。由图 2 可以看出,柞蚕雌蛾提取液对羟基自由基有较好的清除作用,且呈现量效关系,随柞蚕雌蛾提取液质量浓度的增大,清除率上升。柞蚕雌蛾提取液质量浓度大于 32.0 mg/mL 时,清除率明显增加。 IC_{50} 值为 27.998 4 mg/mL。

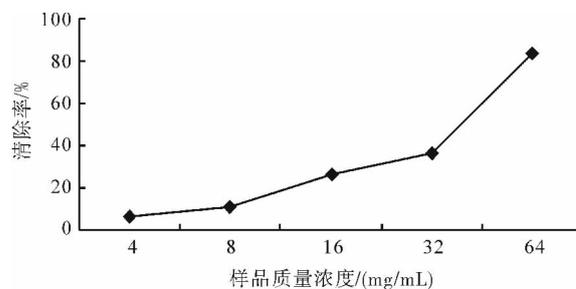


图 2 柞蚕雌蛾提取液对羟基自由基的清除率

2.4 柞蚕雌蛾提取液对 DPPH 自由基的清除作用

由图 3 可以看出,柞蚕雌蛾提取液对 DPPH 自由基的清除有较好的量效关系,且随质量浓度的增大,清除率也逐渐上升。当柞蚕雌蛾提取液质量浓度为 4.0 mg/mL 时,清除率达到 81.13%;大于 4.0 mg/mL 时,其清除率增加缓慢。 IC_{50} 值为 0.648 9 mg/mL。

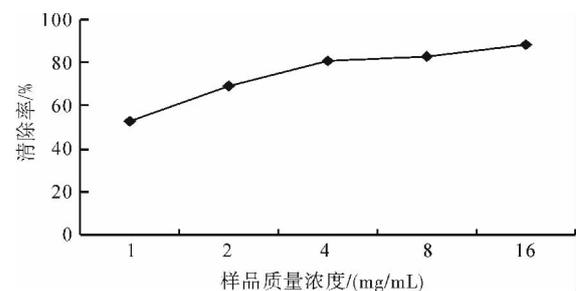


图 3 柞蚕雌蛾提取液对 DPPH 自由基的清除率

2.5 柞蚕雌蛾提取液对 ABTS 自由基的清除作用

ABTS 在适当的氧化剂作用下被氧化成绿色的 ABTS 自由基,在抗氧化物存在时 ABTS 自由基的产生会被抑制。由图 4 可以看出,柞蚕雌蛾提取液对 ABTS 自由基的清除能力较强,呈现良好的量效关系,随着柞蚕雌蛾提取液质量浓度增大,清除率明显增加。9.0 mg/mL 的柞蚕雌蛾提取液,其清除率达 92.64%。IC₅₀ 值为 6.755 7 mg/mL。

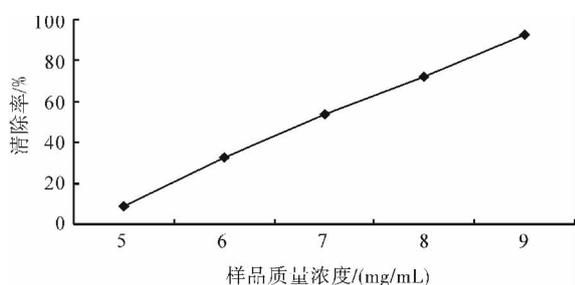


图 4 柞蚕雌蛾提取液对 ABTS 自由基的清除率

3 结论与讨论

本研究结果表明,柞蚕雌蛾体外具有抗氧化活性,有较好的抗氧化能力,其抗氧化能力与提取液质量浓度呈现良好的量效关系,抑制超氧阴离子自由基、羟基自由基、DPPH 自由基和 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 23.525 8、27.998 4、0.648 9、6.755 7 mg/mL。柞蚕雌蛾提取液中总黄酮和总酚酸含量分别为 2.36 mg/g 和 2.44 mg/g。前人^[5,13-14]对雄蚕蛾酒中黄酮和总酚进行测定分析,认为黄酮和总酚是雄蚕蛾酒中起抗氧化、抗衰老和清除自由基作用的主要物质,总黄酮含量为 0.664 8 mg/mL,总酚含量为 0.435 6 mg/mL。另据报道^[2-5,15],柞蚕雄蛾和蚕蛹中还有雄性激素、蜕皮激素、保幼激素、脑激素、维生素和抗氧化肽等抗氧化活性物质。因此,柞蚕雌蛾提取液中除了黄酮和总酚以外,可能还含有其他抗氧化活性成分,这些抗氧化活性成分可能具有协同作用,但关于柞蚕雌蛾中起抗氧化作用的主要物质,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 郭郭. 昆虫的激素[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 邹德庆, 郑淑湘, 李全宏, 等. 柞蚕雄蛾浓缩液成分及免疫调节功能的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 231-234.
- [3] 朱保忠, 李琳. 小鼠肝脏端粒酶活性与 α -亚麻酸、维生素复合剂的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 46(14): 46-49.
- [4] 艾永循, 曹华, 张泽军. 柞蚕雄蛾口服液对小鼠、大鼠抗衰老作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2000(4): 55-56.
- [5] 印玉萍, 吴曙光, 依萨尔古丽, 等. 雄蚕蛾酒黄酮和多酚的提取和分析研究初报[J]. 北方蚕业, 2011, 32(2): 11-12.
- [6] 张黎. 柞蚕蛾的研究近况[J]. 辽宁丝绸, 2009(2): 26-27.
- [7] 赵丹丹, 郑鸿雁. 多年生藤本豆与大豆中黄酮类化合物体外抗氧化活性比较研究[J]. 食品工业科技, 2013, 8(34): 154-157.
- [8] 杨光明, 王栋, 张芳芳, 等. 镰形棘豆总黄酮和总酚的含量测定[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(5): 376-379.
- [9] 王宗君, 廖丹奎. 茶树菇多糖抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 50-54.
- [10] 刘曼, 韩升廷, 张海悦, 等. 花生红衣粗多酚体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 2(34): 120-123.
- [11] 王海敏, 虞海霞, 董蕊, 等. 苕子蜜酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 54-57.
- [12] 韩光亮, 李翠梅, Eduardo Cacace, 等. 改良的 ABTS⁺法及其在优化抗氧化活性物质提取中的应用[J]. 卫生研究, 2004, 33(5): 620-622.
- [13] Xu Y, Yu Z, Wu F. Studies on the flavonoids and antioxidant activities in leaves of black currant[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2002, 19(2): 136-140.
- [14] 张红城, 董捷, 李慧. 六种蜂花粉多酚和黄酮类物质含量测定及抗氧化性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 500-504.
- [15] 卢楠, 廖鲜艳, 翁新楚, 等. 蚕蛹抗氧化剂的制备及其体外抗氧化活性评价[J]. 上海大学学报, 2013, 19(2): 215-219.