

碘酸钾对杜氏盐藻抗氧化能力的影响

于涛, 王晓燕, 洪利亚, 钟韵山, 徐仰仓

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 以杜氏盐藻为材料, 研究碘酸钾对其抗氧化物质含量及清除自由基能力的影响. 当在杜氏盐藻培养液中添加不同质量浓度的碘酸钾时, 藻体内黄酮、 β -胡萝卜素和维生素 E 含量不同程度地升高. 培养液中碘酸钾的质量浓度为 4.0 g/L 时, 藻体内黄酮的含量增幅最大, 为对照的 126.3%, 碘酸钾的质量浓度为 0.4 g/L 时, 藻体内 β -胡萝卜素和维生素 E 的含量增幅最大, 分别为对照的 121.6% 和 126.7%. 不同质量浓度的碘酸钾处理后, 杜氏盐藻提取物清除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 的能力也有不同程度地增强, 其中增幅最大的碘酸钾质量浓度是 0.4 g/L. 以上结果表明, 碘酸钾处理可以增强杜氏盐藻的抗氧化能力.

关键词: 黄酮; β -胡萝卜素; 维生素 E; 自由基; 杜氏盐藻

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2013)03-0006-04

Effect of Potassium Iodate on Antioxidant Capacity of *Dunaliella Salina*

YU Tao, WANG Xiaoyan, HONG Liya, ZHONG Yunshan, XU Yangchang

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The marine medicinal plant *dunaliella salina* was used as a material. The effect of potassium iodate on its antioxidant and free radical scavenging capacity was studied. When the *dunaliella salina* was cultured in medium with potassium iodate for ten days, the contents of flavonoid, beta-carotene and vitamin E were increased. The increase level of flavonoid contents was the highest when treated with 4.0 g/L potassium iodate (126.3% of the control). The beta-carotene content and vitamin E content were the largest when treated with 0.4 g/L potassium iodate. They were 121.6% and 126.7% of the control respectively. The scavenging capacity of *Dunaliella salina* extract to $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ free radicals was also increased by exogenous potassium iodate. The scavenging capacity was the largest when the alga was cultured in medium containing 0.4 g/L potassium iodate. These results indicated that the antioxidant capacity of *dunaliella aalina* was increased by exogenous potassium iodate.

Key words: flavonoid; beta-carotene; vitamin E; free radical; *dunaliella salina*

海洋约占地球表面积的 71%, 蕴藏着丰富的生物资源, 由于高压、高盐、低营养等特殊环境及海洋物种间的生态作用, 再加上遗传和代谢的特异性, 使海洋生物产生多种不同于陆地生物的特殊产物. 杜氏盐藻是一种广泛分布于海洋、盐湖中的单细胞无壁的真核绿藻^[1], 含有丰富的 β -胡萝卜素、黄酮、甘油、维生素 E、亚麻酸、硒、叶酸、多糖等生理活性物质^[2], 具有提高人体免疫力、清除自由基、防治肿瘤、心血管、老年性痴呆和白内障等疾病的功能^[3]. 不同培养

条件下, 杜氏盐藻体内的生理活性物质含量差异很大. 本文研究了含碘盐培养下, 杜氏盐藻体内主要生理活性物质含量及清除自由基能力的变化, 为提高杜氏盐藻的药用价值提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 藻种及培养方法

杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 购自中国科学院水

收稿日期: 2012-11-02; 修回日期: 2012-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670493); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201210057037)

作者简介: 于涛 (1987—), 男, 辽宁人, 硕士研究生; 通信作者: 徐仰仓, 教授, xuycc@tust.edu.cn.

生生物研究所藻种室. 将杜氏盐藻藻种接入本次实验所用培养液中培养.

培养液: 卤水, 取自塘沽盐场, 过滤后用蒸馏水稀释盐度至 30‰. 一次性添加营养盐至下列浓度: NaNO_3 0.4 mmol/L, 尿素 0.2 mmol/L, KH_2PO_4 0.1 mmol/L, 柠檬酸铁 0.01 mmol/L, NaHCO_3 3.0 mmol/L. 121 °C 30 min 灭菌. 培养温度为 25 °C, 光照度为 4 000 lx, 光/暗周期为 16 L/8 D. 培养时间为 10 d. 处理组在培养初始加不同质量浓度的碘酸钾.

1.2 提取及测定方法

1.2.1 β -胡萝卜素的提取及含量的测定

参照张建华等^[4]使用的方法, 称取盐藻粉 0.5 g, 置于 250 mL 三角瓶中, 加入丙酮-石油醚(体积比为 3 : 7) 100 mL, 封口, 60 °C 水浴浸提 2 次, 每次 60 min, 离心分离上清液, 合并提取液, 减压浓缩至 25 mL. 在 450 nm 处测吸光度, 并根据标准曲线计算其含量.

1.2.2 黄酮类化合物的提取及含量的测定

参照黎彧等^[5]的方法, 用芦丁制作标准曲线. 称取盐藻粉 0.5 g, 加入石油醚 50 mL, 室温浸提 60 min, 以便脱去酯类、色素等. 9 200 r/min 离心 5 min, 沉淀用 70% 的乙醇加热再提取 1 次. 合并提取液, 减压浓缩至 25 mL. 然后测 359 nm 处的吸光度, 从标准曲线上查出黄酮的含量.

1.2.3 维生素 E 的提取及含量的测定

参照刘树恒^[6]使用的方法, 用维生素 E (Sigma 公司, α -生育酚 ≥ 96) 制作标准曲线. 称取盐藻粉 0.5 g, 加入无水乙醇 50 mL, 室温浸提 60 min, 9 200 r/min 离心 5 min, 沉淀用 50 mL 无水乙醇再次提取 60 min, 合并提取液, 减压浓缩至 25 mL. 10 mL 反应体系中包含 20 mg/L $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液 0.5 mL、pH 4.6 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 1.0 mL、样品溶液 2.0 mL、5-硝基-1, 10-菲咯啉乙醇溶液 1.0 mL、10.0 g/L 十六烷基三甲基溴化铵溶液 1.0 mL、 H_2O 4.5 mL, 室温反应 10 min. 在 502 nm 处测定吸光度, 从标准曲线上查出维生素 E 含量.

1.2.4 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的测定

采用核黄素-NBT 还原法^[7]. 核黄素在光照下可以产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可被 NBT 还原形成蓝色物质, 后者在 580 nm 处有吸光值. 3 mL 反应体系中含有: 提取液 0.1 mL, 0.1 mol/L EDTA 0.2 mL, 1.5 mmol/L NBT 0.1 mL, 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 2.55 mL, 0.12 mmol/L 核黄素 0.05 mL. 25 °C 下光照 10 min. 在 580 nm 波

长处分别测定样品组吸光度 (A_1) 和对照组吸光度 (A_2), 按照式 (1) 计算 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率.

$$\text{清除率} = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.5 羟自由基($\cdot\text{OH}$)的测定

$\cdot\text{OH}$ 由 Fenton 反应产生, $\cdot\text{OH}$ 的测定采用水杨酸比色法, 参照徐仰仓^[8]使用的方法. 5 mL 反应体系中含有: 10 mmol/L 水杨酸 0.5 mL, 0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 3.0 mL, 或 0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 2.8 mL, 提取液 0.2 mL, 3.8 mmol/L Fe^{2+} -EDTA 溶液 0.5 mL, 4 mmol/L H_2O_2 1 mL. 25 °C 反应 90 min 后, 用乙醚抽提 2, 3-二羟基苯甲酸, 在 510 nm 波长处分别测定样品组吸光度 (A_1) 和对照组吸光度 (A_2), 按照式 (1) 计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率.

1.3 统计分析

利用 t -检验对数据进行分析, 每个数据是 3 次重复实验的平均值.

2 实验结果

2.1 碘酸钾对杜氏盐藻体内黄酮含量的影响

碘酸钾对杜氏盐藻体内黄酮含量的影响如图 1 所示. 当培养液中碘酸钾的质量浓度低于 2.0 g/L 时, 杜氏盐藻体内黄酮的含量并没有发生明显的变化; 当培养液中碘酸钾质量浓度在 3.0 ~ 4.0 g/L 时, 杜氏盐藻体内的黄酮含量明显高于对照; 当培养液中碘酸钾质量浓度为 4.0 g/L 时, 黄酮含量为对照的 126.3%; 当碘酸钾质量浓度为 5.0 g/L 时, 黄酮的含量又基本回到对照水平.

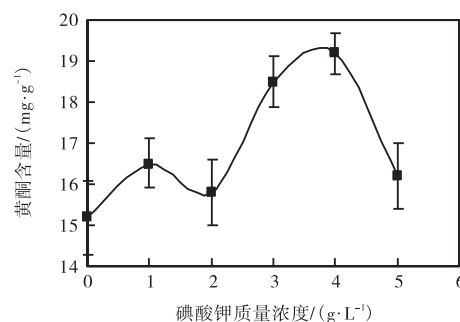


图 1 碘酸钾对杜氏盐藻黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of potassium iodate on flavonoid content in *dunaliella salina*

2.2 碘酸钾对杜氏盐藻体内 β -胡萝卜素含量的影响

碘酸钾对杜氏盐藻体内 β -胡萝卜素含量的影响如图 2 所示. 碘酸钾诱导杜氏盐藻 β -胡萝卜素含量

累积的最佳质量浓度为 0.4 g/L, 此时, β -胡萝卜素含量为对照的 121.6%。此后, 随着培养液中碘酸钾质量浓度的增高, 藻体内的 β -胡萝卜素含量逐渐降低, 碘酸钾质量浓度为 1.0 g/L 时, β -胡萝卜素含量为对照的 96.8%。

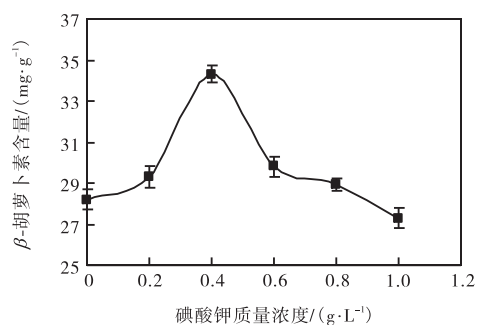


图2 碘酸钾对杜氏盐藻 β -胡萝卜素含量的影响

Fig. 2 Effect of potassium iodate on beta-carotene content in *dunaliella salina*

2.3 碘酸钾对杜氏盐藻体内维生素 E 含量的影响

由图 3 可见: 随着碘酸钾质量浓度的升高, 杜氏盐藻体内的维生素 E 含量逐渐增高, 碘酸钾质量浓度为 0.4 g/L 时达到最大值, 为对照的 126.7%。此后随着碘酸钾质量浓度的增高, 藻体内的维生素 E 含量反而降低, 当碘酸钾质量浓度为 1.0 g/L 时, 藻体内的维生素 E 含量降为对照的 94.7%。

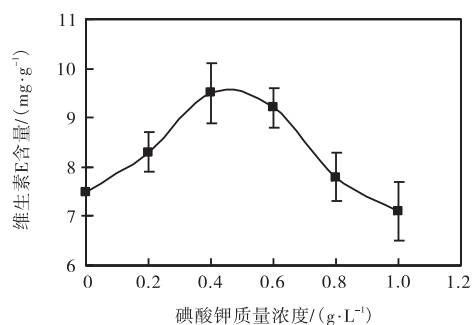


图3 碘酸钾对杜氏盐藻维生素 E 含量的影响

Fig. 3 Effect of potassium iodate on vitamin E content in *dunaliella salina*

2.4 碘酸钾对杜氏盐藻提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 的影响

以上结果表明, 培养液中碘酸钾质量浓度直接影响着杜氏盐藻体内抗氧化剂的含量, 其中刺激作用较大的碘酸钾质量浓度为 0.4 g/L 和 4.0 g/L。为了进一步验证上述结论, 检测不同碘酸钾质量浓度下杜氏盐藻提取液清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 能力的变化。核黄素在光照下可以产生 $O_2^{\cdot-}$ 。杜氏盐藻藻粉提取液(50%乙醇提取液)能部分清除反应体系中核黄素产生的 $O_2^{\cdot-}$, 清除

率为 35.6%(图 4)。杜氏盐藻培养在含碘酸钾的溶液中, 其提取液清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力提高了。碘酸钾质量浓度在 0~1 g/L 时, 藻体清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力与体内 β -胡萝卜素和维生素 E 含量的变化趋势一致, 碘酸钾质量浓度为 0.4 g/L 时, 清除率最大, 达到 59.8%(图 4); 碘酸钾质量浓度在 1~5 g/L 时, 藻体清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力与体内黄酮含量的变化趋势一致, 碘酸钾质量浓度为 4.0 g/L 时, 清除率最大, 达到 52.9%(图 4)。观测碘酸钾对杜氏盐藻提取物清除 $\cdot OH$ 的影响时得到了类似的结果(图 5)。

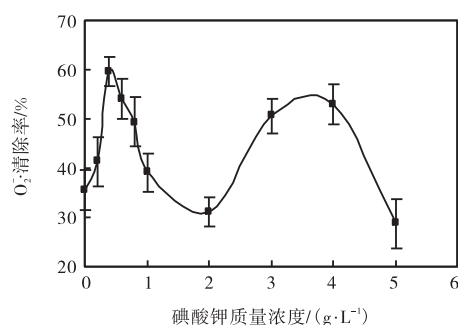


图4 碘酸钾对杜氏盐藻提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力的影响

Fig. 4 Effect of potassium iodate on the $O_2^{\cdot-}$ free radical scavenging capacity of *dunaliella salina* extract

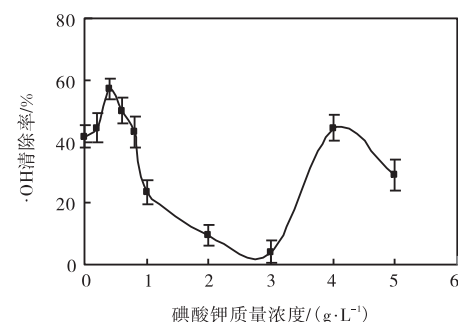


图5 碘酸钾对杜氏盐藻提取物清除 $\cdot OH$ 能力的影响

Fig. 5 Effect of potassium iodate on the $\cdot OH$ free radical scavenging capacity of *dunaliella salina* extract

3 讨论与分析

已知杜氏盐藻是一种重要的海洋药用植物, 含有丰富的 β -胡萝卜素、黄酮、甘油、维生素 E、亚麻酸、硒、叶酸、多糖等生理活性物质, 具有提高人体免疫力、清除自由基、防治癌症、心血管、老年性痴呆和白内障等疾病的功能^[2-3]。为了进一步提高杜氏盐藻的药用价值, 本文以碘酸钾为诱导剂, 研究了其对杜氏盐藻抗氧化能力的影响。结果表明, 0.4 g/L 的碘酸钾能明显提高杜氏盐藻中 β -胡萝卜素和维生素 E 的含

量(图2、图3),4.0 g/L的碘酸钾明显提高了杜氏盐藻中黄酮的含量(图1)。表明培养液中的碘酸钾能提高杜氏盐藻体内抗氧化物质的含量。体外实验也表明碘酸钾增强了杜氏盐藻提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力(图4、图5)。

自由基是存在于生物体内的一把双刃剑,在正常浓度范围内,它是机体的一种功能物质,维持着生命活动的正常进行。但当浓度较高时,则对机体有严重的损伤作用,最终导致各种疾病^[9]。随着年龄的增大,人体自身清除活性氧自由基的能力降低,体内活性氧的含量逐渐增高。因此,只有借助外来抗氧化物质的帮助,才能维持体内自由基的相对平衡^[10]。碘酸钾提高了杜氏盐藻体内抗氧化物质的含量,说明碘酸钾能增加杜氏盐藻的药用价值。

中药材的有效成分常常是一些次生代谢产物,后者是衡量药材品质的一个重要指标。因此设法提高次生代谢产物的含量是中药材研究及生产者追求的目标。除基因工程手段外,改变生存环境也是诱导药用植物次生代谢产物累积的重要措施^[11-12]。碘酸钾是一种氧化剂,当植物遭受由它引起的氧化胁迫时,植物体内的一些抗氧化保护系统被诱导,进而产生较多的抗氧化物质来对抗这种氧化胁迫。这可能是外源碘酸钾提高杜氏盐藻黄酮、 β -胡萝卜素、维生素E含量的原因所在。

参考文献:

[1] 张俊杰,郭连城,崔志强,等. 盐藻工厂化养殖技术与

产品开发(一)[J]. 盐业与化工,2009,38(6):35-38.

[2] 索全伶,李淑清,杨伟,等. 内蒙古吉兰泰杜氏盐藻营养成分的研究[J]. 营养学报,2000,22(4):345-346.

[3] 伍先绍,贺稚非,龚霄. 杜氏盐藻及其在功能食品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2008(2):127-130.

[4] 张建华,张忠兵,乌云. 胡萝卜中 β -胡萝卜素测定的方法[J]. 内蒙古农业大学学报,2010,21(1):121-124.

[5] 黎戡,凌伟忠,叶勇,等. 可见光及紫外光分光光度法测定丁香总黄酮含量的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):271-272.

[6] 刘树恒. 间接分光光度法测定药物中的维生素E[J]. 光谱实验室,2010,27(5):1890-1892.

[7] 庞战军,周玫,陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:16,32.

[8] 徐仰仓. 罗布麻、绿茶及其配伍对活性氧清除能力的比较[J]. 中草药,2007,38(7):1028-1030.

[9] Brimfield A A, Soni S D, Trimmer K A, et al. Metabolic activation of sulfur mustard leads to free radical formation[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 52(4):811-817.

[10] Takashima M, Horie M, Shichire M, et al. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 52(7):1242-1252.

[11] 徐仰仓,李飞飞,徐金. 臭氧对药用植物活性物质含量的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(12):2829-2830.

[12] 徐仰仓,徐金,李飞飞,等. H_2O_2 对药用植物活性成分含量的影响[J]. 四川中医,2011,29(9):43-45.

责任编辑:郎婧