

#### 1.3.1.3 黄腐酸的免疫调节作用研究

许多研究报道显示,腐植酸类物质能够起到免疫调节剂的作用。温元祥等人<sup>[39]</sup>采用黄腐酸钠对烧伤小鼠免疫功能的影响进行研究,发现黄腐酸钠可明显提高 T 淋巴细胞转化、产生 IL-2 和 IL-2。薄芯等人<sup>[40]</sup>对比研究了矿源黄腐酸和生化黄腐酸对动物免疫系统的影响,研究结果显示,生化黄腐酸在免疫各阶段均有促进作用,而矿源黄腐酸的作用不确定,随试验条件不同而表现为促进或抑制作用。薄芯等人认为,生化黄腐酸是在人工控制条件下生产的,生产中未经高温高压和强酸强碱处理,其特点是缩合程度低、分子小、溶解性好、携带更多官能团,同时生化黄腐酸中还有大量多种对生物体有益的成分(多肽多糖氨基酸核酸和微量元素等),这些特点综合决定了生化黄腐酸对免疫系统影响更明显。

#### 1.3.1.4 黄腐酸的抗菌作用研究

从目前已有的研究中可看出,黄腐酸对多种细菌具有较强的抑菌能力,其作用机理可能是通过金属离子螯合作用而起到抑菌效果的。高金岗等人<sup>[41]</sup>通过江西萍乡生化黄腐酸研究了其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌和苏云金杆菌的抑菌作用,并与苯酚,高锰酸钾,乙酰螺旋霉素和头孢拉定的对这四种菌的抑菌作用进行对比。实验结果表明,生化黄腐酸对上述 4 种菌的生长均有抑制作用,但抑制效果比四种阳性对照药差。作者认为这可能是由于生化黄腐酸的分子较大,难以穿透进入细菌内环境,降低了生化黄腐酸的抑菌作用。

#### 1.3.1.5 黄腐酸对糖尿病并发症的治疗作用研究

黄腐酸在一定程度上对糖尿病及其并发症(如肾脏病变、视网膜病变、末梢神经炎等)具有治疗或改善作用。

毕艳艳等人<sup>[42]</sup>研究了云南年青褐煤黄腐酸钠、新疆“旱地龙”黄腐酸钠和新疆“双龙”黄腐酸钠对四氧嘧啶性糖尿病小鼠的降糖作用和机制进行了研究。实验结果说明,各剂量不同黄腐酸钠样品均能降低血糖、甘油三酯和总胆固醇的含量。刘元涛等人<sup>[43]</sup>研究了黄腐酸钠对糖尿病性肾脏的保护作用和机制。实验结果显示黄腐酸钠对血糖控制影响不明显,但其能明显降低 t-PA 活性和尿白蛋白含量,升高 P AI-1 活性,抑制肾小球肿大。得出结论为:黄腐酸钠对糖尿病性肾小球病变具有一定程度保护作用,可延缓糖尿病肾病的发生。袁明霞等人<sup>[44]</sup>

研究了黄腐酸钠对糖尿病大鼠视网膜的两个层面：形态学和功能学。通过这两个不同层面的疗效对作用机制进行了探讨。给予黄腐酸钠的糖尿病组大鼠的视网膜组织较模型组，无论是光镜下还是超微结构变化都有明显改善，但未能回复到正常组水平，这说明黄腐酸钠对糖尿病视网膜病变只能起到抑制作用，与预防糖尿病视网膜病变的发生无关。

#### 1.3.1.6 总结

黄腐酸分子内含有酚羟基、羟基、羧基、羰基和醌基等多种活性基团，具有如消炎、抗病毒、调节免疫系统、抗菌、治疗糖尿病并发症等多种治疗作用，关于黄腐酸在医学上的应用前景十分广阔。

由于腐殖物质结构和成分复杂，不同来源，不同的萃取分离使产品成分不完全相同，从而增加了医学研究的复杂性和难度的应用，使不同研究者可能得出完全一样的结论。目前，黄腐酸对各种治疗作用的究都停留在表面，对机理的研究相对较少，导致作用机制不明确。对黄腐酸的安全性评价也不够充分，不能得出非常确定的结论，因此将腐植酸类物质应用于医学领域还需要很长的研究周期。产地、提取纯化方法、黄腐酸的定义以及分子量大小，这些关键词的不确定在很大程度上抑制了腐黄腐酸在医学上的开发应用。所以，要想更好地将黄腐酸应用于在医学上，就需要解决如下：(1)标准化问题。腐植酸类物质的来源、分离提取工艺、纯化方法都应采用标准控制，至少相同性质的煤炭应实行同一标准，以确保实验中所用黄腐酸成分一致，不会差异太大；(2)黄腐酸对疾病的治疗作用机制。为了弄清楚黄腐酸的作用机制，还需要开展更多深入的研究。只有清楚了其机制，才能找到最主要活性成分，通过各种物理化学方法分离提取有效成分，达到除杂，减毒，增效的作用；(3)黄腐酸的安全性，这一点是所有研究的基础。要想黄腐酸在医学应用中起到更重要的作用，首先要解决好这个问题。因此，要进行更广泛地安全性研究和评价，特别是涉及长期毒性的研究和评价。

#### 1.3.2 本课题的研究目标与意义

黄腐酸具有很多药理作用，对这些作用的研究报道层出不穷，但是目前对黄腐酸的作用研究都只停留在表面现象，只是明确黄腐酸具有什么样的作用，但没有深入到机理层面，不明确为什么具有这样的作用。自由基学说是黄腐酸作用机制之一，本文从分子水平研究了黄腐酸对自由基的作用，通过黄腐酸在体外对两

种常见含氧自由基和一种含氮自由基的清除作用,探讨黄腐酸与不同自由基作用之间的影响因素,作用差异。为了进一步研究黄腐酸的作用机制,本文从整体水平对其进行了研究。建立酒精性肝损伤模型,探讨黄腐酸在生物体内的作用效果,比较研究不同来源、剂量对作用效果的影响。线粒体是人体能量的供应者,在功能过程中可产生大量自由基。本文采用线粒体肿胀模型,考察黄腐酸对线粒体肿胀的抑制作用,初步探讨了黄腐酸对线粒体氧化损伤可能的保护机制。

黄腐酸被认为是大骨节病的诱因之一。有研究表明,在大骨节病病区的水体和土壤中黄腐酸含量增高,可产生自由基,导致氧化应激反应,从而损伤关节软骨及软骨细胞,导致大骨节病。这与黄腐酸自由基机制相矛盾。这两种不同的观点将严重影响云南年轻褐煤氧化降解产物黄腐酸在医药方面的应用,因此,探明云南年青褐煤黄腐酸对自由基的作用具有重大意义的。

### 1.3.3 本课题的研究内容与技术路线

- (1) 医药用黄腐酸及其分级产物的制备
- (2) 黄腐酸对 DPPH 自由基的清除作用研究
- (3) 黄腐酸对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除作用研究
- (4) 黄腐酸对小鼠酒精性肝损伤保护作用的研究
- (5) 黄腐酸对线粒体作用的初探

具体的研究技术路线示意图表示如下:

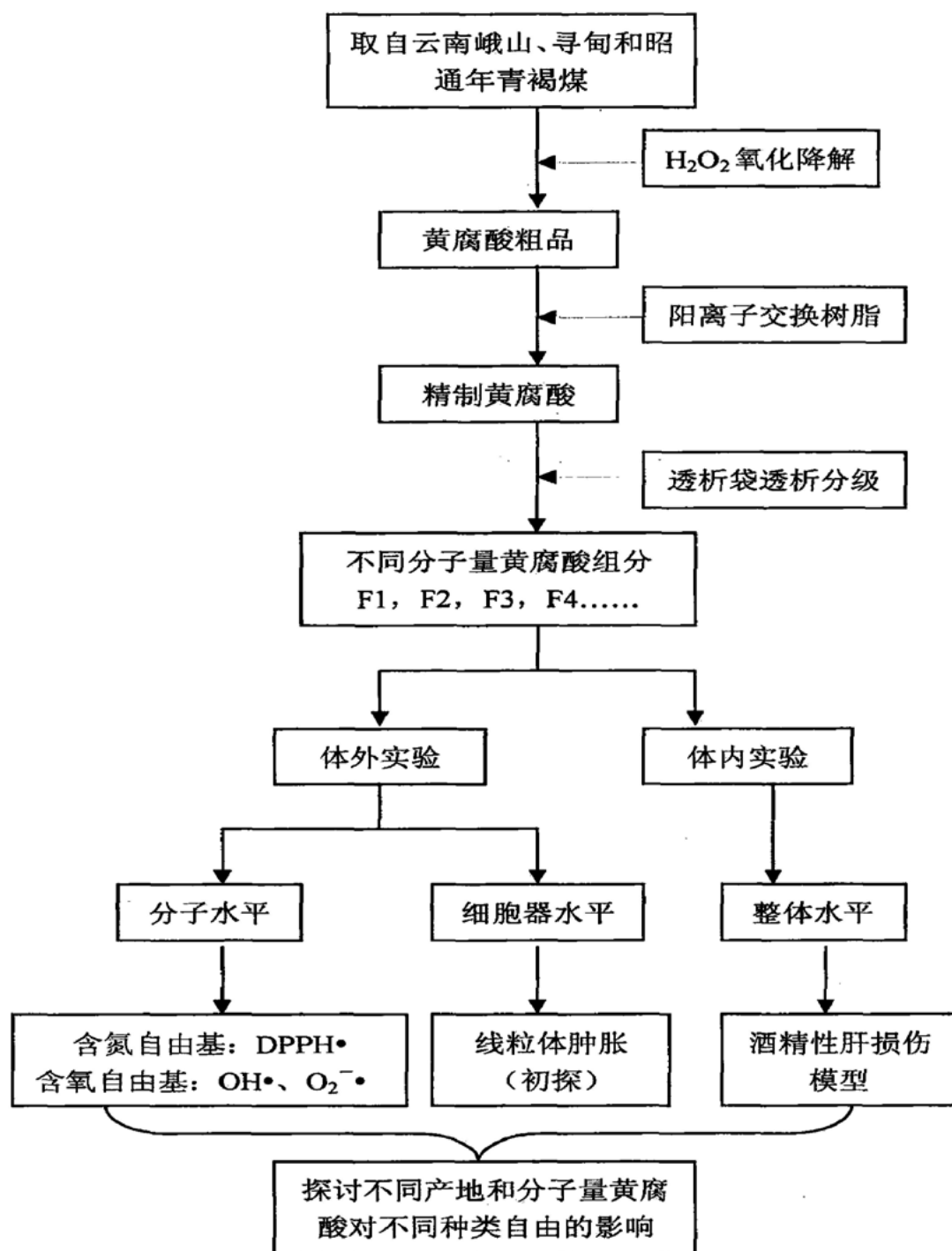


图 1.1 主要研究技术路线示意图

Fig 1.1 the mainly line of research technique

## 第二章 医药用黄腐酸及其分级产物的制备

### 2.1 褐煤资源介绍<sup>[45]</sup>

褐煤形成于成煤过程中的第二阶段前期,有一定的层理状构造,肉眼观察其颜色呈现浅褐色至深褐色。褐煤的特点是碳含量较高,水分较少,基本不包含未分解的植物残体。木煤、柴煤等这些极其年青褐煤中仍会保留有原始植物的年轮、心线等外形结构,或者是含有一定含量的褐煤蜡(也称沥青物质)。全国各地褐煤中 HA 的含量差异较大,低至 1%,高达 85%,HA 含量和褐煤煤化程度之间并无明显相关性联系。

#### 2.1.1 褐煤分布

据 20 世纪末的统计结果和全国第三次煤炭资源预测结果表明,我国褐煤资源已探明褐煤保有储量约 1300 亿吨,另有褐煤预测资源量约 1903 亿吨,分别占全国煤炭总储量的 13%,占全国煤炭预测资源量总量的 41.8%。按地区划分,我国褐煤储量最多的是内蒙古东北部地区,约占全国褐煤保有储量的 75%;其次是西南地区的云南省,褐煤储量约占全国的 20%;东北、华东和中南地区的褐煤仅占 5%左右。

我国褐煤按成煤时期划分,主要分为形成于中生代的晚侏罗纪时期和新生代第三纪。其中前者主要分布于扎赉诺尔、霍林河、伊敏河、大雁等位于内蒙古的东部与东北三省相连的东三盟地区煤田,约为全国褐煤储量的 80%左右;后者主要分布地区在云南省境内昭通、小龙潭和先锋等褐煤煤田,约占全国褐煤的 20%;其他地区(如内蒙古西部)的早、中侏罗纪褐煤的资源 and 产量均极少。

#### 2.1.2 褐煤的煤质特征

褐煤的煤质特征与成煤时代密切关联。

(1) 水分(Mt)差异。侏罗纪褐煤的水分最低,如云南可保褐煤的全水分平均高达 46.6%,昭通褐煤的水分可达 50%以上;晚第三纪褐煤的水分最高,如内蒙古霍林河矿区的晚侏罗世褐煤的水分为 32.2%。

(2) 平均灰分差异。统计结果表明全国褐煤平均灰分(Ad)为 21.90%，其中平均灰分最低的是早、中侏罗世褐煤，平均灰分仅为 10.55%，平均灰分最高的是早第三纪褐煤，高达 23.26 %，是前者的两倍以上。

(3) 褐煤蜡差异更大。侏罗纪褐煤的蜡含量较低，约在 0.2%~1.0%；晚第三纪地区褐煤的蜡含量平均高达 5%以上，其中云南濠浒和寻甸的蜡含量更高达 8%~9%。早第三纪褐煤的蜡含量则介于两者之间，如舒兰矿区的蜡含量在 2.5%~5.5%。

(4) 挥发分差异。经统计结果表明，全国褐煤的平均挥发分(Vdaf) 为 45.21%，其中晚第三纪褐煤是成煤时代越迟的褐煤，挥发分最高，平均高达 55.92%；早、中侏罗世褐煤成煤时代最早，挥发分最低，为 38.60%。

(5) 纯煤发热量 ( $Q_{gr,daf}$ ) 差异。全国褐煤的平均发热量为 28171 MJ/kg，其中早、中侏罗世褐煤最高，为 28154MJ/kg；晚第三纪褐煤的则最低，为 27124MJ/kg。

### 2.1.3 褐煤的开发利用

云南省 80%的地区都有褐煤，而且褐煤中腐植酸含量高，故云南可称得上是“腐植酸王国”。充分合理利用褐煤这种宝贵资源，是值得有关部门深入探讨研究的问题。目前我国褐煤资源的开发和利用主要集中在三个方面：一是褐煤洗选加工；二是褐煤火力发电；三是褐煤综合利用<sup>[46]</sup>。

## 2.2 黄腐酸的提取分离

很多煤炭 HA 原料中 HA 含量并不多，超过 70%的更是凤毛麟角。为了充分利用煤炭资源，进一步提高原料煤的利用率和腐植酸生产效益，人们尝试通过各种粗加工途径提高原料煤中的 HA 含量。目前国内外关于腐植酸原料煤炭提质和再生的方法主要包括四种：机械活化、物理分离、化学氧化和生物降解。

其中提高原料煤中 HA 含量的主要化学方法是人工氧化降解，通常作为工业生产所用的廉价氧化剂主要是空气( $O_2$ )和硝酸。硝酸氧化降解处理低级别煤化工中存在有两点制约因素：一是硝酸来源和价格，高昂的价格和稀少的来源使得不是所有地方都能采用这样方法，只在有条件的地方才适于采用。二是硝酸反应产生的尾气，主要是 NO 和  $NO_2$ ，这两种尾气的吸收处理是环保过程中不可忽视

的重要环节<sup>[47]</sup>。

本课题组采用的是一种本实验室已然成熟的黄腐酸的生产方法— $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化降解法<sup>[48]</sup>。此阶段实验是和同课题组成员杨静同学共同完成。

### 2.2.1 实验材料和试剂

褐煤原料：采自云南省峨山、寻甸和昭通三地的年青褐煤；

30%的过氧化氢：分析纯，实验时需稀释到所需浓度；

BPZ-6033 真空干燥箱：上海一恒科学仪器有限公司；

ZN-400A 型高速粉碎机：长沙市岳麓区中南制药机械厂；

低速大容量多管离心机：上海安亭科学仪器厂；

EYELA 旋转蒸发仪：上海爱朗仪器有限公司；

FA-1A-50 冷冻干燥机：上海比朗仪器有限公司。

### 2.2.2 提取分离方法

各地黄腐酸的制备简述如下：

取峨山(ES)、寻甸(XD)和昭通(ZT)三地年青褐煤原煤，放入烘箱中经过一定程度干燥处理后再用粉碎机破碎处理，接着用 80 目筛网筛选较小颗粒煤粉。

称取一定量过筛后煤粉放入反应容器中，反应容器置于预先加热至一定温度的水域中，少量多次加入一定浓度一定量的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液，并不断搅拌直至反应完成。

反应完成后将溶液取出，离心分离，弃沉淀保留上清液。上清液经抽滤，滤液在旋转蒸发仪中浓缩到一定程度后进行冷冻干燥，即得峨山、寻甸和昭通三地水溶性黄腐酸粗品固体。

## 2.3 黄腐酸的精制

黄腐酸的提取方法很多，但采用各种方法得到的黄腐酸均含有一定的杂质，粗品黄腐酸的纯化过程主要是脱除这些杂质。除杂方法主要有三种：

- (1) 物理絮凝；
- (2) 化学法；
- (3) 黄腐酸与无机盐的分离和精制<sup>[47]</sup>。

本实验采用阳离子交换树脂进行纯化<sup>[49]</sup>。此阶段实验是和同课题组成员杨静同学共同完成。

### 2.3.1 实验材料和试剂

峨山、寻甸和昭通粗品黄腐酸：实验室自制；

001×7 型阳离子交换树脂：上海青析化工有限公司；

盐酸：分析纯；

氢氧化钠：分析纯；

乙醇：分析纯；

EYELA 旋转蒸发仪，上海爱朗仪器有限公司；

FA-1A-50 冷冻干燥机：上海比朗仪器有限公司。

### 2.3.2 精制过程

粗品 FA 的预处理：将粗品 FA 溶于一定量的去离子水中，调节 pH 至 5.0 左右，使其充分溶解。在冰箱中静置 12 小时，然后再离心除去其中不溶性腐植酸成分。

离子交换剂的制备：用一定体积的无水乙醇和一定体积 6mol/L 的盐酸浸泡树脂 24 小时；将浸泡后的树脂装柱，然后用 5% 的盐酸冲洗柱子直至无  $\text{Fe}^{3+}$ ，用去离子水冲洗到无  $\text{Cl}^-$ ，最后用两倍柱体积去离子水冲洗，即得到 001×7 $\text{H}^+$  型阳离子交换树脂。

黄腐酸的纯化处理：用 001×7 $\text{H}^+$  型阳离子交换树脂处理粗品 FA 溶液，循环上样 3-4h，收集过柱后液体，旋蒸浓缩至一定浓度，然后进行冷冻干燥，即得三地黄腐酸精制固体，分别命名为峨山精制黄腐酸（ESFA）、寻甸精制黄腐酸（XDFA）和昭通精制黄腐酸（ZTFA）。

树脂的再生处理：树脂用一定量 3mol/L 的盐酸浸泡 12 小时，随后以 5% 的盐酸冲洗直至无  $\text{Fe}^{3+}$ ，随后用去离子水冲洗到无  $\text{Cl}^-$ ，再用两倍柱体积去离子水冲洗。将再生后树脂保存放好，备用。

纯化得到的 ESFA、XDFA 和 ZTFA 经高级实验师张惠芬老师进行化学分析后，显示合格，可作为医药研究用。

## 2.4 黄腐酸的分级

腐植酸类物质是一种组成结构极其复杂的多分散体系，其分子尺寸范围极大，黄腐酸虽然是腐植酸中分子量最小的组分，但其分子量相对于普遍单体化合物而言还是非常之大，这给黄腐酸的实际应用和基础化学研究带来了很大麻烦。因此，研究者们一直致力于 HS 的分级，希望能把它们尽量分成组成结构相对较窄的“极分”。到目前为止黄腐酸的分级已有不少比较成功的方法，其主要分级的机制有以下四种<sup>[47]</sup>：

- (1) 基于酸碱度、溶解和沉淀分级；
- (2) 基于分子尺寸的分级；
- (3) 基于电荷特性的分级；
- (4) 基于吸附特性的分级。

本实验采用的分级方法是透析袋分级<sup>[50]</sup>，其原理是基于分子尺寸不同。

### 2.4.1 实验材料和仪器

原料：峨山、寻甸和昭通三地精制黄腐酸；

器旋转蒸发仪：上海爱朗仪器有限公司；

冷冻干燥机：上海比朗仪器有限公司；

数显恒温磁力搅拌器：金坛市大地自动化仪器厂；

透析袋 MD34(7000)：美国联合碳化；

透析袋 MD34(3500)：美国联合碳化；

透析袋 MD31(500-1000)：美国光谱医学。

### 2.4.2 分级方法

采用不同相对分子质量的透析袋(500-1000,3500,7000)对精制黄腐酸进行分级。装置及原理见图 2.1。

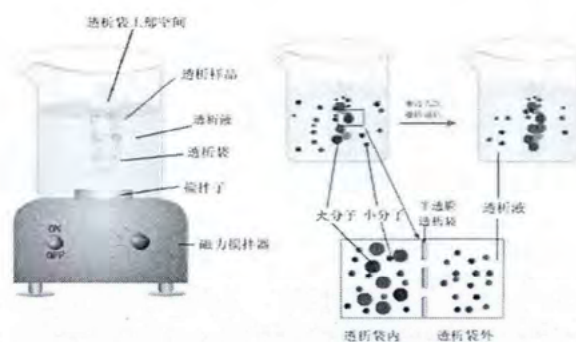


图 2.1 透析装置及过程示意图

Fig 2.1 Schematic of dialysis devices and processes

取精制黄腐酸适量溶于纯水，使浓度为 0.1g/ml。将透析袋剪成 15cm 左右长度备用，用前检漏，加入透析袋内溶液体积应控制在 1/3~1/2 体积，以免透析袋胀破。

每次透析 12h 后换液，透析 3 次。将 3 次袋外透析液合并、旋蒸浓缩、冷冻干燥，最终得到相对分子质量小于 7000 极分(分别命名为 ES7K, XD7K 和 ZT7K)，相对分子质量小于 3500 极分(分别命名为 ES3.5K, XD3.5K 和 ZT3.5K)，相对分子质量小于 1000 极分(分别命名为 ES1K, XD1K 和 ZT1K)，以及相对分子质量为 1000~3500 极分（分别命名为 ES1~3.5K, XD1~3.5K 和 ZT1~3.5K）。

以上透析所得样品经高级实验师张惠芬老师进行化学分析后，显示合格，可作为医药研究用。

## 2.5 小结

众所周知，黄腐酸的结构非常复杂，直到目前为止，其具体结构还未确定，这给黄腐酸的作用和机理研究均带来了不便。不同结构黄腐酸的性质与其产地、成煤年代、提取纯化方法和分子量等都有很大的联系，由于目前黄腐酸没有生产鉴定标准，导致目前研究中的黄腐酸结构性性质各异，实验结果重现性很低。

本研究采用特定地区云南峨山、寻甸和昭通的年青褐煤，全部采用过氧化氢氧化降解法提取分离黄腐酸，并对其进行阳离子交换树脂纯化，使达到医药研究级别。这些样品制备中的特定手段可以保证实验的重现性。

### 第三章 黄腐酸对 DPPH 自由基的清除作用研究

DPPH• (二苯代苦味酰基自由基)是一种含氮自由基,在醇溶液中呈现紫色,可稳定存在,最大吸收位于 517 nm 处。当体系中存在抗氧化剂时,溶液中紫色退去,故可通过测定溶液的吸光度变化来评价抗氧化剂清除 DPPH•的能力。

DPPH 法可同时对物质进行动力学和静力学研究,动力学方法检测的是样品减少 DPPH•的速率;静力学方法检测的是样品可以清除 DPPH•的量。

本研究采用微孔板定量法(microplate quantification, MQ)<sup>[51]</sup>研究了不同黄腐酸样品对 DPPH 自由基的清除作用。微孔板定量法是在传统 DPPH 法的基础上进行改良,将测量仪器换成酶标仪,将反应皿换成 96 孔微孔板的一种可高效筛选抗氧化剂的方法。

#### 3.1 实验材料和试剂

UV-2550PC 紫外-可见光分光光度计:日本岛津公司

酶标仪: Molecular Devicies 公司;

96 孔板: 美国 Costar;

移液枪: 芬兰百得;

DPPH: Sigma 公司;

无水乙醇: 西陇化工股份有限公司;

峨山、寻甸和昭通精制黄腐酸及其分级产物: 本实验室自制。

#### 3.2 实验方法

##### 3.2.1 光谱扫描

采用紫外可见光全波长扫描,对反应加入的 DPPH 储备液和加入黄腐酸的 DPPH 溶液进行吸收峰特性测定。

##### 3.2.2 微孔板定量法测定黄腐酸对 DPPH•的清除作用研究<sup>[52,53]</sup>

DPPH• (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-二苯代苦味酰基苯肼自由基)是一种比较稳定的自由基,在乙醇溶剂中呈现蓝紫色,在 517nm 波长处有较大吸

收。DPPH 结构中含有 3 个苯环, 1 个含有 1 个孤对电子的氮原子。当溶液中有氢供体或供电体存在时, DPPH 不再是自由基状态, 溶液颜色将变浅, 通过分光光计测定溶液吸光度的变化即可评价此氢供体或供电体对 DPPH•的清除率, 即抗氧化活性的大小。

### 3.2.2.1 样品处理及测定

#### (1) 黄腐酸溶液的配制:

精确称取各黄腐酸固体, 用纯水配置成浓度为 0.4 mg/ml、0.6 mg/ml、0.8 mg/ml、1.0 mg/ml、1.5 mg/ml、2.0mg/ml 备用。

#### (2) DPPH•储备液的配制:

准确称取 10mg DPPH 固体, 用无水乙醇溶解并定容于 100ml 棕色容量瓶配置成浓度为 100ug/ml 的 DPPH•溶液。避光保存。

#### (3) 样品反应体系:

移液枪吸取 50ul 黄腐酸溶液与 150ul DPPH•溶液在 96 孔板中反应, 为减小差异, 加样时应用多通道移液枪加样。采用酶标仪于 490nm 处进行吸光值(A) 测定, 每隔 10min 测一次, 共测 90min。根据以下公式计算清除率。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} / \% = (1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}) \times 100 \quad \cdots (\text{公式 3.1})$$

其中:

$A_{\text{样品}}$ 是指加入样品液后的 DPPH 溶液在测定波长 490nm 处的吸光值;

$A_{\text{对照}}$ 是指样品液与相同体积无水乙醇混合时在测定波长 490nm 处的吸光值;

$A_{\text{空白}}$ 是指未加入样品液的 DPPH 溶液在测定波长 490nm 处的吸光值。

### 3.2.2.2 IC<sub>50</sub> 的测定

IC<sub>50</sub> 定义: 体系中 DPPH•清除率为 50%时所需抗氧化剂的浓度, 其测定值根据不同浓度抗氧化剂的清除率作曲线, 求出相应回归方程得出。

### 3.2.2.3 抗总氧化能力值

抗总氧化能力值 (total antioxidative capacity, TAC): 利用回归方程求得清除率为 50%时所需样品浓度为 IC<sub>50</sub>, 及此时样品所对应清除的 DPPH 量 (为 DPPH

浓度\*加入体积\*50%), TAC 计算公式如下:

$$\text{TAC (每毫克黄腐酸样品清除 } \mu\text{g DPPH 量)} = \text{IC}_{50} \text{ 对应清除的 DPPH 量} / (\text{IC}_{50} * \text{体积})$$

#### 3.2.2.4 动力学曲线

以时间 T 为横坐标, TAC 为纵坐标, 绘制动力学曲线。

### 3.3 结果与分析

#### 3.3.1 DPPH•的吸收峰特性

全波长扫描结果如图 3.1, 红色为加入黄腐酸后 DPPH 溶液的吸光度, 黑色为未加黄腐酸的 DPPH 溶液吸光度。由图中可以看出, DPPH•在 328nm 和 517nm 处有最大吸收, 但加样后 517nm 处溶液的吸差最大, 这与相关报道一致<sup>[52,54,55]</sup>。但由于使用的酶标仪没有 517nm 对应的滤光片, 故采用与之接近的 490nm。

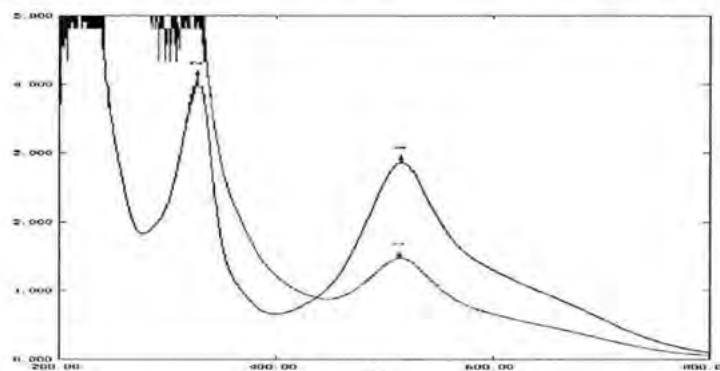


图 3.1 全波长扫描图谱。

Fig 3.1 The result of scanning wavelength by Spectrophotometer.

#### 3.3.2 三地精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH•清除作用的影响

##### 3.3.2.1 三地精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH•的清除率

根据 3.2.2 的实验方法, 以最佳加样比例在 96 孔板中加入黄腐酸和 DPPH 溶液, 反应 90min, 测定吸光度, 并计算各时间点不同浓度样品的清除率, 各黄腐酸对 DPPH•的清除率结果见图 3.2, 3.3 和 3.4。由图可知, 15 个样品均对 DPPH•具有清除作用, 且清除率随着时间和浓度的增加而增大。

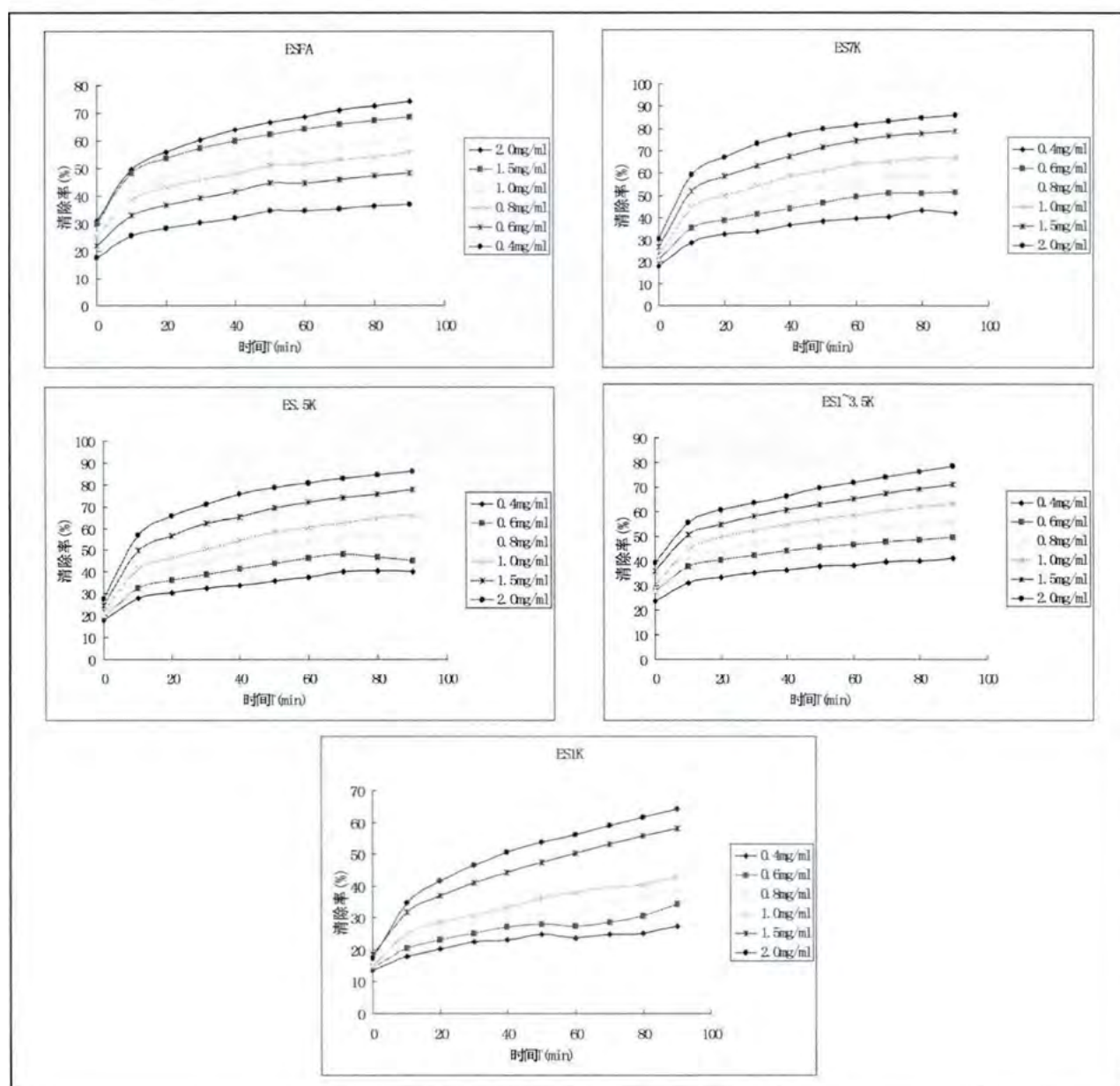


图 3.2 峨山精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH• 的清除率

Fig 3.2 The scavenger rate of fulvic acid and its fractions to DPPH• in Eshan

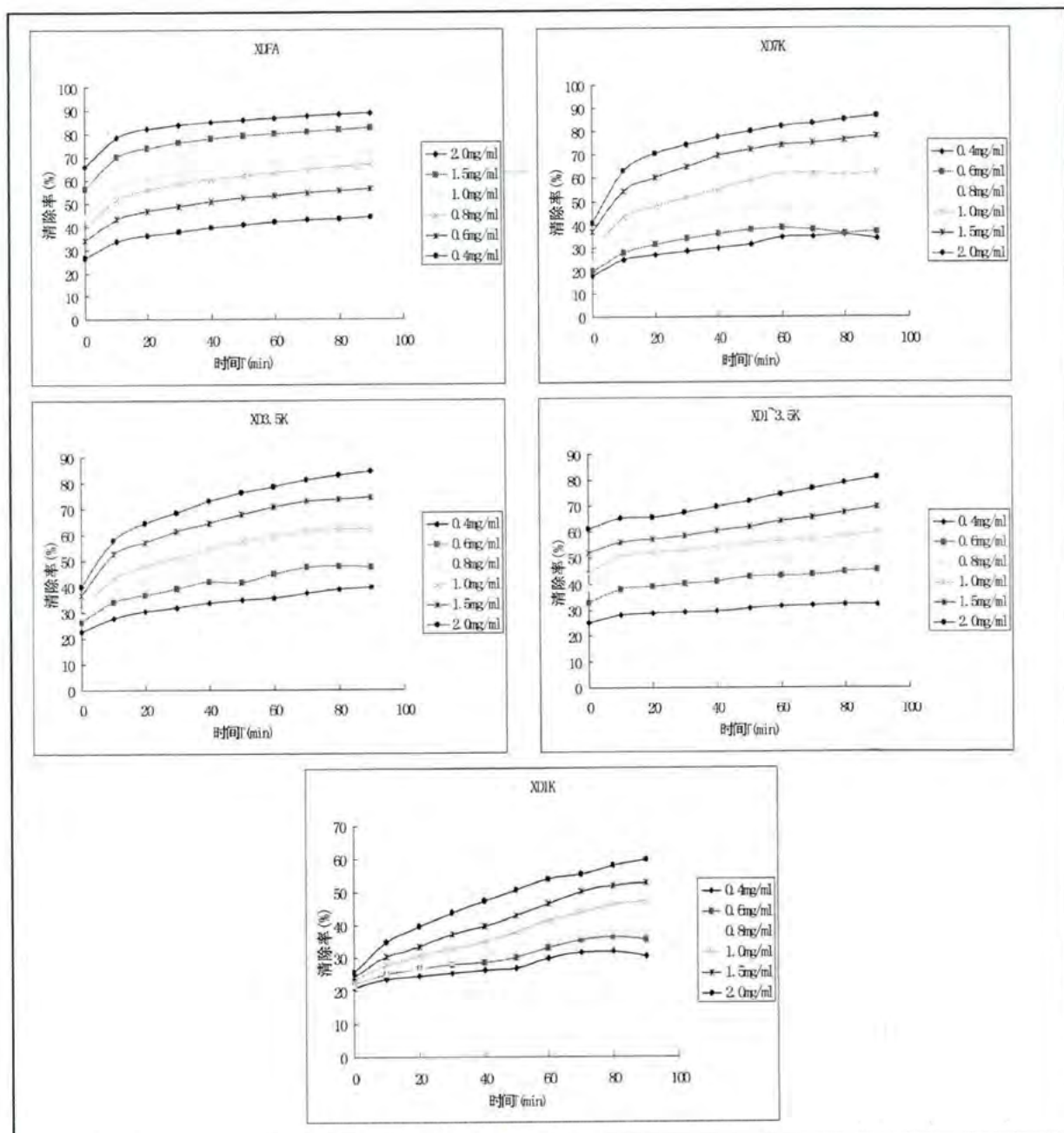


图 3.3 寻甸精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH• 的清除率

Fig 3.3 The scavenger rate of fulvic acid and its fractions to DPPH• in Xundian

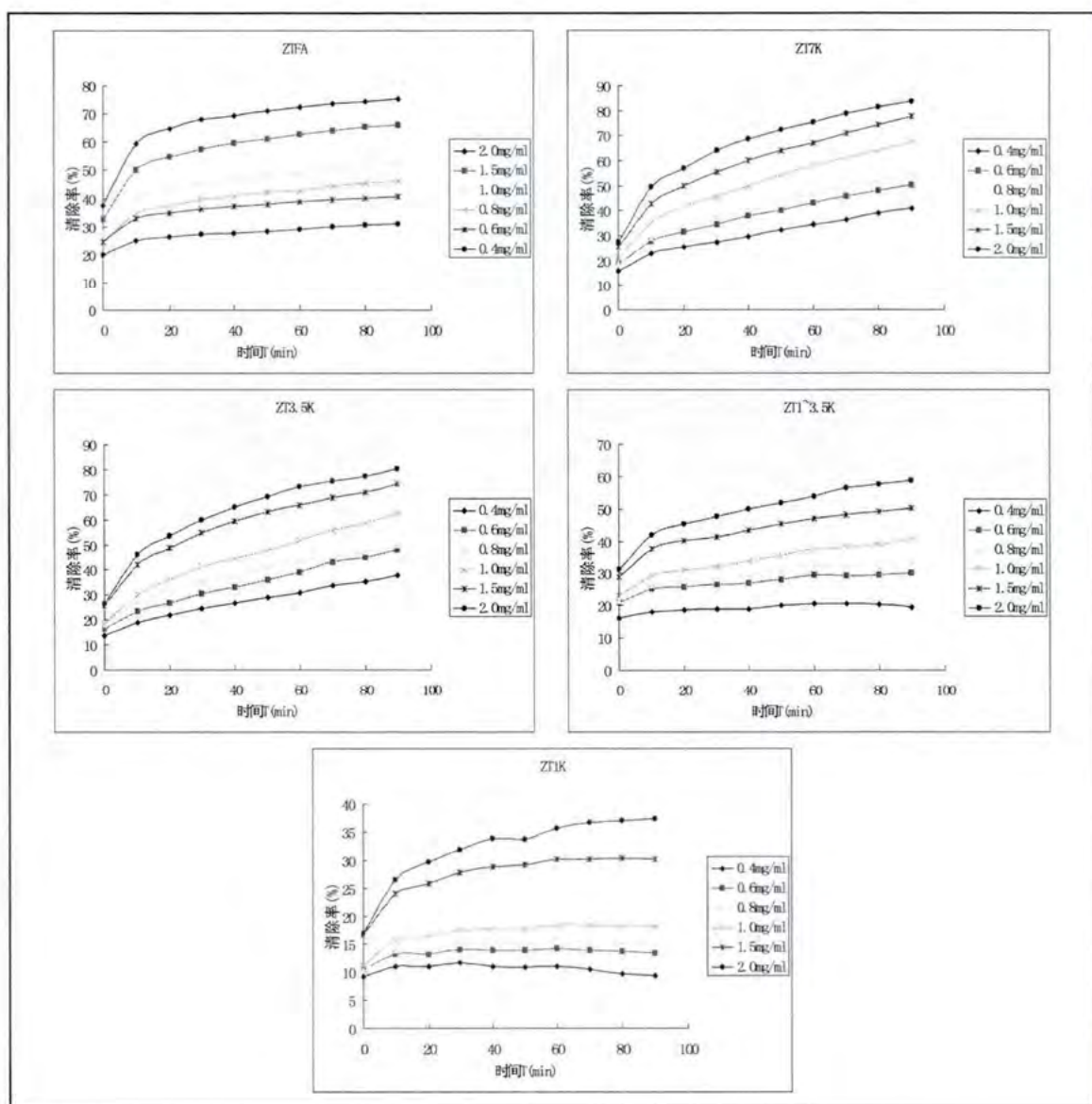


图 3.4 昭通精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH• 的清除率

Fig 3.4 The scavenger rate of fulvic acid and its fractions to DPPH• in Zhaotong

其中, 各样品在  $T=90\text{min}$ ,  $C=2.0\text{mg/ml}$  时的最大清除率见表 3.1。从表 3.1 可知, 不同产地黄腐酸中清除率最小的都是分子量小于 1000 极分 (ES1K、XD1K 和 ZT1K)。峨山 5 个样品中清除率最大的是 ES3.5K, 寻甸 5 个样品中清除率最大的是 XDFA, 昭通 5 个样品中清除率最大的是 ZT7K, 与分子量之间并没有明显关联。

同一产地样品中, 分子量小于 7000 和 3500 的样品最大清除率相差无几, 这

可以用各极分在总黄腐酸中所占组成比例来解释。提取样品时发现, 分子量在 3500~7000 之间的样品极少, 因此可以认为 ES7K 和 ES3.5K 大致上是一样的物质。寻甸样品清除率随分子量的减小而降低, 峨山和昭通也大致符合该趋势, 这可能意味着黄腐酸的清除率与分子量之间存在着某种联系。不同分子量样品的清除率并不是简单的加合作用, 这说明黄腐酸分子之间的某种相互作用对清除率做出了贡献, 但是具体作用方式还不清楚。

表 3.1 三地精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH· 的最大清除率

Table 3.1 the maximum scavenging rate of fulvic acid and its fractions to DPPH·

| 样品                | 最大清除率 (%)           |         |         |
|-------------------|---------------------|---------|---------|
|                   | T=90min, C=2.0mg/ml |         |         |
|                   | 峨山                  | 寻甸      | 昭通      |
| 精制黄腐酸             | 74.4886             | 88.8262 | 75.3530 |
| 分子量小于 7000        | 85.8524             | 86.6063 | 83.7741 |
| 分子量小于 3500        | 86.1978             | 84.4814 | 80.3863 |
| 分子量在 1000~3500 之间 | 78.5920             | 81.1388 | 58.8761 |
| 分子量小于 1000        | 64.1810             | 59.7886 | 37.2828 |

### 3.3.2.2 三地精制黄腐酸及其分级产物的动力学曲线研究

根据 1.2.4 实验方法, 计算 TAC 值作为纵坐标, 并以时间点为横坐标, 做出动力学曲线。峨山、寻甸和昭通三地总黄腐酸及其分级产物动力学曲线结果见图 3.5。根据分子量透析分级得到精制总黄腐酸和分级后不同分子量黄腐酸, 各分子量黄腐酸动力学曲线结果分别见图 3.6。

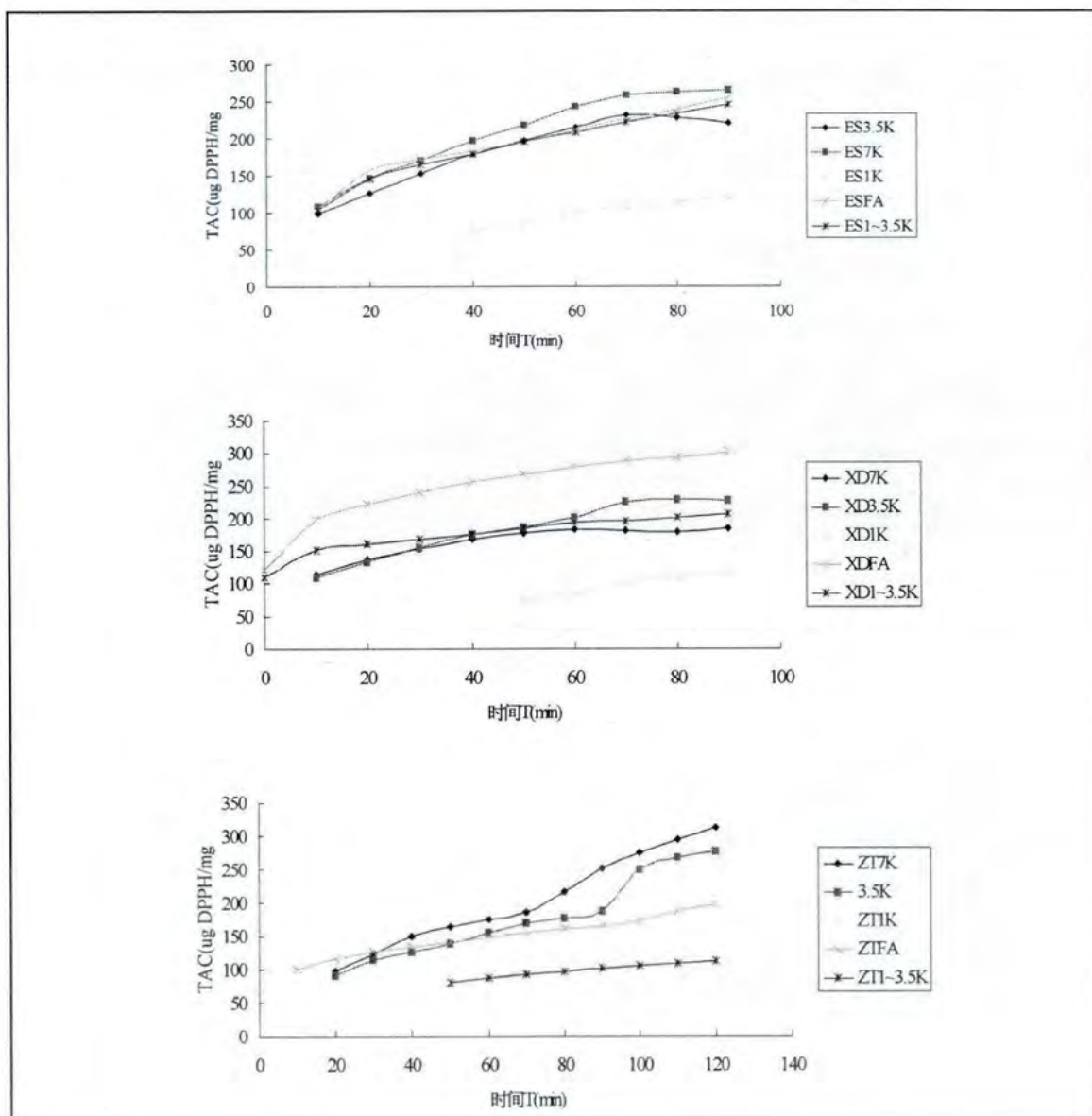


图 3.5 不同产地精制黄腐酸及其分级产物动力学曲线

Fig 3.5 The kinetic curves of fulvic acids and its fractions by dialysis from different areas

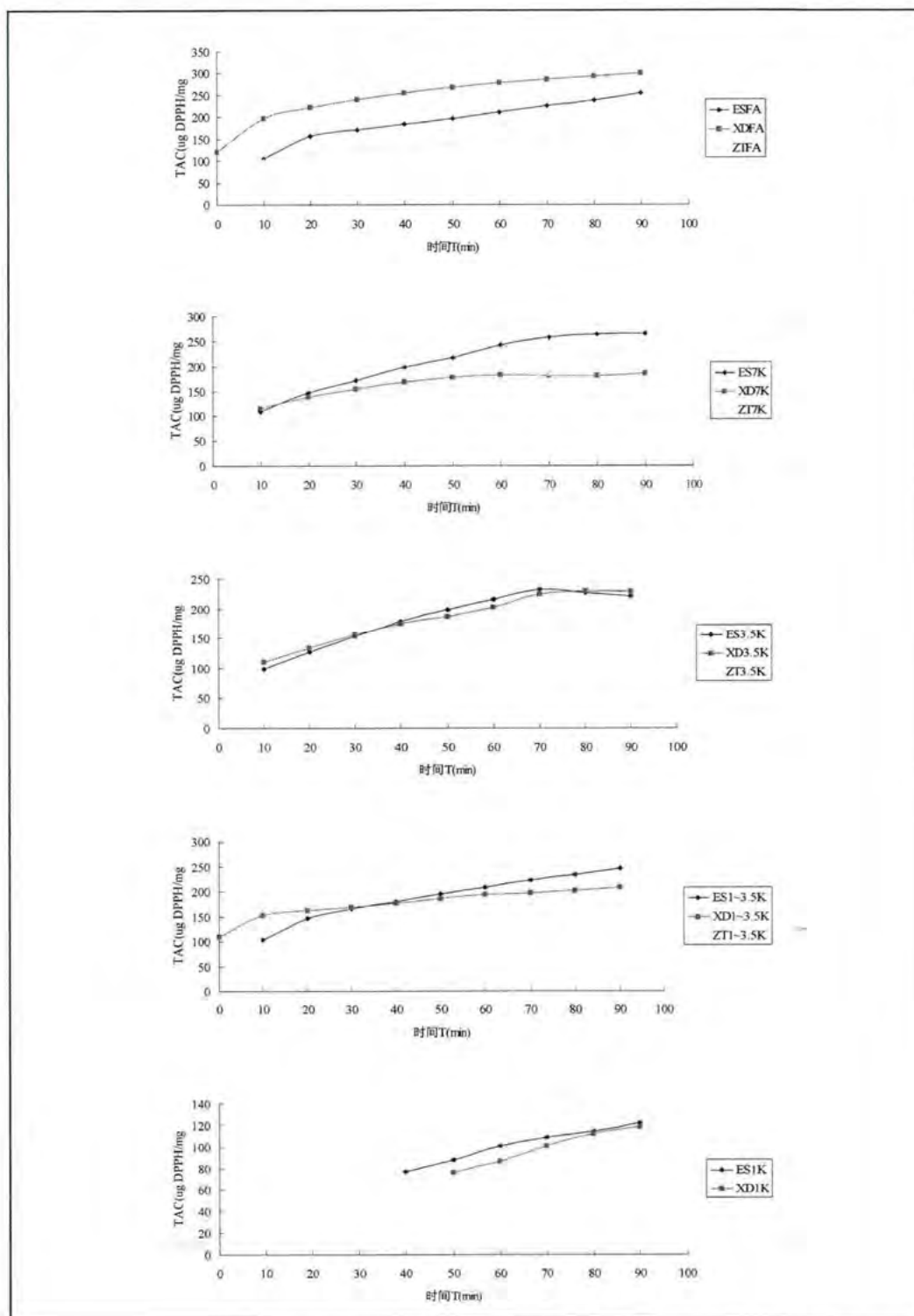


图 3.6 不同分子量精制黄腐酸及其分级产物的动力学曲线

Fig 3.6 The kinetic curves of fulvic acids and its fractions by dialysis in different molecular weight

各黄腐酸对 DPPH• 的最大总抗氧化能力见表 3.2。从表 3.2 中可以看出, XDFA 是 15 个样品中 TAC 最大的, 这说明它对 DPPH• 的清除能力最强; 而 ZT1K 由于在整个反应过程中清除率始终没有达到 50%, 故没有对应的 TAC。三地黄腐酸中 TAC 最小的均为分子量小于 1000 极分, 这与清除率中的趋势是一致的。峨山 5 个样品中 TAC 最大的是 ES7K, 寻甸 5 个样品中 TAC 最大的是 XDFA, 昭通 5 个样品中清除率最大的是 ZT7K, 与清除率中所表现出来的趋势不一致, 分子量与 TAC 之间未见明显相关性。ESFA 和 ZTFA 的 TAC 处于中间值, 可认为各极分的组成比例导致了这样的结果。而 XDFA 的 TAC 是该产地的最大值, 这意味着 TAC 的大小不是各极分之间 TAC 简单的加合作用, 不同分子量的黄腐酸处在同一环境中, 相互之间发生物理或化学作用, 而这种作用可增大样品的 TAC。

表 3.2 三地精制黄腐酸及其分级产物对 DPPH• 的最大总抗氧化能力

Table 3.2 the maximum TAC of fulvic acid and its fractions to DPPH•

| 样品                | TAC(ug DPPH/mg) (T=90min) |          |          |
|-------------------|---------------------------|----------|----------|
|                   | 峨山                        | 寻甸       | 昭通       |
| 精制黄腐酸             | 255.1669                  | 301.4797 | 164.4691 |
| 分子量小于 7000        | 264.7783                  | 185.9155 | 251.0056 |
| 分子量小于 3500        | 220.1393                  | 227.7851 | 187.1795 |
| 分子量在 1000~3500 之间 | 246.2738                  | 207.3644 | 101.0800 |
| 分子量小于 1000        | 121.7687                  | 118.3784 | —        |

将各组分根据产地进行分类对比, 见图 3.5。峨山各组分动力学曲线显示, 各组分能力强弱为: ES7K>ES3.5K>ES1K, 而 ESFA 和 ES1~3.5K 的动力学曲线并行于 ES7K 和 ES3.5K。寻甸各组分动力学曲线显示, 各组分清除能力强弱为 XDFA>XD3.5K>XD7K>XD1K。其中, XD1~3.5K 在 T=40min 前小于 XD3.5K, 而后大于 XD3.5K。XD3.5K 和 XD7K 在反应前期二者 TAC 基本相同, 随着时间延长, 二者差异越来越大。昭通各组分动力学曲线显示, 整个反应过程中未出现 ZT1K, 这是因为 ZT1K 在反应时间内始终清除率没有达到 50%。其他各组分清除能力强弱为 ZT7K>ZT3.5K>ZT1~3.5K, ZTFA 清除能力最初大于 ZT7K, 随着时间延长, ZT7K 和 ZT3.5K 的清除能力均超过 ZTFA。综上所述, 清除能力强弱与分子量之间并没有固定对应关系。

将各组分根据分子量进行分类对比, 见图 3.6。三地总黄腐酸对 DPPH·清除作用, 其强弱顺序为: XDFA>ESFA>ZTFA, 最大值出现在 T=90min 时, 分别为 301.48ug DPPH/mg, 255.17μg DPPH/mg 和 164.47μg DPPH/mg。对于分子量小于 7000 各组分, ES7K 能力大于 ZT7K 和 XD7K, XD7K 反应前半段清除能力强于 ZT7K, 但后半段相反。对于分子量小于 3500 各组分, ES3.5K 和 XD3.5K 二者能力相同, 均强于 ZT3.5K。在分子量介于 1000~3500 组分中, ES1~3.5K 和 XD1~3.5K 均强于 ZT1~3.5K, 其中 XD1~3.5K 反应快但增长慢, 在 T=30min 前其清除作用强于 ES1~3.5K, 但之后被赶超。在分子量小于 1000 组分中, 由于 ZT1K 对 DPPH 自由基的清除能力太弱, 在动力学曲线中未显示出。从图中只能看到 ES1K>XD1K。

### 3.3.2.3 三地精制黄腐酸及其分级产物 TAC 首次出现时间点研究

由于 TAC 是根据 IC<sub>50</sub> 计算得到, 故其值首次出现时间点可以代表样品清除自由基时清除率达到 50%的时间点。各样品 TAC 首次出现时间点见表 3.3。

从表 3.3 中可以看出, 大部分黄腐酸样品在反应 10min 后清除率即可达到 50%, ZT7K 和 ZT3.5K 需要 20min, ES1K 需要 40min, XD1K 和 ZT1~3.5K 需要 50min。反应最快的是 XDFA 和 XD1~3.5K, 这两个样品在反应开始后瞬间达到 50%的清除率, 反应最慢的是 ZT1K, 由于其在整个反应过程中, 清除率始终没有达到 50%, 故无相对应的 TAC 值。这说明分子量对清除速率有一定的影响作用, 不同样品其反应达到 50%所需的时间是不同的。

表 3.3 三地精制黄腐酸及其分级产物 TAC 首次出现时间点

Table 3.3 the first time of TAC of fulvic acid and its fractions

| 样品                | T (min) |    |    |
|-------------------|---------|----|----|
|                   | 峨山      | 寻甸 | 昭通 |
| 精制黄腐酸             | 10      | 0  | 10 |
| 分子量小于 7000        | 10      | 10 | 20 |
| 分子量小于 3500        | 10      | 10 | 20 |
| 分子量在 1000~3500 之间 | 10      | 0  | 50 |
| 分子量小于 1000        | 40      | 50 | —  |

### 3.3.3 结论

通过以上数据分析可知,黄腐酸对 DPPH·的清除率随着样品浓度和反应时间的增加而持续增加,总抗氧化能力也随着时间增加而增大。MQ 是一种常用的体外抗氧化性质评价方法,从数据分析结果可以看出, MQ 可用于黄腐酸抗氧化能力的测定,并能较好的反应出不同级分黄腐酸之间的抗氧化能力差别。

透析分级后,对于同一产地的不同分子量的黄腐酸,其总抗氧化能力不完全一致,某些样品之间存在明显的差异,如 XDFA 和 XD1K,分别为 301.4797 $\mu\text{g}$  DPPH/mg 和 118.3784 $\mu\text{g}$  DPPH/mg;相同分子量的不同来源黄腐酸其总抗氧化能力也不完全一致,如 ES1~3.5K 和 ZT1~3.5K,分别为 246.2738 $\mu\text{g}$  DPPH/mg 和 101.0800 $\mu\text{g}$  DPPH/mg。这说明黄腐酸对 DPPH·的清除能力跟样品的来源和分子量有密切关联。

分子量小于 3500 的样品实际包含了分子量小于 1000 的样品和分子量介于 1000~3500 的样品,但从实验结果中可以看出他们之间并不是直接的加合关系。XD3.5K 的总抗氧化作用大于 XD1~3.5 和 XD1K,这意味着当 XD1~3.5 和 XD1K 混合在一起的时候,黄腐酸分子间发生了某种物理或化学反应,这种反应对自由基清除作用而言起到了一种促进作用。

采用该方法评价黄腐酸的抗氧化能力时,时间是不能忽略的因素,不同黄腐酸反应的快慢不一样。由图可看出,黄腐酸与 DPPH 反应属于慢反应,并不是单一的零级反应或一级反应,若只采用某固定时间的能力值来代表不同黄腐酸的能力,结果是不准确的。很多关于抗氧化物质对 DPPH 清除能力的研究报道中使用的反应时间为  $T=30\text{min}$ ,此时不论是计算黄腐酸对 DPPH·的清除率、 $\text{IC}_{50}$  还是 TAC,都不足以反应样品的真实能力<sup>[56,57]</sup>。

综上所述,黄腐酸对 DPPH·的总抗氧化能力是来源、分子量、分子间相互作用、浓度和时间共同作用的结果。