

精氨酸-共轭亚油酸抗氧化活性研究*

刘晓华,曹郁生,陈燕,周景峰

(南昌大学中德联合研究院,食品科学教育部重点实验室,江西 南昌,330047)

摘要 测定了精氨酸-共轭亚油酸清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)和二苯代苦味肼基自由基(DPPH \cdot)的能力,并与V_C的抗氧化活性进行了比较。结果表明:精氨酸-共轭亚油酸对3种自由基的清除能力均与其浓度存在着量效关系;精氨酸-共轭亚油酸对 $O_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用,但清除能力低于V_C;精氨酸-共轭亚油酸对 $\cdot OH$ 和DPPH \cdot 有较强的清除作用,且清除能力均高于V_C。在精氨酸和共轭亚油酸的协同作用下,精氨酸-共轭亚油酸的抗氧化活性得到增强。因此,精氨酸-共轭亚油酸是一种有效的抗氧化剂。

关键词 共轭亚油酸,精氨酸-共轭亚油酸,抗氧化活性

共轭亚油酸(CLA)是十八碳共轭二烯酸的统称,包括十多种位置和几何异构体。在自然界,CLA主要存在于反刍动物的奶、肉及其制品的脂肪中。大量的研究表明CLA可抑制化学诱导的皮肤癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌,具有抗突变,提高免疫功能的作用,防止动脉硬化,减肥,抗糖尿病,促进骨骼形成等重要生理功能^[1]。研究还发现,CLA的生理活性有异构体特异性,如c9,t11-CLA具有较强的抗癌活性^[2,3],t10,c12-CLA具有较强的减肥和抗II糖尿病活性^[4,5]。

目前人们已建立了生物转化法生产CLA单一异构体的方法^[6~9],并对CLA异构体的结构进行了分析^[10],因此通过生物转化法实现了大量生产具有特定生理活性的CLA异构体。但是CLA是不溶于水的脂溶性物质,这就制约了其在食品、医药等方面的应用。精氨酸(Arg)是碱性氨基酸,并有防治心血管疾病的作用,因此,本研究将其与CLA合成水溶性的盐——精氨酸-共轭亚油酸(Arg-CLA),测定抗氧化活性,为Arg-CLA的应用提供科学依据,从而拓宽CLA的应用范围。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,RE-52AA),循环水真空泵(上海仪表(集团)供销公司,SHZ-III B)、磁力搅拌器(上海仪表(集团)供销公司,79-1),紫外可见分光光度计(Amersham Pharmacia, 4300

Pro)。

共轭亚油酸(南昌华兴生物科技有限公司),精氨酸(BBI),二苯代苦味肼基自由基(DPPH \cdot , Sigma),磷酸氢二钠,磷酸二氢钾,硫酸亚铁,邻苯三酚,二乙三胺五乙酸,Tris,邻菲罗啉,V_C,未注明试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 精氨酸-共轭亚油酸的制备

根据氨基酸能与酸成盐的性质,将1mol精氨酸水溶液置于冰浴中,再将1mol共轭亚油酸的乙醇溶液慢慢加入精氨酸水溶液中,用磁力搅拌器搅拌,直到浑浊消失,用旋转蒸发器将水分蒸干,即得Arg-CLA。

1.2.2 清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力的测定

将150 mmol/L的Tris-HCl(pH=8.2),3 mmol/L的二乙三胺五乙酸,1.2 mmol/L邻苯三酚和Arg-CLA溶液混合,在25℃恒温水浴反应10min后在325 nm处测吸光值。

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率}/\% = \frac{1 - (A_{11} - A_{10})}{A_{01} - A_{00}} \times 100$$

式中: A_{00} 、为不含样品和邻苯三酚的吸光值; A_{01} 、为不含样品,含邻苯三酚的吸光值; A_{10} 、为含样品,不含邻苯三酚的吸光值; A_{11} 为含样品和邻苯三酚的吸光值。

1.2.3 清除羟自由基($\cdot OH$)能力的测定

向1 mL PBS(pH=7.4)中加入1 mL邻菲啉、1 mL FeSO₄(浓度为2.5 mmol/L)、1 mL H₂O₂(浓度为20 mmol/L),再加入0.5 mL Arg-CLA溶液,总反应体积为3.5 mL,不足部分加入蒸馏水补充,37℃恒温水浴反应1.5 h后,在536 nm处测吸光值。

第一作者:博士,副研究员(曹郁生为通讯作者)。

*江西省教育厅科研项目(赣教技字[2007]38号)

收稿日期:2008-02-25,改回日期:2008-05-09

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

式中: A_0 为不含样品和 H_2O_2 的吸光值; A_1 为不含样品, 含 H_2O_2 的吸光值; A_2 为含样品和 H_2O_2 的吸光值。

1.2.4 清除 DPPH· 能力的测定

将 Arg-CLA 溶液加入 DPPH· 的甲醇溶液 (0.20mmol) 中, 置室温并在黑暗中反应 30min 后, 于 517 nm 测吸光值, 以甲醇作为空白。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\% = \frac{1 - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

1.2.5 抗氧化活性比较

分别做 Arg-CLA、Arg、CLA 和 V_C 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH· 能力的实验, 并进行比较。

2 结果与讨论

2.1 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 能力比较

分别以 Arg-CLA、Arg 和 V_C 的浓度为横坐标, 以清除率为纵坐标, 绘制对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 的清除曲线, 见图 1。实验结果表明, Arg-CLA 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 有一定的清除作用, 但清除能力远低于 V_C ; 相同浓度下 Arg-CLA 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 的清除率均高于 Arg; 随着 Arg-CLA 浓度的增加, 清除率上升, 表明 Arg-CLA 的浓度与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 的清除率之间存在着一定的量效关系。

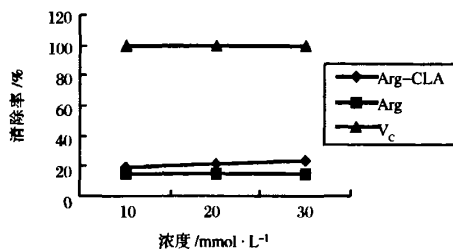


图 1 Arg-CLA、Arg 和 V_C 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 的清除率

2.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力比较

分别以 Arg-CLA、Arg 和 V_C 的浓度为横坐标, 以清除率为纵坐标, 绘制对 $\cdot\text{OH}$ 的清除曲线, 见图 2。实验结果表明, Arg-CLA 对 $\cdot\text{OH}$ 有较强的清除作用, 且清除能力高于 V_C ; 相同浓度下 Arg-CLA 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率均高于 Arg; 随着 Arg-CLA 浓度的增加, 清除率上升, 表明 Arg-CLA 的浓度与 $\cdot\text{OH}$ 的清除率之间存在着明显的量效关系。

2.3 清除 DPPH· 能力比较

以时间为横坐标, 清除率为纵坐标, 分别绘制

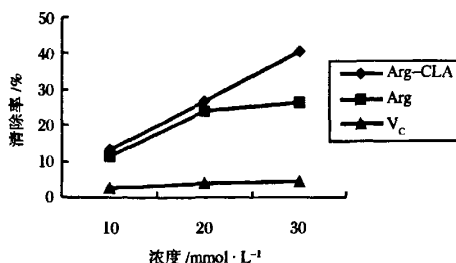


图 2 Arg-CLA、Arg 和 V_C 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率

Arg-CLA、Arg、CLA 和 V_C 对 DPPH· 的清除曲线, 见图 3 和图 6。实验结果表明, Arg-CLA 对 DPPH· 有较强的清除作用, 且清除能力高于 V_C ; 相同浓度下 Arg-CLA 对 DPPH· 的清除率均高于 Arg 与 CLA 两者的总和, 说明在 Arg 和 CLA 的协同作用下, Arg-CLA 的抗氧化活性得到增强; 随着反应时间的延长, Arg-CLA 对 DPPH· 的清除率逐渐增大, 当反应时间达到 2h 时, 清除率趋于恒定; 随着 Arg-CLA 浓度的增加, 清除率上升, 表明 Arg-CLA 的浓度与 DPPH· 的清除率之间存在着明显的量效关系。

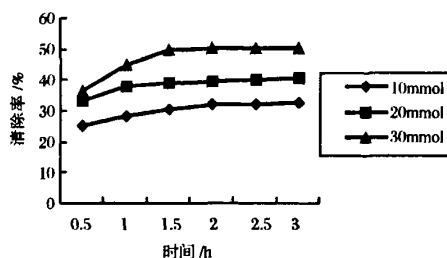


图 3 Arg-CLA 对 DPPH· 的清除率

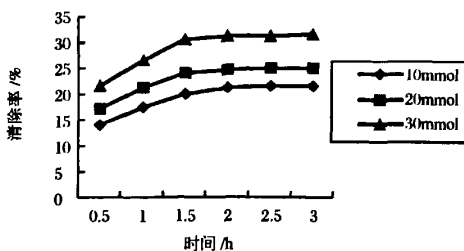


图 4 Arg 对 DPPH· 的清除率

3 结论

Arg-CLA 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH· 的能力均与 Arg-CLA 的浓度存在着量效关系; Arg-CLA 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ · 有一定的清除作用, 但清除能力低于 V_C ; Arg-CLA 对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH· 有较强的清除作用, 且清除

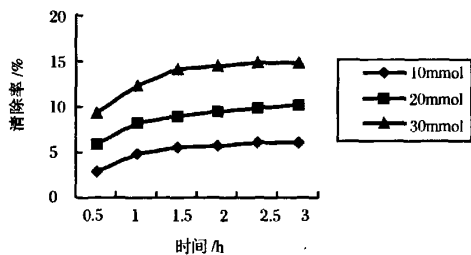


图5 CLA对DPPH·的清除率

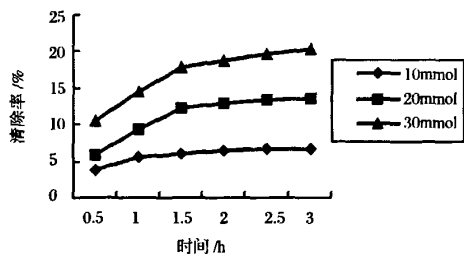


图6 VC对DPPH·的清除率

能力均高于 V_C 。在Arg和CLA的协同作用下,Arg-CLA的抗氧化物活性得到增强。因此,Arg-CLA不仅具有良好的水溶性,而且是一种有效的抗氧化剂,这将显著拓宽CLA在食品和医药等方面的应用范围。

参考文献

- Scimeca J A, Miller G D. Potential health benefits of conjugated linoleic acid [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2000, 19(4): 470s~471s
- Kim J H, Hubbard N E, Ziboh V, et al. Conjugated linoleic acid reduction of murine mammary tumor cell growth

- through 5-hydroxyeicosatetraenoic acid [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1 687(1~3): 103~109
- Lampen A, Leifheit M, Voss J, et al. Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1 735(1): 30~40
- Peters J M, Yeonhwa P, Gonzalez F J, et al. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1533(3): 233~242
- Thijssen M A, Malpuech-Brugere C, Gregoire S, et al. Effects of specific CLA isomers on plasma fatty acid profile and expression of desaturases in humans [J]. Lipids, 2005, 40(2): 137~145
- Alonso L, Cuesta E P, Gilliland S E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(6): 1 941~1 946
- Kishino S, Ogawa J, Omura Y et al. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria [J]. JAOCS, 2002, 79(2): 159~163
- Lin T Y, Hung T H, Cheng T S J. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus* [J]. Acidophilus. Food Chemistry, 2005, 92(1): 23~28
- 刘晓华,曹郁生,陈燕. 瑞士乳杆菌L7生物转化共轭亚油酸的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 86~88
- 刘晓华,曹郁生,陈燕. *L. helveticus* L7生物转化的共轭亚油酸异构体结构分析[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 464~467

Antioxidant Activity of Arginine-conjugated Linoleic Acid Complex

Liu Xiaohua, Cao Yusheng, Chen Yan, Zhou Jingfeng

(Jiangxi-OAI Joint Research Institute, The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT The ability of arginine-conjugated linoleic acid (Arg-CLA) in scavenging superoxide anion radical ($O_2^- \cdot$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) were inspected and compared with the antioxidant activity of conjugated linoleic acid (CLA), arginine and vitamin C (V_C) respectively. The results showed that Arg-CLA exerted radical scavenging activities in a dose-dependent manner in three assays. Arg-CLA was certain to eliminate $O_2^- \cdot$, but had lower activity compared to V_C . Arg-CLA effectively inhibited $\cdot OH$ and DPPH \cdot respectively, and had higher antioxidant activity than V_C . The antioxidant activity of Arg-CLA was enhanced with the synergistic effects of Arg and CLA. The results indicated that Arg-CLA was an efficiency antioxidant.

Key words conjugated linoleic acid, arginine-conjugated linoleic acid, antioxidant activity