

黑糯玉米芯色素清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的体外实验研究*

张 钟 郭元新 李凤霞

(安徽科技学院工学院, 凤阳, 233100)

摘 要 研究了黑糯玉米芯色素(BGCP)清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$) 自由基和羟基自由基($\cdot OH$)的能力。用邻苯三酚法测定 BGCP 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除效果;用 Fenton 体系法测定 BGCP 对 $\cdot OH$ 清除效果。结果表明:不同浓度的 BGCP 对 $O_2^{\cdot-}$ 都有一定的清除作用,在 0.02~0.10 mg/mL 范围内,浓度越大对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率效果越好,随着时间的延长,BGCP 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用迅速减弱;不同浓度的 BGCP 对 $\cdot OH$ 都有一定的清除效果,在 0.02~0.10 mg/mL 范围内,浓度越大对 $\cdot OH$ 的清除效果越好。

关键词 黑糯玉米芯,色素,自由基,体外抗氧化实验

黑糯玉米芯色素属花色苷类色素^[1],花色苷类色素具有抗氧化、清除自由基等作用,并以高效、低毒、高生物利用率而著称^[2]。英国人 Harman 于 1956 年提出了自由基学说,该学说认为自由基(free radical)为了获得电子形成配对,常攻击体内的其他细胞和组织,使这些靶位氧化形成损伤^[3],是引起机体衰老的根本原因,这种观点被越来越多的实验所证明^[4,5],消除体内多余自由基以延长寿命已成为共识^[6,7]。近年来,国内外对自由基及自由基清除剂的研究十分活跃,已经将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价^[8,9]。本文以黑糯玉米芯色素(BGCP)为原料,研究了该色素对自由基的清除作用,为该色素在食品中的应用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 原 料

黑糯玉米芯,由安徽省濉溪县农科所提供。

1.2 主要仪器

722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),FA2004 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),WJX-2501 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),JFSD-70 实验室粉碎磨(上海市嘉宝粮油检测仪器厂),RF-52 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂),ZK-82A 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂)。

1.3 主要试剂

Tris-HCl 缓冲液,邻苯三酚,FeSO₄-EDTA,

H₃PO₄,蔗糖酯,三氯乙酸(TCA),硫代巴比妥酸(TBA), α -脱氧核糖(Fluka Co.)等均为分析纯试剂。

1.4 实验方法

1.4.1 色素的提取、分离、纯化^[1]

采用 0.05 mol/L HCl 溶液,以样品与浸提剂比(g:mL)=1:20 浸提 24 h,在 60℃ 下 2 次浸提后,减压浓缩温度为 60℃、真空度为 0.9 MPa,最后减压干燥(温度为 60℃、真空度为 0.9 MPa)即得该色素。

1.4.2 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除效果的测定^[10]

向 2.7 mL、pH 8.2 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 0.1 mL 蒸馏水,于 25℃ 恒温水浴 10 min 后,加入 25℃ 预热的 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2 mL,迅速混匀,每隔 0.5 min 在 420 nm 处测定溶液的吸光度,记为 A_1 。向 2.7 mL、pH 8.2 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 0.1 mL 不同浓度的 BGCP(0.02、0.04、0.10 mg/mL),于 25℃ 恒温水浴 10 min,加入 25℃ 预热的 10 mmol/L HCl 溶液 0.2 mL,迅速混匀,每隔 0.5 min 在 420 nm 处测定溶液的吸光度,记为 A_2 。向 2.7 mL、pH 8.2 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 0.1 mL 不同浓度的 BGCP(0.02、0.04、0.10 mg/mL),于 25℃ 恒温水浴 10 min,加入 25℃ 预热的 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2 mL,迅速混匀,每隔 0.5 min 在 420 nm 处测定溶液的吸光度,记为 A_3 。将所得数据代入下列公式计算其清除率 $SA = (A_1 - A)/A_1 \times 100$,式中 $A = A_3 - A_2$ 。

1.4.3 BGCP 对羟基自由基($\cdot OH$)清除效果^[11]的测定

取 0.2 mL 的 FeSO₄-EDTA 混合液(10 mmol/L)

第一作者:硕士,教授。

* 安徽省教育厅资助项目(No. 2006KJ200B)和院级重点学科建设基金资助项目(No. YZD 2004-14)

收稿日期:2006-08-08,改回日期:2006-10-16

于具塞试管中,加入 0.2 mL 的 α -脱氧核糖溶液(10 mmol/L),然后加入 0.2 mL 不同浓度的 BGCP (0.02、0.04、0.10 mg/mL),用 pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)定容至 1.8 mL,再加入 0.2 mL H_2O_2 (10 mmol/L)和 1 mL 的质量分数 5% 蔗糖酯,混匀后置于 37℃ 恒温水浴中反应 1 h,然后加入质量分数 2.8% 三氯乙酸(TCA)溶液 1 mL,质量分数 1.0% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液 1 mL,混匀后置于沸水浴中反应 15 min,冷却后于 532 nm 处比色测定吸光值为 A,对照管除不加 BGCP 外,其他相同,所测吸光值为 A_0 ,空白管以 2 mL PBS 调零。BGCP 对 $\cdot OH$ 自由基的清除能力为:

$$SA/\% = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

表 1 BGCP 对超氧阴离子自由基的清除作用($\bar{X} \pm sD$)

BGCP 浓度/mg·mL ⁻¹		时间/min									
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
0.00	A ₁	0.443 ± 0.002 94	0.479 ± 0.002 62	0.497 ± 0.001 63	0.511 ± 0.002 16	0.522 ± 0.004 83	0.530 ± 0.002 70	0.536 ± 0.001 82	0.541 ± 0.002 449	0.545 ± 0.002 44	0.548 ± 0.018 07
		0.046 ± 0.000 81	0.047 ± 0.000 81	0.046 ± 0.000 00	0.047 ± 0.001 41	0.046 ± 0.000 81	0.046 ± 0.000 816	0.046 ± 0.000 00	0.046 ± 0.000 81	0.046 ± 0.000 00	0.046 ± 0.000 00
0.02	A ₂	0.078 ± 0.000 216	0.076 ± 0.000 81	0.075 ± 0.000 81	0.076 ± 0.000 81	0.075 ± 0.002 16	0.078 ± 0.001 63	0.078 ± 0.000 81	0.076 ± 0.000 00	0.074 ± 0.000 81	0.074 ± 0.000 00
		0.145 ± 0.000 81	0.146 ± 0.001 41	0.145 ± 0.000 81	0.144 ± 0.000 81	0.144 ± 0.000 81	0.145 ± 0.000 81	0.143 ± 0.000 81	0.143 ± 0.000 81	0.145 ± 0.000 81	0.145 ± 0.000 81
0.10	A ₃	0.281 ± 0.008 58	0.309 ± 0.001 82	0.332 ± 0.002 44	0.352 ± 0.001 82	0.370 ± 0.001 82	0.384 ± 0.002 70	0.397 ± 0.001 82	0.407 ± 0.001 82	0.418 ± 0.001 82	0.426 ± 0.001 82
		0.252 ± 0.003 55	0.278 ± 0.002 16	0.297 ± 0.003 36	0.315 ± 0.004 96	0.349 ± 0.001 82	0.343 ± 0.003 65	0.354 ± 0.002 94	0.364 ± 0.002 58	0.372 ± 0.002 58	0.380 ± 0.002 70
0.04	A	0.273 ± 0.001 63	0.286 ± 0.001 82	0.307 ± 0.001 82	0.329 ± 0.003 16	0.341 ± 0.001 82	0.362 ± 0.002 58	0.363 ± 0.001 82	0.384 ± 0.002 44	0.413 ± 0.001 82	0.396 ± 0.003 65
		0.239 ± 0.174	0.262 ± 0.202	0.286 ± 0.222	0.305 ± 0.239	0.324 ± 0.274	0.338 ± 0.265	0.351 ± 0.276	0.361 ± 0.288	0.372 ± 0.298	0.380 ± 0.306
0.02	SA/%	0.128	0.140	0.162	0.185	0.197	0.217	0.22	0.241	0.268	0.251
		46.05	45.30	42.45	40.31	37.93	36.23	34.51	33.27	31.74	30.66
0.04	SA/%	60.72	57.83	55.33	53.23	47.51	50.00	48.51	46.77	45.32	44.16
		71.11	70.77	67.40	63.80	62.26	59.06	58.96	55.45	50.83	54.20

表 1 表明,3 种浓度的 BGCP 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)都有一定的清除作用;在 0.02~0.10 mg/mL 范围内,浓度越大对 $O_2^{\cdot -}$ 自由基的清除效果越好;随着时间的延长,3 种浓度的 BGCP 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用迅速减弱。证明了 BGCP 对 $O_2^{\cdot -}$ 自由基有较好的清除作用。

2.2 BGCP 对羟基自由基($\cdot OH$)的清除效果

由表 2 可知,(1)3 种浓度的 BGCP 对 $\cdot OH$ 自由基都有一定的清除效果。(2)在 0.02~0.10mg/mL 范围内,浓度越大对 $\cdot OH$ 自由基的清除效果越好。证明了 BGCP 对 $\cdot OH$ 自由基也有较好的清除作用。

1.4.4 统计学处理
用 SAS6.12 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 BGCP 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的清除效果

邻苯三酚会发生自动氧化反应,其自氧化反应速率被抑制的程度显示 $O_2^{\cdot -}$ 被清除作用的强弱。邻苯三酚自氧化是一类链式反应,在自氧化过程中, $O_2^{\cdot -}$ 不断消失又不断生成,达到稳定时,其浓度保持恒定。按 1.4.2 方法,不同浓度 BGCP (0.02、0.04、0.10 mg/mL)对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的清除作用,可通过吸光度来表示,实验结果见表 1。

表 2 BGCP 对羟基自由基的清除作用($\bar{X} \pm sD$)

BGCP 浓度/mg·mL ⁻¹		A_{532}	SA/%
0.00	A_0	$0.864 \pm 0.002 16$	—
0.02	A	$0.612 \pm 0.004 96$	29.167
0.04		$0.536 \pm 0.001 82$	37.963
0.10		$0.408 \pm 0.002 94$	52.778

3 讨论

钱玉春等人^[12]研究发现,丹贝异黄酮能防止猪油的自动氧化,对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧自由基 $O_2^{\cdot -}$ 和抗坏血酸体系产生的羟自由基

·OH都有显著的清除效果。清除自由基是抗氧化剂发挥抗氧化作用的主要机制^[13],李雪华等人^[14]认为大枣多糖具有清除氧自由基的作用,其活性大小与多糖的用量呈正相关。与本实验中清除自由基能力随BGCP浓度的增大而增大相一致。

自由基与其他生理现象如衰老、肿瘤、心血管疾病等紧密相关^[15], $O_2^{\cdot-}$ ·自由基的形成是氧毒性的主要因素,在生理条件下,96%~99%的氧可通过酶催化还原为 H_2O ,还有1%~4%转化为 $O_2^{\cdot-}$ ·和 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ·和 H_2O_2 若得不到及时清除,则可继续反应生成毒性更大的·OH自由基^[7];·OH是化学性质最活泼的一种活性氧分子,其危害性最大^[13],几乎能和所有的生物大分子发生各种不同类型的反应,并有非常高的速度常数,是进攻性最强的化学物质之一;BGCP能与脂质过氧化基反应,阻止脂质过氧化过程。BGCP的抗氧化活性作者已作了初步研究^[16],有关BGCP抗氧化及清除氧自由基的作用机理还有待进一步研究。

4 结 论

(1)不同浓度的BGCP对 $O_2^{\cdot-}$ ·都有一定的清除作用,在0.02~0.10mg/mL范围内,浓度越大清除率效果越好,随着时间的延长,BGCP对 $O_2^{\cdot-}$ ·的清除作用迅速减弱;

(2)不同浓度的BGCP对·OH都有一定的清除效果,在0.02~0.10mg/mL范围内,浓度越大对·OH的清除效果越好。

参 考 文 献

1 张 钟,宫 坤,陈守江.黑糯玉米芯色素的提取及性质

- 研究[J].中国粮油学报,2004(2):62~63
- 2 杨朝霞,王亦军,高 磊.紫甘薯花色苷色素研究进展[J].青岛大学学报(工程技术版),2004,19(2):32~36
- 3 刘建文.药理实验方法学——新技术与新方法[M].北京:化学工业出版社,2003.92~106
- 4 William C O, Rajindar S S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [J]. Science,1994,263:1 128
- 5 张 英,唐莉莉,丁霄霖.竹叶功能因子生物抗氧化性质的研究[J].营养学报,1998,20(3):367~371
- 6 钟耀广.功能性食品[M].北京:化学工业出版社,2004.156~170
- 7 孙存普,张建中,段绍瑾,等.自由基生物学导论[M].合肥:中国科学技术出版社,1999.2~4
- 8 张翼伸.怎样研究植物多糖[J].生命的化学,1999,19(6):296~297
- 9 郑晶泉.抗氧化剂抗氧化实验研究进展[J].国外医学卫生学分册,2000,27(1):37~38
- 10 Alexandre C, Kurt H, Wahjo D, et al. Antioxidant and lipophilic constituent softinos poracrispa[J]. Planta Medica, 1998,64:393~396
- 11 Marklund S. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, 47:469
- 12 钱玉春,董明盛,江汉湖.丹贝异黄酮的抗氧化作用[J].南京农业大学学报,1998,21(2):104~108
- 13 胡 春,丁霄霖.用化学发光法研究黄酮化合物对·OH和 $O_2^{\cdot-}$ 的清除[J].无锡轻工学报,1996,19(3):194~198
- 14 李雪华,龙盛京.大枣多糖的提取和抗活性氧研究[J].广西科学,2000,7(1):54~56
- 15 Hopia A,Heinonen M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate[J]. Journal of Oil Chemistry Society,1999,76:139~144
- 16 张 钟,张志海.影响黑糯玉米芯色素抗氧化活性的因素及与其他抗氧化剂效应的比较[J]食品与发酵工业,2006,32(6):30~33

In Vitro Study on Scavenging Capacity of Pigment in Black Glutinous Corncob on Super Oxide Free Radical and Hydroxyl Free Radical

Zhang Zhong Guo Yuanxin Li Fengxia

(Institute of Technology, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

ABSTRACT The effects of BGCP on scavenging $O_2^{\cdot-}$ · and ·OH were studied. The method of Pyrogallol Autoxidation System and Fenton System were used to test the effects of BGCP on scavenging $O_2^{\cdot-}$ · and ·OH. The results showed that different concentrations from 0.02~0.10mg/mL all have certain scavenging effects, the higher the concentration, the better effect it showed. However, with the time passing, scavenging effects on $O_2^{\cdot-}$ · decreased rapidly.

Key words black glutinous corncob, pigment, free radicals, *in vitro* anti oxidant activity