

两种天然抗氧化剂清除活性氧的研究

金 辉 赵亚平 于文利 王大璞

(上海交通大学化学化工学院, 上海 200240)

摘 要 采用化学发光法研究了番茄红素和天然 VE 对活性氧的清除作用, 并比较了二者的抗氧化能力随时间和浓度的变化规律。结果表明, 番茄红素清除超氧阴离子、羟基自由基和脂类过氧化效果较好, EC_{50} 分别为 0.75、0.05、0.1 mg/ml, 而所需的时间分别不超过 6s、6s 和 24s。天然 VE 对超氧阴离子的清除能力则较差, 在 1mg/ml 的浓度时清除率不超过 25%, 但清除羟基自由基和脂类过氧化的效果与番茄红素相近, 其 EC_{50} 分别为 0.1mg/ml 和 0.1mg/ml, 而所需的时间为 6s 和 24s。

关键词 番茄红素 天然 VE 清除率 自由基 化学发光法

Abstract The scavenging ability on ROS of lycopene and VE was evaluated by means of chemiluminescence in models for generation of superoxide anions hydroxyl radicals, and lipid peroxidation. The changes of antioxidant behaviors with time and concentration were investigated and compared. The efficient concentration (EC_{50}) of lycopene towards superoxide anions hydroxyl radicals lipid peroxidation and was 0.75mg/ml, 0.05mg/ml and 0.1 mg/ml, respectively. The required time was 6 second, 6 second and 24 second, respectively. VE was not an effective scavenger towards superoxide anions. EC_{50} of VE towards hydroxyl radicals and lipid peroxidation was 0.1mg/ml and 0.1mg/ml. The required time was 6 second and 24 second, respectively.

Key words lycopene; vitamin E; scavenging rate; free radicals; chemiluminescence

活性氧(Reactive Oxygen Species 简称 ROS)被公认为是癌症、慢性病和老化的诱因, 同时人们也发现多种天然食品对上述病症有防治作用。天然食品的这种功效主要是由于其中含有清除 ROS 的有效活性成分。事实上, 已有大量生物活性物质如植物中的黄酮, 茶叶中的茶多酚都已被证实具有清除自由基的作用。关于富含番茄红素的番茄和富含天然 VE 的大豆这两类食品的对人类健康有益的文献也屡见报道, 番茄红素已被证明是非常有效的单线态氧猝灭剂, 同时也对氮氧自由基(NO)、磺酰基(RSO₂)等自由基有消除作用; 而 VE 对脂类过氧化的抑制作用也得到了公认。但是关于番茄红素和 VE 消除如超氧阴离子、羟基自由基等 ROS 的报道则较少。为此本文采用化学发光法研究和比较了从番茄和大豆中分别提取得到的具有较高有效成分含量的番茄红素(Lycopene)和天然 VE 清除氧自由基的作用, 为该产品的深度研究与开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜番茄酱、大豆油脱臭物 市售;

邻苯三酚(Parogallo) 由北京化学药品有限公司提供; 鲁米诺(Luminol)、AAPH(2, 2'-Azobis(2-amidino-propane) hydrochloride)、1, 10-二氮杂菲(1, 10-Phenanthroline) 由 Sigma 化学药品公司提供; 月苋草油(γ -亚油酸含量不低于 20%)、NaOH、H₂O₂、HCl、CuCl 均

为分析纯, 上海试剂二厂生产; 碳酸盐缓冲溶液(CBSS, pH=10.2)、蒸馏水 由实验室制备。

Lambda-20 型紫外光谱仪 美国制造; SH-G 型化学发光分析仪 上海分析仪器六厂; Waters 2690 HPLC, Symmetry C18 柱。

1.2 Lycopene 和 VE 的制备

Lycopene 由番茄酱提取制得: 番茄酱脱水预处理后, 用乙酸乙酯萃取三次, 合并萃取液, 然后减压蒸去溶剂后得到 Lycopene, 用紫外光谱法测定其番茄红素含量为 50%。VE 从大豆中提取: 将大豆油脱臭物首先进行甲酯化反应, 然后将反应混合物于 5℃下冷析除去甾醇, 最后用分子蒸馏得到天然 VE 浓缩物, 用 HPLC 法测定其 VE 含量为 60%。

1.3 超氧阴离子的产生方法

超氧阴离子由邻苯三酚自氧化产生^[1]: 将 50 μ l 邻苯三酚(1mmol/L)、700 μ l CBSS、20 μ l 鲁米诺(1mmol/L)和一系列不同浓度样品分别放入样品池, 测前快速混匀后, 立即开始测定, 每 6s 记录数据一次, 另做空白实验。清除率(%) = 100(空白值 - 样品峰值) / 空白值

1.4 羟基自由基的产生及清除

羟基自由基是由 Fenton 型反应产生^[2]: 将 20 μ l FeCl₂(1mmol/L)、30 μ l 1, 10-二氮杂菲(1mmol/L)、80 μ l CBSS 和一系列不同浓度样品分别加入样品池, 最后加入 50 μ l 10.6%的 H₂O₂。测前快速混匀后, 立即开始

测定,每6s记录数据一次,另做空白实验。清除率(%)=100(空白值-样品峰值)/空白值。

1.5 清除脂类过氧化

脂类过氧化由AAPH引发月苋草油产生:将100 μ l的月苋草油、20 μ l鲁米诺(1mmol/L)和一系列不同浓度样品及100 μ l AAPH分别加入样品池,在烘箱中37 $^{\circ}$ C下预热0.5h后上机测试,每6s记录数据一次,测试温度38 $^{\circ}$ C,另做空白实验。清除率(%)=100(空白值-样品峰值)/空白值。

2 结果与讨论

2.1 清除超氧阴离子

超氧阴离子是一个从活体组织中新陈代谢产生的氧自由基。在生物活体中,当超氧阴离子浓度达到一定浓度时将会对大分子如蛋白质、DNA等进行破坏。图1是不同浓度Lycopene对超氧阴离子清除率与时间的关系。由此可见清除率在0~6s间上升最快;在6~42s内清除率随时间变化很小,浓度为1.0mg/L时清除率在6s内达到70%。一般定义自由基清除率在50%以上时的浓度为EC₅₀,则Lycopene对超氧阴离子的EC₅₀为0.75mg/ml。图2显示了VE清除超氧阴离子的清除率与时间的关系,可以看出清除率随时间上升缓慢,同时虽然浓度增加有利于清除率上升,但在VE浓度大于1mg/ml时,清除率仍然在25%以下,远比番茄红素的清除率小。

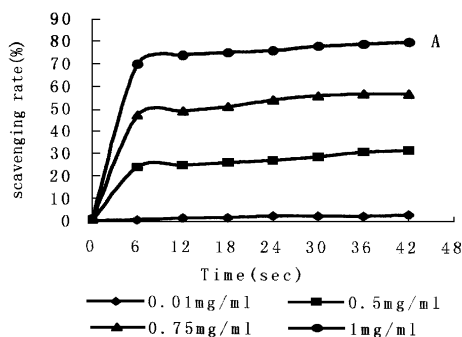


图1 Lycopene清除超氧阴离子清除率与时间关系图

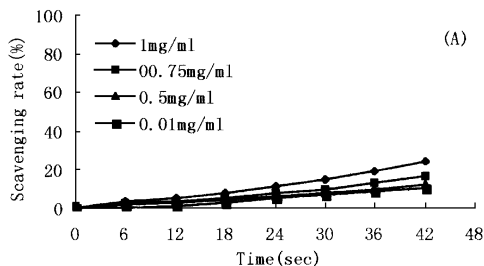


图2 VE清除超氧阴离子清除率与时间关系图

2.2 清除羟基自由基

羟基自由基是生物活体内最具进攻性的活性氧。

Lycopene清除率与时间的关系如图3所示。由此看出在加入Lycopene后清除反应立即开始,在6s内已达到最大,之后随着时间的延长,清除率基本没有变化,因此有效抑制羟基自由基的时间不超过6s。当Lycopene为0.1mg/ml,清除率接近100%,因此Lycopene的EC₅₀为0.05mg/L。图4是VE清除率与时间的关系,由图可见6s内清除率上升较快,6s后基本上不变。同时可见EC₅₀为0.1mg/ml,显示了VE清除羟基自由基较清除超氧阴离子的能力好。

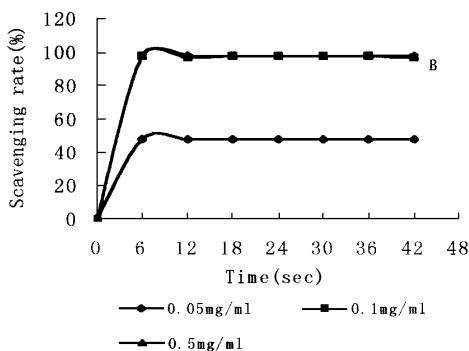


图3 Lycopene清除羟基自由基清除率与时间关系图

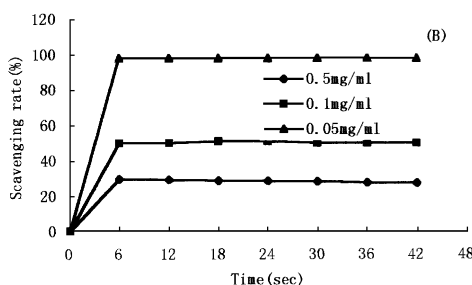


图4 VE清除羟基自由基清除率与时间关系图

2.3 清除脂类过氧化

脂类的过氧化作用是由在生物系统如脂蛋白、脂质体、微粒体和细胞膜等的氧化所引发的破坏。因此清除脂类过氧化的能力也是衡量抗氧化作用的一个重要指标。Lycopene抑制脂类过氧化的自由基清除率与时间关系如图5所示。我们可以看出有效清除

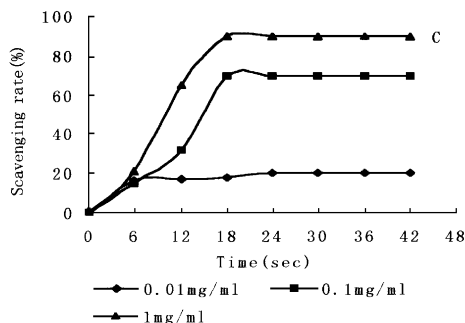


图5 Lycopene清除脂类过氧化清除率与时间关系图

核桃油自氧化及其抗氧化的实验研究^{*}

赵声兰 李涛 蔡绍芬 魏大巧 余旭亚 陈朝银^{**}

(昆明理工大学化学学院, 昆明 650051)

摘要 以过氧化值(POV)为指标研究了温度、时间对核桃油自氧化过程的影响及添加抗氧化剂对核桃油抗氧化性能的影响。结果表明, 温度、时间对核桃油的氧化过程有高度显著的影响。TBHQ 对核桃油具有较好的抗氧化性能, 抗坏血酸和柠檬酸对 TBHQ 均表现出较强的协同抗氧化效应, 且抗坏血酸的协同抗氧化性优于柠檬酸。使用 0.015%TBHQ+0.01%柠檬酸或 0.015%TBHQ+0.01%抗坏血酸为核桃油的抗氧化剂, 可使核桃油在 15℃下的贮藏期从 2.9 个月分别延长至 29.8 个月和 38.9 个月。

关键词 核桃油 自氧化 抗氧化

Abstract The effects of temperature and time on the auto-oxidation of walnut oil and antioxidation activity of several antioxidants in walnut oil were studied by oven-storage test. The results were; The POV of walnut oil was affected remarkably by temperature and time. TBHQ had good antioxidative activity for walnut oil. TBHQ with vitamin C or with citric acid exhibited remarkable antioxidant activity and synergistic effect in the walnut oil. Vitamin C was better than citric acid. When 0.015%TBHQ with 0.01% citric acid or with 0.01% vitamin C was used in the oil, the assurance period of the oil could be prolonged to 29.8 months or 38.9 months at 15℃ respectively.

Key words walnut oil; oxidation; antioxidation

由核桃仁提炼的核桃油味美醇香、营养丰富, 含亚油酸 64.6%、油酸 16.3%、亚麻酸 11.2%、棕榈酸 5.6%、硬脂酸 2.2%, 其中饱和脂肪酸达 92.1%, 必需脂肪酸(EFA)的含量达 75.8%^[1]。在经济发达的国家视核桃油为保健专用油, 近年在国际食用油市场上价格达 8000~10000 美元/t, 且供不应求^[2]。但

由于核桃油富含不饱和脂肪酸, 在加工、贮藏及销售过程中极易发生氧化酸败变质。为此本文进行了核桃油自氧化和抗氧化的实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃仁 购于云南省会泽县; 核桃油 自核桃仁提取精炼而得; 三氯甲烷、冰乙酸、硫代硫酸钠、碘化钾、可溶性淀粉、柠檬酸、抗坏血酸 均为国产分析纯试剂; TBHQ、BHT、PG 均为国产食品添加剂。

脂类过氧化所需的时间为 24s 左右。当浓度在 0.1mg/ml 以上时, 清除率可达 50%以上, 可见 EC₅₀ 为 0.1mg/ml。图 6 是 VE 清除脂类过氧化的清除率和时间关系, 在 24s 内对脂类过氧化消除率达到最大。同时可见清除率随浓度增加而增加, 在 1mg/ml

时达到 80%, EC₅₀ 为 0.1mg/ml。

3 结论

实验结果表明, 番茄红素和天然 VE 浓缩物对活性氧均具有清除和抑制作用, 前者的作用强于后者。实验使用的反应模型均为水溶液模型, 因此该实验结果提示, 在生物活体水溶液环境中, 番茄红素和 VE 仍能发挥良好的清除和抑制活性氧的作用。

参考文献

- 1 Bauer V., Nakajima T., Pucovsky V., et al. Effects of superoxide generating systems on muscle tone, cholinergic and NANC responses in cat airway. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 2000, 79: 34~44
- 2 Zhao BL, Li XJ, He RG, et al. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Bio-phys*. 1989, 14: 175

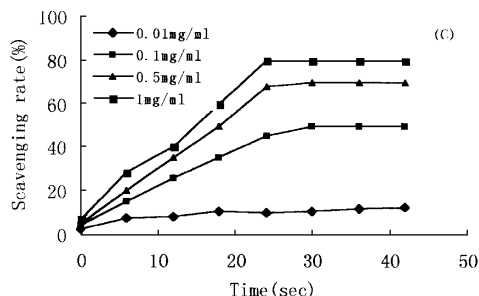


图 6 VE 清除脂类过氧化清除率和时间关系图