

山葡萄籽和皮中原花青素类 SOD 活性的测定

张兰杰, 辛 广, 王艳丽
(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114007)

摘 要: 采用邻苯三酚自氧化法测定山葡萄籽和皮中原花青素 SOD-L 的活性为 192.85U/g 和 78.45U/g。通过实验确定了适宜的测定条件: 测定波长 325nm, 缓冲体系为 Tris-HAc 缓冲液, 浓度为 50mmol/L, pH8.2。原花色素 SOD-L 对连苯三酚自氧化的抑制率达到 91%。

关键词: 山葡萄籽和皮; 原花青素; SOD-L 活性; 连苯三酚自氧化法

Determination of Superoxide Dismutase (SOD) -like Activity of Proanthocyanidins in Seeds and Peels of *Vitaceae amurensis*

ZHANG Lan-jie, XIN Guang, WANG Yan-li
(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114007, China)

Abstract : Pyrogallol autooxidation method was applied to determine SOD-like activities of proanthocyanidins in seeds and peels of *Vitaceae amurensis*. The results indicated that the SOD-like activities of proanthocyanidins in seeds and peels of *Vitaceae amurensis* are 192.85 U/g and 78.45 U/g, respectively. The optimum parameters for this assay are as follows: determining absorbance at the wavelength of 325 nm, and taking Tris-HA at pH 8.2 and at the concentration of 50 mmol/L as buffer system. The inhibition percentage of proanthocyanidins against pyrogallol antiooxidation reaches 91%.

Key words: *Vitaceae amurensis*; proanthocyanidins; superoxide dismutase activity; pyrogallol autooxidation

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0072-03

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC.1.15.1.1 缩写 SOD)是生物体内重要的自由基清除剂, 也是一类广泛存在于各类生物体内的氧化还原酶。1969 年由 McCord 和 Fridovich^[1]发现此酶以来, 有关 SOD 在生物界的分布及特性的研究倍受重视。目前已经证实 SOD 不仅在生物体内可以抗氧化、抗衰老, 而且也有抗辐射、抗肿瘤、解毒等功效^[2], 因此受到科技界、医药界的极大关注。

近年来研究表明, 葡萄籽中的原花色素具有优良 SOD-L(Superoxide dismutase-like, 简称 SOD-L)活性。据文献^[2]报道, 在相同浓度下, 原花色素对超氧阴离子的抑制率相当于 VC 的 20 倍、VE 的 50 倍。目前, 国内测定原花青素类 SOD 活性的方法多采用连苯三酚自氧化法^[3]。该法是利用连苯三酚在碱性条件下发生自氧化反应, 生成一系列中间产物, 同时释放出 $O_2^{\cdot -}$, SOD 在有质子存在的介质中能迅速将 $O_2^{\cdot -}$ 歧化, 产生 O_2 和 H_2O , 从而阻止中间产物的积累, 据此可测定 SOD 活

性。不同的测定条件, 对样品 SOD 活性测定的结果有较大的影响。本实验采用鞍山地区盛产的野生山葡萄, 取其废弃物葡萄籽和皮, 提取原花青素 SOD-L, 用连苯三酚自氧化法测定对影响 SOD-L 活性的诸多因素进行了研究, 旨在为山葡萄的进一步利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山葡萄采自千山乡摩云山, 由鞍山林业所孙忠诚教授鉴定。

连苯三酚(分析纯)购自贵州遵义化学试剂厂, 用 0.01mol HCl 配制成 50mmol/L 的邻苯三酚溶液; 三羟甲基氨基甲烷(分析纯)购自沈阳市医药公司化玻站试剂, 配制成 pH8.2 50mmol/L Tris-HAc 缓冲液。

PHS-3C 型数字酸度计 上海精密科学仪器有限公司; U-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 方法

收稿日期: 2008-06-30

基金项目: 鞍山市科委科学研究项目(2007SF26)

作者简介: 张兰杰(1957-), 女, 教授, 研究方向为生物化学。E-mail: zhanglanjeras@163.com

1.2.1 山葡萄籽和皮中 SOD-L 的提取

将山葡萄籽和皮洗净、烘干、粉碎,用 65% 的丙酮索氏提取 5h 后用乙酸乙酯萃取三次,合并萃取液,再经大孔吸附树脂 AB-8 进行分离纯化、减压浓缩、干燥,得粉末状 SOD-L。精密称取 SOD-L 50mg,用双蒸水配制质量浓度为 1mg/ml 水溶液待用。

1.2.2 山葡萄籽和皮中 SOD-L 活性的测定

原花青素 SOD-L 的测定采用连苯三酚自氧化法^[4],定义为:单位时间(min)内抑制连苯三酚自氧化速率为 50% 的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.2.1 连苯三酚自氧化速率的测定

取两支干燥、洁净的试管,一支为空白对照管,另一支为测定管,分别在两支试管中加入 pH 8.2, 50mmol/L Tris-HAc 缓冲液 3ml,混匀置于 25℃ 的恒温水浴中 20min,然后在测试管中加入 7μl 的连苯三酚,加入瞬间开始计时,用 U-1810 紫外可见分光光度计,测定波长 325nm,对照管调零,记录测定管的吸光度 A₀,换算 A₀=0.070/min,ΔA₀ 的值为每分钟连苯三酚自氧化速率的吸光度。

1.2.2.2 SOD-L 活性的测定

取两支试管加入 50mmol/L Tris-HAc 缓冲液 3ml,在测试管中加入精制的原花青素待测液 36μl,置于 25℃ 的恒温水浴中保温 20min,然后在测定管中加入 7μl 的连苯三酚,加入瞬间开始计时,对照管调零,记录测定管的吸光度 A₁,换算 A₁=0.034/min,ΔA₁ 的值为每分钟 SOD-L 吸光度。SOD-L 的活性按下式计算:

$$\text{SOD 活性(U/ml)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0 \times 50\%} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{加酶液体积}} \times \text{酶液稀释倍数}$$

$$\text{抑制率 S(\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100$$

式中:ΔA₀ 为连苯三酚的自氧化率;ΔA₁ 为加入待测液后连苯三酚的自氧化率。

2 结果与分析

2.1 山葡萄籽和皮中 SOD-L 的最大吸收光谱

肖付才等报道^[5]葡萄籽原花青素的最大吸收波长在 280nm 附近。将山葡萄籽、皮 SOD-L 稀释,测定其吸收光谱,其最大吸收峰都在 280nm,见图 1。同时将 SOD-L 置于酸性条件下加热可降解和氧化形成花色素(Bate-Smith 反应)^[5]可转化为红色的物质。因此判断此 SOD-L 的主要成分是原花青素,由香草醛一盐酸分光光度法测定,其原花青素的纯度达到 96%。

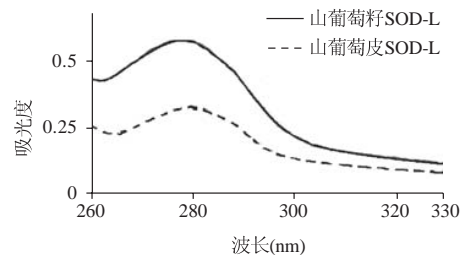


图1 山葡萄籽和皮中 SOD-L 的吸收光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectra of components with SOD-like activity in seeds and peels *Vitaceae amurensis*

2.2 检测波长的选择

在 3ml 的缓冲液中加入 7μl 连苯三酚,溶液由无色变成淡黄色,随后再变成淡绿色,最后转变为深黄色,经测定在 325nm 处有最大吸收峰,如图 2 所示。

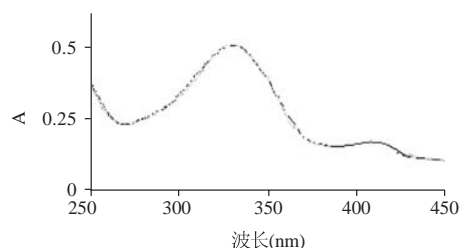


图2 连苯三酚 325nm 处吸收峰

Fig.2 Ultraviolet-visible absorption spectrum of phloroglucinol

图 2 表明,连苯三酚在 325nm 和 420nm 均有吸收峰,325nm 处的吸收峰随放置时间延长而迅速增高,24min 以后,吸收峰开始降低,420nm 处的吸收峰则是缓慢增高,这与连苯三酚自氧化生成的中间产物不断氧化有关。根据检测结果选择 325nm 和 420nm 作为测定波长,进行比较。结果表明:波长为 325nm 时,吸光度比较大。在 3ml 的缓冲液中加入山葡萄籽、皮素 SOD-L 溶液,然后再加入连苯三酚,经测定在 325nm 处仍有最大吸收峰,说明两种 SOD-L 的加入对最大吸收峰的波长没有改变,故可选择 325nm 为测定波长。

2.3 pH 值对 SOD-L 抑制率的影响

表 1 不同缓冲液 pH 值对 SOD-L 活性的影响

Table 1 Effects of different pH value of buffer system on SOD-like activities of proanthocyanidins in seeds and peels of *Vitaceae amurensis*

pH	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5
山葡萄籽 SOD-L 抑制率(%)	48	76	91	74	61	44
山葡萄皮 SOD-L 抑制率(%)	46	78	90	71	59	42

固定体系其他条件不变,仅改变缓冲溶液 pH 值进行实验,结果见表 1。SOD-L 对邻苯三酚自氧化的抑制

率随 pH 值的升高而先升高后降低, 当 pH8.2 时两种 SOD-L 对邻苯三酚自氧化的抑制率最高。根据动力学研究, 邻苯三酚自氧化速率随 pH 值的升高而增大, 从而使两种 SOD-L 对邻苯三酚自氧化的抑制率降低。但当 pH 值太低时, 邻苯三酚自氧化速率很低不便于准确读数, 另外原花色素本身在酸度过大或过小时都不稳定, 所以此实验选 pH8.2 作为缓冲液适宜的 pH 值。

2.4 缓冲液成分组成对原花色素 SOD-L 抑制率的影响
缓冲液成分组成较多, 如 Tris-HCl、Tris-H₃PO₄、巴比妥钠-HCl 等, 采用 Tris-HCl 者为多。实验在固定缓冲液的 pH 值及浓度保持不变的情况下, 采用不同成分组成的缓冲液进行对比较, 结果见表 2。

表2 缓冲液体系的影响

Table 2 Effects of different bufer systems on SOD-like activities of proanthocyanidins in seeds and peels of *Vitaceae amurensis*

缓冲液组成 (50mmol/L)	山葡萄籽 SOD-L 抑制率(%)	山葡萄皮 SOD-L 抑制率(%)
Tris-HCl	78	76
Tris-HCl(含 1mmol EDTA-2Na)	52	51
Tris-HAc	94	92
Tris-HAc(含 1mmol EDTA-2Na)	60	58

表3 山葡萄籽和皮中原花色素 SOD-L 活性的测定

Table 3 SOD-like activities of proanthocyanidins in seeds and peels *Vitaceae amurensis* under optimized determination conditions

种类	A ₀	A ₁	体积(μl)	SOD-L(U/ml)	SOD-L (U/g)
山葡萄籽	0.070	0.034	32	96.43	192.85
山葡萄皮	0.070	0.035	35	88.16	78.45

实验结果表明: 缓冲液成分的组成对体系的影响很大, 用醋酸代替盐酸可大大提高两种 SOD-L 对 O₂⁻ 的抑制率, 从而使体系的测活灵敏度大为提高。这个结果与文献[8]曾报道的 Cl⁻ 对原花色素有一定的抑制作用相一致。故实验选择 Tris-HAc 为缓冲液。很多金属离子

可以催化邻苯三酚自氧化, 加入 EDTA-2Na 可以掩蔽这些金属离子, 减少对体系的影响, 但此实验结果表明: 加入 EDTA-2Na 反而使两种 SOD-L 对邻苯三酚自氧化的抑制率降低, 所以在测定原花色素 SOD-L 活性时不宜加入 EDTA-2Na。

2.5 山葡萄籽和皮中原花色素 SOD-L 活性的测定结果

按 1.2.2 的方法, 测定了山葡萄籽和皮中原花色素的 SOD-L 的活性, 山葡萄籽 SOD-L 活力为 192.85U/g, 山葡萄皮 SOD-L 活力为 78.45U/g, 结果见表 3。

3 结 论

山葡萄籽、皮 SOD-L 活性测定选择的条件为: 测定波长为 325nm, 缓冲液体系为 Tris-HAc, 浓度为 50mmol/L, pH8.2; 温度为 25℃。在该体系的测定结果中山葡萄籽 SOD-L 活力为 192.85U/g, 山葡萄皮 SOD-L 活力为 78.45U/g。采用这种改良的测定原花色素 SOD-L 活性的体系, 结果较稳定, 实验批内变异系数为 4.73%(n=6), 批间变异系数为 5.19%(n=3), 测定结果比较稳定。

参考文献:

- [1] MCCORD J M, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte[J]. J Biol Chem, 1969, 244: 6049-6055.
- [2] 吕丽爽, 曹栋. 薄层色谱法分离葡萄籽中的低聚原花色素[J]. 无锡轻工业大学学报, 2001, 20 (1): 65-67.
- [3] 邹国林, 胡文玉, 邱涛, 等. 几种超氧化物歧化酶测定方法灵敏度的研究[J]. 武汉大学学报, 1997, 43(2): 233-237.
- [4] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-219.
- [5] 肖付才, 李华, 王华. 葡萄籽原花色素的提取和检测方法[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(06): 165-168.
- [6] HASLMAM E. Plant polyphenols[M]. Cambridge University Press, 1989: 14-15.
- [7] 张宏, 谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报, 2002, 33(6): 677-681.
- [8] 许申鸿, 杭瑚, 李运平. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进[J]. 化学通报, 2001, 64(8): 516-519.