

菹草类胡萝卜素体外抗氧化活性的研究

任丹丹¹, 彭光华¹, 王海滨^{1, 2}, 张声华¹

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;

2. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 菹草类胡萝卜素是红心鸭蛋中红色素的天然来源。本文用 D-脱氧核糖法研究菹草类胡萝卜素清除 $\cdot\text{OH}$ 的效果, 用硫代巴比妥酸法测定小鼠肝组织及肝线粒体中丙二醛含量, 用分光光度法测定小鼠红细胞溶血和肝线粒体肿胀程度, 从而研究类胡萝卜素的抗氧化效果。结果表明: 菹草类胡萝卜素可以清除 $\cdot\text{OH}$, 抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致丙二醛的产生, 减少红细胞溶血, 减轻肝线粒体肿胀程度。可以得出菹草类胡萝卜素具有明显的抗氧化的作用。

关键词: 菹草; 类胡萝卜素; 羟基自由基; 抗氧化

Study on Antioxidative Effects of Carotenoids Extracted from *Potamogeton crispus* L. in Vitro

REN Dan-dan¹, PENG Guang-hua¹, WANG Hai-bin^{1,2}, ZHANG Sheng-hua¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Carotenoids in *Potamogeton crispus* L. is a natural source of the red pigment in the red yolk of duck eggs. The scavenging effect of Carotenoids in *Potamogeton crispus* L. on hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) was studied by D-deoxyribose method. To study the anti-oxidative effect of Carotenoids in *Potamogeton crispus* L. the contents of MDA in tissue of liver and mitochondria of liver were studied by TBA assay *in vitro*, and the hemolysis extent of red blood cells and the swelling extent of mitochondria of liver were also detected by spectrophotometric methods. The result showed that Carotenoids in *Potamogeton crispus* L. had the $\cdot\text{OH}$ scavenging activity. It could inhibit the generation of MDA, the swelling of mitochondria, and the hemolysis of red blood cells. The conclusion was that Carotenoids in *Potamogeton crispus* L. could have the effect of anti-oxidation.

Key words: *Potamogeton crispus* L.; carotenoids; hydroxyl radical; anti-oxidation

收稿日期: 2004-02-26

基金项目: 国家博士点基金资助项目(20020504008)

作者简介: 任丹丹(1980-), 女, 在读博士, 研究方向为功能食品及其分子生物学基础。

具有一定的抑制作用, 并且随用量的增加其清除率逐渐上升, 二者呈正相关。POL II 和 POL III 对 $\text{O}_2\cdot$ 几乎没有清除作用。

对马齿苋多糖结构的进一步阐明及其它方面的生物活性有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李俊, 韩向晖, 李仲洪, 等. 花菱多糖的提取及含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(2): 49-50.
- [2] 方积年, 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定[J]. 药学通报, 1984, 19(10): 46-49.

- [3] 任金山, 吴梧桐, 李颖, 等. 花粉多糖的分离纯化及其组成单糖分析[J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(3): 173-175.
- [4] 陶乐平, 丁在富. 气相色谱在多糖结构测定中的应用[J]. 色谱, 1994, 12(5): 351-354.
- [5] 张林维, 当归水溶性多糖级分 As-III a 和 As-III b 的纯化鉴定与结构研究[J]. 激光生物学报, 1999, 8(2): 123-126.
- [6] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [7] 肖华山, 何文锡, 傅文庆, 等. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 180-183.

中图分类号: R151.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)03-0228-04

菹草(*Potamogeton crispus* L.)是眼子菜科多年生沉水维管束植物,它广泛分布于江河、湖沼、水库、渠沟、池塘和沼泽等处。它的营养十分丰富,现广泛用于畜禽鱼的优质饲料。在湖北的仙桃、洪湖等蛋鸭饲养地区,发现蛋鸭采食菹草后能产下优质的红心鸭蛋,这种红心蛋蛋黄因呈现独特绚丽的天然红色而备受消费者青睐。实验证明菹草类胡萝卜素是红心鸭蛋中红色素的主要来源^[1]。类胡萝卜素不仅是重要的天然色素,而且因其具有重要的生理活性得到了人们的重视,寻找富含类胡萝卜素的生物资源一直是研究的热点。经研究表明,菹草中类胡萝卜素的含量较高,与类胡萝卜素含量较高的果蔬相当,例如番茄中类胡萝卜素的含量约为1.2~3.7mg/100g鲜重,南瓜中类胡萝卜素的含量约为2.3mg/100g鲜重^[2],而菹草中类胡萝卜素的含量约为2.1mg/100g鲜重。菹草的分布广泛,且其中含有特殊的红色素,经本实验研究表明该红色素具有较强的抗癌^[3],降血脂功效。由此可见菹草类胡萝卜素的应用与开发的重要性。

关于菹草中类胡萝卜素抗氧化活性系统的研究尚未见到报道。为了对菹草类胡萝卜素进一步开发及应用,探讨其活性的作用机制,作者对其体外抗氧化作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菹草:鲜菹草采于湖北仙桃,经中科院武汉植物研究所鉴定为眼子菜科植物菹草 *Potamogeton crispus* L.;实验动物为昆明种小白鼠,雌雄各半,体重22±2g,由湖北省卫生防疫站提供。

1.2 化学试剂

D-脱氧核糖 Sigma Co.; TBA 中国医药集团上海化学试剂公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 实验仪器

752紫外分光光度计 上海分析仪器总厂;电子恒温水浴锅 深圳国华仪器厂;Beckman L8-80离心机;飞鸽牌 TDL-5-A型离心机 上海安亭科学医学仪器厂。

1.4 实验方法

1.4.1 菹草类胡萝卜素的提取

鲜菹草适量,加少量碳酸钠和BHT,在组织捣碎机中用石油醚-丙酮(1:1, V/V)提取,将提取液转入分液漏斗并加蒸馏水洗涤去掉丙酮层,将石油醚层用无水硫酸钠干燥、过滤,滤液在40℃以下减压浓缩蒸发至

干,即得菹草色素提取物,用适量石油醚溶解,加40%氢氧化钾-甲醇溶液充氮并置暗处于室温下皂化12h,将皂化液转于分液漏斗用蒸馏水洗涤,弃去下层,将上层(石油醚层)用蒸馏水洗至中性,并用无水硫酸钠干燥,过滤、滤液在40℃以下减压浓缩蒸发至干,即得菹草类胡萝卜素(Carotenoids Extracts from *Potamogeton crispus* L. 简称CEPC)。将其用无水乙醇溶解备用。类胡萝卜素的定量按文献^[2]的方法测定,总类胡萝卜素含量(mg)=A450×总体积(ml)×稀释倍数×10÷2500。

1.4.2 类胡萝卜素清除·OH效果

D-脱氧核糖法^[4] 由羟自由基诱导脱氧核糖降解产生的MDA的量来测定·OH的量,以[对照组-(样品组-空白组)]/对照组×100%计算·OH的清除率。

1.4.3 对H₂O₂所致的红细胞氧化溶血的影响^[5]

小鼠眼眶取血,肝素抗凝,2000r/min离心分离得红细胞,冷生理盐水洗涤三次,直至上层澄清无红色,制成0.5%悬浮液。取红细胞悬液4ml,加入不同浓度的样品0.5ml,最后加60mmol/L的H₂O₂ 0.4ml启动反应,37℃温育1h后,2500r/min离心10min,415nm处测定吸光度,以H₂O₂+红细胞为对照组,同时设正常红细胞组。

1.4.4 对H₂O₂诱导肝匀浆脂质过氧化的影响^[6]

取小鼠的肝组织,用冷的生理盐水洗净后冰浴下匀浆,制成1%的悬浮液。取1%肝匀浆1ml,加入不同浓度的样品0.2ml,再加入6mmol/L FeSO₄ 0.1ml,60mmol/L H₂O₂ 0.1ml,对照组加0.2ml的无水乙醇,37℃温育1h后,加入15%三氯乙酸1ml,终止反应,以3000r/min离心10min,取上清液,加0.67%硫代巴比妥酸1ml后,沸水浴15min,流水冷却,测定532nm处的吸光值。

1.4.5 对VC-Fe²⁺系统诱导肝线粒体肿胀度的影响^{[6][9]}

取肝组织在冰浴下以0.25mol/L蔗糖制成10%匀浆,3000r/min 4℃离心20min,沉淀用冷的0.25mol/L蔗糖洗两次,合并上清液,10000r/min 4℃离心20min,沉淀用冷的0.25mol/L蔗糖洗两次,合并沉淀。所得沉淀即为线粒体。将新鲜制备的线粒体用0.02mol/L pH7.4的tris-HCl溶液配成吸光度为0.7~0.8的溶液,取线粒体1.2ml,依次加入0.2ml的样品,0.2ml的42.5μmol/L FeSO₄和0.1ml的0.85mmol/L VC,在520nm处测吸光值,每隔20min测一次,观察吸光值下降的程度。

1.4.6 对VC-Fe²⁺系统诱导肝线粒体脂质过氧化的影响^[8]:线粒体1ml,依次加入0.2ml的样品,0.1ml的0.2mol/L pH7.4 tris-HCl缓冲溶液,0.05ml 3.5mol/L的KCl溶液,0.2ml的5mmol/L FeSO₄和0.1ml的10mmol/L VC,

37℃温育 1h 后取出测 MDA。

1.5 数据处理

每次实验均设三个平行管,取平均值为一次实验数据,实验重复三次,由 SAS 软件处理数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示结果。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素对 ·OH 清除作用

表 1 不同浓度的 CEPC 对 ·OH 的清除作用
Table 1 The scavenging effect of CEPC on ·OH (n=3 $\bar{x} \pm s$)

浓度 Conc. (μg/ml)	A ₅₃₂	清除率 Scavenging rate (%)
Control	0.999 ± 0.046	—
0.5	0.750 ± 0.010 ^a	24.92
1	0.646 ± 0.012 ^a	35.34
5	0.354 ± 0.013 ^a	64.56
10	0.155 ± 0.012 ^a	84.48

a:p < 0.001,vs control.

表 1 的结果表明,不同浓度的苋菜类胡萝卜素对 ·OH 均有清除作用,并且随着浓度的增加,其清除 ·OH 的作用增强。类胡萝卜素分子中含有多个共轭多烯双键,可使具有高度氧化性的自由基还原,从而终止自由基的连锁反应,起到清除自由基的目的。

2.2 对 H₂O₂ 所致的红细胞氧化溶血的影响

表 2 CEPC 对 H₂O₂ 所致的红细胞氧化溶血的影响
Table 2 Effect of CEPC on RBC hemolysis induced by H₂O₂ (n=3 $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Conc. (μg/ml)	A ₄₁₅	溶血率 Hemolysis(%)
Normal	—	0.193 ± 0.013	14.14
Control	—	1.365 ± 0.099 ^a	100
CEPC	0.2	1.344 ± 0.052	98.46
	0.4	0.947 ± 0.080 ^b	69.38
	1.0	0.728 ± 0.074 ^b	53.33
	1.5	0.544 ± 0.068 ^b	39.85
	2.0	0.522 ± 0.054 ^b	38.24

a:p < 0.001,vs normal; b:p < 0.001 c: p < 0.01, vs control.

加入 H₂O₂ 后红细胞溶血量显著高于正常组,说明 H₂O₂ 使红细胞膜受氧化而损伤,胞内容物外流,CEPC 可显著抑制溶血的发生,结果见表 2。表明 CEPC 可抑制红细胞的氧化损伤,保护红细胞膜,且呈良好的剂量效应关系。这种效应可能与类胡萝卜素对羟自由基的清除作用有关。

2.3 对 H₂O₂ 诱导肝匀浆脂质过氧化的影响

表 3 中,对照组与正常组相比,丙二醛生成量(A_{532nm} 值)显著增加,说明 ·OH 可促使小鼠肝线粒体脂质过氧化反应。剂量各组丙二醛生成量与对照组相比显著降低,说明 CEPC 可抑制 ·OH 所致小鼠肝线粒体脂质过氧化,且抑制率随浓度的增加而提高。

表 3 CEPC 对 H₂O₂ 诱导肝匀浆脂质过氧化
Table 3 Effect of CEPC on lipid peroxidation in liver homogenate by H₂O₂ (n=3 $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Conc. (μg/ml)	A ₅₃₂	抑制率 Inhibition rate(%)
Normal	—	0.318 ± 0.005 ^a	—
Control	—	1.156 ± 0.049	—
CEPC	7.5	1.064 ± 0.008	22.32
	10.0	0.757 ± 0.014 ^a	51.73
	12.5	0.600 ± 0.013 ^a	66.96
	15.0	0.454 ± 0.009 ^a	78.98
	20.0	0.330 ± 0.004 ^a	93.68

a:p < 0.001, vs control.

2.4 对 VC — FeSO₄ 系统诱导肝线粒体肿胀度的影响

随着时间的延长各组在 520nm 吸光值下降,见图 1,说明线粒体膜被氧化损伤而发生了肿胀,其中对照组下降幅度最大,说明 ·OH 诱导加速了氧化损伤,肿胀严重。加 CEPC 组与对照组相比下降趋势减缓,表明 CEPC 可抑制 ·OH 所致氧化损伤程度,肿胀减轻。而且 CEPC 高浓度组损伤程度低于低浓度组,这表明 CEPC 作用效果呈剂量效应关系。

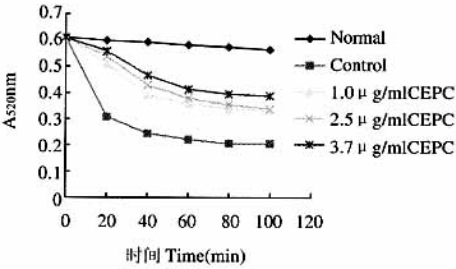


图 1 CEPC 对 VC — FeSO₄ 系统诱导肝线粒体肿胀度的影响
(此表中的各点数据为平均值)

Fig.1 Effect of CEPC on liver mitochondria swelling induced by VC — FeSO₄

2.5 对 VC — FeSO₄ 系统诱导肝线粒体脂质过氧化的影响

实验结果(表 4)表明,CEPC 能显著抑制 VC — FeSO₄ 系统诱导肝线粒体脂质过氧化产物丙二醛的生成,而且具有较好的剂量效应关系。高剂量的 CEPC 对线粒体膜有较好的保护作用。

表 4 CEPC 对 VC — FeSO₄ 系统诱导肝线粒体脂质过氧化的影响
Table 4 Effect of CEPC on lipid peroxidation in liver mitochondria by VC — FeSO₄(n=3 $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	浓度 Conc. (μg/ml)	A ₅₃₂	抑制率 Inhibition rate(%)
Normal	—	0.105 ± 0.004 ^a	—
Control	—	0.628 ± 0.028	—
CEPC	1.5	0.597 ± 0.004	4.94
	2.5	0.472 ± 0.006 ^a	24.84
	4.0	0.399 ± 0.013 ^a	36.46
	5.0	0.288 ± 0.006 ^a	54.14
	8.0	0.130 ± 0.002 ^a	79.30

a:p<0.001, vs control.

3 讨论

生物膜对机体细胞具有重要的防御功能。当机体中自由基过量时, 自由基与机体内的生物膜中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 产生丙二醛和过氧化脂质, 从而导致生物膜(如线粒体膜细胞膜等)的破损或通透性增加。膜内容物外流造成红细胞溶血和线粒体肿胀等现象的发生。本实验证明苎草类胡萝卜素能够清除羟自由基, 抑制由羟自由基引起的脂质过氧化, 保护生物膜, 减少红细胞溶血, 减轻肝线粒体肿胀程度。目前, 国内外学者正积极寻找具有清除自由基和抗脂质过氧化功能的有效药物。本实验说明苎草有可能作为保健品或新药材来开发利用。

参考文献:

- [1] 王海滨, 彭光华, 刘良忠, 等. 苎草类胡萝卜素的研究——苎草与红心鸭蛋类胡萝卜素特性的初步比较[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 41-45.
- [2] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [3] 刘良忠, 张民, 等. 天然红心鸭蛋中的类胡萝卜素及对 S₁₈₀ 肿瘤抑制作用的初步研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 133-136.
- [4] Barry Halliwell, et al. The deoxyribose method: A simple of "Test — Tube" assay for detennination of rate constant for reactions hydroxyl radicals[J]. Analytical Biochemist, 1987, 165: 215-219.
- [5] 田京伟, 杨建雄. 白藜芦醇苷的体外抗氧化活性[J]. 中草药, 2001, 32(10): 918-920.
- [6] 王建华, 张民, 等. 枸杞多糖-1 对羟自由基所致小鼠肝线粒体损伤的作用[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(10): 669-672.
- [7] 王建华, 张民, 等. 枸杞多糖-2 的抗羟基自由基氧化作用[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 11-13.
- [8] 龚国清, 刘同征, 李立文, 等. 西红花酸的体外抗氧化作用的研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(4): 306-309.
- [9] 杨建雄, 朱淑云, 等. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 120-123.
- [10] Yenhun He, Fereidoon Shahidi. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 4262-4265.
- [11] 吴广枫, 汤坚. 芦荟多糖的纯化与体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 129-132.
- [12] 王庆利, 林茂, 等. 异丹叶大黄素的体外抗氧化作用[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(12): 810-814.
- [13] 李志孝, 黄成钢. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学报, 2000, 35(5): 358-362.
- [14] 李忠. 枸杞子类胡萝卜素化学及抗氧化作用研究[D]. 华中农业大学 1998 届博士学位论文.

信息

日本如何开发婴幼儿辅助食品

日本近年来出生率呈现微减的趋势, 但婴儿食品市场并不因婴儿数所减少, 反而有逐年增长的态势。依据出生数与婴儿食品供给量的统计数字来看, 每一婴儿一年所消费的婴儿食品为 8.3 公斤(干物未换算成湿物重), 1988 年比 1997 年增长 2.3 倍。日本政府将颁布已达 16 年之久的《婴幼儿辅助食品的基本》进行修订, 把婴幼儿辅助食品的结束期由 12 个月延长至 15 个月(最长 18 个月)。同时, 在《婴幼儿辅助食品的基本》改订版中, 对于婴幼儿食品的使用方法也有详细记载, 尤其是在给母亲们的育儿及辅助食品的指导中, 对于婴幼儿食品的正确使用方法更有详尽的说明。婴儿食品必须比一般食品更安全。在开发的阶段, 厂商对于原料、容器的选择慎重, 甚至对于制造工艺以及保存、流通期间可能发生的危害都充分加以分析。美味: 除了安全性外, 婴儿食品的味道也是非常重要的因素。研究表明, 婴幼儿期间的饮食习惯对于今后的味觉形成有很大影响, 因此, 必须采用清淡的或刺激性较小等适合婴儿食用的柔和调味。此外, 在一般加工食品中添加的味精及其他食品添加剂均不能使用。不能依靠盐分或调味料来呈现美味的部分, 应选定或配合可充分展现风味的原料以及考究的制作方法来弥补。换言之, 婴幼儿辅助食品与一般加工的食品具有完全不同的调味方法。质感: 婴幼儿期是形成咀嚼机能的重要时期, 对于各断奶阶段有不同程度的物性需求, 所以在产品开发阶段, 首先对于原料的大小、硬度以及整体之黏度必须加以考虑与研究; 进而在营养补给源上, 将各项成分的平衡及消化吸收列入分析, 务必使开发出来的商品能符合断奶期婴儿的营养需求。目前市场上强化钙、铁等含量的产品, 得到了消费者的好评。由于社会环境的改变, 婴儿及幼儿食品市场的前景非常看好。今后除重视安全性、美味与简便性外, 更应重视其机能性的改善。而在提高品质的同时, 又如何不影响成本, 也是厂商面对的重要课题。