

文章编号 :1009-038X(2002)05-0439-04

米糠中 γ -谷维醇抗氧化功能与分子结构的关系

龚院生, 姚惠源

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:通过实验和理论分析,对 γ -谷维醇和其水解产物——阿魏酸、三萜醇的抗氧化特性进行了研究。 γ -谷维醇的抗氧化及清除自由基的能力,主要来自于阿魏酸基团。阿魏酸基团之所以具有抗氧化能力,是因为其结构中的酚羟基和共轭体系能够形成较稳定的自由基,并阻止自动氧化过程中自由基的链式传递,从而表现出抗氧化功能。

关键词:抗氧化;清除自由基; γ -谷维醇;阿魏酸;分子结构

中图分类号:Q 946.48

文献标识码:A

The Relationship Between the Antioxidative Function of γ -Oryzanol and Its Molecular Structure

GONG Yuan-sheng, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The antioxidative properties of γ -oryzanol and its hydrolysates, i. e. ferulic acid and triterpene alcohol, were studied through experiments and theoretical analysis. The antioxidative properties and radical scavenging activity of γ -oryzanol were attributed to its ferulic acid residue. Ferulic acid includes a phenol hydroxyl group and a stable conjugated system, which increases stability of radical. That is why γ -Oryzanol can stop the chain-transporting of radical in the autoxidation process. Therefore, it is a good chain-breaking antioxidant.

Key words: antioxidation; radical scavenging; γ -Oryzanol; ferulic acid; molecular structure

γ -谷维醇是米糠中存在的微量生物活性物质。 γ -谷维醇具有降血脂^[1,2]、抗氧化^[3]、抗衰老、去自由基^[4]等功能作用。

物质的功能特性与其分子结构之间存在着密切的关系。性质是物质内在结构的表征。自然界中存在的具有抗氧化特性的物质中,其分子结构中都存在酚羟基、共轭体系等抗氧化基团。如合成的抗氧化剂 BHA、BHT、TBHQ 等都是酚类化合物,与此相似,大多数具有抗氧化活性的天然抗氧化剂也都

是酚类化合物。他们的抗氧化活性与其分子结构中芳香环上电子的分散性以及芳香环上的取代基团的结构和性能密切相关^[5]。正是由于所述功能基团的存在,才使得这些物质具有抗氧化特性。

γ -谷维醇的分子结构中存在阿魏酸基团,阿魏酸基团中的酚羟基和共轭体系具有抗氧化活性,这可能是 γ -谷维醇具有抗氧化生理功能的本质所在。作者在对 γ -谷维醇的抗氧化特性进行研究的基础上,对其分子结构与功能特性的关系进行探讨,以

收稿日期 2001-05-10; 修订日期 2002-06-22.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A03)资助课题.

作者简介:龚院生(1962-),男,河南项城人,工学博士,副教授.

期对 γ -谷维醇的抗氧化、抗衰老等作用的机理有所了解.

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 主要材料 阿魏酸、鲁米诺(FLUKA Switzerland) 甘油、硫代巴比妥酸(TBA)均为化学纯 ,甲醇、氯仿、无水乙醇、三氯乙酸、硫酸铜、无水硫酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、浓盐酸、乙二胺四乙酸钠、邻苯三酚、过氧化氢、邻菲罗啉和抗坏血酸均为分析纯 γ -谷维醇 实验室层析制备 阿魏酸、三萜醇 实验室水解制备 ;TBA 试剂 :TBA 0.5% ,三氯乙酸 15% ,溶于蒸馏水中 ,质脂体 粉末大豆磷脂于蒸馏水中配成质量浓度为 0.8% 的溶液 ,经超声波处理 30 min 形成均匀的乳状液.

1.1.2 主要仪器设备 ZFA-1 型旋转蒸发仪 ,上海玻璃仪器二厂制造 ;UV-1100 型紫外可见分光光度计 ,北京瑞利仪器公司制造 ;VCX4000 型超声波振荡器 ,美国产品.

1.2 方法

米糠中提取的 γ -谷维醇经溶剂纯化后 ,进行水解处理 ,经过碱水解、溶剂萃取、干燥等过程 ,得到环木菠萝醇混合物和阿魏酸^[3]. 抗脂质过氧化试验参照参考文献 [3] 所述试验方法进行(234 nm 紫外测定和 TBA 法测定). 清除自由基试验参照参考文献 [6,7,8] 所述试验方法进行(化学发光法).

2 结果与讨论

2.1 γ -谷维醇的水解

γ -谷维醇是三萜醇、甾醇的阿魏酸酯 ,比较难水解.但在 10% 氢氧化钠、加热(80 $^{\circ}\text{C}$)情况下 ,回流 0.5 h 以上 ,可被水解.为保证水解完全 ,回流时间达 3 h. 水解产物混合醇和阿魏酸的紫外扫描光谱有较大不同.见图 1 ,图 2.

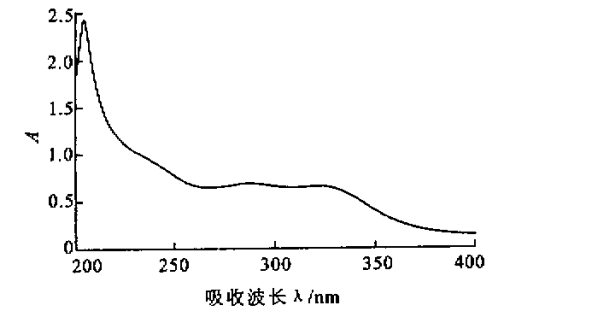


图 1 混合三萜醇的紫外扫描光谱

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the mixture of triterpenols

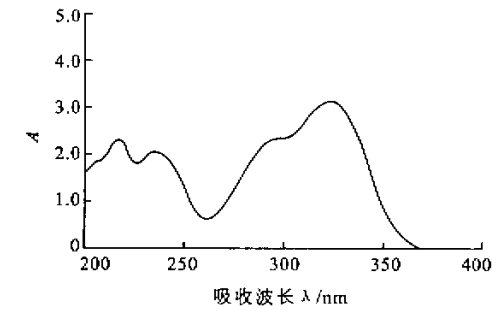


图 2 阿魏酸紫外扫描光谱

Fig.2 Ultraviolet absorption spectrum of ferulic acid

2.2 抗脂质过氧化

对 γ -谷维醇水解产物阿魏酸(FA)和混合醇(MTA)与 VE 的抗脂质氧化能力进行对照. 234 nm 紫外测定结果见表 1 和图 3. TBA 法测定结果如表 2 和图 4 所示.

表 1 234 nm 测定抗氧化抑制率(浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$)

Tab.1 Antioxidant inhibition(%)determined under 234 nm (100 $\mu\text{mol/L}$)

抗氧化剂	抑制率/ %
MTA	17.0
阿魏酸	80.8
VE	50.2

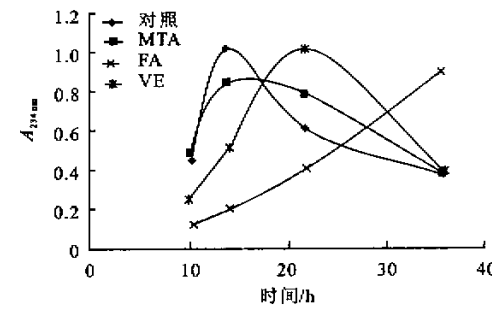


图 3 抗氧化能力的比较(紫外 234 nm)

Fig.3 Comparison of antioxidant activity(234 nm)

由图 3 可以看出 ,混合醇峰值与对照相近 ,VE 出现较晚 ,而阿魏酸在测定时间内还未出现峰值 ,说明阿魏酸的抗脂质体氧化的能力较强(抑制率 80.8%).

由图 4 可以看出 ,阿魏酸的抗氧化能力强于 VE ,抗氧化抑制率分别为 76.5% 和 40.1% ,而混合醇的抗氧化能力较弱 ,抑制率为 14.6% .试验结果表明 ,阿魏酸作为 γ -谷维醇的组成部分 ,是 γ -谷维醇抗氧化作用的关键基团 ,而三萜醇的抗氧化贡献很小.

表 2 TBA 法测定(22 h)抗氧化抑制率
Tab. 2 Antioxidant inhibition (%) determined by TBA method (22 h)

抗氧化剂	抑制率/%
MTA	14.6
阿魏酸	76.5
VE	40.1

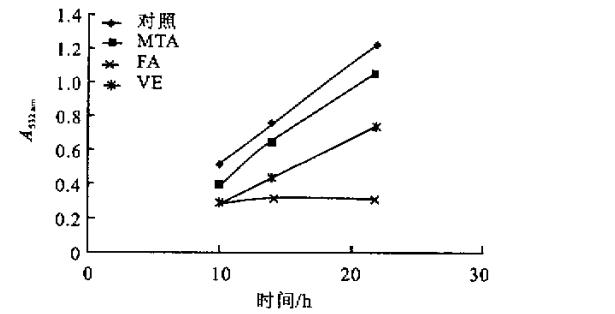


图 4 抗氧化能力的比较(TBA 吸光度)
Fig.4 Comparison of antioxidant activity(TBA)

2.3 清除自由基实验结果

2.3.1 超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除

实验结果如表 3 和图 5 所示。 γ -谷维醇(γ -OZ)具有一定的清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的功能,而阿魏酸则表现出很强的清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的能力,说明 γ -谷维醇清除自由基的能力主要是由于分子中的阿魏酸基的作用。

表 3 各组分清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的 IC_{50}^*
Tab.3 IC_{50} of [$O_2^{\cdot-}$] radical scavenging

物 质	半抑制浓度 $IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$
γ -OZ	0.778
FA	0.530
MTA	9.373

* 注:半抑制浓度 IC_{50} 的计算是按抑制率曲线的直线部分 经回归计算而得。

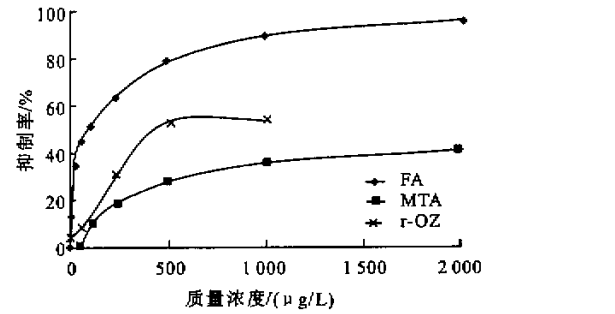


图 5 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基发光抑制率曲线
Fig.5 Chemiluminescence inhibition of [$O_2^{\cdot-}$] radical scavenging

在清除超氧阴离子自由基方面, γ -谷维醇具有一定的清除能力,但在本试验条件下,浓度过高时,会出现沉淀,影响其清除效果,清除率反而下降(见图 5),而阿魏酸表现出很强的清除能力,发光抑制率可达 96% 以上。混合三萜醇有较弱的清除能力,抑制率为 40% 左右。从半抑制浓度看,混合三萜醇清除能力很低。

2.3.2 羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除

阿魏酸在清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基方面同样表现出较强的清除能力,结果见表 4 和图 6。

表 4 各物质清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的 IC_{50}^*
Tab.4 IC_{50} of [$\cdot\text{OH}$] radical scavenging

物 质	半抑制浓度 $IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$
γ -OZ	0.277
FA	0.283
MTA	0.722

注:半抑制浓度 IC_{50} 的计算是按抑制率曲线的直线部分,经回归计算而得。

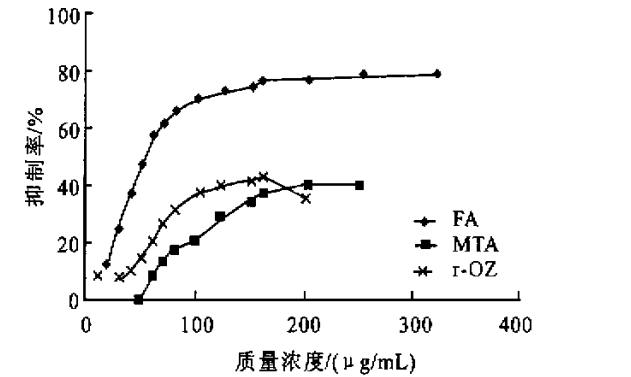


图 6 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基发光抑制率曲线
Fig.6 Chemiluminescence inhibition of [$\cdot\text{OH}$] radical scavenging

从图 6 可见,阿魏酸清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力较强,抑制率接近 80%,而混合三萜醇较弱,抑制率 40% 左右。从表 4 半抑制浓度看,阿魏酸和 γ -谷维醇相近。但由于在实验条件下, γ -谷维醇的浓度提高会出现沉淀,因此,当其清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基抑制率达到 43.2% 后,若再提高浓度,抑制率反而下降。

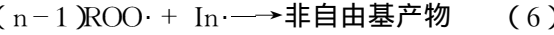
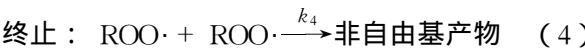
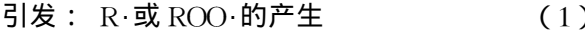
从半抑制浓度分析,阿魏酸因其本身的结构特性及良好的水溶性,表现出强的清除超氧阴离子和羟基自由基的能力。三萜醇则表现出较弱的清除自由基的能力,相对来说,三萜醇清除羟基自由基的能力(IC_{50} 为 $0.722 \mu\text{mol/L}$)强于清除超氧阴离子自由基的能力(IC_{50} 为 $9.373 \mu\text{mol/L}$)。

2.4 分子结构与抗氧化作用的关系

实验结果表明, γ -谷维醇具有抗氧化和清除自由基的功能, 这一点通过动物实验得到了证实^[4]. 同时, 通过实验还证实了 γ -谷维醇的抗氧化能力主要来自分子中的阿魏酸基团. 以下就阿魏酸基团与其抗氧化能力的关系进行探讨.

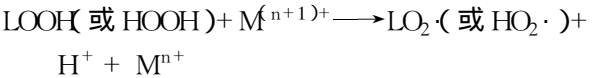
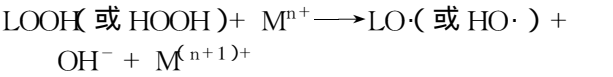
2.4.1 脂质氧化的一般机理

普遍被接受的脂质氧化的机理是自由基参与脂质自动氧化过程. 它可以被描述为如下所示的自由基链式传递过程. 首先是自由基的引发. 由有机物 (RH) 自动氧化产生(或由自由基引发物产生)^[9].



式中: $ROO\cdot$ 是过氧化自由基; InH 为抗氧化剂; $ROOH$ 是氧化产生的氢过氧化物, 它可以分解产生自由基, 也可以分解产生小分子醛、酮化合物; $ROOH$ 在 234 nm 紫外光下有强吸收峰, 可以通过测定它在 234 nm 的吸光度来判断氧化程度.

脂质自动氧化自由基的引发可以有多种情况, 如受自由基的攻击, 受紫外光的照射, 热、辐射或金属离子作用等. 金属离子尤其是过渡金属离子如铁、铜离子, 可以催化产生自由基:



大多数的有机物自动氧化产生氢过氧化物(3a 反应), 但一些多不饱和烯烃产生聚过氧化物(3b 反应). 在有抗氧化剂存在时, 链式反应发生(5)(6)的终止自由基反应. n 表示抗氧化剂捕获自由基因子. 在无抗氧化剂存在时, 脂质自动氧化的反应速率可表示为溶液中氧含量的减少速度, 以下式表示:

$$\frac{-d[O_2]}{dt} = \frac{k_3[RH][R_i]^{1/2}}{(2k_4)^{1/2}} \quad (I)$$

在有抗氧化剂存在时, 脂质自动氧化的反应速率可表示为:

$$\frac{-d[O_2]}{dt} = \frac{k_3[RH][R_i]}{k_{inh}[InH]} \quad (II)$$

由反应速率等式(II)可以看出, 脂质自动氧化的反应速率与氢过氧化物形成的速度常数成正比, 与自由基引发速度 R_i 成正比, 而与抗氧化剂捕获自由基因子 n 、抗氧化剂自由基 $In\cdot$ 的形成速度常数 k_{inh} 成反比^[9]. 由此可以看出, 对于抗氧化剂来说, 其形成的 $In\cdot$ 越稳定, k_{inh} 就越大, 抗氧化能力就越强^[10]. 而 $In\cdot$ 的稳定性取决于分子结构中是否具有分散自由基电子的能力.

2.4.2 γ -谷维醇和阿魏酸的分子结构与其抗氧化功能

一般的抗氧化剂分子都存在酚羟基/共轭双键, 在脂质自动氧化过程中, 起到终止自由基链式传递的作用(抗氧化能力的大小主要取决于 k_{inh} 的大小, 取决于 $In\cdot$ 的稳定性, 即与其分子结构有关). 由此可以分析, γ -谷维醇和阿魏酸之所以具有抗氧化能力, 就是因为其分子中的酚羟基是一个容易形成自由基的基团, 而且, 在 γ -谷维醇和阿魏酸分子中可以形成一个大的共轭体系, 使得自由基电子较为分散而比较稳定, 见图 7.

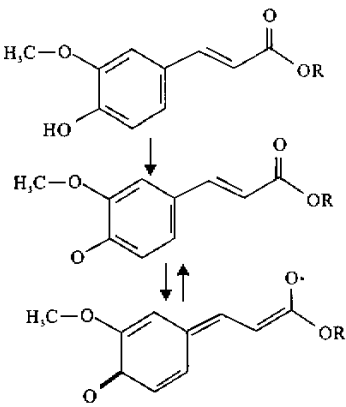


图 7 阿魏酸自由基示意图

Fig. 7 Structural formula of ferulic acid Radical

在参与抗氧化过程中, 反应(5)的 k_{inh} 比较大, 使整个脂质氧化反应的速度减小而起到抗脂质氧化的作用. 相比之下, 三萜醇和甾醇的抗氧化能力很弱. 这已经在实验中得到证实(见表 1 和表 2).

3 结 论

通过水解、抗脂质氧化以及清除自由基实验, 证实了 γ -谷维醇的抗氧化能力主要来自于其分子中的阿魏酸基团, 而其分子中的三萜醇和甾醇对抗氧化能力的贡献很小. 分析可知, 阿魏酸基团表现出较强的抗氧化能力, 是由于其共轭体系能够形成较为稳定的自由基, 在脂质自动氧化过程中起到终止自由基链式传递的作用. (下转第 451 页)

从图 9 ,10 结果可以看出 ,在同一种酶——脂肪酶 SSW 催化条件下 ,3 种中碳酸与甘油酯化反应的转化率随反应时间的变化规律相似 ,无论是达到反应平衡的时间 ,还是反应结束(10 h)时 ,酸的总转化率都只是稍有或几无差异 .实验结果表明 ,实验中所选脂肪酶 SSW 对辛酸、癸酸以及混合中碳酸没有基质特异选择性差别 ,催化性能也没有表现出显著不同 .

3 结 论

根据中碳酸转化率的大小对 5 种不同来源的

固定化脂肪酶进行筛选 ,其中固定化脂肪酶 SSW 的酶催化转化率最高 ,辛酸和癸酸转化率分别为 91.5% ,93.5% .对脂肪酶 SSW 酶促合成甘油辛酸偏酯的反应条件的研究表明 ,适宜反应条件为 :在敞口反应器中 ,反应温度 55 ℃、加酶量 100 U/g、辛酸/甘油投料摩尔比为 1:1.1、甘油初始加水量 4% .实验范围内中碳酸品种对脂肪酶 SSW 不显示基质特异性 .

参考文献 :

[1] KIM S M , RHEE J S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system[J]. *J Am Oil Chem Soc* , 1991 , 68 :499 – 503.

[2] BABAYAN V K. Medium-chain length fatty acid esters and their medical and nutritional applications[J]. *J Am Oil Chem Soc* , 1981 , 58 :49 – 51.

[3] 田桂玲 ,邢国文 ,叶蕴华 .在非水介质中进行酶促反应的几个重要问题[J]. *有机化学* ,1998 ,18 :11 – 19.

[4] 曹宗顺 ,卢凤琦 .高碘酸氧化法测定甘油单硬脂酸酯的含量[J]. *日用化学工业* ,1993 ,5 :257 – 258.

[5] 崔玉敏 ,魏东芝 ,俞俊棠 .水在有机介质酶催化反应中的作用[J]. *生物工程进展* ,1999 ,19 :54 – 58.

[6] 姚鹏 ,马润宇 ,王立新 .非水相中的酶催化[J]. *化工进展* ,1998 ,17 :3 – 7.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 442 页)

参考文献 :

[1] 龚院生 ,姚惠源 .米糠中生理活性物质的研究[J]. *中国粮油学报* ,2000 ,(6):14.

[2] 龚院生 ,姚惠源 .米糠中活性因子 γ -谷维醇降血脂功能研究[J]. *粮食与饲料工业* ,2000 (8):37.

[3] 龚院生 ,姚惠源 .米糠中 γ -谷维醇抗脂质氧化作用[J]. *粮食与饲料工业* ,2000 (11):40.

[4] 龚院生 ,孙震 ,姚惠源 .米糠 γ -谷维醇对小鼠抗氧化和抗肿瘤作用的研究[J]. *动物科学与动物医学* ,2002 (2):26.

[5] CUVELIER MARIE-ELISABETH , RICHARD HUBERT , BERSET CLAUDTTE. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship[J]. *Biosci Biotech Biochem* , 1992 , 56 (2):324 – 325.

[6] CAO GUOHUA , VERDON CARL P , ALAN H B , *et al* . Automated assay of oxygen radical absorbing capacity with the COBAS FARA II[J]. *Clinical Chemistry* , 1995 , 41 (12):1738 – 1744.

[7] 胡天喜 ,陈季武 ,许建营等 .云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用[J]. *生物化学与生物物理进展* ,1992 ,24 (5):465 – 470.

[8] 范小兵 ,李慈娟 ,沙大年等 .邻菲罗啉化学发光体系测定羟基自由基的建立[J]. *基础医学与临床* ,1998 ,18 (6):68 – 71.

[9] BURTON G W , INGOLD K U. Autoxidation of biological molecules 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro[J]. *J Am Chem Soc* , 1981 , 103 :6472 – 6477.

[10] STANLEY Z DZIEDZIC , BERTRAM J F HUDSON. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils[J]. *Food Chemistry* , 1983 , 12 :205 – 212.