

## 荧光法研究高粱红色素清除羟自由基活性

张海容, 王文艳

忻州师范学院生化分析技术研究所, 山西 忻州 034000

**摘要** 由多种黄酮类化合物组成的天然产物高粱红色素, 主要存在于高粱属植物的壳、茎等部位, 广泛应用于食品工业、化妆品和染色等领域, 对清除氧自由基、保护人体健康非常重要。通过  $\text{Cu}^+$  催化过氧化氢-抗坏血酸反应体系产生羟自由基模型, 根据羟基苯甲酸的荧光大小对比研究了亚硝酸钠、槲皮素和红色素对羟自由基的清除能力。结果表明: 高粱红色素、亚硝酸钠、槲皮素对  $\text{OH}^\cdot$  自由基的清除能力呈一定的量效关系, 亚硝酸钠、槲皮素优于红色素对羟自由基的清除能力。探讨了红色素、槲皮素、亚硝酸钠的猝灭机理, 表明红色素、亚硝酸钠为动态猝灭, 槲皮素为静态猝灭过程。本研究可为高粱红色素的合理开发和利用提供一定的参考依据。

**关键词** 高粱红色素; 羟自由基; 荧光法

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2007)03-0547-05

### 引言

高粱红色素主要存在于高粱壳、籽皮、秆中, 其主要成分是 5, 7, 4'-三羟基黄酮和槲皮素等黄酮类衍生物<sup>[1]</sup>, 结构式见图 1。

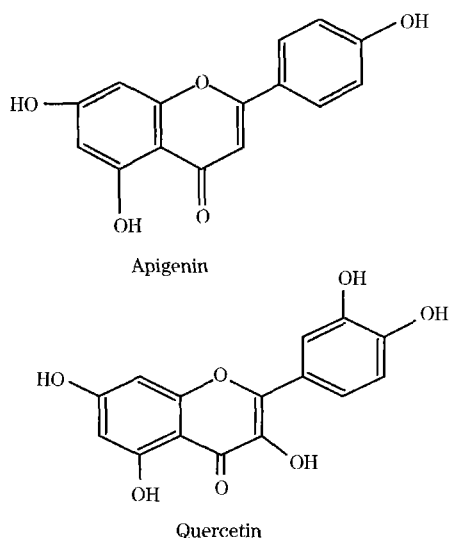
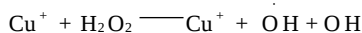
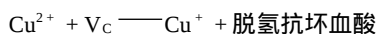


Fig 1 The chemical structure of flavone derivatives

天然高粱红色素对热稳定, 色调鲜亮, 可溶于水、乙醇等极性溶剂中略有特殊气味, 水溶液呈透明红棕色, 无沉淀现象, 广泛用于食品、染色剂及植物蛋白着色等<sup>[2]</sup>。生物体内活性氧代谢物质羟自由基可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 具有损伤膜结构及功能和多种生物分子的能力<sup>[3]</sup>, 由此常常引起一些严重的疾病, 如肿瘤、心血管疾病、肺气肿、衰老等。许多学者<sup>[4-6]</sup>提出引起生物系统损伤的自由基主要是  $\text{OH}^\cdot$  自由基, 并且一旦形成,  $\text{OH}^\cdot$  自由基便由最初的链反应增加氧化损伤的能力。研究表明, 自由基引起的损伤能够被称作清除剂的化合物抑制, 有趣的是人们发现生物体内存在防御  $\text{OH}^\cdot$  自由基损伤的各种抗氧化剂, 如尿酸、谷胱甘肽、色素等。鉴于红色素的来源廉价易得, 应用广范等优点, 本文通过荧光光谱分析法研究了红色素对  $\text{OH}^\cdot$  自由基的清除能力及其量效关系, 可为合理开发天然食品抗氧化剂和临床医学研究提供一定的理论依据。

本实验利用  $\text{Cu}^+$  催化过氧化氢氧化产生  $\text{OH}^\cdot$  自由基<sup>[7]</sup>,  $\text{OH}^\cdot$  进而与苯甲酸得到羟基苯甲酸反应的荧光物质, 反应原理如下。



收稿日期: 2006-01-08, 修订日期: 2006-04-16

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20051028)和教育部归国留学人员科研启动基金项目(2005383)资助

作者简介: 张海容, 1957年生, 忻州师范学院生化分析技术研究所教授 e-mail: biochem@xztc.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

苯甲酸, 分析纯, 北京市朝阳区旭东华工厂; 抗坏血酸, 化学纯, 北京化工厂; 双氧水, 分析纯, 上海华星化工厂; 氯化铜, 化学纯, 北京化工厂; 乙醇(95%), 分析纯, 天津市北辰方正试剂厂; 槲皮素, 生化试剂, 上海恒信化学试剂有限公司; 亚硝酸钠, 化学纯, 北京红星化工厂。

PHS-3TC 精密数显酸度计, 上海天达仪器有限公司; AB204-N 电子分析天平, Mettler-Toledo Group; LGWD900 型烧烤微波炉, LG(天津)电器有限公司; 501 型超级恒温器, 上海市宝验仪器厂; 恒温水浴锅, 江苏省金坛市仪器有限公司; F-4500 荧光光谱仪, 日本日立公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 高粱红色素的提取

准确称取高粱壳粉末 1 g 于 250 mL 的三角烧瓶中, 加 50 mL, pH 为 3.05 的 70% 的酸性乙醇, 采用微波辅助提取, 控制功率为 540 W, 固液比 1:50, 提取时间 2 min, 然后过滤, 将滤液在容量瓶中定容到 50 mL, 备用。

#### 1.2.2 OH 自由基的测定

在 25 mL 的比色管中依次加入 2 mL pH 为 5.38 的缓冲溶液, 0.3 mL 的  $1.14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{CuCl}_2$  溶液, 1.00 mL 的  $0.97 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的抗坏血酸液, 2 mL 0.1% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1.20 mL  $0.925 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯甲酸, 稀释至刻度, 摇匀, 在室温下静置 90 min, 作为实验的基体溶液。发射波长为  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$  下测定荧光强度。

#### 1.2.3 红色素对 OH 自由基清除能力的测定<sup>[8]</sup>

清除能力 (%) =  $(F_0 - F_r) / (F_0 - F)$

$F_r$  为加入一定量的红色素的荧光强度,  $F_0$  为未加红色素的空白体系的荧光强度,  $F$  为未加  $V_c$  及红色素时体系的荧光强度。

#### 1.2.4 红色素、槲皮素和亚硝酸钠的猝灭机理研究

在基体溶液中加入一定量的猝灭剂稀释至刻度, 摇匀, 在室温下放置 90 min。恒温控制温度在 30, 40, 50 条件下分别测 3 种猝灭剂红色素、槲皮素和亚硝酸钠存在时基体液的荧光强度。并根据 Stern-Volmer 方程式<sup>[9]</sup>计算其猝灭常数  $K_{SV}$ , 关系式为

$$F_0 / F_g = 1 + K_{SV} [Q]$$

$K_{SV}$  为猝灭常数,  $[Q]$  为高粱红色素的浓度,  $F_g$  为加入猝灭剂的荧光强度,  $F_0$  为未加猝灭剂的空白体系的荧光强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 羟基苯甲酸的发射光谱

随高粱红色素的浓度增大, 荧光强度逐渐下降, 但发射峰的位置不变, 实验选定发射波长  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ , 荧光光谱见图 2。

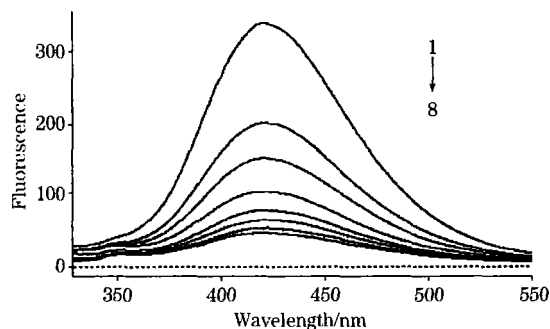


Fig 2 Fluorescence emission spectra of hydroxybenzoic acid in the presence of sorghum pigment

Concentration of sorghum pigment ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

1: 0; 2: 2.9; 3: 5.8; 4: 8.6;

5: 29; 6: 58; 7: 120; 8: 289  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

### 2.2 pH对荧光强度的影响

在 9 支基体溶液的比色管中分别加入 2 mL pH 为 3.38, 4.40, 5.38, 6.32, 7.41, 8.40, 9.37, 10.38, 11.34 的缓冲溶液, 测其荧光强度, 结果见图 3。pH 为 5.38 时羟基苯甲酸的荧光强度最大。

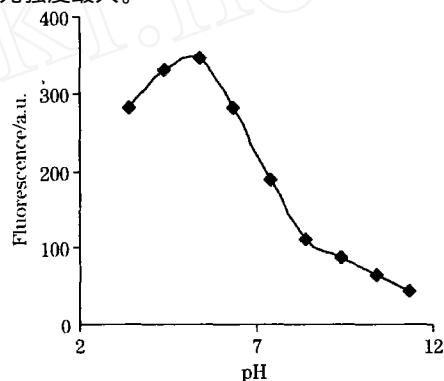


Fig 3 Effect of pH on fluorescence intensity of hydroxybenzoic acid

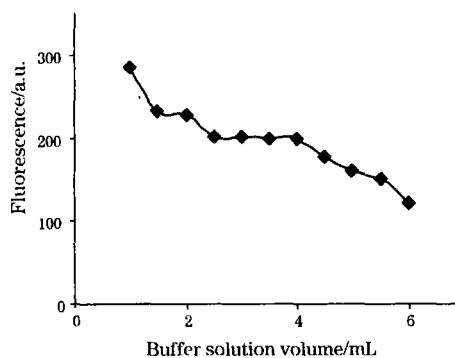


Fig 4 Effect of buffer solution volume on fluorescence intensity of hydroxybenzoic acid

### 2.3 缓冲溶液用量的选择

在 9 支装有基体溶液的比色管中分别加入不同体积的 pH 为 5.38 的缓冲溶液, 测定其荧光强度。由图 4 可知, 随

着缓冲溶液用量的增加荧光强度呈逐渐减小趋势;但缓冲溶液用量太少,起不到控制溶液酸碱度作用,本实验选用 2 mL 缓冲液。

#### 2.4 $\text{H}_2\text{O}_2$ 用量

在 9 支装有基体溶液的比色管中分别加入不同体积的双氧水,测定其荧光强度。随过氧化氢体积增大,荧光强度逐渐增大,结果见图 5。综合考虑反应物的比例和体积,选取 2 mL 双氧水为测量条件。

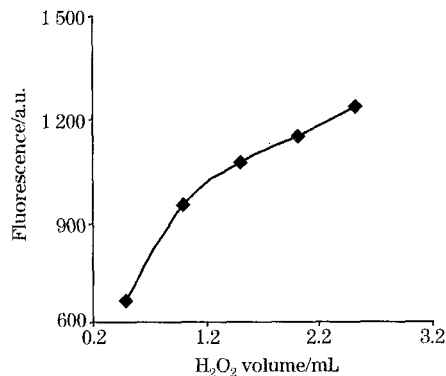


Fig 5 Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%,  $\phi$ ) amounts on fluorescence intensity of hydroxybenzoic acid

#### 2.5 $\text{CuCl}_2$ 最佳浓度的选择

在 9 支装有基体溶液的比色管中分别加入不同体积的  $\text{CuCl}_2$  溶液,测定其荧光强度,结果见图 6。0.3 mL  $\text{CuCl}_2$  荧光强度最大,故选取 0.3 mL  $\text{CuCl}_2$  为测定浓度。

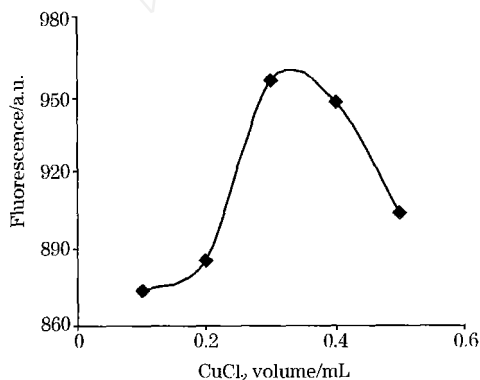


Fig 6 Effect of  $\text{CuCl}_2$  concentration on fluorescence intensity of hydroxybenzoic acid

#### 2.6 最适 $V_c$ 浓度选择

在装有基体溶液的比色管中分别加入不同体积的  $V_c$  溶液,按实验方法测定其荧光强度。由图 7 可知,荧光强度随  $V_c$  浓度的增加而增大,但超过 2.0 mL 时,荧光强度变化较缓慢,所以取 2 mL 为测量条件。

#### 2.7 红色素、槲皮素、亚硝酸钠清除 OH 自由基的能力

由图 8, 9, 10 知红色素、槲皮素、亚硝酸钠都有一定的清除 OH 自由基作用。用  $E_{50}$  (清除率达 50 % 时至少需猝灭剂的浓度) 作判断标准, OH 自由基的清除能力的大小顺序

为,亚硝酸钠 > 槲皮素 > 高粱红色素。

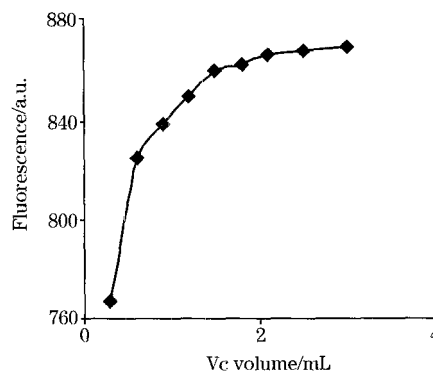


Fig 7 Effect of  $V_c$  concentration on fluorescence intensity of hydroxybenzoic acid

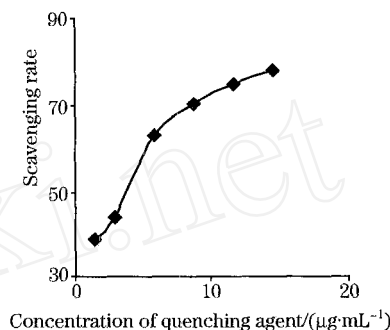


Fig 8 Determination of OH scavenging of sorghum piment

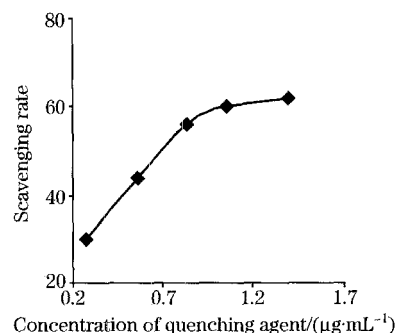


Fig 9 Determination of OH scavenging of sodium nitrite

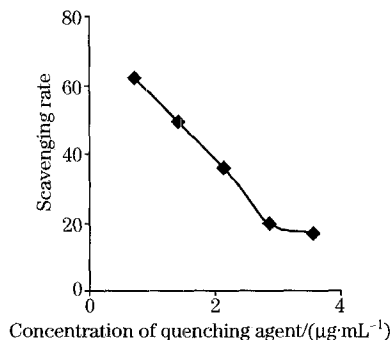


Fig 10 Determination of OH scavenging rate of quercetin

## 2.8 不同浓度红色素、槲皮素、亚硝酸钠猝灭机理验证

根据经典的荧光猝灭理论,若随着温度的升高,猝灭常数( $K_{SV}$ )增大为动态猝灭,否则为静态猝灭<sup>[9,10]</sup>。红色素和亚硝酸钠的猝灭常数随温度的增大逐渐增大,表明为动态猝灭。槲皮素的猝灭常数随温度的增大未呈现正相关,说明槲皮素与羟自由基作用过程的复杂性,结果见表 1。

OH 自由基是生物细胞新陈代谢中产生的高活性物质,红色素是 OH 自由基清除剂。实验表明,在一定的浓度范围内,高粱红色素清除羟基自由基的能力与其浓度呈量效关系。随着温度的升高,猝灭常数逐渐增大,呈现出动态猝灭现象,说明高粱红色素与自由基的结合为碰撞猝灭。由于天然红色素安全、稳定以及对自由基的清除作用,相信在食品、医药、化妆品等领域将受到更多科技工作者的广泛关

注。

**Table 1 Confirmation of quenching mechanism of sorghum pigment, sodium nitrite and quercetin at different temperature of 30, 40 and 50**

|      | 温度/ | 回归方程               | $r^2$ | $K_{SV}$ |
|------|-----|--------------------|-------|----------|
| 红色素  | 30  | $Y = 0.59x + 1.50$ | 0.999 | 0.588 2  |
|      | 40  | $Y = 1.25x + 1.70$ | 0.995 | 1.242 57 |
|      | 50  | $Y = 3.31x + 2.12$ | 0.994 | 3.313 1  |
| 槲皮素  | 30  | $Y = -0.006 2x$    | 0.994 | -0.006 2 |
|      | 40  | $Y = -0.007 7x$    | 0.995 | -0.007 7 |
|      | 50  | $Y = -0.006 6x$    | 0.992 | -0.006 6 |
| 亚硝酸钠 | 30  | $Y = 0.70x + 2.60$ | 0.995 | 0.702 9  |
|      | 40  | $Y = 1.17x + 3.86$ | 0.991 | 1.170 3  |
|      | 50  | $Y = 2.20x + 8.43$ | 0.993 | 2.202 9  |

## 参 考 文 献

- [1] ZHANG Zhao-jun, XIAO Li-juan(张兆俊,肖丽娟). Food and Grease(粮食与油脂), 2005, (5): 40.
- [2] WANG Qing-bin, CHEN Guo-liang(王清滨,陈国良). Food Colorant and Its Analytical Methods, First Edition(食品着色剂及其分析方法·第1版). Beijing: Chemical Industry Press(北京:化学工业出版社), 2004. 53.
- [3] JIA Zhi-shen, WU Jian-min, TANG Meng-cheng(贾之慎,邬建敏,唐孟成). Progress of Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1996, 23(2): 184.
- [4] ZHANG Li-wei, WANG Jin-shan, JIANG Chong-qiu(张立伟,王金山,江崇球). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(9): 1103.
- [5] CHEN Guan-hua, TIAN Yi-ling, YANG Geng-liang, et al(陈冠华,田益玲,杨更亮,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 634.
- [6] TIAN Yi-ling, CHEN Guan-hua, CUI Tong(田益玲,陈冠华,崔同). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 617.
- [7] Gutteridge J M C. Biochemical J., 1987, 243: 709.
- [8] QU Peng, LI Guan-lian, XU Mao-tian(瞿鹏,李贯良,徐茂田). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1407.
- [9] YANG Pin(杨频). Introduction of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学导论). Xi'an: Press of Xi'an Jiaotong University, First edition(西安:西安交通大学出版社·第1版), 1989. 154.
- [10] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al(张海容,郭祀远,李琳,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 829.

# Study of Scavenging Activity of Sorghum Pigment to Hydroxyl Free Radicals by Fluorimetry

ZHANG Hai-rong, WANG Wen-yan

Lab of Biochemical Analysis, Xinzhou Teacher's University, Xinzhou 034000, China

**Abstract** A natural product, sorghum pigment, consists of a number of important flavonoid derivatives, occurs on the seed capsules or in the stems of many sorghums, and is widely applied in different fields of food, cosmetic and dyeing industries. It is important for scavenging hydroxyl free radicals and protection of human healthiness. Scavenging capacities of hydroxyl free radicals with sodium nitrite, quercetin and sorghum pigment were comparatively researched by fluorimetry, and the model of hydroxyl free radicals produced is based on the reaction of  $Cu^{2+}$ -catalyzed oxidation of ascorbic acid in the presence of hydrogen peroxide. The hydroxyl radicals react with benzoic acid, forming a fluorescent product, and the fluorescence intensity was determined by the concentration of hydroxybenzoic acid. The experimental results show that the sodium nitrite, quercetin and sorghum pigment have a quantity-effect relationship for scavenging hydroxyl free radicals, and sodium nitrite and quercetin in comparison with sorghum pigment have high antioxidant capacity. Finally, the quenching mechanisms were explored with sodium nitrite, sorghum pigment, and quercetin respectively. The sorghum pigment and sodium nitrite feature a dynamic quenching processes,

while quercetin shows a static quenching processes. A reference method was provided for reasonable exploitation and utilization of sorghum pigment.

**Keywords** Sorghum pigment; Hydroxyl free radical; Fluorimetry

(Received Jan. 8, 2006; accepted Apr. 16, 2006)

## 《光谱学与光谱分析》投稿简则

《光谱学与光谱分析》是由中国科协主管,中国光学学会主办,钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的专业学术期刊。国内外公开发行,从2004年起为月刊,大16开本,2007年仍为月刊,每期208页。《光谱学与光谱分析》主要报道我国光谱学与光谱分析领域内具有创新性科研成果,及时反映国内外光谱学与光谱分析的进展和动态;发现并培育人才;推动和促进光谱学与光谱分析的发展。为科教兴国服务。读者对象为从事光谱学与光谱分析的科研人员、教学人员、分析测试人员和科研管理干部。

### 栏目设置和要求

1. 研究报告 要求具有创新性的研究成果,一般文章以8000字(包括图表、参考文献、作者姓名、单位和中文、英文摘要,下同)为宜。
2. 研究简报 要求在前人研究的基础上有重大改进或阶段性研究成果,一般不超过5000字。
3. 评述与进展 要求评述国内外本专业的发展前沿和进展动态,一般不超过10000字。
4. 新仪器装置 要求介绍新型光谱仪器的研制、开发、使用性能和应用,一般不超过5000字。
5. 来稿摘登 要求测试手段及方法有改进并有应用交流价值,一般以3000~4000字为宜。

### 稿件要求

1. 投稿者请经本刊编委(或历届编委)一人或本专业知名专家推荐,并附单位保密审查意见及作者署名顺序,主要作者介绍。文章有重大经济效益或有创新者,请说明,同时注明受国家自然科学基金或省部级基金资助情况。
2. 来稿要观点明确、数据真实可靠、层次分明、言简意明、重点突出。来稿必须字迹清晰(含各种符号和外文字母大写、小写、正体、斜体、希腊字母、拉丁字母;上角、下角标位置应标清楚)。中文摘要以300字为宜,英文摘要以1500字符为宜;另附关键词。要求来稿应达到“齐、清、定”,中文、英文文字通顺,方可接受送审。
3. 来稿请用A4复印纸单面打印(用4号字,行距一倍),一式两份和其他相关材料,通过邮局挂号寄到本刊。等待通知再行修改,严禁“一稿两投”、“一稿多投”,一经发现,取消三年投稿资格。
4. 文中插图要求完整,图中坐标、线条、单位、符号、图注等应标注准确、完整。图幅大小:单栏图7.5cm(宽)×6cm(高);双栏图:14cm(宽)×6cm(高);图中数字、图题、表题全部用中文、英文对照,图中数字、中文、英文全用6号字(另请备一份合格的图附在文章的后边)。
5. 文中出现的单位必须按“中华人民共和国计量标准”及有关GB标准规定书写。物理量符号一律用斜体,单位符号和词头用正体字母。
6. 名词术语,请参照全国科学技术名词规定书写。
7. 参考文献,采用顺序编码制,只列主要文献;内部资料、私人通讯、未经公开发表的一律不能引用。日文、俄文等非英文文献,请用英文表述;中文文献和中文图书采用中、英文对照表述,文献书写格式请参照本刊。
8. 请在投稿第一页左下角写明投稿联系人的电话和E-mail,以便及时联系。

### 稿件处理

1. 自收到稿件之日起,一个月内作者会收到编辑部的录用通知。请根据录用通知中所提出的要求认真修改,希望修改稿在40天内寄回编辑部,若二个月内编辑部没收到修改稿,将视为自行撤稿处理。
2. 有重大创新并有基金资助者可优先发表;不录用的稿件,编辑部将尽快通知作者,底稿一律不退,请自留底稿。
3. 来稿一经发表将酌致稿酬并送样书两本,本人文章两份抽页。
4. 遵照“中华人民共和国著作权法”,投稿作者须明确表示,该文版权(含各种媒体的版权)授权给光谱学与光谱分析期刊社。国内外各大文献检索系统摘录本刊刊出的论文;凡不同意被检索刊物无稿酬摘引者,请在投稿时事先声明,否则,本刊一律认为已获作者授权认可。

5. 来稿请寄:100081 北京市海淀区魏公村学院南路76号,光谱学与光谱分析期刊社

电话:010-62182998 或 62181070 传真:010-62181070

E-mail: chngpxygpfx@vip.sina.com; 修改稿专用邮箱: mengzh1018@vip.sina.com

网址: http://www.gpxygpfx.com