

Maillard反应中间体清除活性氧自由基作用的研究

彤霖 殷发强 何佳文

(湖北省烟草化学研究室 武汉市珞瑜路1037号 430074)

关键词: 化学发光法 中间体 清除 活性氧自由基 邻苯三酚自氧化

摘要: 用化学发光方法研究了以Maillard反应中间体清除 $\cdot\text{OH}$ (羟自由基) 的作用, 用分光光度法研究了中间体清除邻苯三酚自氧化过程中产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (超氧阴离子) 的作用。结果表明Maillard反应中间体具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力, 特别对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果较好, Maillard反应中间体是一种很有潜力的清除活性氧自由基的物质, 在香烟增香减害方面, 应用前景非常广泛。

Study on scavenge of Active Reactive species by Maillard intermediate

RONG-LING, YING-FAQIANG, HE-JIAWEN

Institute of tobacco chemical, Wuhan 430074, Hubei, china

Key word: Chemiluminescence intermediate scavenge free-radical pyrogallol auto-oxidation

Abstract: The scavenging effect of the intermediate of Maillard Reaction on $\cdot\text{OH}$ was studied by using chemiluminescence, and its effect on $\text{O}_2^{\cdot-}$ was studied by inhibiting pyrogallol auto-oxidation. The results show that the intermediate has the ability of scavenging $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$, especially on $\cdot\text{OH}$. The intermediate is a kind of substance with the ability of scavenging free-radical, it can be widely used in tobacco products.

前言

自由基是分子或原子带有未成对的游离的单电子, 性质相当活泼, 易夺取其他分子或原子上的电子, 从而破坏其他分子或原子的结构。香烟燃烧时除了产生复杂的化合物之外, 还产生大量的自由基, 包括香烟焦油自由基和气相自由基。有研究^[1]表明, 在吸烟过程中, 危害健康的物质主要是气相自由基。这些自由基会引发体内脂质过氧化^[2, 3], 加快机体的衰老过程, 并可诱发癌症、心血管等疾病。因此寻找安全高效的清除卷烟烟气中活性氧自由基的清除剂, 对于降低卷烟的危害、维护人体健康意义非常重大。在多种自由基中, 超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)是最活泼的, 其反应速度极快, 是对人体危害最大的自由基。

Maillard反应物已经被普遍用在卷烟制品中, 用于改善口感、增香、降刺。但是, Maillard反应中间体(以下简称中间体)用于卷烟增香减害方面的研究, 国内目前尚未见报道。本文通过化学发光法和分光光度法分别对中间体清除化学体系中 $\cdot\text{OH}$ 的能力和清除邻苯三酚自氧化过程中产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力进行了研究, 目的在于使Maillard反应的中间体尽快应用于卷烟产品增香和减害过程中。

1、材料与amp;方法

1.1 试验材料

Maillard反应中间体(由湖北省烟草化学研究所提供)

硫酸铜、硼砂、双氧水、邻苯三酚、邻菲罗啉(国产分析纯)

抗坏血酸(生化级) Tris(三羟甲基氨基甲烷)(分析纯)

鲁米诺(SIGMA 德国进口, 色谱级)

微弱化学发光仪(Ultra-Weak Luminescence Analyzer)

lambda-40Bio型UV-Vis分光光度计

1.2 分析方法

1.2.1 试剂的配制

1mmol/L硫酸铜溶液：直接用蒸馏水配制；

1mmol/L抗坏血酸溶液：溶于含有0.1mmol/L EDTA的蒸馏水中；

1mmol/L邻菲罗啉：用二次水配制，50℃加热溶解；

0.15mmol/L H₂O₂：30%的H₂O₂稀释60倍；

0.05mol/L硼砂（pH9.24）：直接用蒸馏水配制；

45mmol/L邻苯三酚：用1mmol/L HCl溶解，其中含有0.1mmol/L EDTA；

1mol/L Tris-HCl缓冲液：取2.42克Tris（三羟甲基氨基甲烷）溶于16mL二次蒸馏水中，加浓盐酸调pH值至8.2，稀释至20mL。

1.2.2 中间体清除活性氧自由基作用的测定

（1）中间体清除·OH的测定

采用邻菲罗啉—抗坏血酸化学发光体系^[4]，原理是Fenton反应产生的羟自由基，可以氧化邻菲罗啉，使其激发。当激发态的邻菲罗啉返回基态时就产生化学发光。

将中间体用双蒸水溶解，配制成水溶液，取50μL加入化学发光仪的测量杯中，然后加入1mmol/L硫酸铜溶液50μL，1mmol/L抗坏血酸溶液20μL，1mmol/L邻菲罗啉溶液50μL，0.15%的双氧水50μL，原位注入780μL 0.05mol/L硼砂溶液（pH9.24），反应总体积1mL，启动发光，延时10s，测定60s内发光强度（CL）。以水为空白，以CL为纵坐标，时间为横坐标，用Origin 7.0分析软件作图，并进行曲线拟合。每个样品测5次，取平均值，按下式计算抑制率：

$$\text{抑制率} = (CL_0 - CL_1) / CL_0 \times 100\%$$

CL₀—空白

CL₁—添加中间体的体系的发光强度

（2）中间体清除O₂⁻·作用的测定

用分光光度法，采用邻苯三酚自氧化体系^[5]测定中间体对O₂⁻·的清除作用。

取9mL pH=8.2的Tris-HCl缓冲液，25℃水浴放置20分钟，用微量注射器注入40μL 25℃预热的邻苯三酚溶液（45mmol/L邻苯三酚于10mmol/L HCl中），立即混匀倒入1cm比色皿中，在25℃下扫描200—500nm，得到最大吸收波长为327.2nm。然后按上述方法每隔30秒定点测一次A_{327.2nm}，自氧化速率控制在0.06/min左右。邻苯三酚自氧化3分钟后，迅速滴加1滴抗坏血酸，立即混匀，室温放置5min测得327.2nm处的吸光度，即A₀，可表示邻苯三酚自氧化速率。

在上述Tris-HCl缓冲液中预先加入一定浓度的中间体，再按照上述方法测定邻苯三酚自氧化速率得到A₁，每个样品测5次，取平均值，按下式计算抑制率：

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

（3）不同浓度的中间体清除·OH和O₂⁻·作用的测定

精确称取0.1g中间体，用蒸馏水溶解于10mL的容量瓶中，定容至10mL。溶液的浓度为10mg/mL，然后稀释成不同浓度，采用以上体系，分别测定中间体对·OH和O₂⁻·的清除作用。样品均测定5次，分别以抑制率为纵坐标，中间体浓度为横坐标，用Origin 7.0分析软件作出抑制率随浓度变化的关系曲线。

2、结果与讨论

2.1 中间体清除·OH的能力

由于中间体有还原性易被自由基氧化，从而发挥清除自由基的作用。本试验中，中间体对邻菲罗啉—抗坏血酸体系产生的·OH，表现为较明显的清除作用。在体系中加入中间体后，发光强度明显变弱，表明中间体对·OH有清除效果，以CL抑制率为纵坐标，以时间为横坐标，得到发光曲线如图1所示：

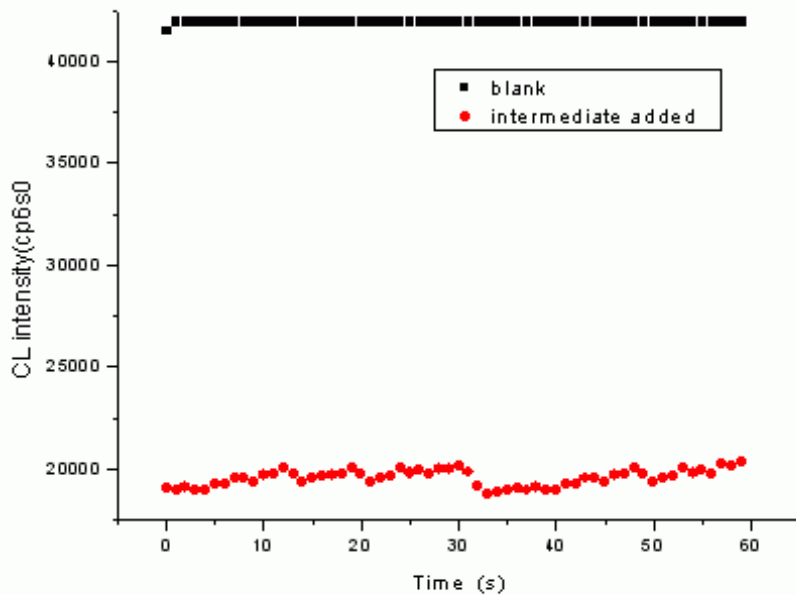


Figure 1 the curve of the ability of intermediate inhibiting $\cdot\text{OH}$

图1 中间体抑制 $\cdot\text{OH}$ 能力曲线

2.2 中间体清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力

邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化，释放出 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，生成有色的中间产物，可用分光光度法进行测定。当有清除剂存在时，清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，从而阻止中间产物的积累，使邻苯三酚自氧化速率降低^[6]。以吸光度为纵坐标，以时间为横坐标，得到邻苯三酚自氧化的速率曲线，线性拟合曲线的斜率可以表示自氧化速率，如图2所示：

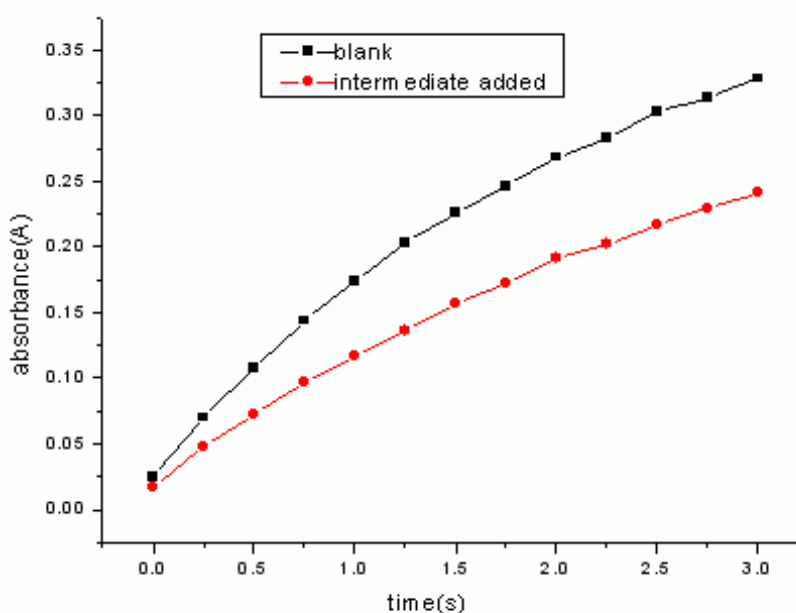


Figure 2 the curve of the velocity of pyrogallol auto-oxidation

图2 邻苯三酚自氧化速率曲线

由图可以明显看出加入中间体使邻苯三酚自氧化速率降低，说明了中间体有清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用。

2.3 不同浓度的中间体对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

将中间体配制成浓度为10mg/mL的水溶液，分别稀释成1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL，分别加入产生 $\cdot\text{OH}$ 的体系中，测定其发光强度，并计算抑制率，以抑制率为纵坐标，以中间体浓度为横坐标，得到中间体浓度与抑制率的关系曲线，如图3所示，经多项回归得回归方程：

$$y=91.86309 - 606.01773/[1+\exp((x+2.44665)/1.06873)]$$

$$\text{相关系数}r=0.9944$$

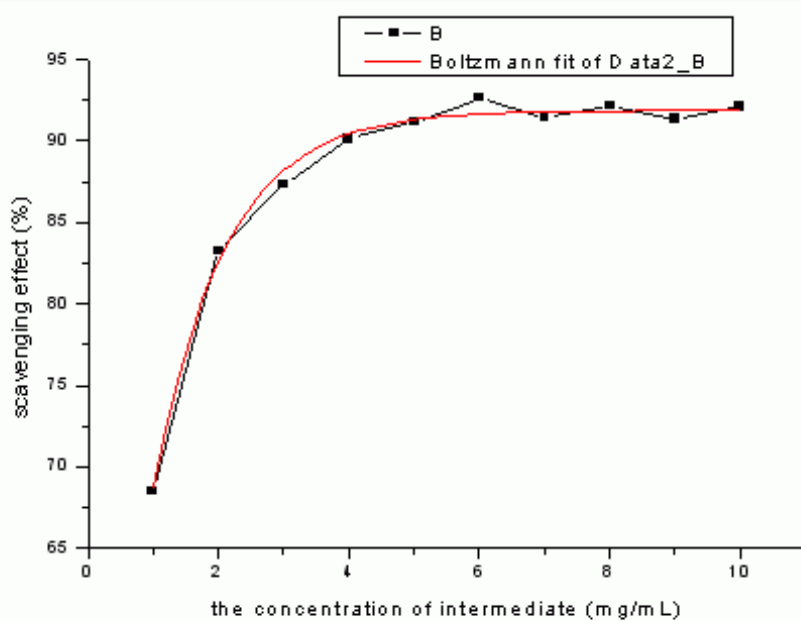


Figure 3 the curve of the change of the intermediate's inhibition rates on $\cdot\text{OH}$ with its concentration

图3 中间体对 $\cdot\text{OH}$ 抑制率与中间体浓度关系曲线

由图可以看出，中间体对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用随中间体浓度的增加而显著增加，

当中间体浓度为4mg/mL到10mg/mL时，其清除作用基本趋于平稳，抑制率都在90%以上。并且，在试验过程中发现，放置后的中间体对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力略有增加，可能是因为在水溶液中放置后氢键的作用增加了中间体羟基的活性。

2.4 不同浓度的中间体对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力

将中间体配制成浓度为1mg/mL—10mg/mL的水溶液，分别加入邻苯三酚自氧化体系中，在UV-Vis分光光度计上测327.2nm处体系的吸光度。在测试过程中，邻苯三酚自氧化3分钟后，加入抗坏血酸以终止其自氧化^[7]，由此可以准确的测出 $A_{327.2\text{nm}}$ 。由测得的吸光度，计算抑制率，以抑制率为纵坐标，以中间体浓度为横坐标，得到中间体浓度与抑制率的关系曲线如图4，经多项回归得回归方程：

$$y=569.03386-535.04144/[1+\exp((x-14.17407)/1.3392)]$$

相关系数 $r=0.97645$

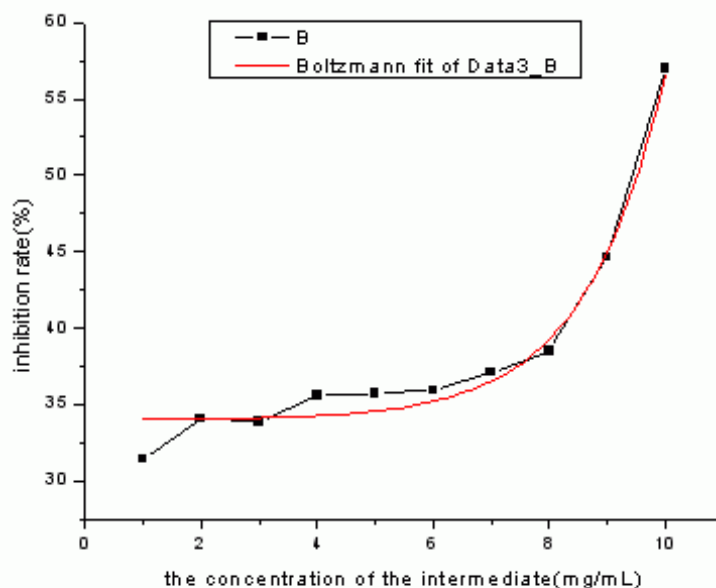


Figure4 the curve of the change of the intermediate's inhibition rates on $\text{O}_2^{\cdot-}$ with its concentration

图4 中间体对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 抑制率与中间体浓度关系曲线

由图可以看出，中间体对邻苯三酚在碱性条件下的自氧化产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有清除作用，随着中间体浓度的增加，清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用逐渐增加。

3、结论

Maillard反应中间体有明显的清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用，特别是对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果尤为理想。

Maillard反应中间体对体系中 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用均随中间体浓度的增加而增强。浓度为4mg/mL以上的中间体水溶液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用已趋于平稳。浓度为8mg/mL以上的中间体对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用增加幅度较大。

Maillard反应中间体具有较好的抗氧化功能，对卷烟的增香减害有着较好的应用前景。对于应用于卷烟烟气中的清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用正在研究之中。

参考文献：

- [1] 祈俊生 香烟烟雾中自由基的检测 理化检验-化学分册 Vol. 37 No. 8 Aug. 2001 364-366
- [2] Pryor W A. Cigarette smoke and the involvement of free radical reaction in chemical carcinogenesis [J]. Br. J. Cancer, 1987, 55(suppl. 8)19-23
- [3] Bermudez E, Stone K, Career K M, et al. Environmental tobacco is as damaging to DNA as mainstream smoke [J]. Environ. Health Perspect, 1994, 102:870-874
- [4] 李会军, 李萍, 张重义, 赵明强 金银花类中药提取物清除自由基的作用 2002, 33 (6): 496-498
- [5] 焦中高, 刘杰超, 王思新 黑莓红色素抗氧化活性的研究 食品科技 2003 NO. 8 .63-65
- [6] 张英 竹叶提取物类SOD活性的邻苯三酚法测定 食品科学 1997Vol. 18 No. 5 (总209) 47-49
- [7] 静天玉, 赵晓瑜 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法 生物化学与生物物理进展 1995 22 (1) 84-86

基金项目：国家烟草专卖局基金资助项目子项目：110200202010

作者简介：彤霖，女，华中科技大学化学系在读研究生

www.tobacco.org.cn All Rights Reserved.

版权所有 中国烟草学会

本网站由中国烟草物资电子商务网提供技术支持