

不同品种生姜粗黄酮抗氧化活性的比较

梅邢¹, 汪琼², 田瑞³, 李伟¹

(1. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000) (2. 湖北民族学院化学与环境工程学院, 湖北恩施 445000) (3. 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000)

摘要: 本文比较分析了品种对生姜粗黄酮抗氧化效果的影响, 实验选用凤头姜老姜、凤头姜仔姜及黄瓜姜老姜为原料, 采用化学发光法测定了三种不同生姜粗黄酮在对超氧阴离子自由基、羟自由基、双氧水的清除作用和对 DNA 损伤的保护作用。结果发现, 老姜黄酮的抗氧化效果优于仔姜, 但在 DNA 损伤体系中, 仔姜的保护效果要显著优于老姜。就品种而言, 在双氧水体系中不同品种生姜粗黄酮的抗氧化效果差异不显著, 其它三个体系差异性均达到了显著水平; 在羟自由基、双氧水和 DNA 损伤保护作用体系中, 凤头姜抗氧化效果优于黄瓜姜的, 但黄瓜姜老姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用要略优于凤头姜的, 但在 0.01 水平上差异并不显著。综合比较发现品种和成熟期对生姜粗黄酮抗氧化效果均有影响。

关键词: 品种; 生姜; 化学发光法; 粗黄酮; 抗氧化能力

文章编号: 1673-9078(2017)12-68-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.011

Comparative Analysis of Antioxidant Activity of Crude Flavonoids in Different Varieties of Ginger

MEI Xing¹, WANG Qiong², TIAN Rui³, LI Wei¹

(1. College of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China) (2. School of Chemistry & Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China) (3. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Enshi 445000, China)

Abstract: In this paper, the effects of different varieties on the antioxidant activities of crude flavonoids from ginger were mainly compared and analyzed. Using the fengtou tender and old ginger and yellow craw old ginger as the raw materials, the effects of three different flavonoids from ginger on the scavenging effect of superoxide anion free radicals, hydroxyl radical and hydrogen peroxide as well as the protective effect of the DNA-damage were determined by the chemiluminescence methods. The results showed that the antioxidant effect of flavonoids from old ginger was superior to that of tender ginger, but the protective effect of flavonoids from tender ginger was significantly better than that of old ginger in the DNA damage system. In terms of variety, the antioxidant effect of the flavonoids from different varieties in hydrogen peroxide system was not significant, while the differences of the other three systems reached a significant level. The antioxidant effect of flavonoids from fengtou ginger was better than that of yellow craw ginger in the hydroxyl radical, hydrogen peroxide and DNA damage protection system, but the scavenging effect on the superoxide anion free radical of flavonoids from yellow craw ginger was slightly better than the fengtou ginger. However, the difference was not significant at 0.01 level. A comprehensive study showed that the antioxidant effect of crude flavonoids from ginger was influenced by variety and maturity.

Key words: variety; ginger; chemiluminescence; crude flavonoids; antioxidant activity

生姜是姜科多年生草本植物姜(*Zingiber officinale* Roscoe)的新鲜根茎, 其品种主要包括黄瓜姜、红爪姜、来凤姜和野生生姜等二十余个。湖北省来凤县凤头姜

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 湖北省教育厅产学研合作项目 (C2010052)

作者简介: 梅邢 (1994-), 男, 硕士在读, 研究方向: 林特食品加工与开发

通讯作者: 李伟 (1975-), 男, 副教授, 研究方向: 生物化学及资源开发工作

因其每只有二三十个头, 生长形状与凤凰头相似而得名, 在来凤县具有 500 余年的种植和加工历史, 是来凤县闻名于全国的传统特产^[1], 目前已生产了诸如槽姜、冰姜、姜汁、姜膏、姜粉、姜茶和姜脯等一系列凤头姜产品^[2-4]。此外凤头姜仔姜鲜嫩可口, 其口感与可接受性明显优于老姜, 鄂西地区偏好食用仔姜, 因此凤头姜仔姜产品畅销全国。生姜自久远的古代就被当做药食同源的普通食材佐料和疗效甚好的保健品, 有祛湿寒、暖胃和通血脉等诸多保健功能^[5], 而凤头

姜仔姜的功效和老姜是否有差异,目前尚属未知。凤头姜在湖北省栽培较普遍,与黄瓜姜和红瓜姜相比,除了口感的优势外,是否具有其它优势也属未知。

现在已经证明生姜黄酮具有很好的抗氧化性^[6],但生姜黄酮的种类有很多,依赖不同的提取溶剂浸提出的黄酮类化合物的结构有差异,结构不同造成其生理功能也存在差异。此外目前抗氧化能力评价方法有多种体系,如比色法、荧光化学发光法和荧光光度法等,但由于测定过程受多种因素的影响造成测定结果不一致,一种抗氧化物质在某一抗氧化体系中抗氧化效果好,但在另一体系中效果不一定好。因此本文以来凤县凤头姜老姜、仔姜和黄瓜姜老姜为试材,借助于荧光化学发光法,研究凤头姜与其它品种生姜,不同成熟期的凤头姜粗黄酮抗氧化活性的差异,本研究将为进一步开发恩施地区丰富的凤头姜资源奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

凤头姜老姜:2016年11月购于湖北省来凤县;凤头姜仔姜:2016年7月购于湖北省来凤县;黄瓜姜老姜:2016年11月购买于湖北恩施菜市场。

乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、无水乙酸钠、无水三氯化铁、EDTA、无水碳酸钠、碳酸氢钠、没食子酸、硼酸、抗坏血酸、醋酸钠、冰醋酸、无水硫酸铜、双氧水和邻苯三酚,以上试剂为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;芦丁(分析纯),山东西亚化学工业有限公司;鲁米诺, sigma 公司。

1.2 主要仪器设备

RE-2000A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;TGL-16GB 离心机,上海安亭科学仪器厂生产;GloMax®-Multi Jr 单管化学发光仪,美国 Promega 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 生姜粗黄酮的提取

将不同的新鲜生姜洗净沥干,榨汁机榨汁,将汁液用200目尼龙布过滤,滤液于4℃冰箱中静置过夜,取上清液于磁力搅拌器中用80%乙醇60℃恒温萃取1h,萃取液4000 r/min 离心15 min 得到提取液,提取液旋转蒸发浓缩后得浓缩液,置于4℃冰箱静置24h,离心15 min 后得上清液,上清液再次置于4℃冰箱冷藏,4000 r/min 离心15 min 得上清液,如此重复3次,

冷冻干燥备用。

1.3.2 黄酮含量的测定: Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 法^[7]

按照参考文献^[7]方法,略作修改。以芦丁为标准品,准确配制0.2 mg/mL 芦丁标准溶液,分别取0、1、2、3、4、5、6 mL 芦丁标准溶液与25 mL 容量瓶中,依次加入5% NaNO₂, 10% Al(NO₃)₃ 溶液各0.6 mL,充分混匀后加4% NaOH 溶液8 mL,摇匀后定容,静置15 min,于510 nm 测定吸光度值。以芦丁质量(mg)为横坐标, A₅₁₀ 为纵坐标,绘制标准曲线拟合后得回归方程: $y=0.44x-0.01$, $R^2=0.9992$ 。

生姜黄酮含量测定:分别移取不同生姜粗黄酮溶液1 mL,按标准曲线测定方法,测定510 nm 下吸光度值(A₅₁₀),根据式(1)来计算粗黄酮含量。

$$\text{黄酮含量 (mg/mL)} = \frac{A_{510} + 0.01}{0.44} \times F \quad (1)$$

式中, F 为稀释倍数。

1.3.3 不同生姜粗黄酮抗氧化能力测定

1.3.3.1 不同生姜粗黄酮对超氧阴离子自由基清除作用:邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系^[8-12]

向发光池中注入50 μL 不同浓度的样品(以样品溶液为对照),然后注入 6.25×10^{-4} mol/L 邻苯三酚0.05 mL,最后加入鲁米诺和碳酸缓冲液混合物900 μL 启动反应(30℃)。间隔2 s 记数发光强度,测定400 s 时的总发光积分强度。本底发光强度为未加邻苯三酚时的发光值。

1.3.3.2 不同生姜粗黄酮对羟基自由基清除作用: CuSO₄-Phen-Vc-H₂O₂ 化学发光体系^[13-16]

取50 μL 不同浓度的样品,放入样品池内(以水为对照),加入1.0 mmol/L CuSO₄ 溶液50 μL,1 mmol/L 邻菲罗啉溶液50 μL 和0.05 mol/L 硼砂溶液700 μL (pH 9.0),充分混匀,然后加入100 μL 1 mmol/L Vc 溶液和50 μL、0.15% H₂O₂ 溶液(本底不加双氧水),立即启动化学发光系统。间隔3 s 记数,记录400 s 内化学发光动力学曲线。

1.3.3.3 不同生姜粗黄酮对过氧化氢清除作用:双氧水-鲁米诺化学发光体系

在样品池中依次加入0.4 mmol/L FeSO₄ 50 μL, 1.5% H₂O₂ 50 μL, 50 μL 样品或样品溶液(对照),最后加入pH 7.4 的0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液配制成的0.1 mmol/L 鲁米诺液0.6 mL,立即混匀,测定发光强度。反应温度30℃,间隔2 s 记数,测定100 s 的总发光积分强度,本底发光强度为未加 H₂O₂ 时的系统发光值。

1.3.3.4 不同生姜粗黄酮对 DNA 损害的保护作用:

用 CuSO₄-Phen-Vc-H₂O₂-DNA 的化学发光体系^[15-19]

在发光池中依次加入 100 μL 不同浓度的样品溶液, 800 μL DNA-Cu²⁺-Phen 体系溶液, 100 μL Vc, 轻轻振荡混匀后置于发光装置中, 打开记录系统后, 立刻注入 200 μL 双氧水, 启动发光装置。每隔 3 s 记录数据 1 次, 记录 800 s 内的动态发光过程。本底不加双氧水。

1.3.3.5 不同生姜粗黄酮抗氧化数据统计

所有实验均重复三次, 曲线面积积分表示相对发光强度, 按照式(2)计算抑制率, 并以 Origin 7.0 Version 软件统计数据。

$$\text{清除率}/\% = \frac{CL_{\text{空白}} - CL_{\text{样品}}}{CL_{\text{空白}} - CL_{\text{本底}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: CL_{空白}-空白对照组的相对发光强度; CL_{本底}-本底组相对发光强度; CL_{样品}-样品组相对发光强度。

1.3.4 多酚含量测定: FC 法^[20]

准确配制 0.2 mg/mL 的没食子酸标准溶液, 分别准确移取 0.0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL 的标准溶液于 20 mL 棕色具塞试管中, 加入 1.0 mL、0.8 mL、0.6 mL、0.4 mL、0.2 mL、0.0 mL 80%乙醇溶液, 而后分别加入 10% FC 试剂 5 mL 和 7.5% Na₂CO₃ 4 mL, 最后加蒸馏水 10 mL, 45 °C 水浴 40 min, 取出后摇匀, 室温放置 10 min 后于 765 nm 处测定吸光度。以 A₇₆₅ 为纵坐标, 没食子酸质量 (mg) 为横坐标, 绘制标准曲线拟合得回归方程为 y=3.56x+0.01, R²=0.9994。

样品中总多酚的测定: 从不同生姜粗黄酮溶液中移取 0.1 mL 于 20 mL 棕色具塞试管中, 按标准曲线的方法测定 765 nm 吸光度, 根据式 (3) 计算多酚含量。

$$\text{多酚含量} (\text{mg/mL}) = \frac{A_{765} - 0.01}{3.56 \times 0.1} \times F \quad (3)$$

F: 稀释倍数。

1.3.5 还原糖含量测定方法: DNS 法^[21]

配制 1 mg/mL 葡萄糖标准液, 分别吸取 0.0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL 于 25 mL 的容量瓶中, 蒸馏水补齐至 2 mL, 加入 1.5 mL DNS 试剂, 摇匀, 沸水浴 5 min, 取出后立即冷却至室温, 定容至 25 mL, 混匀, 测定 540 nm 吸光度值。以 A₅₄₀ 为纵坐标, 葡萄糖质量 (mg) 为横坐标, 绘制标准曲线拟合得回归方程 y=0.36x-0.0037, R²=0.9992。

样品还原糖测定: 取 5 mL 不同生姜粗黄酮样液和 5 mL 蒸馏水于 100 mL 容量瓶中, 50 °C 水浴 20 min, 冷却后定容, 过滤后为还原糖待测样液。取待测样液 2 mL 和 1.5 mL DNS 试剂于试管中, 按标准曲线方法

测定 540 nm 吸光度, 根据式 (4) 计算还原糖含量。

$$\text{还原糖含量}(\text{mg/mL}) = \frac{A_{540} - 0.0037}{0.36 \times 2 \times 5} \times 100 \quad (4)$$

1.3.6 Vc 含量测定: 2,4-二硝基苯肼比色法^[22]

按照 GB/T 5009.86-2003, 以抗坏血酸为标样, 以抗坏血酸含量 (μg) 为横坐标, 以 A₅₀₀ 的吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 拟合得回归方程 y=0.05x+0.005, R²=0.9992。

样品中 Vc 测定: 取 1 mL 样液和 1 mL 2%草酸于 100 mL 容量瓶内, 充分混匀后用 1%草酸溶液定容, 过滤取清液备用。移取 25 mL 此滤液, 加入适量活性炭后充分振摇过滤, 弃去最初的滤液数毫升, 取 10 mL 此提取液与 10 mL 2%硫脲溶液混匀。取 4 mL 上述混有硫脲的提取液于试管中, 加入 1.0 mL、2% 2,4-二硝基苯肼溶液, 放入 37 °C 恒温箱 3 h 后取出, 取出后冷却到室温。加 1.0 mL、2% 2,4-二硝基苯肼溶液于试管中, 室温放置 15 min, 放入冰水内, 同时做空白。当试管放入冰水后, 缓慢滴加 85%硫酸 5 mL, 边加边摇匀。硫酸滴加完毕, 将试管取出, 在室温放置 30 min 显色。在 500 nm 处测定吸光值。按式 (5) 计算 Vc 含量。

$$\text{Vc 含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{500} - 0.005}{0.05 \times 4 \times 10} \times 20 \times 100 \quad (5)$$

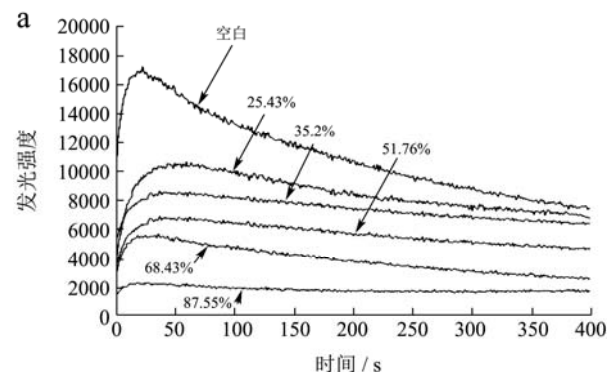
1.3.7 数据统计分析

所有实验重复三次, 实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 数据以 Mean±SD 表示, 采用 Excel 作图。

2 结果与讨论

重点把三种不同生姜粗黄酮对超氧阴离子自由基、羟自由基、过氧化氢的清除作用和对 DNA 损害的保护作用作对比, 以评价品种对生姜的抗氧化能力的影响。

2.1 不同生姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用



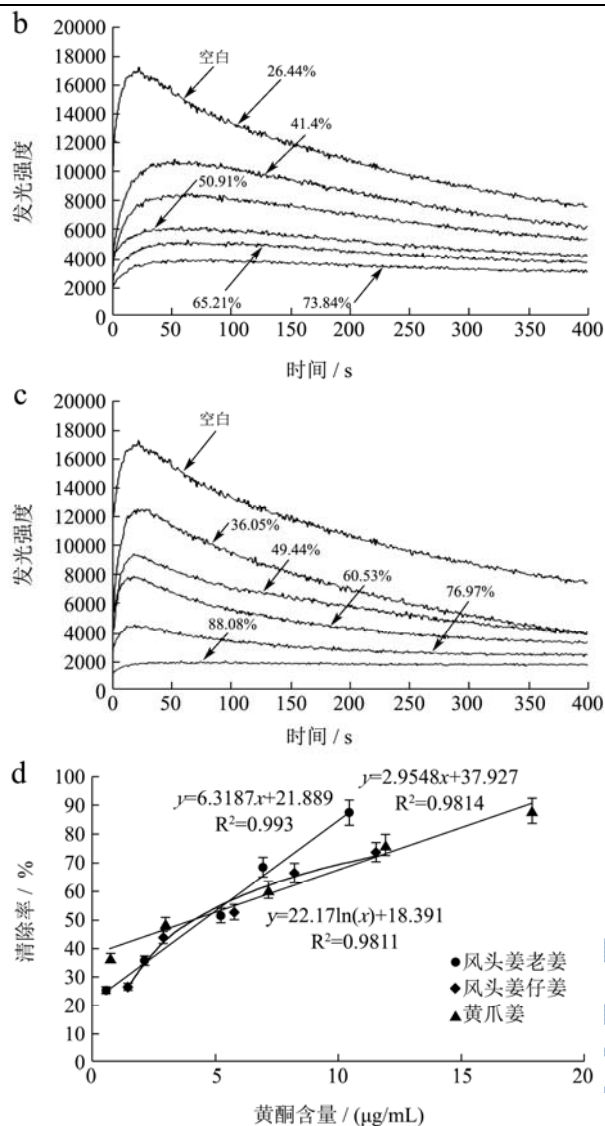


图1 不同生姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.1 The scavenging effect of crude flavonoids from different ginger on the superoxide anion radicals

注: a 表示风头姜老姜化学发光图; b 表示风头姜仔姜化学发光图; c 表示黄瓜姜老姜化学发光图; d 表示计量效应关系图。

根据图1中的回归方程可以计算出风头姜老姜、风头姜仔姜、黄瓜姜老姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的IC₅₀分别为4.45±0.05 μg/mL、5.47±0.21 μg/mL和4.13±0.15 μg/mL,由此可见黄瓜姜老姜对超氧阴离子自由基的清除作用最强,分别是风头姜老姜和仔姜的1.08倍和1.32倍,风头姜老姜对超氧阴离子自由基的清除效果是仔姜的1.23倍。

2.2 不同生姜粗黄酮对羟自由基的清除作用

根据图2中的回归方程可以计算出风头姜老姜、风头姜仔姜、黄瓜姜老姜粗黄酮对羟自由基的IC₅₀分别为0.79±0.04 μg/mL、1.44±0.07 μg/mL和1.72±0.07

μg/mL,就羟自由基体系而言,风头姜老姜粗黄酮的抗氧化效果分别是风头姜和黄瓜姜老姜的1.82倍和2.18倍。

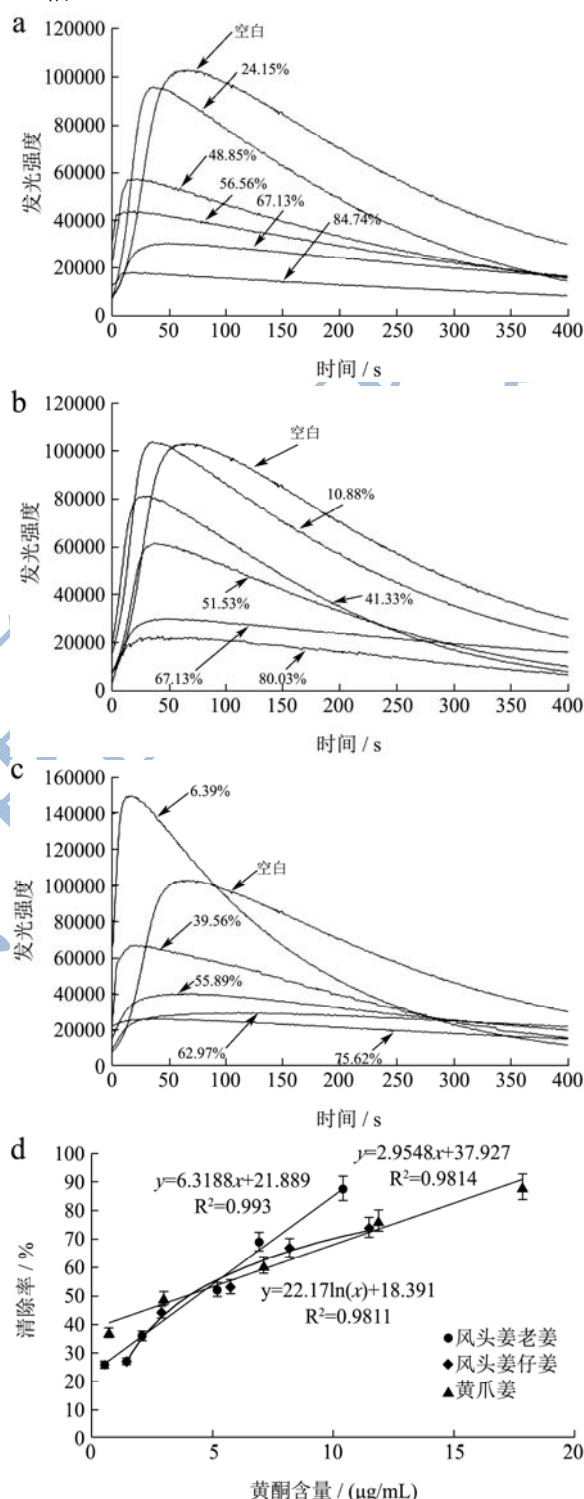


图2 不同生姜粗黄酮对羟自由基的清除作用

Fig.2 The scavenging effect of crude flavonoids from different ginger on the hydroxyl radical

注: a 表示风头姜老姜化学发光图; b 表示风头姜仔姜化学发光图; c 表示黄瓜姜老姜化学发光图; d 表示计量效应关系图。

2.3 不同生姜粗黄酮对过氧化氢的清除作用

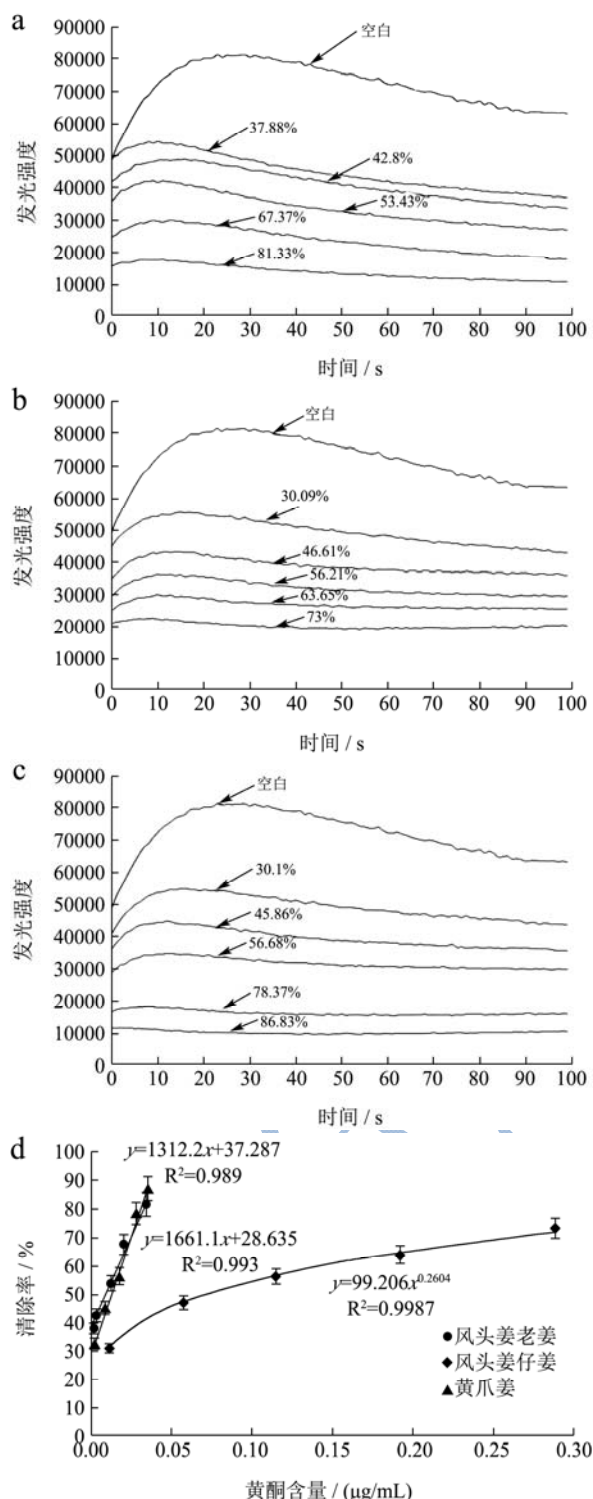


图3 不同生姜粗黄酮对过氧化氢的清除作用

Fig.3 The scavenging effect of crude flavonoids from different ginger on the hydrogen peroxide

注: a表示凤头姜老姜化学发光图; b表示凤头姜仔姜化学发光图; c表示黄瓜姜老姜化学发光图; d表示计量效应关系图。

根据图3中的回归方程可以算出凤头姜老姜、凤头姜仔姜、黄瓜姜粗黄酮对过氧化氢的 IC₅₀ 分别为

0.01±0.001 μg/mL、0.10±0.01 μg/mL 和、0.01±0.001 μg/mL, 由此可发现, 凤头姜老姜和黄瓜姜老姜粗黄酮对过氧化氢的清除作用相当, 但显著优于凤头姜仔姜的, 二者分别是凤头姜仔姜的 10 倍。

2.4 不同生姜粗黄酮对 DNA 损害的保护作用

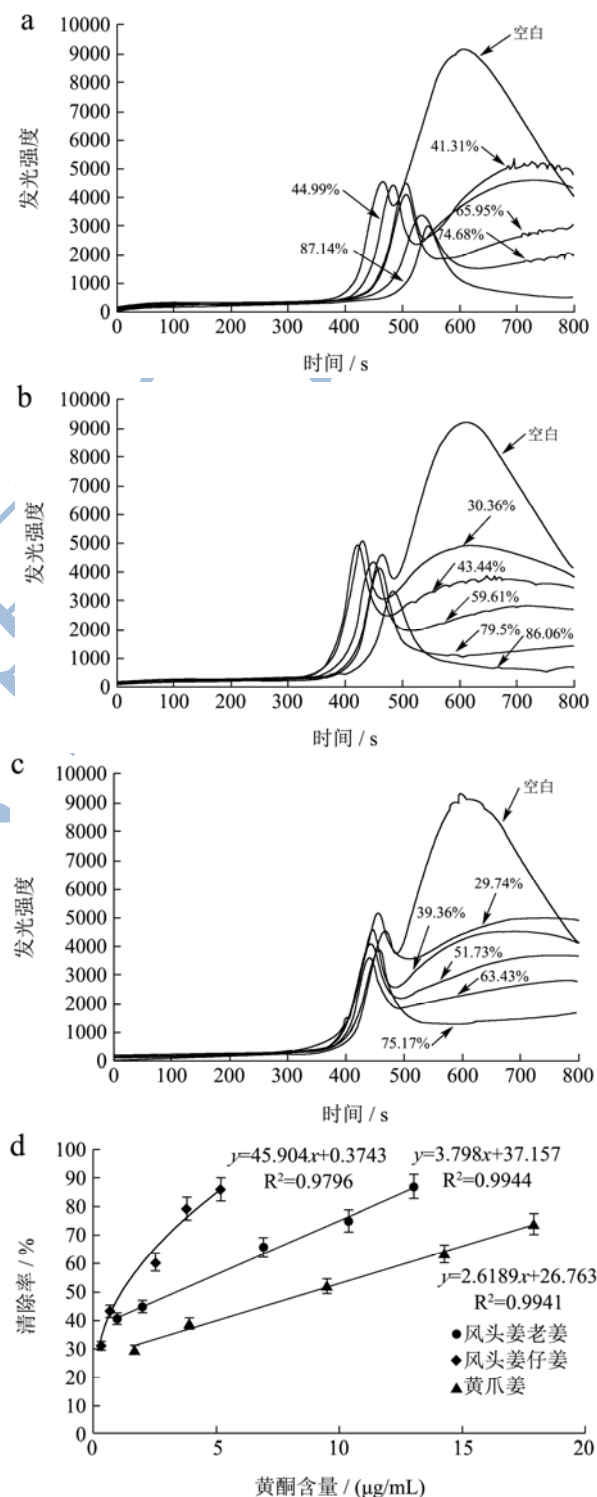


图4 不同生姜粗黄酮对 DNA 损害的保护作用

Fig.4 The protective effect of crude flavonoids from different ginger on the DNA damage

注: a 表示凤头姜老姜化学发光图; b 表示凤头姜仔姜化学发光图; c 表示黄瓜姜老姜化学发光图; d 表示计量效应关系图。

根据图 4 中的回归方程可以算出凤头姜老姜、凤头姜仔姜、黄瓜姜老姜粗黄酮对 DNA 损伤的保护作用 IC₅₀ 分别为 3.31±0.07 μg/mL、1.66±0.12 μg/mL 和 8.88±0.33 μg/mL, 由此可见凤头姜仔姜对 DNA 损伤的保护效果最好, 分别是凤头姜老姜和黄瓜姜老姜的 1.99 倍和 5.35 倍。

2.5 不同生姜粗黄酮对各自由基的清除指标

IC₅₀ 多重比较

从表 1 中可看出采收期对生姜粗黄酮抗氧化效果影响非常显著, 在四种抗氧化体系中, 一般老姜粗黄酮的抗氧化效果优于仔姜, 但在 DNA 损伤体系中, 仔姜的保护效果要优于老姜。就品种而言, 实验涉及的两个品种的生姜粗黄酮在四个抗氧化体系中的抗氧化效果差异性不同, 在双氧水体系中, 不同品种的生姜的抗氧化效果差异不显著, 其它三个体系差异性均达到了显著水平; 在羟自由基、双氧水和 DNA 损伤保护作用体系中, 凤头姜抗氧化效果优于黄瓜姜的, 但黄瓜姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用要略优于凤头姜的另外凤头姜粗黄酮的抗氧化效果, 但在 0.01 水平上差异并不显著。此表说明生姜品种和采收期对其粗黄酮的抗氧化效果有影响, 但此影响取决于

实验选用的抗氧化体系和自由基的种类。

2.6 不同生姜粗黄酮抗氧化能力的偏相关分析

在四种抗氧化体系中, 生姜粗黄酮对 O₂⁻清除和对·OH、H₂O₂、DNA 损伤体系之间具有显著正相关, 但就 H₂O₂ 体系和对 DNA 损伤抑制作用之间虽具有相关性, 但未达到显著水平。相关性不显著可能是因为不同体系发生反应的自由基种类不同且作用机理不同^[23]。也可能是因为 O₂⁻是第一氧自由基^[24,25], 参与多种氧化反应, 生成·OH 和 H₂O₂ 等氧化产物, 这三种自由基的产生有直接或间接的关系, 所以抗氧化剂对它们的清除作用也有相关性; O₂⁻在金属离子的催化下可衍生·OH 和 H₂O₂, H₂O₂ 也能催化产生·OH, 而·OH 活性最高, 作用于机体引发 Fenton 反应, 而后激发过氧化反应^[26], 所以·OH 对其它种类的自由基有影响。

DNA 的氧化损伤是通过 DNA 断裂键指标来检测的, 朱本占等^[27,28]的研究对其机理做出了阐述, 用硫酸铜-Phen-Vc-过氧化氢-DNA 体系检测 DNA 损伤, 铜离子能催化 Phen 与 H₂O₂ 作用生成·OH, 对抗坏血酸也有氧化过程。生姜粗黄酮的抗氧化成分能有效竞争铜离子, 从而降低金属离子对 Phen 的催化, 减少·OH 的产生, 从而达到对 DNA 损伤的保护作用。

表 1 不同生姜粗黄酮对各自由基的清除指标 IC₅₀ 多重比较

Table 1 Multiple comparison of IC₅₀ scavenging indexes of crude flavonoids from different ginger

种类	对 O ₂ ⁻ 的清除效果	对·OH 的清除效果	对 H ₂ O ₂ 的清除效果	对 DNA 损伤的保护作用
凤头姜老姜	4.45±0.05 ^{bb}	0.79±0.04 ^{cc}	0.01±0.001 ^{bb}	3.31±0.07 ^{bb}
凤头姜仔姜	5.47±0.21 ^{aa}	1.44±0.07 ^{bb}	0.10±0.01 ^{aa}	1.66±0.12 ^{cc}
黄瓜姜老姜	4.13±0.15 ^{cb}	1.72±0.07 ^{aa}	0.01±0.001 ^{bb}	8.88±0.33 ^{aa}

注: a, b, c; A, B, C 表示的是在 0.05 和 0.01 水平上的差异。

表 2 不同生姜粗黄酮抗氧化指标的偏相关分析

Table 2 The partial correlation analysis of antioxidant indexes of crude flavonoids from different ginger

		O ₂ ⁻	·OH	H ₂ O ₂	DNA 损伤
O ₂ ⁻	Pearson 相关性	1	.897**	.608**	.762**
	显著性 (双尾)		.000	.000	.000
·OH	Pearson 相关性	.897**	1	.539**	.924**
	显著性 (双尾)	.000		.001	.000
H ₂ O ₂	Pearson 相关性	.608**	.539**	1	.199
	显著性 (双尾)	.000	.001		.245
DNA 损伤	Pearson 相关性	.762**	.924**	.199	1
	显著性 (双尾)	.000	.000	.245	

注: **在 0.01 水平 (双尾) 上显著相关。

表 3 不同生姜粗黄酮功效成分与抗氧化指标的偏相关分析

Table 3 The partial correlation analysis between functional components of crude flavonoids from different ginger and antioxidant

		indexes			
		$O_2^{\cdot-}$	$\cdot OH$	H_2O_2	DNA 损伤
黄酮	Pearson 相关性	.934**	.880**	.365	.626*
	显著性 (双侧)	.000	.000	.182	.013
多酚	Pearson 相关性	.942**	.764**	.340	.763**
	显著性 (双侧)	.000	.001	.215	.001
Vc	Pearson 相关性	.833**	.799**	.304	.851**
	显著性 (双侧)	.000	.000	.271	.000
还原糖	Pearson 相关性	.888**	.811**	.436	.532*
	显著性 (双侧)	.000	.000	.104	.041

注: **. 在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; * 在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关。

对 $\cdot OH$ 的清除采用硫酸铜-Phen-Vc-过氧化氢体系, 此体系与对 DNA 损伤有一定相似之处, Phen 在铜离子和 EDTA 作用下引发 Fenton 反应产生 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 起氧化作用。用过氧化氢-鲁米诺体系测定对 H_2O_2 的清除作用, 溶解氧还原为 $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 发生 Haber-Weiss 反应生成 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 与鲁米诺生成的鲁米诺自由基与过氧化氢阴离子氧化, 达到激发态后, 发生化学发光反应^[29]。虽然这三个体系都是 $\cdot OH$ 作用产生氧化, 但机制过程不同, 其中对 $\cdot OH$ 的清除和 DNA 的保护反应机制相似, 所以 H_2O_2 体系的清除和对 DNA 损伤的抑制体系虽有相关性但此相关性未达显著水平。此外可能生姜粗黄酮中含有的其它化学成分与黄酮类物质抗氧化具有协同作用, 从而导致生姜粗黄酮在不同体系的清除作用效果也会有所不同^[30,31]。

2.7 不同生姜粗黄酮功效成分与抗氧化指标的偏相关分析

不同生姜粗黄酮中黄酮、多酚、Vc、还原糖均对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 的清除和 DNA 损伤的保护作用有显著相关性, 但四种成分对 H_2O_2 的清除作用的相关性为达到显著水平。虽然仅需微量的成分对过氧化氢便有十分显著的清除效果, 但由相关性来看, 这也许是多种功效成分协同复合作用的效果。

3 结论

3.1 本文采用化学发光法对凤头姜老姜、凤头姜仔姜、黄瓜姜老姜粗黄酮对超氧阴离子自由基、羟基自由基、过氧化氢的清除作用及 DNA 损伤的保护作用进行了测定, 结果显示: 在邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系中粗黄酮对超氧阴离子自由基清除效果由强到弱依次为: 黄瓜姜老姜、凤头姜老姜、凤头姜仔姜, 黄

瓜姜老姜对超氧阴离子自由基的清除作用分别是凤头姜老姜和仔姜的 1.08 倍和 1.32 倍, 凤头姜老姜对超氧阴离子自由基的清除效果是仔姜的 1.23 倍。在 $CuSO_4$ -Phen-Vc- H_2O_2 化学发光体系中粗黄酮对羟基自由基的清除效果由强到弱依次为: 凤头姜老姜、凤头姜仔姜、黄瓜姜老姜, 凤头姜老姜粗黄酮的抗氧化效果分别是凤头姜和黄瓜姜老姜的 1.82 倍和 2.18 倍。在双氧水-鲁米诺化学发光体系中, 凤头姜老姜和黄瓜姜老姜粗黄酮对过氧化氢的清除作用相当, 但显著优于凤头姜仔姜的, 二者分别是凤头姜仔姜的 10 倍。在 $CuSO_4$ -Phen-Vc- H_2O_2 -DNA 化学发光体系中粗黄酮对 DNA 损害的保护作用由强到弱依次为: 凤头姜仔姜、凤头姜老姜、黄瓜姜老姜, 凤头姜仔姜对 DNA 损伤的保护效果最好, 分别是凤头姜老姜和黄瓜姜老姜的 1.99 倍和 5.35 倍。

3.2 由以上实验结果可以发现, 品种和采收期对生姜黄酮抗氧化效果均有影响, 其中老姜黄酮的抗氧化效果优于仔姜, 但在 DNA 损伤体系中, 仔姜的保护效果要显著优于老姜。在双氧水体系中, 不同品种的生姜的抗氧化效果差异不显著, 其它三个体系差异性均达到了显著水平; 在羟基自由基、双氧水和 DNA 损伤保护作用体系中, 凤头姜抗氧化效果优于黄瓜姜的, 但黄瓜姜粗黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用要略优于凤头姜的另外凤头姜粗黄酮的抗氧化效果, 但在 0.01 水平上差异并不显著。

3.3 由于材料收集的限制, 本文只进行了两个品种和采收期的生姜粗黄酮的抗氧化体系的研究, 为了更好的验证本实验结果, 还需增加更多生姜品种和不同采收期的生姜原料, 对其进行更深入的探索, 以便更有效的利用自然资源。此外生姜粗黄酮中仍存在其它微量的化学成分, 如维生素 C 和还原糖等, 这些成分对黄酮的抗氧化效果的协同作用仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] 吴金平,田延富,郭凤领,等.武陵山区凤头姜产业现状及发展对策[J].中国园艺文摘,2015,10:58-59,109
WU Jin-ping, TIAN Yan-fu, GUO Feng-ling, et al. The industry present situation and development countermeasures of fengtou ginger in wuling mountainous area [J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2015, 10: 58-59, 109
- [2] 莫开菊,罗祖友,汪兴平,等.风味糟姜的护色技术研究[J].食品科学,2002,23(8):101-105
MO Kai-ju, LUO Zu-you, WANG Xing-ping, et al. The color-keeping technology of Zao-ginger [J]. Food Science, 2002, 23(8): 101-105
- [3] 贾生平,周宇梅.姜脯、姜汁的加工[J].企业技术开发,2000, 2:28
JIA Sheng-ping, ZHOU Yu-mei. The processing of preserved ginger and ginger juice [J]. Enterprise Technology Development, 2000, 2: 28
- [4] 郑灿龙,张月明,王良.姜茶保健饮料开发研究[J].食品工业科技,2006,2:112-114
ZHENG Can-long, ZHANG Yue-ming, WANG Liang. The development research of ginger health drink [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 2: 112-114
- [5] 吴晓慧,顾龚平,张卫明,等.姜综合利用及深加工技术研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22(3):5-9
WU Xiao-hui, GU Gong-ping, ZHANG Wei-ming, et al. Development of studies on comprehensive utilization and processing techniques of zingiber officinale [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2003, 22(3): 5-9
- [6] 莫开菊,柳圣,程超.生姜黄酮的抗氧化活性研究[J].食品科学,2006,27(9):110-115
MO Kai-ju, LIU Sheng, CHENG Chao. Study on antioxidant activity of the ginger flavonoid [J]. Food Science, 2006, 27(9): 110-115
- [7] 徐洪宇,张京芳,成冰,等.26种酿酒葡萄中抗氧化物质含量测定及品种分类[J].中国食品学报,2016,16(2):233-241
XU Hong-yu, ZHANG Jing-fang, CHENG Bing, et al. Content determination of the antioxidant substance and classifying the grape from 26 kinds of the wine grapes [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(2): 233-241
- [8] 程超,薛峰,李伟,等.3种处理方式对葛仙米藻胆蛋白清除超氧阴离子自由基能力的影响[J].食品科学,2014, 35(13): 26-31
CHENG Chao, XUE Feng, LI Wei, et al. Effect of pretreatment and extraction conditions on superoxide anion radical scavenging capacity of phycobiliprotein from *Nostoc sphaeroides* kütting [J]. Food Science, 2014, 35(13): 26-31
- [9] 韩少华,朱靖博,王妍妍.邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J].中国酿造,2009,28(6):155-157
HAN Shao-hua, ZHU Jing-bo, WANG Yan-yan. Measurement of the antioxidant activity by pyrogallol autoxidation [J]. China Brewing, 2009, 28(6): 155-157
- [10] 吕晓玲,孙荣荣.化学发光法测定匙羹藤提取物的抗氧化能力[J].食品科学,2006,27(10):514-516
LV Xiao-ling, SUN Rong-rong. Study on antioxidant of gymnemic extract by chemiluminescence [J]. Food Science, 2006, 27(10): 514-516
- [11] 郭蔼光,王振镒.邻苯三酚自氧化-化学发光法测定 SOD 活性[J].植物生理学通讯,1989,3:54-57
GUO Ai-guang, WANG Zhen-yi. Autoxidation of pyrogallol-chemiluminescence assay for superoxide dismutase activity [J]. Plant Physiology Communications, 1989, 3: 54-57
- [12] 吴秋华,李正平,方正.鲁米诺化学发光体系应用新进展[J].化学试剂,2005,27(4):212-216
WU Qiu-hua, LI Zheng-ping, FANG Zheng. Recent development of luminol chemiluminescence analysis [J]. Chemical Reagent, 2005, 27(4): 212-216
- [13] 胡赛因·默罕默德·克莱迪.新鲜莲子壳中黄酮的结构鉴定、抗氧化活性及抗肿瘤活性评价[D].武汉:华中农业大学,2010
- [14] 陈季武,胡天喜.测定 OH 产生与清除的化学发光体系[J].生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136-140
CHEN Ji-wu, HU Tian-xi. The chemical luminescence system for determination of the oh generation and removal [J]. Biochemical and Biophysical Development, 1992, 19(2): 136-140
- [15] 姚晓琳,徐晓云,段春红,等.锦橙皮中多甲氧基黄酮提取物的抗氧化活性和抗 DNA 损伤作用[J].食品科学,2009, 30(19):19-22
YAO Xiao-lin, XU Xiao-yun, DUAN Chun-hong, et al. Antioxidant activity and DNA damage prevention of polymethoxyflavone extracts from peels of *C. Sinensis* osbeck [J]. Food Science, 2009, 30(19): 19-22
- [16] Yi Z B, Yu Y, Liang Y Z, et al. In Vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of pericarpium citri reticulatae of a new citrus cultivar and its main flavonoids [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(4): 597-603
- [17] 陈季武,朱振勤,王喜露,等.一种新颖的测定和分析羟自由

- 基氧化损伤 RNA 及其分子机理的化学发光体系[J].发光学报,2002,23(1):71-74
- CHEN Ji-wu, ZHU Zhen-qin, WANG Xi-lu, et al. A novel chemiluminescence system for detecting and analyzing oxidative damaged RNA by hydroxyl radical and molecular mechanism [J]. Chinese Journal of Luminescence, 2002, 23(1): 71-74
- [18] 徐盼.化学发光法用于评价蜂蜜对 DNA 氧化损伤保护能力及其机理研究[D].西安:西北大学,2015
- XU Pan. A chemiluminescence method for evaluation the prevention oxidative DNA damage effect of honey and its mechanism [D]. Xi'an: Northwest University, 2015
- [19] Juan Zhou, Peng Li, Ni Cheng, et al. Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(8): 2766
- [20] 张科卫,马彩霞,缪六舒.Folin-Ciocalciu 比色法测定不同产地生姜中总酚[J].中成药,2012,34(12):186-188
- ZHANG Ke-wei, MA Cai-xia, LIAO Liu-shu. Determination of total phenol of ginger from different regions by folin-ciocalciu colorimetric methods [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2012, 34(12): 186-188
- [21] 于国萍.食品生物化学实验[M].北京:中国林业出版社,2012
- YU Guo-ping. Food biochemistry experiments [M]. Beijing: Chinese Forestry Publishing House, 2012
- [22] GB/T5009.86-2003.蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定(荧光法和 2,4-二硝基苯肼)[S]
- GB/T 5009.86-2003. Determination of total ascorbic acid in vegetables, fruits and their products (Fluorescent and 2, 4-dinitrophenylhydrazine) [S]
- [23] 郑荣梁.自由基生物学[M].北京:高等教育出版社,1992
- ZHENG Rong-liang. Free radical biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1992
- [24] Yao D, Vlessidis A G, Evmiridis N P, et al. Novel chemiluminescence method for detection of superoxide anions and its application to dry-cured meat [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 467(1-2): 145-153
- [25] 刘志东,郭本恒,王荫榆.抗氧化活性检测方法的研究进展[J].天然产物研究与开发,2008,20(3):563-567
- LIU Zhi-dong, GUO Ben-heng, WANG Yin-yu. Methods to determine antioxidant activity [J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20(3): 563-567
- [26] 朱本占,毛莉,范瑞梅,等.天然抗氧化剂麦角硫因保护铜所致 DNA 和蛋白质氧化损伤的作用机理[J].科学通报,2011,56(27):2283-2288
- ZHU Ben-zhan, MAO Li, FAN Rui-mei, et al. Mechanism of protection by natural antioxidant ergothioneine against copper-induced oxidative damage to DNA and protein [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(27): 2283-2288
- [27] Zhu B Z, Mao L, Fan R M, et al. Ergothioneine prevents copper-induced oxidative damage to DNA and protein by formation of a redox-inactive ergothioneine-copper complex [J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(1): 30-34
- [28] 杜建修.鲁米诺-过氧化氢-还原剂化学发光反应体系的研究[D].西安:陕西师范大学,2000
- DU Jian-xiu. Xian: study on the chemiluminescence system of luminol-hydrogen peroxide-reducing agent [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2000
- [29] Shirin Apr, Prakash A. Chemical composition and antioxidant properties of ginger root(*Zingiber officinale*)[J]. Journal of medicinal plant research, 2011, 4(24): 2674-2679
- [30] ALI B H, Blunden G, Tanira M O, et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(2): 40-420
- [31] Yuxin Li, Yan Hong, Yanquan Hana, et al. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1011: 223-232