

光谱法研究抗氧化剂、DPPH 与人血清蛋白三元体系的作用

汤小玉¹, 罗云敬^{1*}, 李曙光², 林太凤¹, 王妍¹

1. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124
2. 北京市工业技师学院食品中心, 北京 100023

摘要 选取几种天然抗氧化剂杨梅素、桑色素、辣椒碱、甜菜碱作为研究对象, 运用荧光光谱法、同步荧光光谱法以及三维荧光光谱法研究了四种抗氧化剂以及 DPPH 自由基与人血清蛋白相互作用, 结果表明辣椒碱、甜菜碱、V_C 不与人血清蛋白发生猝灭反应, 杨梅素、桑色素、DPPH 均能够与人血清蛋白发生猝灭反应, 反应均为形成了稳定复合物而导致的静态猝灭, 通过疏水作用力与 HSA 结合, 结合位点数均为 1, 主要结合位点在色氨酸基团附近, DPPH 与人血清蛋白猝灭过程改变了人血清蛋白结构的疏水性, 引起蛋白质构象发生变化, 而杨梅素、桑色素与人血清蛋白相互作用未造成其构象发生了变化。运用荧光光谱法研究了四种抗氧化剂抑制 DPPH 直接损伤人血清蛋白的能力, 杨梅素、桑色素、辣椒碱、甜菜碱、V_C 对 DPPH 损伤 HSA 的抑制率分别为 25%, 18.30%, 85.38%, 4.02% 和 84.58%。根据分子结构分析辣椒碱主要通过清除 DPPH 自由基作用从而抑制其损伤人血清蛋白, 根据二元体系反应结果可知杨梅素与桑色素三元体系反应过程中两种抗氧化剂与 DPPH 竞争结合位点, 因此杨梅素、桑色素主要通过占据结合位点的方式抑制 DPPH 损伤人血清蛋白, 而甜菜碱既不能占据结合位点也不能清除自由基, 因而抑制能力最弱。分析表明几种天然抗氧化剂的抑制能力与其分子结构中主要官能团结构密切相关。

关键词 天然抗氧化剂; DPPH 自由基; 人血清蛋白; 荧光光谱法

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)10-3122-07

引言

DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-Diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl)hydrazyl) 是一种稳定的含氮自由基, 具有强氧化性^[1-2]。能够与具有抗氧化物质的活性成分发生反应生成稳定的 DPPH 化合物, DPPH 检测法常用于研究天然抗氧化活性成分的抗氧化能力^[3-6]。人血清蛋白 (human serum albumin, HSA) 在人体内能够与许多种化合物结合, 起着贮存和运输作用^[7-8]。因此若 HSA 与具有强氧化性的自由基结合引起构象变化, 则会影响人体正常生理代谢循环的运转; 因此有必要探究天然抗氧化剂与自由基以及 HSA 之间的相互作用机制。

相关研究证明多种天然抗氧化剂具有清除自由基、氧化的能力。Zhang 等^[9] 研究证明杨梅素能够抑制生物体内超氧根阴离子形成。Jabeen^[10] 等研究证明桑色素在较低浓度时

即可对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 产生良好的清除作用。刘安^[11] 等研究证明辣椒碱具有清除 DPPH 自由基, 超氧根阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$), 以及 $\cdot\text{OH}$ 的能力。王策^[12] 等研究证明 $\cdot\text{OH}$ 自由基能够降低蛋白质结构中离子键与氢键作用力, 致使蛋白质二级结构发生变化。李学鹏^[13] 等研究发现 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有强氧化性能够增加六线鱼肌原纤维蛋白表面疏水性, 导致六线鱼肌原纤维蛋白结构和性质发生改变。安鹏姣^[14] 等研究了三苯甲基自由基酯基衍生物与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 之间的相互作用。

目前关于抗氧化剂与自由基以及自由基与蛋白质之间相互作用已有一定的研究, 但是关于抗氧化剂、自由基以及蛋白质三元体系的相关研究甚少。运用同步荧光光谱法以及三维荧光光谱法研究了 DPPH、杨梅素、桑色素、辣椒碱、甜菜碱与 HSA 之间的相互作用, 以及几种天然抗氧化剂对 DPPH 与 HSA 之间相互作用的影响。几种抗氧化剂的分子结构见图 1。本次研究对进一步天然抗氧化剂抑制自由基损伤能力提供了实验基础和理论依据, 对于药物、保健品以及

收稿日期: 2018-09-06, 修订日期: 2019-02-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2015BAK44B00) 资助

作者简介: 汤小玉, 1989 年生, 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室博士研究生

e-mail: 892127710@qq.com * 通讯联系人 e-mail: luoyj@bjut.edu.cn

食品添加剂行业健康化发展具有重要意义。

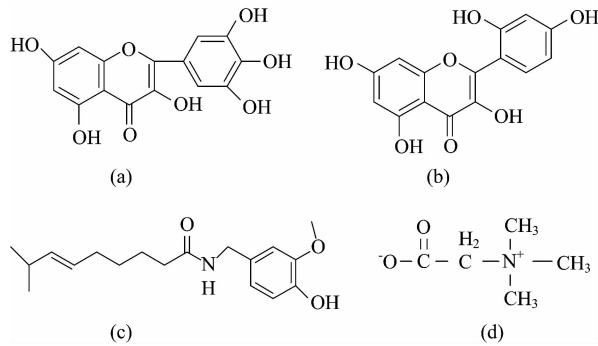


图 1 几种抗氧化剂分子结构图

(a): 杨梅素; (b): 桑色素; (c): 辣椒碱; (d): 甜菜碱

Fig. 1 Molecular structure diagrams of several antioxidants

(a): Myricetin; (b): Morin; (c): Capsaicin; (d): Betaine

1 实验部分

1.1 材料与仪器

DPPH 购自于上海阿拉丁, 维生素 C、无水乙醇购自于天津市福晨化学试剂厂, 氢氧化钠、盐酸购自于北京化工厂, 甲醇(GR)、杨梅素、辣椒碱、桑色素、甜菜碱购自于上海安谱科学实验仪器有限公司, 三羟甲基氨基甲烷购自于国药集团化学试剂有限公司。杨梅素、辣椒碱、桑色素、甜菜碱、DPPH 用无水乙醇配置成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。 V_C 用超纯水配置成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。

F-4500 荧光分光光度计, BS-210S 电子天平购于上海舜宇恒平科学仪器有限公司, 电热恒温水槽购于上海森信实验仪器有限公司, PHS-25 数显酸度计购于上海精密科学仪器有限公司, PR020XXM1 纯水机购于北京 PALL 纯水公司。

1.2 方法

准确称取 3.9 mg DPPH 于 10 mL 的容量瓶中, 用无水乙醇定容得 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。

天然抗氧化剂以及 DPPH 和人血清蛋白相互作用: 无水乙醇配置 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 储备液, 无水乙醇梯度稀释 DPPH 储备液浓度分别为 3×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} 和 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取一定浓度的 DPPH 溶液 0.2 mL 于 5 mL 的离心管中, 加入 0.8 mL 浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 溶液, 混匀后加入 2 mL 预热至 37 °C 的 pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 混匀后于 37 °C 水浴保温 30 min。取出上述反应液倒入 1 cm 的荧光比色皿中, 随后进行波长差为 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 进行同步荧光光谱检测, 以及三维荧光检测。几种天然抗氧化剂进行相同的实验, V_C 进行阳性对照。实验三次结果取平均值。

三元体系之间相互作用: 在 5 mL 的离心管中加入 0.8 mL 浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 溶液, 加入 pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 随后加入 0.2 mL 浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的天然抗氧化剂溶液, 混匀后于 37 °C 水浴避光反

应 10 min, 反应后加入 0.2 mL 不同浓度的 DPPH 溶液(浓度分别为: 3×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)混匀后于 37 °C 水浴避光反应 30 min。反应结束后于 1 cm 荧光比色皿中依次检测荧光强度。本实验使用 V_C 作为阳性对照, 实验结果重复三次取平均值。

荧光检测条件: 荧光光谱仪检测 $E_x = 280 \text{ nm}$, E_M 为 300~500 nm 的发射光谱与三维荧光光谱, 随后进行波长差为 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 进行同步荧光光谱检测。荧光参数如下: 扫描模式: Emission/3-D Scan, 数据模式: Fluorescence, 激发波长: 280 nm, 发射波长范围: 300~450 nm, 扫描速度: $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 激发狭缝: 10.0 nm, 发射狭缝: 5.0 nm。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化剂/DPPH 与 HSA 的二元体系相互作用检测结果

2.1.1 抗氧化剂/DPPH 与 HSA 之间荧光猝灭光谱

37 °C 下 HSA 与不同浓度抗氧化剂、DPPH 相互作用的荧光光谱如图 2。不同浓度猝灭率见表 1。

由图 2 可知随着杨梅素、桑色素、DPPH 浓度的增大 HSA 的峰值明显降低, 说明杨梅素、桑色素、DPPH 与 HSA 均发生猝灭反应, 辣椒碱在该浓度范围不与 HSA 发生猝灭反应, 甜菜碱-HSA、 V_C -HSA 检测结果同辣椒碱。

2.1.2 抗氧化剂/DPPH 与 HSA 之间相互作用猝灭类型

根据 Stern-Volmer 方程(1)与 Lineweaver-Burk 方程(2)进行分析

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] + 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[Q] \quad (2)$$

F_0 和 F 分别为加入猝灭剂与加入猝灭剂时反应荧光强度, K_q 是蛋白质的猝灭速率常数; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。 τ_0 指蛋白质未加入猝灭剂时的平均荧光寿命(通常为 10^{-8} s), K_A 为结合常数; Q 是指猝灭剂浓度。以猝灭剂浓度 Q 为 x 轴, F_0/F 为 y 轴作 Stern-Volmer 曲线, 如果猝灭反应类型是单一的静态猝灭或者动态猝灭, 则 Stern-Volmer 曲线呈线性。如果猝灭反应类型为静态与动态共同参与的混合猝灭, 则 Stern-Volmer 曲线呈弯曲的非线性曲线。以 $\lg[Q]$ 为 x 轴, $\lg[(F_0 - F)/F]$ 为 y 轴作 Lineweaver-Burk 曲线, DPPH、杨梅素、桑色素的 Stern-Volmer 曲线见图 3(a), Lineweaver-Burk 曲线见图 3(b)。

由图 3(a)可知杨梅素、桑色素、DPPH 与 HSA, 之间作用的猝灭率呈良好线性关系, 说明该浓度范围杨梅素、桑色素、DPPH 与 HSA 发生作用为单一类型的猝灭; 从线性关系斜率可知杨梅素-HSA、桑色素-HSA、DPPH-HSA 的 K_{SV} 值分别为 1.73×10^4 , 3.82×10^4 和 $2.24 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 推算出 K_q 的值分别为 1.73×10^{12} , 3.82×10^{12} 和 $2.24 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。 K_q 大于 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($K_q = 2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 为蛋白质的动态猝灭速率常数的最大值), 表明杨梅素、桑色素、DPPH 和 HSA 的猝灭反应均为

形成了稳定复合物而导致的静态猝灭。根据图 3(b) 中 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 与 $\lg[Q]$ 线性关系的斜率和截距可算出杨梅素-HSA、桑色素-HSA、DPPH-HSA 结合位点数分别为 0.73,

1.20 和 0.79, 均约等于 1。结果表明, DPPH 与 HSA、杨梅素与 HSA 的结合摩尔比均为 1:1。

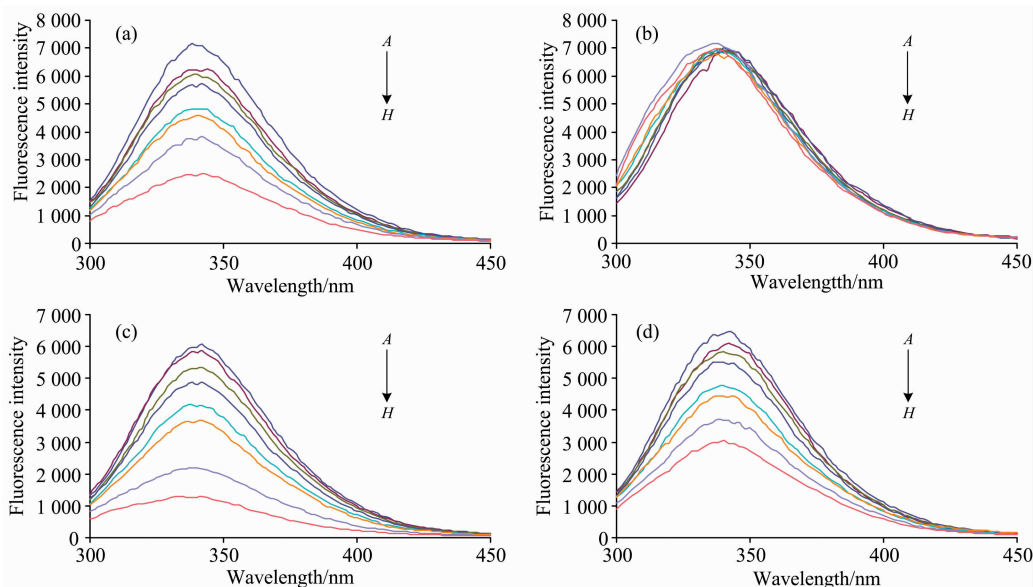


图 2 不同浓度的抗氧化剂以及 DPPH 与人血清蛋白作用的荧光光谱
 (a): 杨梅素-HSA; (b): 辣椒碱-HSA; (c): 桑色素-HSA; (d): DPPH-HSA
 A→H 的浓度为: (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) × 10⁻⁶ mol · L⁻¹

Fig. 2 Fluorescence spectra of different concentrations of antioxidants and the effects of DPPH on HSA
 (a): Myricetin-HSA; (b): Capsaicin-HSA; (c): Morin-HSA; (d): DPPH-HSA
 The concentration of A→H is (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) × 10⁻⁶ mol · L⁻¹

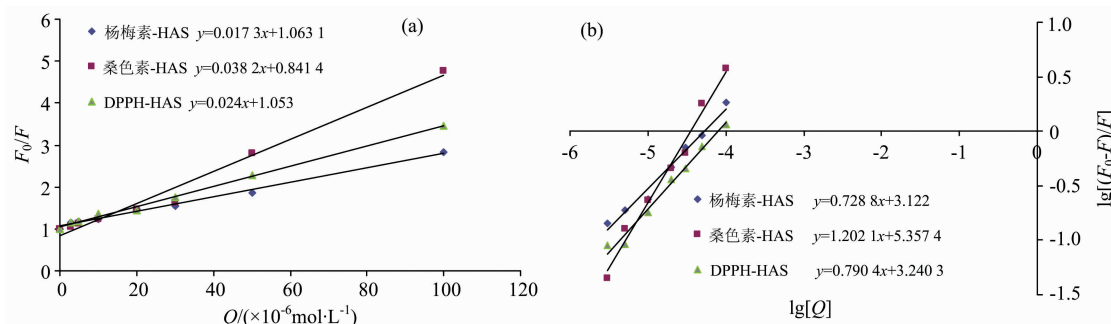


图 3 荧光峰值 F 与猝灭剂浓度 Q 之间的线性关系

(a) 和 (b) 分别为杨梅素-HSA、桑色素-HSA、DPPH-HSA 的 Stern-Volmer 曲线与 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 3 The linear relationship between fluorescence intensity and quencher concentration

(a) and (b) are respectively the Stern-Volmer curve and Lineweaver-Burk curve of Myricetin-HSA, Morin-HSA and DPPH-HSA

2.1.4 杨梅素、桑色素、DPPH 与人血清蛋白猝灭作用同步荧光光谱

当 $\Delta\lambda$ 的值分别为 60 和 15 nm, 同步荧光分别显示出色氨酸和酪氨酸残基的特征信息。几种抗氧化剂同步荧光光谱见图 4。

由图 4 可知酪氨酸和色氨酸残基的荧光强度随着猝灭剂浓度的增加逐渐降低, 杨梅素-HSA 体系中酪氨酸荧光光谱发生蓝移(从 288 nm 到 285 nm), 疏水性增加, 而色氨酸荧光光谱呈红移(从 282 nm 到 286 nm), 疏水性降低。桑色素-

HSA 检测结果与杨梅素-HSA 体系相同。DPPH-HSA 体系中色氨酸最大发射波长发生了轻微红移现象(从 282 nm 到 285 nm), 疏水性降低。由图 5 荧光猝灭效率曲线可知几种体系中 $\Delta\lambda=60$ nm 的曲线始终比 $\Delta\lambda=15$ nm 低, 表明在所研究浓度范围内, 两种物质主要猝灭的是人血清蛋白的色氨酸残基, 说明杨梅素、桑色素、DPPH 是通过疏水作用力与 HSA 结合, 在 HSA 上的结合位点距离酪氨酸较远, 主要在色氨酸附近。

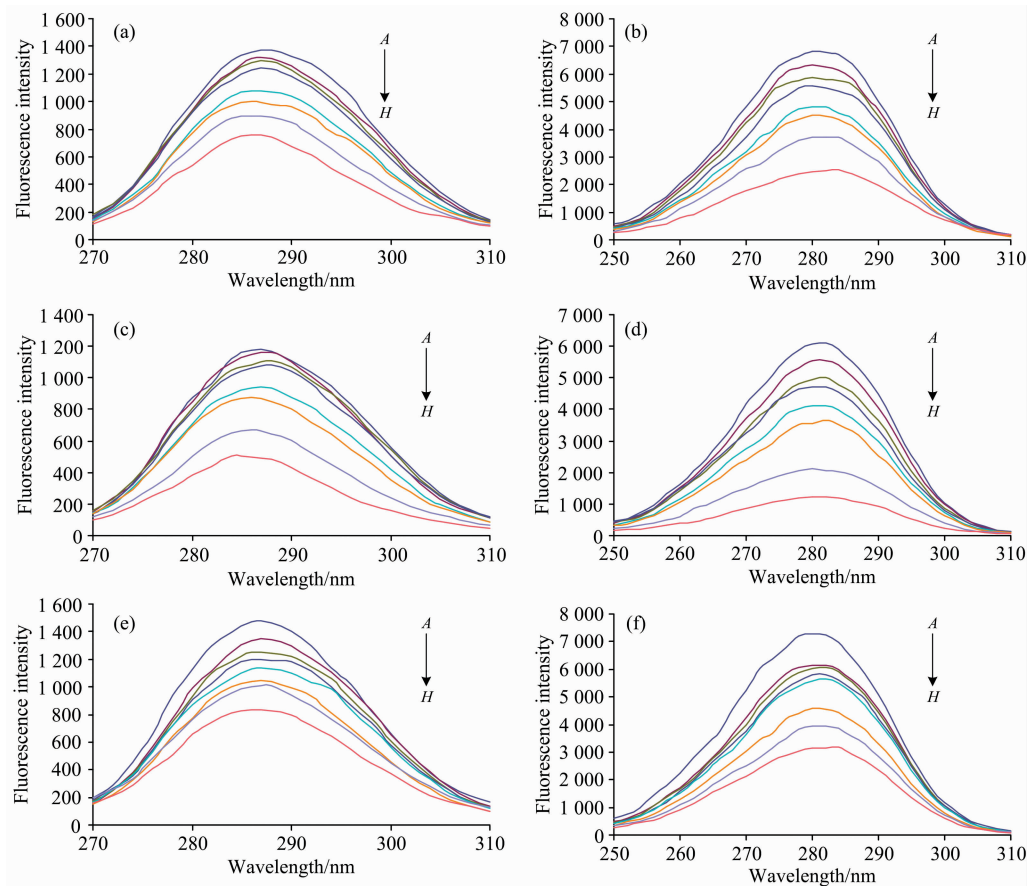


图 4 不同浓度抗氧化剂和 DPPH 与 HSA 作用的同步荧光光谱图

(a), (c), (e) 分别为杨梅素、桑色素、DPPH, $\Delta\lambda=15$ nm; (b), (d), (f) 分别为杨梅素、桑色素、DPPH, $\Delta\lambda=60$ nm;

A→H 的浓度为: (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) $\times 10^{-6}$ mol \cdot L $^{-1}$

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of different concentrations of antioxidants and DPPH with HSA

(a), (c), (e) are respectively Myricetin, Morin, DPPH, $\Delta\lambda=15$ nm;

(b), (d), (f) are respectively Myricetin, Morin, DPPH, $\Delta\lambda=60$ nm;

The concentration of A→H is: (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) $\times 10^{-6}$ mol \cdot L $^{-1}$

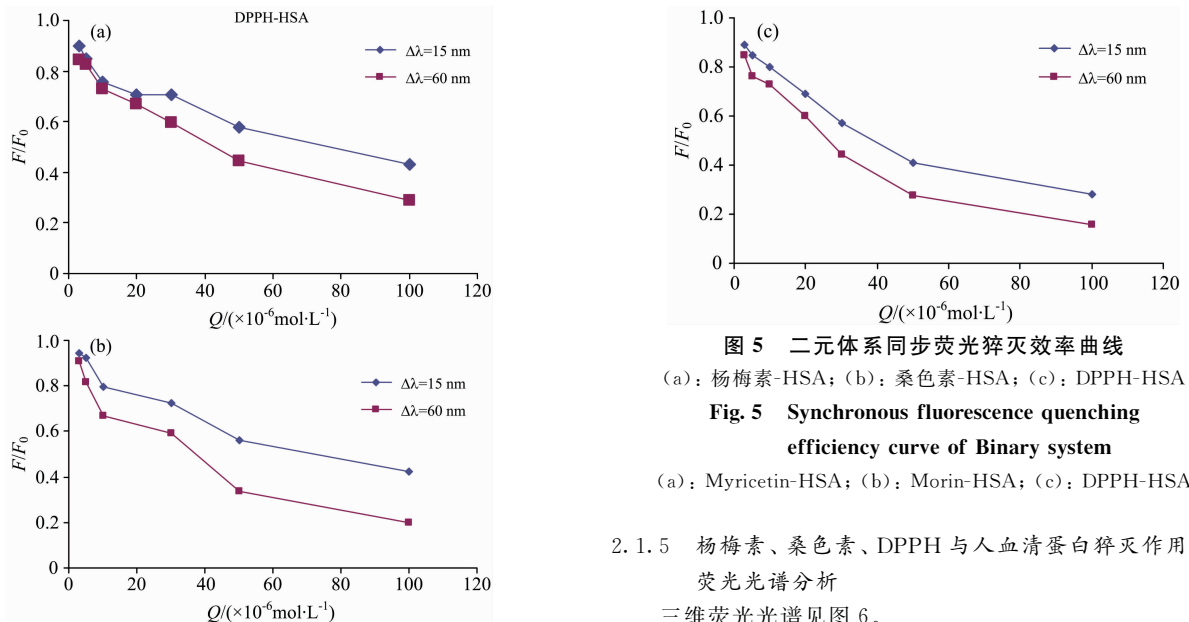


图 5 二元体系同步荧光猝灭效率曲线

(a): 杨梅素-HSA; (b): 桑色素-HSA; (c): DPPH-HSA

Fig. 5 Synchronous fluorescence quenching efficiency curve of Binary system

(a): Myricetin-HSA; (b): Morin-HSA; (c): DPPH-HSA

2.1.5 杨梅素、桑色素、DPPH 与人血清蛋白猝灭作用三维荧光光谱分析

三维荧光光谱见图 6。

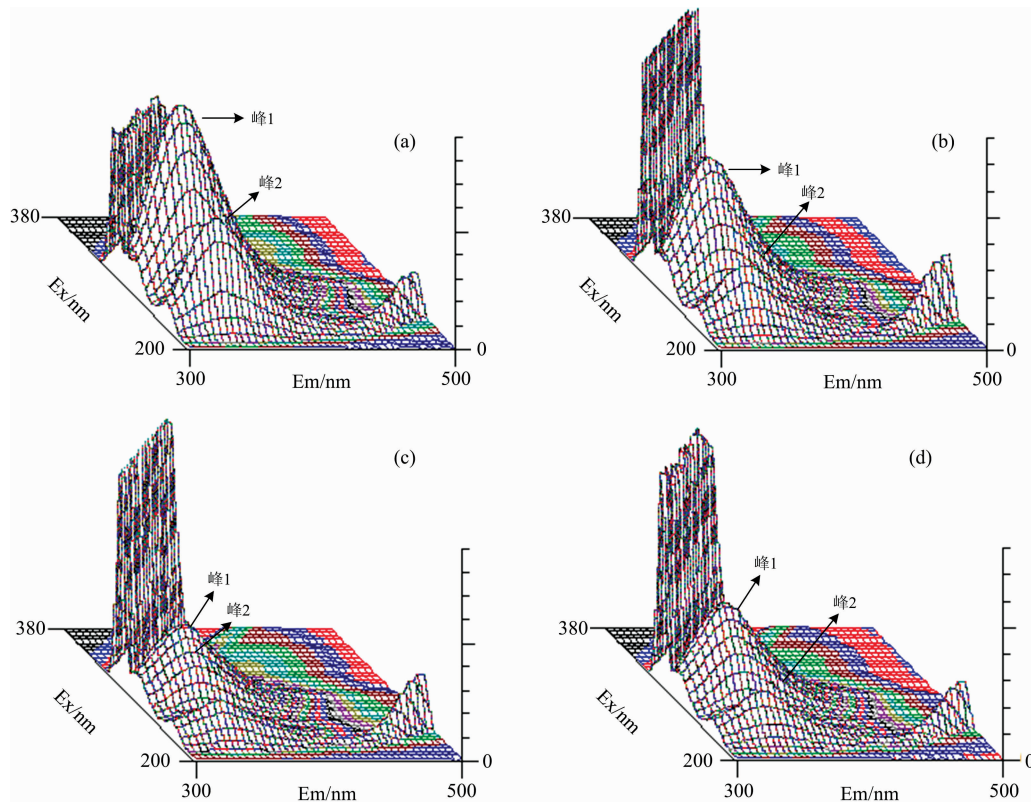


图 6 二元体系三维荧光光谱图

(a): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA; (b): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH;
 (c): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 桑色素; (d): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 杨梅素

Fig. 6 Three dimensional fluorescence spectrum of Binary system

(a): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA; (b): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH;
 (c): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Morin; (d): $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HSA + $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Myricetin

根据图 6 三维荧光检测结果可知, HSA 的三维荧光峰中峰 1 : 峰 2 = 6 851 : 4 001 = 1.71 : 1; DPPH-HSA 峰 1 : 峰 2 = 5 043 : 2 127 = 2.37 : 1, 桑色素-HSA 峰 1 : 峰 2 = 3 187 : 1 821 = 1.75 : 1; 杨梅素-HSA 峰 1 : 峰 2 = 2462 : 1405 = 1.75 : 1, 说明在猝灭反应过程中 DPPH 对峰 2 的猝灭作用更加明显, 可能是因为几乎所有的疏水腔都存在于 HSA 的圆筒状结构峰。DPPH 的猝灭作用导致疏水性发生改变, 从而导致 HSA 构象发生变化, 而杨梅素、桑色素与 HSA 相互作用时未造成 HSA 构象发生了变化。

2.2 抗氧化剂-DPPH-HSA 三元体系检测结果

由图 1(d)与图 7 对比可知 DPPH-HSA 二元体系的荧光猝灭反应效率强于杨梅素、桑色素、辣椒碱、V_C 三元体系猝灭反应过程, 甜菜碱-DPPH-HSA 的猝灭效果与 DPPH-HSA 相比无明显变化。由图 8 可知杨梅素、桑色素、辣椒碱、V_C 降低了 DPPH-HSA 的猝灭效率, 而甜菜碱-DPPH-HSA 体系猝灭效率与 DPPH-HSA 体系相比无明显变化。

2.2.2 三元体系猝灭机理

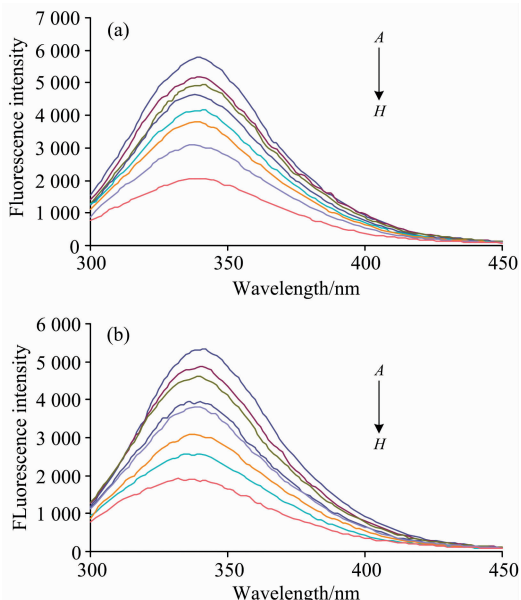
根据式(3)计算抗氧化剂对 DPPH⁻与 HSA 结合损伤的抑制率。

$$\text{抑制率} = [(K_{sv} - K'_{sv}) / K_{sv}] \times 100\% \quad (3)$$

式中, K_{sv} 为 DPPH 对 HSA 的猝灭常数; K'_{sv} 为加入抗氧化

剂后 DPPH 对 HSA 的猝灭常数。

由图 9 可知三元体系猝灭反应为单一的猝灭, 由表 1 可知 $K_q > 2 \times 10^{10}$ ($K_q = 2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 为蛋白质的动



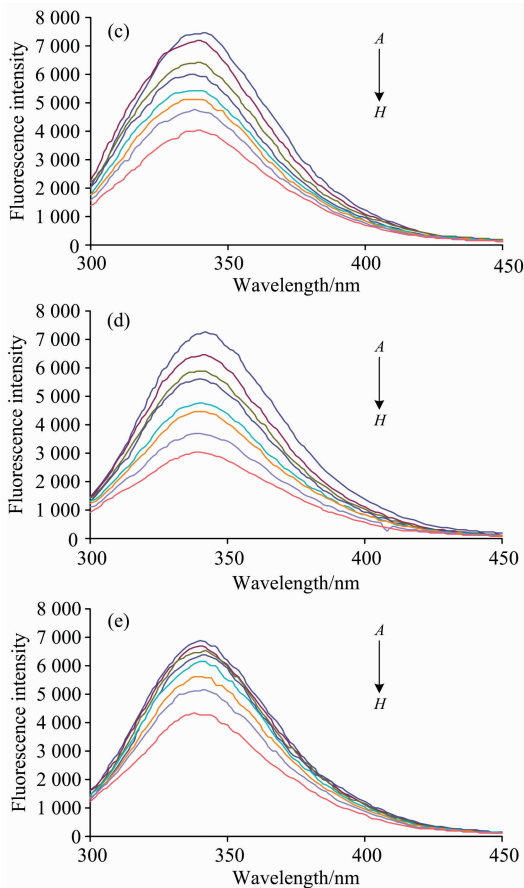


图 7 三元体系荧光光谱图

(a): 杨梅素-DPPH-HSA; (b): 桑色素-DPPH-HSA; (c): 辣椒碱-DPPH-HSA; (d): 甜菜碱-DPPH-HSA; (e): VC-DPPH-HSA
A→H DPPH 的浓度为: (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) × 10⁻⁶ mol · L⁻¹

Fig. 7 Fluorescence spectra of ternary system

(a): Myricetin-DPPH-HSA; (b): Morin-DPPH-HSA; (c): Capsaicin-DPPH-HSA; (d): Betaine-DPPH-HSA; (e): VC-DPPH-HSA
The concentration of DPPH A to H is (0, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100) × 10⁻⁶ mol · L⁻¹

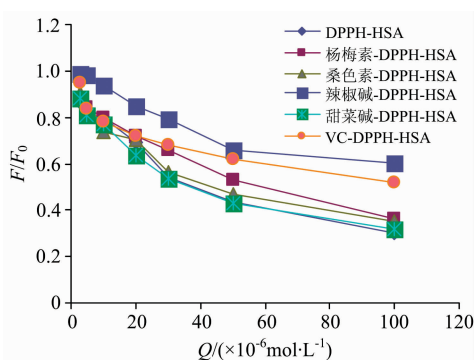


图 8 DPPH-HSA 与三元体系猝灭效率对比图

Fig. 8 Comparison of quenching efficiency between DPPH-HSA and ternary system

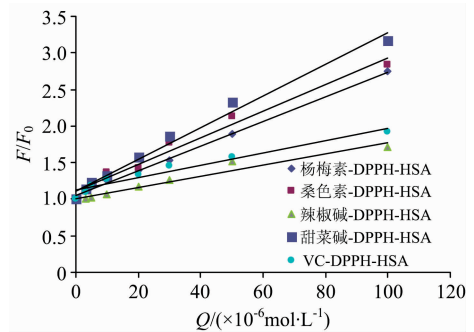


图 9 三元体系 Stern-Volmer 曲线图

Fig. 9 Curve between F_0/F and quenching agent Q of ternary system

表 1 DPPH-HSA 与三元体系的 K_{SV} 和 K_q 值

Table 1 The K_{SV} and K_q values of DPPH-HSA and ternary system

体系	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$
DPPH-HSA	2.24×10^4	2.24×10^{12}
杨梅素-DPPH-HSA	1.68×10^4	1.68×10^{12}
桑色素-DPPH-HSA	1.83×10^4	1.83×10^{12}
辣椒碱-DPPH-HSA	3.7×10^3	3.7×10^{11}
甜菜碱-DPPH-HSA	2.15×10^4	2.15×10^{12}
VC-DPPH-HSA	3.9×10^3	3.9×10^{11}

态猝灭速率常数的最大值), 表明三元体系反应为静态猝灭, 三元体系猝灭速率常数 K_{SV} 比 DPPH-HSA 的 K_{SV} 低。在 $3 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内杨梅素、桑色素、辣椒碱、甜菜碱、VC 对 DPPH 直接与 HSA 结合损伤的抑制率分别为 25%, 18.30%, 85.38%, 4.02% 和 84.58%。因为, 游离的天然抗氧化剂中含有不同的抗氧化活性结构, 能够起到抑制 DPPH 的作用。所以, 含有较多 OH 基团与共轭基团的 VC 具有较强的抑制能力; 辣椒碱分子结构中含有酚羟基、C=C、C=O、—NH 等活性基团, 因此辣椒碱与 VC 是通过清除 DPPH 的方式从而抑制其损伤 HSA。结合二元体系实验结果分析, 杨梅素、桑色素、DPPH 和 HSA 二元体系猝灭反应过程均是通过疏水作用力与 HSA 结合, 有 1 个接近色氨酸附近的结合位点, 说明杨梅素、桑色素三元体系反应过程中主要通过占据结合位点的方式抑制 DPPH 损伤 HSA。甜菜碱-DPPH-HSA 三元体系反应过程中甜菜碱既不能占据结合位点也不能清除自由基, 因而抑制能力最弱。基于上述分析, 抗氧化剂对 DPPH 损伤 HSA 的抑制作用主要通过占据结合位点和自身自由基清除能力两种因素, 在两种因素中自身自由基清除能力占主导作用。

3 结论

运用荧光光谱法、同步荧光光谱法以及三维荧光光谱法研究了抗氧化剂、DPPH 与人血清蛋白三元体系的作用, 结果显示 DPPH 能够与 HSA 发生猝灭反应, 并引起 HSA 构象变化。三元体系中杨梅素与桑色素主要是通过占据结合位

点的方式减少损伤, 辣椒碱与 VC 是通过其抗氧化活性基团抑制自由基损伤蛋白。本次研究的实验方法适用于研究一些天然化合物的活性成分的抗氧化性, 以及化学食品添加剂对

蛋白质的损伤研究, 有助于保护食品安全、药品安全、维护人体健康。

References

- [1] WEI Xian-ya, YIN Li-qin, ZHONG Cheng, et al(韦献雅, 殷丽琴, 钟 成, 等). Food Science(食品科学), 2014, 35(9): 317.
- [2] Nurdianah H F, Ahmad Firdaus A H, EshaifolAzam O, et al. International Food Research Journal, 2016, 23(1): 403.
- [3] LI Cai-yi, ZHANG Guo-ying, DONG Xiu-ying, et al(李采恹, 张国英, 董秀英, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2017, 37(8): 2402.
- [4] LI Chang-qin, YAO Chen, ZHU Rong-yao, et al(李昌勤, 姚 辰, 朱荣遥, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2016, 41(9): 1670.
- [5] Musa K H, Abdullah A, Alhaiqi A. Food Chemistry, 2016, 194(4): 705.
- [6] Oliveira G K F, Tormin T F, Sousa R M F, et al. Food Chemistry, 2016, 192: 691.
- [7] Hazra M, Dolai T, Pandey A, et al. Journal of Saudi Chemical Society, 2017, 21: S240.
- [8] Dangkoobf F, Housaindokht M R, Asoodeh A, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2014, 137: 1106.
- [9] Zhang C, Zhang G, Liao Y, et al. Food Chemistry, 2017, 221: 1569.
- [10] Jabeen E, Janjua N K, Ahmed S, et al. Electrochimica Acta, 2017, 258.
- [11] LIU An, WANG Zhen, LIU Lin-feng, et al(刘 安, 王 振, 刘林峰, 等). Food & Machinery(食品与机械), 2015, (6): 179.
- [12] WANG Ce, LI Xia, DENG Shao-ying, et al(王 策, 李 侠, 邓少颖, 等). Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学), 2017, 50(15): 3013.
- [13] LI Xue-peng, ZHOU Kai, WANG Jin-xiang, et al(李学鹏, 周 凯, 王金厢, 等). Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology(中国食品学报), 2014, 14(6): 19.
- [14] AN Peng-jiao, YU Nan-nan, SUN Rui-sheng, et al(安鹏姣, 于楠楠, 孙睿声, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2017, 38(8): 1354.

The Effects of Antioxidant, DPPH and Human Serum Albumin Ternary System Studied by Spectrophotometry

TANG Xiao-yu¹, LUO Yun-jing^{1*}, LI Shu-guang², LIN Tai-feng¹, WANG Yan¹

1. Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

2. Food Center, Beijing Industrial Technician College, Beijing 100023, China

Abstract In this study, the natural antioxidants myricetin, morin, capsaicin and betaine were selected as the research objects, and the interaction between several antioxidants, DPPH free radical and human albumin was studied by synchronous fluorescence spectroscopy and three-dimensional fluorescence spectroscopy. Results showed that capsaicin, betaine, VC do not have quench effects with human serum albumin, and myricetin, morin and DPPH have quench effects with human albumin. The reactions are static quenching caused by stable complexes, combining hydrophobic interaction with HSA. The binding sites are 1, the main binding sites are near the tryptophan groups, and DPPH and human serum albumin's quenching process changes the structure of human serum protein hydrophobicity, causes protein conformation changes, and the interaction between myricetin, morin and human albumin does not cause its conformation changes. Fluorescence spectroscopy were used to study the inhibitory effect of several antioxidants on DPPH-induced direct damage to human serum albumin. The inhibition rate of myricetin, morin, capsaicin, betaine and VC to DPPH damage HSA was 25%, 18.30%, 85.38%, 4.02% and 84.58%. Capsaicin inhibits the damage of human serum albumin by inhibiting the action of DPPH. The binary system reaction results showed that myricetin reacted with Morin ternary system to form competitive binding sites with DPPH, and Myricetin and Morin inhibit DPPH damage to human serum albumin by occupying binding sites, while Betaine can neither occupy the binding sites nor scavenge free radicals, so the inhibition ability is the weakest. The results showed that the inhibitory ability of several natural antioxidants is closely related to the main functional groups in the molecular structure.

Keywords Natural antioxidants; DPPH free radical; Human serum albumin; Fluorescent spectrometry

* Corresponding author

(Received Sep. 6, 2018; accepted Feb. 8, 2019)