

性只增加 9.4%，而对照果和药物处理的过氧化物酶活性却分别增加 98.9% 和 65.4%。紫外辐照降低酶活性的原因可归结为灭菌、产生臭氧，至于更深入的生理机制，要用量子统计理论才能解释。c. 适当剂量的紫外辐照，可使柑桔电学频率特性曲线的性质，尽量保持贮藏初期的状况。贮藏初期，果实的输出阻抗明显地依赖于输入信号频率 f （见图 2 中曲线①）：输入信号频率很低时，输出阻抗随 f 增大而增大，呈电感性；中频情况下，输出阻抗几乎与 f 无关，呈电阻性；在 f_0 附近，曲线出现谐振峰；当 $f > f_0$ 时，输出阻抗随 f 增大而减小，呈电容性。贮藏一段时间后，对照果和药物处理的果实，其频率特性的上述性质已明显消失且无谐振峰存在（见图 2 中的曲线③，④，⑥），而紫外辐照 60min 处理的果实，其频率特性的上述性质仍然保持，只是谐振峰位置稍有改变（见图 2 中的曲线②，⑤）。由于输出阻抗与物质结构、成分有关，频率特性曲线的变化表明：适当剂量的紫外辐照，可以延缓柑桔结构成分的变化，收到保鲜效果。

贮藏初期柑桔的电学频率特性，可用图 3a 所示的电路模拟。由图 2 曲线①的特点知道，模拟电路中的 L_1 、 C_0 应较小， L_2 应较大，才能保证低频情况的输出呈电感性，中频情况呈电阻性， f_0 附近呈谐振性，高频情况呈电容性。的确，由于 L_1 、 C_0 较小， L_2 较大，低频时， $\omega L_1 \ll R_1$ ， $1/\omega C_0 \gg R_2$ ， $1/\omega C_0 \gg \omega L_2$ ，这时，可忽略 L_1 和 C_0 的作用，模拟电路由图 3a 变成图 3b，从 R_1 上的输出阻抗就随频率升高而增大，呈电感性（式中的 $\omega = 2\pi f$ ）；中频情况时， ωL_2 和 $1/\omega C_0$ 均远大于 R_2 ，而 $\omega L_1 \ll R_1$ ，这时， L_1 、 L_2 、 C_0 的作用均可忽略，电路由图 3a 变成图 3c， R_2 上的输出就与输入信号的频率无关，呈电阻性；频率进一步增大， $\omega L_2 \gg R_2$ ，这时， L_2 的作用可忽略，电路由图 3a 变为图 3d，在某频率附近呈谐振性质，而更高频率时则呈电容性。由中频的等效电路（图 3c）和图 2 曲线①的中频（取 $f = 10\text{kHz}$ ）输出阻抗实验值，利用回路中的电流（0.05

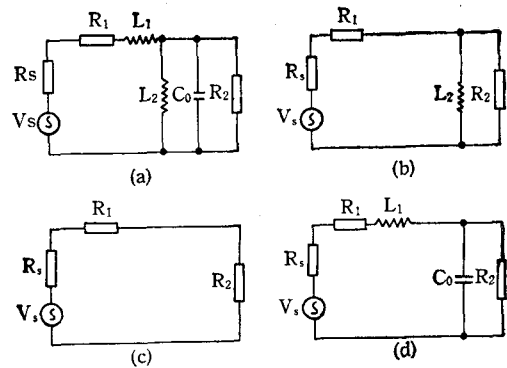


图 3 锦橙果实电学频率特性的等效电路

μA ）、信号源电压（1V）、内阻（ $R_s = 600\Omega$ ）可以估算出等效电路中的 $R_1 \approx 4.4\text{M}\Omega$ ， $R_2 \approx 2.2\text{M}\Omega$ ， $L_1 \approx 11\text{H}$ ， $L_2 \approx 250\text{H}$ ， $C_0 \approx 0.4\text{pF}$ 。从等效电路的角度讲，适当剂量的紫外辐照，将使柑桔等效电路的结构尽量保持贮藏初期的状况。适当剂量的紫外辐照，可以提高锦橙保鲜质量。所述处理方式中，以紫外辐照 60min 的效果较佳。贮藏到 3 月中旬后，Vc 含量只降低 9.2%，而对照果和药物处理的果实，Vc 含量分别降低 25.2% 和 23.8%。至于腐烂率、酸度等，通过紫外辐照后也有明显改善^[3]。

总之，适当剂量的紫外辐射，可降低柑桔过氧化物酶活性，减慢生物参量和电学参量的变化过程。因此，可利用紫外辐照并辅以其它手段，达到物理方法保鲜柑桔的目的。

参 考 文 献

- 1 任洪湘等. 西南师范大学学报（自然科学版），1990；15（1）：134
- 2 吕昌祥. 生理科学进展，1983；14（3）：250
- 3 郑瑞伦，任洪湘. 生物化学与生物物理进展，1991；18（2）：157

余甘果汁清除超氧阴离子自由基的效能及人体试验初步观察

刘凤书 侯开卫 李绍家 杨臣武 赵 苹

（中国林业科学研究院资源昆虫研究所，昆明 650216）

关键词 余甘子，超氧化物歧化酶（SOD），超氧阴离子自由基

余甘子（*Phyllanthus emblica* L.）系大戟科叶下珠属落叶乔木或灌木。主要分布于南亚热带的印度、巴西、斯里兰卡、泰国和我国南方各省（区）。初食其

果，味酸涩，后回甜生津，有清热解暑、消食化滞、保健

收稿日期：1991-02-19

修回日期：1991-07-12

强身等功效,自古以来即作为鲜食和药用水果。中国林业科学研究院资源昆虫研究所近年通过体外模拟试验、动物试验和人体试验证明,其鲜果汁能阻断强致癌物 N-亚硝基化合物在体内外的合成,阻断率在 90% 以上,比同浓度的维生素 C 高 3—5 倍。表明余甘果汁中除含有丰富的维生素 C 外,还含有其他有效成分^[1-3]。

为了进一步研究余甘果的保健作用和药用价值,从而为开发和充分利用余甘果这一珍贵野生资源奠定基础,我们在研究余甘果是否含有清除超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)的酶类物质的基础上,对 15 名 55 岁以上的老年人进行了初步的临床研究。

1 实验方法

1.1 酶液的制备

余甘果洗净去核,常规压榨取汁。吸取 50ml 原汁装入透析袋中,用 2.5mmol/L pH7.8 磷酸缓冲液进行动态透析 6h。透析液冷冻后,经 4000r/min 离心 25 min,弃沉淀物,上清液再用聚乙二醇-6000 浓缩,最后定容至 50ml,即为余甘汁粗提液。

1.2 酶活性测定

酶液活性测定是利用超氧化物歧化酶(SOD)抑制邻苯三酚的自动氧化方法^[4],于 4.5ml pH8.2, 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl 缓冲反应液中,加入 10 μ l, 80mmol/L 邻苯三酚溶液,加 4 μ l 酶液后于 325nm 每隔 0.5min 测一次吸光度 A 值。以双蒸水代替酶液作空白。酶活性单位采用 1ml 反应液中每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量定为一个活力单位。

1.3 受试对象及血样处理

受试对象为 15 名年龄在 55—67 岁的身体健康老人,其中男性 11 人,女性 4 人,平均年龄为 62.9 岁。试验前一周及试验过程中均未服用药物及滋补品。每人每天服用余甘果汁早晚各一次,每次 40ml,用 60℃ 温开水冲稀 3 倍口服,2 个月为 1 疗程。在疗程开始与结束时,空腹抽静脉血 2ml 作酶活力及过氧化脂质(LPO)含量测定,并用血红蛋白比色计测血红蛋白含量。

1.4 红细胞 SOD 活力测定

1.4.1 邻苯三酚自氧化速率测定:在试管中加入 4.5ml pH8.2, 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,25℃ 保温 20min,然后加入预热的邻苯三酚(80mmol/L) 6 μ l 计时,迅速摇匀后测吸光度,每隔 30s 读一次 A_{325} 值,要求自氧化速率控制在 0.070A/min。

1.4.2 红细胞抽提液 SOD 活力测定:在试管中加入 pH8.2, 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5ml,25℃ 保温 20min。加入红细胞提取液 50 μ l,摇匀,加入预热的 80mmol/L 邻苯三酚 6 μ l,计时,迅速摇匀倒

入比色杯中,每隔 30s 测 A_{325} 值一次。

活力单位定义为:在一定条件下,每毫升反应液中,每分钟抑制自氧化速率达 50% 的酶量定为一个单位(U)。

1.5 血浆 LPO 含量的测定

1.5.1 工作曲线的制作:在 5 支试管中分别加入 4×10^{-6} mol/L 的四乙氧基丙烷标准应用液 50,100,150,200,250 μ l (相当于 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0nmol/L),再加入 TBA (硫代巴比妥酸)试剂 1ml,沸水浴 70min,水冷却后加入 5ml 正丁醇,混匀,3500r/min 离心 10min,取上层正丁醇相在荧光光度计上测定各管的荧光强度(波长:激发光 500nm,发射光 550nm),以四乙氧基丙烷含量为横坐标,荧光强度为纵坐标作图。

1.5.2 血浆样品的测定:在试管中加入血浆 50 μ l,再加 1/24mol/L 硫酸 4ml,10% 磷钨酸 0.5ml,混匀。放置 5min 后 3000r/min 离心 5min,弃上清液。再在沉淀中加入 1/24mol/L 硫酸 2ml,10% 磷钨酸 0.3ml,混匀后 3000r/min 离心 5min,弃上清液。于沉淀中加入 1ml 重蒸水和 1ml TBA 试剂,混合后沸水浴 70min。以后操作同工作曲线。测得的荧光强度在工作曲线上可查得相应的 LPO 含量,然后再换算出每毫升血浆中的 LPO 含量。

2 实验结果

2.1 余甘果粗提液对四氮唑蓝(NBT)光化还原的抑制

根据 Giannopolitis 和 Ries 方法^[5],实验条件为:在 3ml 反应混合液中含有 1.3×10^{-6} mol/L 核黄素; 13×10^{-3} mol/L 甲硫氨酸; 63×10^{-6} mol/L NBT;0.05 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液。利用核黄素光敏之后产生的 $\cdot O_2^-$ 与 NBT 作用生成蓝色的甲臌在 560nm 处有最大光吸收。当反应液中有 SOD 时,则 SOD 与 NBT 竞争 $\cdot O_2^-$,从而抑制 NBT 转化为蓝色的甲臌。

NBT 在 30℃ 时,于 4000lux 荧光下光照 5—50 min,于 560nm 处测吸光度,其光化还原速率呈直线上升,35min 后还原速率趋于稳定(图 1a)。余甘果粗提液加入后,对 NBT 光化还原有明显的抑制效果(图 1b),而且抑制的百分率随余甘果提取液加入量的增加而增加。

2.2 余甘果粗提液对肾上腺素自氧化的抑制

许多自氧化反应属于游离基链反应,自氧化过程产生 $\cdot O_2^-$, $\cdot O_2^-$ 又参与链式反应过程。SOD 可通过清除 $\cdot O_2^-$ 而降低自氧化反应的总速度,这种原理已被用来分析 SOD 活性。肾上腺素在碱性条件下可以发生自氧化作用,这种自氧化属于游离基链反应,即以 $\cdot O_2^-$ 作为反应链的延长剂。当反应液中有 SOD 时,肾

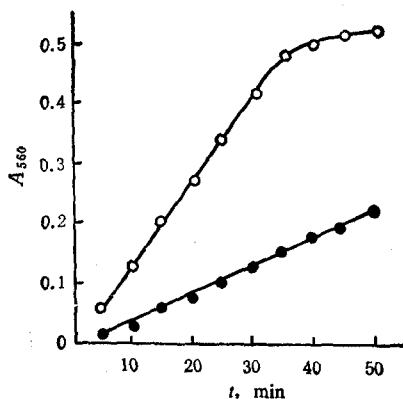


图1 余甘果粗提液对 NBT 光化还原的抑制
○—○: 不加余甘果粗提液; ●—●: 加入余甘果粗提液

上腺素的自氧化作用受到抑制, 又因肾上腺素的自氧化产物在 480nm 表现特征吸收, 故可用于 SOD 分析。

Misra 和 Fridovich 发现动物组织的 SOD 能抑制肾上腺素自氧化^[6], 用余甘果粗提液也能观察到同样的结果, 并且随着肾上腺素浓度的增加, 余甘果粗提液抑制其自氧化的比率也增大(表 1)。

表1 肾上腺素浓度与余甘果粗提液抑制其自氧化比率的关系

肾上腺素浓度 mol/L	A_1 (无余甘果粗提液时的吸光度) ¹⁾	A_2 (有余甘果粗提液时的吸光度) ¹⁾	ΔA ($A_1 - A_2$)	抑制肾上腺素自氧化比率 (%)
0.4	0.065	0.046	0.019	29.23
0.3	0.053	0.040	0.013	24.53
0.2	0.043	0.036	0.007	16.28
0.1	0.034	0.030	0.004	11.76

1) 系反应 5min 的测定值

实验条件: 3ml 反应混合液 (0.05mol/L Na_2CO_3 , 2.8ml pH10.2; 0.1mol/L EDTA 0.1ml; 各浓度的肾上腺素 0.1ml) 中加入 20 μl 余甘果粗提液, 在 30℃ 条

件下反应 5min, 于 480nm 处测肾上腺素自氧化产物的吸光度。

2.3 余甘果中所含清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 物质的活性

实验条件如“材料与方法”中酶活性的测定。利用邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化, 释放出 $\cdot\text{O}_2^-$, 生成带色的中间产物。反应开始后溶液先变成黄绿色, 几分钟后转为绿色, 线性时间维持在 3—3.5min, 经 325nm 测吸光度值。邻苯三酚自氧化速率为 0.070 A/min。有 4 μl 余甘果粗提液时, 样液速率为 0.040 A/min, 单位活力按公式计算为 964 U/ml。若按余甘果出汁率为 50% 计算, 则每克余甘果含有能清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的物质的活性为 482 U。

2.4 余甘果汁对老年人红细胞 SOD 活性, 血浆 LPO 含量的影响

15 例服用余甘果汁受试者, 二个月后, 红细胞 SOD 活性明显高于服用前, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 受试人 100% 的提高了体内的抗氧化能力; 同时, 受试者中大多数入血浆中 LPO 含量有所下降, 总平均值也有所下降(表 2)。

表2 服用余甘果汁前后 SOD 活性和 LPO 含量的变化情况

例数 (n)	平均年龄 (岁)	SOD 活力 (U/gHb)		LPO 含量 (nmol/ml)	
		前	后	前	后
15	62.9	893 $\pm$ 216	2015 $\pm$ 393	4.51 $\pm$ 0.56	4.02 $\pm$ 1.1

参 考 文 献

- 1 刘凤书, 侯开卫等. 热带作物学报, 1988; 9(2): 65
- 2 侯开卫, 刘凤书等. 热带作物学报, 1989; 10(1): 63
- 3 侯开卫, 刘凤书等. 林业科学研究, 1989; 2(1): 55
- 4 袁勤生. 全国首届 SOD 学术会议论文集, 1987: 14
- 5 Giannopolitis C N, Ries S K. *Plant Physiol*, 1977; 59: 309
- 6 Misra H P, Fridovich L. *J Biol Chem*, 1972; 247: 3170