

萝卜苗中异硫氰酸盐的动态变化及体外抗氧化活性

赵功玲^{1,2}, 由宏², 郝睿², 朱毅^{2,*}, 罗云波²

(1. 河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 测定不同生长时期的6种萝卜苗(长春白萝卜苗、盛丰白萝卜苗、象牙白萝卜苗、德国特白萝卜苗、抚顺红萝卜苗及满堂红萝卜苗)正己烷提取物的总异硫氰酸盐和4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC)含量, 分别用FRAP法、ABTS法、抗超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和抗羟自由基($\cdot OH$)能力4种方法测定提取物的体外抗氧化性能。结果显示: 萝卜苗中MTBITC含量占总异硫氰酸盐的80%以上; 5~10d的萝卜苗中含有较高的MTBITC含量; 同生长期的苗中, 长春白萝卜苗、盛丰白萝卜苗、象牙白萝卜苗、德国特白萝卜苗的MTBITC含量比抚顺红萝卜苗和满堂红萝卜苗高。长春白萝卜苗、盛丰白萝卜苗、象牙白萝卜苗、德国特白萝卜苗4种萝卜苗的抗氧化性能与MTBITC含量呈正相关。而满堂红和抚顺红萝卜苗中MTBITC含量较低, 但却表现出较强的抗氧化性能。
关键词: 萝卜苗; 异硫氰酸盐; 4-methylthiobutyl isothiocyanate (MTBITC); 动态变化; 抗氧化

Dynamic Changes of Isothiocyanates and Antioxidant Properties during Radish Seedling Development

ZHAO Gong-ling^{1,2}, YOU Hong², HAO Rui², ZHU Yi^{2,*}, LUO Yun-bo²

(1. College of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing 453003, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The contents of total isothiocyanate contents and 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) in *n*-hexane extracts of radish seedlings from 6 cultivars at different development stages were measured. Along with this, their antioxidant properties in vitro were evaluated using commercial FRAP, ABTS, superoxide anion free radical and hydroxyl free radical assay kits. The present study found that over 80% of total isothiocyanates in radish seedlings was MTBITC during 15 days of development. Radish seedlings aged 5–10 days revealed higher MTBITC content. At the same development stage, the seedlings of Changchun white radish, Shengfeng white radish, ivory white radish and German Giant radish contained more MTBITC than those of Fushun red radish and Mantanghong red radish. Moreover, the seedlings of Changchun white radish, Shengfeng white radish, ivory white radish and German Giant radish indicated a positive antioxidant effect-MTBITC content correlation. Despite having lower MTBITC content, Fushun red radish and Mantanghong red radish presented strong antioxidant effect.

Key words: radish seedlings; isothiocyanates; 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBITC); dynamic change; antioxidant
中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)13-0102-04

研究表明, 十字花科植物如花椰菜、卷心菜、萝卜、西兰花等, 由于含有大量的硫苷^[1-3]而具有抗氧化、抗癌、阻止慢性病发生等广泛的生物活性。流行病学调查也显示多吃十字花科植物可以降低肺癌、结肠癌发病率, 减少氧化损失发生^[4-5]。十字花科植物中的硫苷种类很多, 性质也不稳定, 当它们与内源或外源黑芥子酶接触, 就会水解生成相应的异硫氰酸盐^[6]。对硫苷及异硫氰酸盐的研究中, 大多集中在对硫苷及莱菔硫烷

(4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate)的研究。存在于花椰菜中的硫苷主要是 Glucoraphanin, 在酶作用下可水解为莱菔硫烷。莱菔硫烷具有多种生物活性, 是人们公认的最重要的抗癌物质之一^[7-8]。

随着对异硫氰酸盐研究的不断深入, 存在于萝卜苗和萝卜根部的辛辣风味物质 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC), 则被认为有着抑制癌细胞增长、抗突变、抗氧化和调节血脂代谢等作用^[9-10]。有研究

收稿日期: 2010-09-17

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2009-1-86)

作者简介: 赵功玲(1968—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品营养与卫生。E-mail: hnzgl@163.com

* 通信作者: 朱毅(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: zhuyi_cau@126.com

表明,生长期不同的萝卜苗中所含的硫苷含量不同^[11-13]。不同的萝卜苗品种,在生长过程中MTBITC的变化规律可能不同,粗提物的抗氧化性能也可能不同。本实验以6种萝卜苗即长春白萝卜苗、盛丰白萝卜苗、象牙白萝卜苗、德国特白萝卜苗、抚顺红萝卜苗及满堂红萝卜苗为例,研究它们在生长过程中的MTBITC和粗提物的抗氧化性能的变化规律,为人们合理栽培和食用萝卜苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长春白萝卜种子、盛丰白萝卜种子、象牙白萝卜种子、德国特白萝卜种子、满堂红萝卜种子、抚顺红萝卜种子 北京种子公司。

三芥子酸甘油酯(Erucin)、正己烷(色谱纯)、1,2-苯二硫醇、苯基异硫氰酸酯、1,1-二苯-2-苦肟基(DPPH, 纯度90%) 美国Sigma-Aldrich公司;甲醇、异丙醇、硼酸钠、盐酸等试剂均为分析纯 北京化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;UV-2102 PCS型紫外分光光度计 上海尼龙科仪器有限公司;Agilent 7890/5975C-GC-MS联用仪 美国安捷伦公司;DK-98-11A双列四孔电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;MK3型酶标仪 上海雷勃分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 萝卜苗的栽培

拌匀花卉土壤,分装在20cm×20cm的30个花盆内,要求每盆的土样相同。每个盆里种5g种子,每个品种种4盆,在25℃、湿度70%~80%、光照12h的条件下培养。每2d浇水一次。出苗后5、10、12、15d采收整盆苗作为样品。

1.3.2 总异硫氰酸盐和MTBITC的提取

根据文献[14],本实验采用正己烷做提取剂。用蒸馏水洗净采收的萝卜苗,吸水纸擦干苗上的水。称取10g苗,液氮保护下碾碎,转入碘量瓶,加水5mL,摇匀。加20mL正己烷,用力振摇3~5min,7200r/min冷冻离心5min,取正己烷层。残渣用相同方法再提取两次,合并3次提取液,旋转蒸发浓缩至20mL,−20℃保存。

1.3.3 总异硫氰酸盐含量测定^[14]

提取液100μL,液氮吹干,快速加无水甲醇2mL、1.8mL 50mmol/L的硼酸钠缓冲液(pH 8.5)、0.2mL 8mmol/L 1,2-苯二硫醇,混合物在65℃水浴锅中加热1h,然后

冷却至室温,365nm波长处测定吸光度。用苯基异硫氰酸盐做标准曲线,计算总异硫氰酸盐的含量。

1.3.4 MTBITC含量测定^[15]

用GC-MS联用仪测定MTBITC。色谱柱:HP-5弹性石英毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25μm);气化室温度250℃;载气流速(He)1.0mL/min;程序升温:80℃保持5min,以20℃/min升到280℃,保持5min。接口温度280℃;EI⁺源:70eV、200℃;检测器电压350V;扫描频率2次/s;质量范围:35~500u;分流比:1:20;进样量1μL。以Erucin做标准品,用外标法定量。

1.3.5 体外抗氧化活性测定

1.3.5.1 总抗氧化能力(FRAP法)测定

提取液400μL,氮气吹干,加0.1mL甲醇溶解,用于总抗氧化能力(T-AOC)实验。按南京建成生物工程研究所生产的总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒测定。

1.3.5.2 总抗氧化能力(ABTS法)测定

提取液200μL,液氮吹干,加20μL甲醇溶解,作为样品。采用碧云天生物技术研究所生产的总抗氧化检测试剂盒(ABTS快速法)检测。

1.3.5.3 抗超氧阴离子自由基(O₂^{•−})实验

提取物200μL,氮气吹干,加0.05mL甲醇溶解,作为样品。按南京建成生物工程研究所生产的抗超氧阴离子自由基测定试剂盒测定。

1.3.5.4 抗羟自由基(•OH)实验

提取物200μL,氮气吹干,加200μL甲醇溶解,作为样品。按南京建成生物工程研究所生产的羟自由基测定试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 总异硫氰酸盐含量

经波长扫描,总异硫氰酸盐的反应体系最大吸收波长在365nm,扫描图见图1,标准曲线见图2,提取物的总异硫氰酸盐的测定结果见图3。

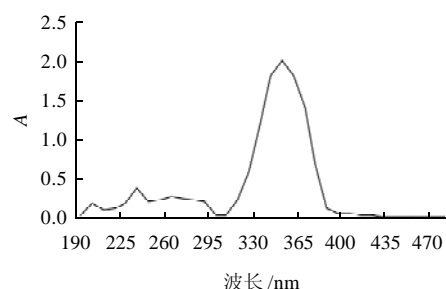


图1 总异硫氰酸盐反应体系吸收波长扫描图

Fig.1 UV absorption spectrum of total isothiocyanates from radish seedlings

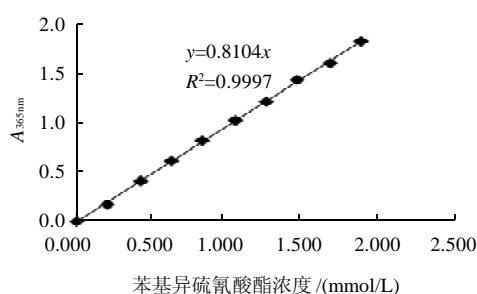


图2 总异硫氰酸盐测定标准曲线
Fig.2 Standard curve for determination of total isothiocyanates

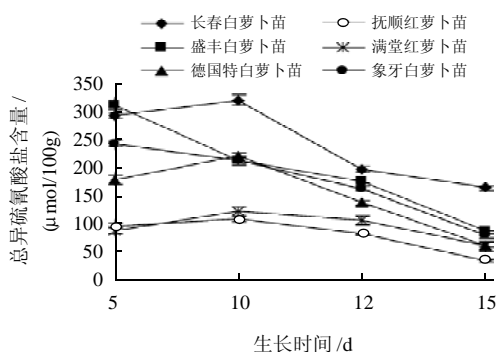


图3 萝卜苗中总异硫氰酸盐含量
Fig.3 Total isothiocyanate contents in radish seedlings from 6 cultivars at different development stages

由图3可知,在15d生长期,6种萝卜苗中的总异硫氰酸盐的含量随生长时间的延长总体趋势是降低的;盛丰和象牙白萝卜苗5d的总异硫氰酸盐的含量均高于10、12、15d的,这与文献[12]报道的在有光的条件下发育,5d苗的总硫苷含量比6~7d的苗高的结论相吻合;长春、德国特、抚顺、满堂红10d苗中的总异硫氰酸盐含量均高于5、12、15d的苗;6种苗中,总异硫氰酸盐的含量从高到低的顺序为10d长春白苗、5d盛丰白苗、5d象牙白苗、10d德国特白苗、10d满堂红苗、10d抚顺红苗;10d以后的苗中,异硫氰酸盐含量几乎急剧下降。因此,为获得高含量的异硫氰酸盐,萝卜苗的适宜生长时间为5~10d。在栽培中发现,10d以后的苗开始长真叶,12d的6种苗几乎都有真叶长出,并且在以后的生长期中,真叶的生长速度很快。由此可以推论,真叶的出现是苗中异硫氰酸盐急剧降低的标志。

2.2 MTBITC的含量

由于Erucin与MTBITC的分子质量、结构式(图4)相似,相同分离条件下出峰时间相近,又由于MTBITC的标准品难得,所以选用Erucin做标准品^[16],外标法测定MTBITC的含量。结果如图5所示。

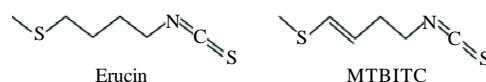


图4 Erucin-MTBITC 结构简图

Fig.4 Structure of erucin-MTBITC

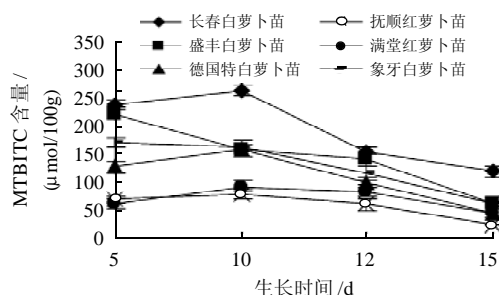
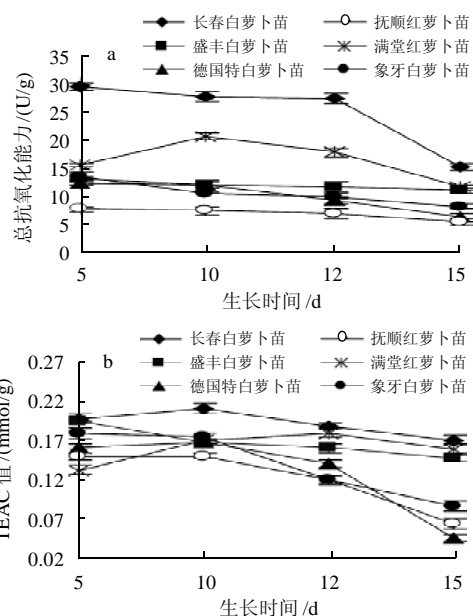


图5 萝卜苗中MTBITC的含量
Fig.5 MTBITC contents in radish seedlings from 6 cultivars at different development stages

由图5可知,6种萝卜苗中MTBITC含量随生长期的变化规律同总异硫氰酸盐,只是数值上低于总异硫氰酸盐。除盛丰和象牙白萝卜子以外,在5~10d的生长期,随生长时间的延长,其余5种苗中的MTBITC含量呈升高趋势,这与文献[13]中报道的在0~10d的生长期,随生长时间的延长,萝卜苗中的Glucoraphasatin(酶解后转变成MTBITC)的含量逐渐升高相吻合。经计算,萝卜苗提取物中的MTBITC占总异硫氰酸盐的80%以上。所以,在本实验检测条件下,提取物中的异硫氰酸盐主要是MTBITC。另外,15d的生长期,长春苗的MTBITC含量高于相同生长期的其他品种。

2.2.5 体外抗氧化性能测定



a.FRAP法; b.ABTS法。

图6 萝卜苗总抗氧化能力(T-AOC)

Fig.6 Total antioxidant capacity of radish seedlings from 6 cultivars at different development stages

由图 6a(FRAP 法)可以看出, 5d 或 10d 后的萝卜苗的总抗氧化能力随生长时间的延长而降低; 除满堂红苗外, 萝卜苗的总抗氧化能力与其含有的异硫氰酸盐和 MTBITC 呈正相关, 其中长春白萝卜苗的抗氧化能力显著高于同时期的其他品种; 相对于异硫氰酸盐和 MTBITC 的含量, 满堂红苗的总抗氧化能力明显高, 可能是由于提取物中含有较高的其他抗氧化物质, 具体原因有待进一步研究。图 6b 显示的是 ABTS 法测定的萝卜苗的总抗氧化能力。6 种萝卜苗的变化规律和 FRAP 法基本相似, 但长春苗没有表现出很强的抗氧化优势。另外, 10d 以后的德国特、抚顺、象牙苗的总抗氧化性能急剧下降。

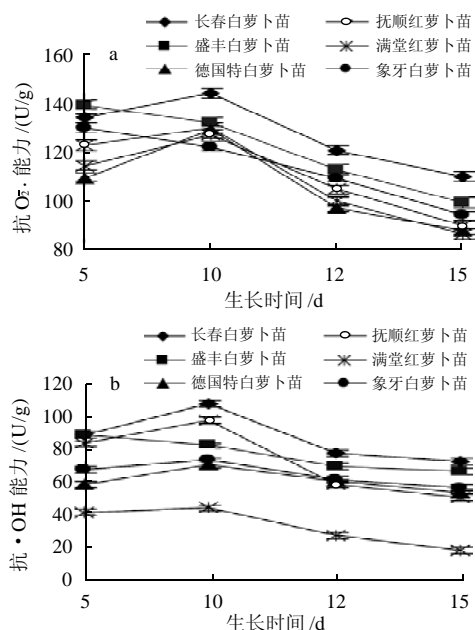


图7 萝卜苗抗自由基能力

Fig.7 Free radical scavenging capacity of radish seedlings from 6 cultivars at different development stages

由图 7a 可知, 10d 后的萝卜苗的总抗氧化能力随生长时间的延长而急剧降低; 除抚顺和满堂红苗外, 4 种白萝卜苗的总抗氧化能力与其含有的异硫氰酸盐和 MTBITC 的量呈正相关, 只是 5d 长春苗的数值低于同期的盛丰苗, 但差异不显著。抚顺和满堂红苗中的 MTBITC 含量低, 但抗超氧阴离子自由基的能力并不低, 可能是由于其中含有较高的其他抗超氧阴离子自由基物质。图 7b 显示的是 6 种苗抗羟自由基的能力。变化规律与抗超氧阴离子自由基的能力基本相似, 但满堂红苗的抗羟自由基的能力比其他苗低, 并有显著性, 其中的原因应该与满堂红苗含有较低含量的异硫氰酸盐、MTBITC 及可能含有诱导羟自由基产生的因子有关, 确切的原因有待进一步研究。

3 结 论

随生长时间的延长, 正己烷萝卜苗提取物中的总异硫氰酸盐与 MTBITC 的含量变化呈现出相同的规律, MTBITC 的含量占总异硫氰酸盐的 80% 以上; 5~10d 的萝卜

苗中总异硫氰酸盐和 MTBITC 含量高于其他生长期; 相同生长期下, 长春白萝卜苗中的 MTBITC 含量最高, 其他 3 种白萝卜苗比抚顺红萝卜苗和满堂红萝卜苗高; 苗真叶的出现可能是苗中异硫氰酸盐和 MTBITC 急剧降低的标志。

5d 或 10d 以后的萝卜苗的总抗氧化和清除自由基能力随生长时间的延长而降低; 4 种白萝卜苗的总抗氧化和清除自由基能力随其中含有的 MTBITC 量的增加而增加。长春白萝卜苗的总抗氧化和清除自由基能力高于其他苗。而抚顺红和满堂红苗中 MTBITC 的含量较低, 但满堂红苗表现出较强的总抗氧化性能, 抚顺红萝卜苗则表现出较强的抗超氧阴离子自由基和羟自由基的活性, 其中的原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] BARILLARI J, CERVELLATI R, COSTA S, et al. Antioxidant and choleretic properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 9773-9778.
- [2] BARILLARI J, LORI R, BROCCOLI M, et al. Glucoraphasatin and glucoraphenin, a redox pair of glucosinolates of brassicaceae, differently affect metabolizing enzymes in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(14): 5505-5511.
- [3] PODSEDEK A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40:1-11.
- [4] LAMY E, MERSCH-SUNDERMANN V. MTBITC mediates cell cycle arrest and apoptosis induction in human HepG2 cells despite its rapid degradation kinetics in the *in vitro* model[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2009, 50(3): 190-200.
- [5] CONAWAY C C, YANG Y M, CHUNG F L. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans[J]. Current Drug Metabolism, 2002, 3(3):233-255.
- [6] 李雷, 邹翔, 季宇彬. 十字花科植物中异硫氰酸盐的性质及活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2007, 23(4): 385-399.
- [7] FAHEY J W, TALALAY P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes[J]. Food Chemistry and Toxicology, 1999, 37: 973-979.
- [8] ZHANG Y, TALALAY P, CHO C G, et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidant and choleretic properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9773-9778.
- [9] PAPI A, ORLANDI M, BARTOLINI G, et al. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(3): 875-883.
- [10] CHATURVEDI P. Inhibitory response of *Raphanus sativus* on lipid peroxidation in albino rats[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2008, 5(1): 55-59.
- [11] CISKI E, HONKE J, KOZOWSKA H. Effect of light conditions on the contents of glucosinolates in germinating seeds of white mustard, red radish, white radish, and rapeseed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 9087-9093.
- [12] MARTINEZ-VILLALUENGA C, PENAS E, CISKI E, et al. Time dependence of bioactive compounds and antioxidant capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 710-716.
- [13] BARILLARI J, CEVELLATI R, PAOLINI M, et al. Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 9890-9896.
- [14] NAKAMURA Y, IWAHASHI T, TANAKA A, et al. 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, a principal antimutagen in daikon (*Raphanus sativus*; Japanese white radish)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 5755-5760.
- [15] BEEVI S S, MANGAMOORI L N, DHAND V, et al. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L.[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(1): 129-136.
- [16] HANLON P R, WEBBER D M, BARNES D M. Aqueous extract from spanish black radish (*Raphanus sativus* L. Var. niger) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 6439-6446.