

荠菜中酚类物质与过氧化物酶作用底物研究

张艳芬, 蒋娟, 姜丽, 侯田莹, 郁志芳*

(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 针对荠菜在贮运保鲜过程中的变质问题, 以与衰老密切相关的过氧化物酶(POD)为研究对象, 运用紫外光谱扫描和高效液相色谱法分析荠菜中的酚类物质, 并研究不同浓度的酚类物质对其中过氧化物酶活性的影响。结果表明: 荠菜中酚类提取物的最大吸收波长为213nm, 初步确定荠菜中的主要酚类物质是焦性没食子酸, POD的最适底物是绿原酸, 酶促反应的最佳底物浓度为8mmol/L。

关键词: 荠菜; 酚类; 过氧化物酶; 作用底物

Phenols and Peroxidase Substrate Specificity in *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus

ZHANG Yan-fen, JIANG Juan, JIANG Li, HOU Tian-ying, YU Zhi-fang*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to provide experimental references for solving the problem of quality deterioration during the storage and fresh-keeping *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus, the major phenols in the edible wild vegetable were extracted by grinding in the presence of methanol and analyzed by UV-visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). Besides, crude peroxidase (POD) extracted from the edible wild vegetable was measured for its substrate specificity. The results showed that the maximum absorption wavelength of phenolic extract from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus was 213 nm. The major phenolic component was initially identified as pyrogalllic acid. The preferred phenolic substrate of POD was identified as chlorogenic acid with the optimal enzymatic reaction concentration of 8 mmol/L.

Key words: *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus; polyphenol; peroxidase; substrate specificity

中图分类号: TS255.36

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0324-03

荠菜[*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus]属于十字花科一年或两年生草本植物, 别名护生草、荠荠菜、香善菜、田儿菜、雀巢菜、地米菜等^[1]。荠菜含有芥菜酸、生物碱、黄酮类化合物和多种氨基酸、维生素等成分, 具有丰富的营养和很高的药用价值^[2-3]。但是由于荠菜采摘期和贮藏期短, 大大降低了其食用价值。为此, 研究荠菜的保鲜、贮藏和加工过程中的衰老机理, 对于综合开发利用现有的资源具有重要的意义。

近年来, 国内研究者对荠菜的研究主要局限在保鲜方法^[4-5]及其营养物质成分^[6-10]的提取上, 但是从影响荠菜衰老的酚类物质和相关酶类方面研究未曾涉及。相关材料表明, 过氧化物酶活性的增加是植物衰老的显著特征之一^[11], 酚类物质则是过氧化物酶作用的直接底物^[12]。前期研究结果表明, 在荠菜衰老的过程中, 总酚和游离酚类含量下降, 同时, POD活性增大, 二者呈显著

正相关。酚类物质与植物组织的衰老和褐变密切相关。本实验研究荠菜中的酚类物质鉴定和过氧化物酶底物特性, 以期对荠菜的贮藏和保鲜加工提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荠菜 南京市购; 愈创木酚、焦性没食子酸(分析纯) 中国医药集团上海化学试剂公司; 儿茶酚(分析纯) 南京生兴生物科技有限公司; 绿原酸(色谱纯) 美国Sigma公司; 表儿茶酚(色谱纯) 瑞典Fluka公司; 没食子酸(色谱纯) 德国Merck公司; 咖啡酸(色谱纯) 比利时Acros公司。

1.2 仪器与设备

UV/VIS 2802PC分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; BS 224S型电子精密天平 德国赛多利斯公司;

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 江苏省科技厅科技攻关课题(BE2003347)

作者简介: 张艳芬(1968—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为采后生物学。E-mail: yfzhang@njau.edu.cn

*通信作者: 郁志芳(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为采后生物学。E-mail: yuzhi88@yahoo.com.cn

GL-20G- II 型飞鸽牌低温冷冻离心机 上海安亭科学仪器总厂; 1100 高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酚类物质的提取

酚类物质的提取方法^[13]: 用甲醇作为溶剂, 将芥菜和甲醇按照 1:2(g/mL) 的比例进行研磨, 得提取液供实验研究。

1.3.2 酚类物质的紫外-可见光谱扫描

取 3mL 芥菜酚类物质提取液置于石英比色皿中, 在 200~500nm 紫外区域扫描, 基线扫描以甲醇作为标准液。同时用甲醇配制浓度 0.1mmol/L 的酚类标样进行光谱扫描, 与样品紫外吸收光谱图进行比较^[14]。

1.3.3 酚类物质的高效液相色谱分析

参照郁志芳等^[15]方法稍有改动。吸取 2.0mL 芥菜酚类物质提取液, 以 0.22 μ m 有机膜过滤备用。色谱条件: 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(46mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相用乙腈、水(含 1.0% 醋酸)梯度洗脱, 间隔时间 30min, 乙腈体积由 5% 上升至 35%; 柱温 30℃; 流速 1.0mL/min, 检测波长为 280nm, 进样体积为 20 μ L。

1.3.4 过氧化物酶液的制备和酶活测定

粗酶液的提取: 准确称取芥菜叶片样品 0.5g, 放入研钵, 放少许石英砂, 加入 pH7.8 的磷酸缓冲溶液 6mL 进行研磨, 抽提后于低温 4000r/min 离心, 20min 后收集上清液即为 POD 粗酶液。

过氧化物酶活性测定^[16]: 反应体系中依次加入 2.0mL 0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.4), 1mL 酚类底物, 50 μ L 粗酶液, 最后加入 0.1mL 0.75% H₂O₂ 溶液, 迅速颠倒混匀, 于 A₄₆₀ 处测其吸光度, 每 30s 读数 1 次, 计时 3~5min。以磷酸缓冲液取代酶液作为空白管, 以每分钟在 460nm 吸光度变化 0.001 为 1 个酶活性单位。

1.3.5 酚类底物种类和浓度对 POD 活力的影响

按 1.3.4 节反应体系中, 按底物种类分别为焦性没食子酸、没食子酸、绿原酸、儿茶酚、表儿茶酚、咖啡酸, 底物浓度分别为 4、6、8、10mmol/L 添加, 然后放在 30℃ 水浴锅内静置 10min, 取出后冷却于波长 460nm 测定吸光度。以底物浓度为横坐标, 以 ΔA_{460} 为纵坐标, 绘制底物浓度曲线。

2 结果与分析

2.1 酚标样溶液及芥菜自然褐变物质的紫外-可见光谱扫描

试验将多种酚类标准样品进行紫外扫描并与芥菜中酚类物质提取液的紫外吸收光谱进行对照(表 1)。结合图 1, 芥菜酚类提取物的吸收峰形有一个明显的主峰, 吸收波长在 213nm。其芥菜酚类物质提取物与标样焦性没食子酸的紫外-可见扫描谱图波形和典型波长高度一致(图 1 和表 1)。而与儿茶酚、绿原酸和酪氨酸等标样的吸收峰不同(表 1)。因此, 推断芥菜中的主要酚类物质为焦性没食子酸。

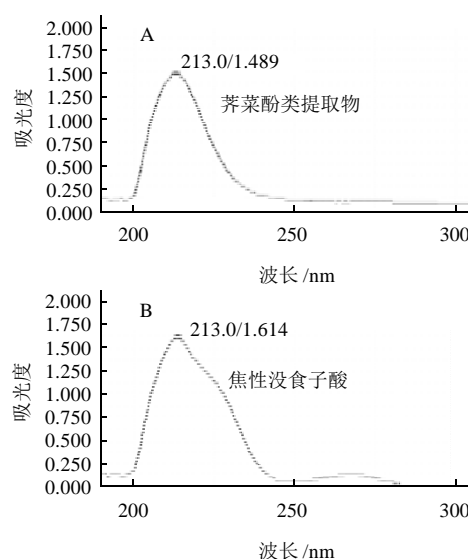


图 1 芥菜酚类提取物(A)与焦性没食子酸标样(B)紫外吸收扫描图
Fig.1 Ultraviolet absorption spectra of phenolic extract(A) from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus and pyrogallol standard(B)

2.2 芥菜酚类物质的 HPLC 分析

由图 2 中各峰的峰高判断样品的主要成分, 芥菜的主要酚类保留时间显示在 6~7min 之间, 故芥菜中的酚类物质以焦性没食子酸为主; 根据各峰的保留时间判断酚类物质的种类, 芥菜的酚类色谱图在 4.5、6.8、17.3min 都有明显的吸收峰出现。对照表 2 所示的标准样品保留时间, 可以推断焦性没食子酸、咖啡酸、表儿茶酚在芥菜中同时存在。

表 1 芥菜酚类提取物和酚类标样紫外吸收峰波长的比较

Table 1 Maximum absorption wavelength of phenolic standards and phenolic extract from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medicus

样品	芥菜提取物	儿茶酚	绿原酸	咖啡酸	焦性没食子酸	愈创木酚	表儿茶酚	没食子酸
紫外吸收峰波长/nm	213	219、275	219、244、296、330	219、294、320	213	222、276	218、280	218、269

表 2 不同酚标准样高效液相色谱保留时间

Table 2 HPLC retention times of phenolic standards

标准样品	没食子酸	焦性没食子酸	绿原酸	儿茶酚	表儿茶酚	咖啡酸	愈创木酚
保留时间/min	2.748 \pm 0.02	7.015 \pm 0.04	13.39 \pm 0.02	14.06 \pm 0.08	15.367 \pm 0.05	18.801 \pm 0.03	21.655 \pm 0.02

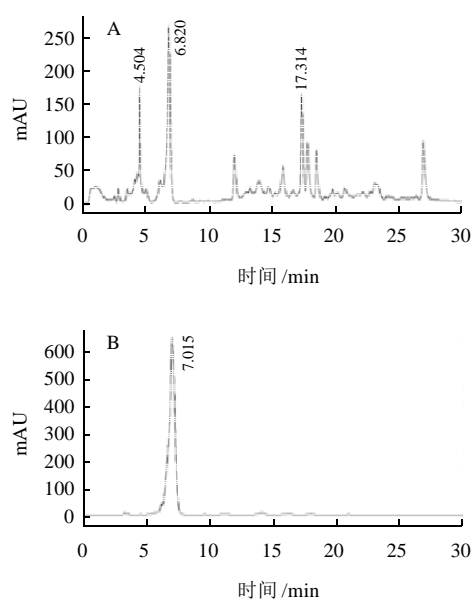


图2 荠菜提取物酚类物质(A)和焦性没食子酸标样(B)的液相色谱图
Fig.2 HPLC chromatograms of phenolic extract from *Capsella bursapastoris* and pyrogallol acid standard

2.3 酚类底物种类和浓度对 POD 比活力的影响

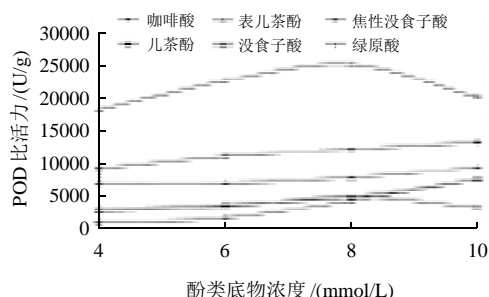


图3 各酚类物质底物不同浓度下 POD 酶比活力曲线
Fig.3 POD activity curves under different concentrations of different phenolic substrates

由图3可知,当不同种类的酚类物质作为反应底物时,POD酶的比活力不同。其中,底物浓度均为8mmol/L时,POD酶比活力大小排列如下:绿原酸>焦性没食子酸>表儿茶酚>没食子酸>儿茶酚>咖啡酸;且绿原酸作为底物时,POD酶比活力远远大于其他几种底物。这表明,荠菜中POD酶的最适酚类底物为绿原酸。

随着酚类底物浓度的增加,POD酶比活力大小呈现不同的变化趋势。焦性没食子酸、儿茶酚、表儿茶酚和咖啡酸作为底物时,随着浓度从2mmol/L上升到10mmol/L,POD酶比活力呈倍数直线增加趋势。而当没食子酸和绿原酸作为底物时,POD酶比活力曲线为抛物线形。当底物浓度达8mmol/L时,POD酶比活力最大,分别为4740U/g和24840U/g。随着底物浓度的增加,越来越多的酶分子与底物相结合,最后在达到一

定浓度后,酶被底物饱和^[17],因此进一步提高底物浓度也不能提高酶活性。酶活性的降低是由于较高的绿原酸可抑制POD活性,在苹果^[18]和小麦^[19]中也有类似的结果出现;没食子酸达到一定浓度,对POD也有抑制作用,在龙眼^[20]中也有相似报道。至于二者通过何种途径对POD产生抑制作用,还需进一步研究。

3 结 论

综合荠菜酚类提取物的紫外扫描和高效液相色谱的分析结果得出:荠菜中含有焦性没食子酸、咖啡酸、表儿茶酚3种酚类物质,以焦性没食子酸为主。荠菜中酚类物质的最大吸收波长是213nm。此外,荠菜酚类提取物的高效液相色谱图中保留时间为4.5min处的酚类物质还有待进一步确定。荠菜POD最适作用底物为绿原酸,酶促反应的最佳底物浓度为8mmol/L。

参考文献:

- [1] 孙德水,王守本.药食兼用话荠菜[J].特种经济动植物,1999(2):38.
- [2] 赵秀玲.荠菜及其研究开发现状[J].中国林副特产报,2009(6):97-99.
- [3] 黄雪梅,蔡军.荠菜的生物学特性及其开发利用[J].食品与药品,2005(7):66-68.
- [4] 常立新,李林,霍军华.低温贮存条件下荠菜品质的变化[J].食品科技,2004(12):82-85.
- [5] 张香美,郝秋娟,赵凤存,等.三种保鲜剂对荠菜保鲜效果的影响[J].食品工业科技,2009,30(3):295-297.
- [6] 高义霞,周向军.荠菜叶挥发性成分分析[J].资源开发与市场,2009,25(12):1070-1071.
- [7] 吴洪特,刘霞.微波辅助法提取荠菜中总黄酮的含工艺研究[J].安徽农业科学,2008,36(27):11800-11801.
- [8] 王璐,田歌,常霞,等.荠菜中黄酮类化合物提取工艺的研究[J].山西农业大学学报,2010,30(4):312-315.
- [9] 潘明.超声波强化提取荠菜中总生物碱的研究[J].化学与生物工程,2006,23(11):33-35.
- [10] 许瑞波,刘玮玮,王明艳,等.荠菜黄酮的超声提取工艺研究[J].食品科技,2007(8):149-151.
- [11] 毕玉蓉,谭保才,梁厚果.暗诱导绿豆叶片衰老期间多酚氧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化[J].甘肃科学学报,1991,3(2):67-72.
- [12] 张墨英,滕玉萍.草莓酚类和褐变度的研究[J].食品科学,1992(9):9-13.
- [13] 成宇峰,张振文,岳泰新,等.HPLC同时检测葡萄酒中10种单体酚的方法[J].食品科学,2008,29(4):287-290.
- [14] 张仲平,孙英,牛超,等.香椿多酚类化合物的提取、分离和薄层研究[J].中国野生植物资源,2002,21(4):52-53.
- [15] 郁志芳,赵友兴,李宁,等.鲜切莲藕酶促褐变底物的分析确定[J].食品科学,2002,23(4):41-44.
- [16] 徐朗莱,叶茂炳.过氧化物酶活力连续记录测定法[J].南京农业大学学报,1989,12(3):80-83.
- [17] 阚建全.食品化学[M].北京:中国科学技术出版社,2002:111-115.
- [18] 陈建中,章镇,黄赛芹,等.外源绿原酸对苹果抗病相关酶的影响[J].果树学报,2003,20(1):67-69.
- [19] 徐朗莱,叶茂炳.过氧化物酶及其同工酶与小麦抗赤霉病性的关系[J].植物病理学报,1991,21(4):285-290.
- [20] 潘科,孙远明,黄丽,等.几种物质对龙眼果肉中过氧化物酶和脂肪氧化酶的影响[J].食品与发酵工业,2003,28(6):13-16.