

天然桑椹红色素体外清除自由基活性的研究

徐建国^{1,2}, 田呈瑞¹, 胡青平¹

(1. 山西师范大学食品工程系, 山西 临汾 041004;

2. 陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘 要: 采用超氧阴离子自由基体系、羟基自由基体系、过氧化氢自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系及DPPH(二苯代苦味酰肼自由基)自由基体系对桑椹红色素的清除自由基活性进行了研究, 并同VC进行了比较。结果表明, 桑椹红色素对这几种自由基均有不同程度的清除作用, 其对超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢自由基的清除能力较好, 且高于VC。清除DPPH自由基的能力低于VC。在所选浓度范围内, 清除烷基自由基的能力不明显, 和VC相当, 清除率均低于50%。桑椹红色素是一种很好的天然自由基清除剂。

关键词: 桑椹红色素; 清除; 自由基

Study on Scavenging Capacity of Free Radical by Natural Mulberry Red Pigment in vitro

XU Jian-guo^{1,2}, TIAN Cheng-rui¹, HU Qing-ping¹

(1. Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

2. Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: By using the superoxide radical system, hydroxyl radical system, H₂O₂ radical system, oxidation system of linolic acid induced by alkane radical and system of DPPH, the antioxidant activities of mulberry red pigment were studied and compared with VC. The results showed: the mulberry red pigment had different scavenging effects in these radical systems, and the scavenging capacity of mulberry red pigment in the superoxide radical system, hydroxyl radical system and H₂O₂ radical system showed good performance and its scavenging capacity was stronger than VC. The scavenging capacity to DPPH was lower than VC. In the selected concentration range, its capacity to alkane radical was not obvious, and almost equal to VC, with scavenging rate lower than 50%. Mulberry red pigment hence was a good kind of natural radical scavenger.

Key words: mulberry red pigment; scavenging; free radical

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0077-05

收稿日期: 2004-12-27

作者简介: 徐建国(1971-), 男, 讲师, 硕士研究生, 主要从事果蔬加工及植物资源开发利用研究。

离出的酵母SA1菌株有着良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Yamada S, Nabe K, Izeo N, et al. Production of L-phe from trans-cinnamic acid with Rhodotorula glutinis containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 42(5): 773-778.
- [2] James F Kane, Michael J Fiske. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase in rhodotorula glutinis[J]. J Bacteriol,

1985, 161(3): 963-966.

- [3] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1998. 48-50.
- [4] Evans CT, Conard D, Hanna K. Stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 25(5): 399-405.
- [5] 李清彪, 等. 反应条件下苯丙氨酸解氨酶的活力稳定性[J]. 生物工程学报, 1996, 12(3): 340-344.

自由基是生物体新陈代谢过程中产生的一类可以单独存在的具有高度氧化活性的带有一个或几个不配对电子的分子或原子,其化学性质相当活跃。自由基学说^[1]认为,自由基攻击生命大分子物质造成组织细胞损伤是引起机体衰老的根本原因,也是诱发肿瘤等恶性疾病的重要原因,自由基的产生和机体对自由基的清除功能的动态平衡同人体的生理、病理生长发育及疾病、衰老密切相关。

桑椹(Mulberry)俗称桑果,为桑科桑属植物桑(Morus alba L)的近成熟聚花果,是我国第一批公布的“既是食品又是药品”品种之一,具有滋阴养血、安魂镇神等功效^[2,3]。桑椹红色素是从桑椹中提取的一种花青苷类色素,其主要成分为矢车菊-3-葡萄糖,花青苷具有抗氧化及消除自由基等作用^[4~6]。国内也有报道表明,一些天然色素具有良好的防腐作用和抗氧化活性^[7,8],而对于桑椹红色素清除自由基能力的研究,尚未见详细报道。本文采用超氧阴离子自由基体系、羟基自由基体系、过氧化氢自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系及DPPH(二苯代苦味酰肼自由基)体系等五种自由基体系对桑椹红色素体外清除自由基能力进行了研究,以期综合开发利用桑椹资源提供参考,同时也为桑椹红色素的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

桑椹果渣 陕西安康桑果榨汁厂提供冷冻保存;
LSA-21大孔吸附树脂 西安蓝深树脂有限公司提供;亚油酸(81%) 许昌元化生物科技有限公司;鲁米诺、DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Sigma公司 其他试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器厂;恒流泵、自动收集器 上海沪西分析仪器厂; Christ Alpha-4低温冷冻干燥机 德国;旋转蒸发器RE-52AA 上海亚荣生化仪器厂;TSHZ-2A台式水浴恒温振荡器 上海跃进医疗器械厂;BPCL超微弱化学发光测量仪 中国科学院生物物理研究所。

1.3 试验方法

1.3.1 桑椹红色素的制备

以含0.01% HCl的80%乙醇溶液作为浸提剂,在料液比1:20,温度20℃的条件下,浸提桑椹果渣1.0h,过滤离心,减压除去乙醇,将浓缩液配制成吸光值为0.425A, pH值1.57左右的色素溶液以3.5BV/h的流速上柱吸附,填料为LSA-21大孔吸附树脂,吸附完毕后以流速1.5BV/h的蒸馏水洗脱1.4h,除去残留杂质,再用

含0.01% HCl的75%乙醇溶液作洗脱剂,以流速1.0BV/h进行洗脱,得到纯化的色素溶液,减压蒸发除去乙醇,然后将浓缩液在温度30℃,冷阱温度-55℃,大气压30~50Pa的条件下真空冻干12h,得到紫黑色的色素粉末。经测定,其色价为58.16左右。

1.3.1 超氧阴离子自由基体系^[9]

取0.05mol/L pH8.2的Tris-HCl缓冲液4.5ml,置于25℃水浴中预热20min,分别加入1ml试样和0.4ml 25mmol/L的邻苯三酚溶液,混匀后于25℃水浴中反应5min,加入8mol/L HCl 1.0ml终止反应,以Tris-HCl缓冲液作参比,在299nm处测定吸光度,计算清除率。空白对照组以1ml试样溶剂代替样品,每个处理均做三个重复。清除率的计算公式:超氧阴离子自由基清除率(%)=100(A₁-A₂)/A₁,其中A₁为空白的平均吸光度,A₂为试样的平均吸光度。

1.3.2 羟基自由基体系^[10]

羟基自由基由Fenton反应产生。在10ml具塞试管中依次加入10mmol/L的水杨酸溶液0.5ml,0.2mol/L的磷酸缓冲液(pH7.4)3ml,3.8mmol/L Fe²⁺-EDTA(1:1)溶液0.5ml,待测液1ml,最后加入1ml 4mmol/L H₂O₂溶液启动反应,于25℃水浴中反应90min之后,加入1ml 6mol/L HCl终止反应,再加入0.5g NaCl,4ml冷的乙醚充分混匀,静置后移取上层乙醚3ml于10ml离心管内,在40℃恒温水浴中蒸干乙醚,然后依次加入10%三氯乙酸(W/V)0.15ml,10%钨酸钠(W/V)0.25ml,0.5% NaNO₂(W/V)0.25ml,混匀放置5min后,加入1mol/L NaOH溶液0.25ml,滴加去离子水至4ml,混匀,在510nm处测定吸光度,计算清除率。空白用1ml试样溶剂代替试样,每个处理均做三个重复。清除率的计算公式:羟基自由基清除率(%)=100(A₁-A₂)/A₁,式中A₁为空白的平均吸光度,A₂为试样的平均吸光度。

1.3.3 过氧化氢自由基体系

在碱性条件下,H₂O₂氧化冷发光剂鲁米诺使之处于激发态,当退激发时发出425nm的光,鲁米诺转变为不活泼的氨基酞酸。此体系的发光强度和H₂O₂含量成正比,若受试物具有清除H₂O₂的作用,则发光强度下降。因此可利用该特性测定桑椹红色素和VC对H₂O₂自由基的清除能力。本试验采用的化学发光体系为:鲁米诺浓度3×10⁻⁴mol/L,H₂O₂浓度为0.1mol/L,反应介质为pH12的NaOH溶液,流动注射,流路见图1。每个处理做5次重复,取其发光强度的平均值C,空白用试样溶剂代替样品。各试样对自由基的抑制率用下式计算,自由基抑制率(%)=100(C_{空白}-C_{样品})/C_{空白}。

1.3.4 烷基自由基引发的亚油酸氧化体系

参考文献[9]稍做修改。将2ml乙醇、2ml 0.1mol/L

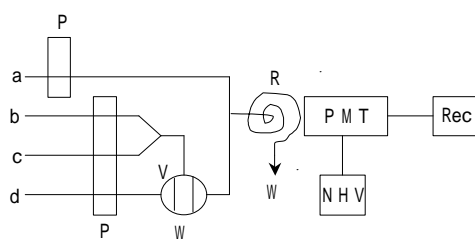


Fig.1 Schematic diagram of flow injection chemiluminescence

图1 流动注射化学发光流程图

磷酸缓冲液(pH8.0)、1ml 试样与0.1ml 亚油酸混合,用10 W紫外灯的紫外光照射60min,然后加入4ml 20%三氯乙酸(W/V)中止反应,再加入1ml 3%硫代巴比妥酸(W/V),在95℃水浴反应90min,冰浴冷却,离心,于532nm处比色,以1ml 试样溶剂代替试样作为空白对照,每个处理均做三个重复。清除烷基自由基活性的计算公式:烷基自由基清除率(%)=100(A₁-A₂)/A₁,式中A₁为空白的平均吸光度,A₂为试样的平均吸光度。

1.3.5 DPPH 自由基体系^[11]

将桑椹色素和VC 分别用pH3 的缓冲液和水配成0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mg/ml 等浓度的溶液备用,另配制0.05mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液,浓度为 2.5×10^{-4} mol/L 的DPPH 95%乙醇溶液,避光保存。取1ml 试样与2ml DPPH 乙醇溶液混合,再加入2ml Tris-HCl (pH7.4)缓冲液并剧烈摇晃,在室温下避光保存20min,然后在517nm 处测定吸光值,每个处理均做三个重复。各试样对DPPH 自由基的清除率用下式计算: DPPH 自由基的清除率(%)=100(A₁-A₂)/A₁,式中空白=1ml 试样溶剂+2mlDPPH+2mlTris-HCl 缓冲液,另外每个试样测定前需用1ml 试样+2mlTris-HCl 缓冲液对照调零,以消除试剂本身颜色带来的误差。

2 结果与讨论

2.1 样品对超氧阴离子自由基的清除作用

样品对超氧阴离子自由基的清除作用见图2。由图2 可知,桑椹色素对超氧阴离子自由基有显著的清除作用,当其浓度在0.5μg/ml 时,清除率就达到92.9%,浓度在1.0μg/ml 时,清除率达到97.93%,基本上达到最大值。而VC 在较低的浓度范围内,清除率呈负值,说明当浓度过低时,VC 对超氧阴离子自由基没有清除作用,反而可能产生促进作用,浓度在5.0μg/ml 时,清除率只有0.04%,在此之后,随着浓度的提高,清除率增加幅度较小,当浓度达到100μg/ml 时,清除率才有明显的增加,达到71.82%,浓度为500μg/ml 时,

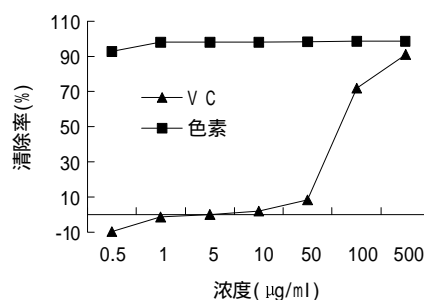


图2 样品对超氧阴离子自由基的清除结果
Fig.2 Scavenging result of sample to the superoxide radical

清除率为91.2%,但是也低于桑椹红色素在最低浓度时清除率。由此可以看出,VC 在较高的浓度下,对超氧阴离子自由基有较明显的清除作用,其对超氧阴离子自由基的清除能力远远低于桑椹红色素对超氧阴离子自由基的清除能力。

2.2 样品对羟基自由基的清除作用

羟基自由基是活性氧中化学性质最活泼的自由基,它几乎能与活细胞中任何生物大分子发生反应,且反应速度极快,是对机体危害最大的自由基。羟基自由基主要是通过Fenton 反应形成的,Fenton 反应产生 $\cdot OH$ 的反应式如下: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + H_2O + Fe^{3+}$,反应产生的羟基自由基进攻水杨酸分子上的苯环,产生2,3-二羟基苯甲酸,其在510nm 处的吸光值与 $\cdot OH$ 的量成正比。反应体系中若加入具有清除 $\cdot OH$ 作用的物质即可降低该吸光值。因此可通过分光光度法测定其含量来描述羟基的量及待测物质清除羟基自由基的能力。桑椹红色素和VC 清除羟基自由基的结果见图3。

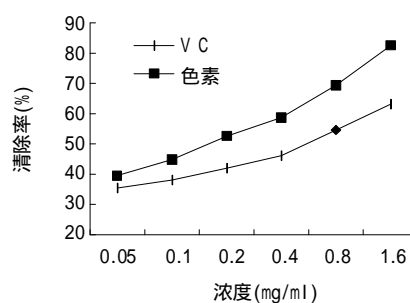


图3 样品对羟基自由基的清除结果
Fig.3 Scavenging result of sample to the superoxide radical to hydroxyl radical

由图3 可知,桑椹红色素和VC 对羟基自由基有较高的清除能力,随着桑椹红色素和VC 浓度的升高,它们对羟基自由基的清除能力逐渐增强。在0.05~1.6mg/ml 的浓度范围内,色素和VC 对羟基自由基的清除率为39.56%~82.40%和35.41%~63.10%,色素的IC₅₀为0.15mg/ml 左右,VC 的IC₅₀为0.75mg/ml 左右,这说明桑椹红色素

清除羟基自由基的能力强于VC。

2.3 样品对 H_2O_2 自由基的清除效果

H_2O_2 是一个弱氧化剂,但是它能迅速穿过细胞膜,在细胞内侧能与 Fe^{2+} 或 Cu^{+} 离子生成 $\cdot OH$,毒性很大。桑椹红色素和VC清除 H_2O_2 自由基的结果见图4。

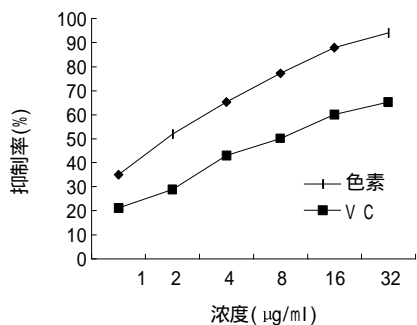


图4 样品对 H_2O_2 自由基的清除结果

Fig.4 Scavenging result of sample to the superoxide radical to H_2O_2 radical

由图4可以看出,在所选浓度范围内,发光体系中加入不同浓度的桑椹红色素和VC溶液后,抑制率均呈现上升趋势,说明桑椹红色素和VC对 H_2O_2 自由基均有抑制作用,抑制率与浓度有关,加入样品的浓度越大,其对 H_2O_2 自由基的抑制作用越强。在所选浓度范围内,色素的抑制率为35.12%~94%,高于VC的21.1%~63.95%,其 IC_{50} 为 $2\mu g/ml$ 也高于VC的 IC_{50} $8\mu g/ml$ 。可见,桑椹红色素可以有效清除过氧化氢,且清除能力高于VC。

2.4 样品对烷基自由基的清除效果

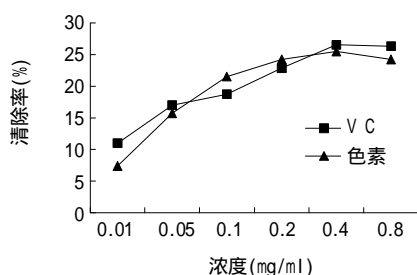


图5 样品对烷基自由基的清除结果

Fig.5 Scavenging result of sample to the superoxide radical to alkane radical

样品对烷基自由基的清除作用见图5。由图5可知,在所选浓度范围内,桑椹红色素和VC对烷基自由基的清除能力相当,均不明显,最高清除率分别为25.5%和26.3%,这说明桑椹红色素和VC对烷基自由基具有一定的清除能力,但不明显。

2.5 样品对DPPH自由基的清除效果

DPPH是一种被广泛使用的自由基,在有机溶剂中

非常稳定,呈紫色,在517nm处有一个特征吸收峰,当其遇到自由基清除剂时,DPPH的孤电子被配对,使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小。因此,可通过测定吸光度的变化来评价对DPPH自由基的清除效果。桑椹红色素和VC清除DPPH自由基的结果见图6。

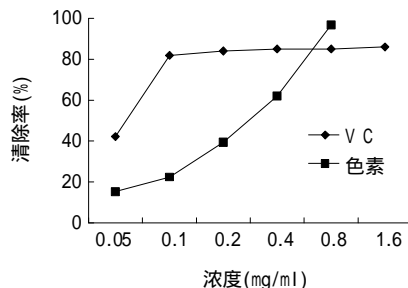


图6 样品对DPPH自由基的清除结果

Fig.6 Scavenging result of sample to DPPH radical

图6是不同浓度的桑椹红色素和VC对DPPH自由基清除能力的关系曲线。由图6可以看出,在0.05~0.8mg/ml的浓度范围内,桑椹红色素对DPPH自由基的清除率为15.23%~96.83%,并且随着浓度的升高,其对DPPH自由基的清除能力显著增强,当浓度达到0.8mg/ml时,自由基基本上被完全清除。而作为对照的VC,在所选浓度范围内,对DPPH自由基的清除率为42.32%~86%,当浓度达到0.1mg/ml时,其对DPPH自由基的清除率为82%,基本上达到最大值,随着浓度的进一步升高,清除率的变化并不明显。从以上数据也可以算出,桑椹红色素的 IC_{50} 为0.3mg/ml左右,小于VC的 IC_{50} 0.0625mg/ml,但其在较高浓度下,清除率高于VC,能清除所有的DPPH自由基。

3 结论

根据上述试验和分析,得出以下结论:桑椹红色素对超氧阴离子自由基、羟基自由基、过氧化氢自由基、烷基自由基和DPPH自由基均有不同程度的清除作用,其对超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢自由基的清除能力较好,且高于VC,清除DPPH自由基的能力低于VC;在所选浓度范围内,桑椹红色素清除烷基自由基的能力不明显,和VC相当,清除率均低于50%。桑椹红色素是一种很好的天然自由基清除剂,这为我们更合理开发利用桑椹资源提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 方允中,郑荣梁.自由基生物学的理论与应用[M].科学出版社,2002.
- [2] 肖更生,徐玉娟,刘学铭,等.桑椹的营养、保健功能及其加工利用[J].中药材,2001,24(1):70-72.

香蕉汁储藏过程中非酶褐变的研究

王素雅¹, 王 璋²

(1. 南京财经大学食品学院, 江苏 南京 210003 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文探讨了香蕉汁储藏中非酶褐变的原因与动力学。结果表明还原糖与氨基化合物发生的Maillard反应是造成香蕉汁储藏期间非酶褐变的主要原因。经与一级动力学和零级动力学模型拟合, 推测香蕉汁储藏期间的非酶褐变符合零级动力学方程, 其发生非酶褐变的活化能为80.46kJ/mol。

关键词: 香蕉汁; 非酶褐变; Maillard 反应; 动力学模型

Research on Nonenzymatic Browning of Banana Juice during Storage

WANG Su-ya¹, WANG Zhang²

(1. School of Food Science and Technology, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The paper discussed causes and kinetics of nonenzymatic browning during banana juice storage. The results showed that Maillard Reaction between amide and reducing sugar was the main nonenzymatic browning cause of banana juice. Zero and first order kinetics was applied to describe evolution of relative absorbance at 420nm. Nonenzymatic browning was successfully adjusted to zero order kinetic model, and the activation energy found for the nonenzymatic browning was 80.46kJ/mol.

Key words: banana juice; nonenzymatic browning; Maillard Reaction; kinetic model

中图分类号: S668.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0081-05

许多食品在储藏过程中因非酶褐变严重影响产品的风味与色泽, 使果汁品质下降。造成非酶褐变的原因很多, 反应亦十分复杂, 研究果蔬汁储藏期间某些物质含量的变化, 对于揭示果汁非酶褐变的物质基础十分有意义。

为了研究非酶褐变, 建立产品褐变速率常数的动力学模型, 掌握果汁储藏温度对非酶褐变反应动力学的影响十分重要。研究认为非酶褐变随时间呈线性增加(零级动力学)或以指数增加(一级动力学)^[1,2]。

零级动力学方程 $C = C_0 + kt$ (1)

收稿日期: 2004-12-02

作者简介: 王素雅(1969-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品科学。

-
- | | |
|--|--|
| [3] 于守洋, 崔洪斌. 中国保健食品的进展[M]. 人民卫生出版社, 2000. | [7] 王威. 常用天然色素抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 96-100. |
| [4] Idolo Tedesco, Gian Luigi Russo, Filomena Nazzaro, et al. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001, 12: 505-511. | [8] 杨洋, 韦小英, 阮征. 国内外天然食品抗氧化剂的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 137-140. |
| [5] Yasuko Noda, Takao Kneyuki, Kiharu Igarashi, et al. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels[J]. Toxicology, 2000, 148: 119-123. | [9] 范晓, 严小军, 房国明, 等. 高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 494-499. |
| [6] R Lo Scalzoa, T Iannocari, C Summaa, et al. Effect of thermal treatments on antioxidant and anti-radical activity of blood orange juice[J]. Food Chemistry, 2004, 85: 41-47. | [10] 贾之慎, 邬建敏, 唐孟成. 比色法测定Fenton反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184-187. |
| | [11] S T Chow, W W Chao, Y C Chung. Antioxidative activity and safety of 50% ethaolic red extract[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 21-25. |