

蜂王浆冻干粉体外抗氧化作用

高 慧, 程 妮, 贾 琪, 王毕妮, 邓建军, 曹 炜*

(西北大学化工学院食品科学与工程系, 陕西 西安 710069)

摘 要: 对青海、陕西、安徽和浙江产油菜蜂王浆的冻干粉中水溶性蛋白、总酚和 10-羟基-2-癸烯酸(10-HDA)含量进行测定, 并通过 DPPH 法和 FRAP 法评价蜂王浆冻干粉的抗氧化活性。结果表明: 不同产地油菜蜂王浆的冻干粉中总酚含量无显著性差异, 但青海产油菜蜂王浆的冻干粉中水溶性蛋白含量最高(190.32mg/g), 10-HDA 含量最高的为陕西产油菜蜂王浆的冻干粉(4.28%); 不同产地油菜蜂王浆的冻干粉均具有良好的 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力, 且样品的总抗氧化能力与其所含有的水溶性蛋白($r = 0.88$)和总酚含量($r = 0.95$)间呈显著正相关。

关键词: 蜂王浆; 水溶性蛋白; 10-HDA; 抗氧化作用

in vitro Antioxidant Activity of Lyophilized Rape Royal Jelly

GAO Hui, CHENG Ni, JIA Qi, WANG Bi-ni, DENG Jian-jun, CAO Wei*

(Department of Food Science and Engineering, School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Water-soluble protein, total phenol and 10-HDA in lyophilized samples of rape royal jelly from different regions: Qinghai, Shaanxi, Anhui and Zhejiang were analyzed in this study. The antioxidant activities of water-soluble extract from these samples were determined using DPPH radical scavenging and FRAP assays. The results showed that there were no significant differences in total phenol content among royal jelly samples from the different regions above. Royal jelly samples collected from Qinghai and Shaanxi had the highest water-soluble protein and 10-HDA contents, reaching 190.32 mg/g and 4.28%, respectively. All the samples investigated had powerful DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity. Strong correlations were observed between total antioxidant capacity and water-soluble protein content ($r = 0.88$) or total phenol content ($r = 0.95$).

Key words: lyophilized royal jelly; water-soluble proteins; 10-HAD; antioxidant activity

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0052-04

蜂王浆(royal jelly)亦称蜂皇浆、蜂乳, 是 5~15 日龄工蜂头部舌腺(咽下腺)和上颚腺共同分泌的一种乳白或浅黄色, 有酸涩、辛辣味、微甜并具有特殊香气的浆状物^[1], 含有丰富的生物活性物质, 如蛋白质、类固醇、酶、维生素及微量元素和多酚等^[2-3]。蜂王浆冻干粉(lyophilized royal jelly)是将鲜王浆真空冷冻干燥后得到的蜂王浆制品, 它既保留了鲜王浆的活性成分, 又克服了鲜王浆容易变质和储存不便的弊病, 因而越来越广泛的为消费者所熟悉和青睐。现代医学研究表明, 蜂王浆是一种天然的保健、营养食品, 具有抗衰老、抗肿瘤、增强免疫和护肤美容的功效^[3-5], 这些与蜂王浆具有抗氧化活性有关^[6-8]。本研究以青海、陕西、安徽和浙江产油菜蜂王浆的冻干粉为研究对象, 测定蜂王浆冻干粉的水溶性蛋白、总酚和 10-HDA 含量, 还以体外

抗氧化模型(DPPH 法和 FRAP 法)评价其抗氧化活性, 以期能更好的指导消费者并为开发新型蜂王浆产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂王浆冻干粉 实验室自制; 牛血清白蛋白、DPPH、10-HDA、水溶性 VE(Trolox)、三吡啶三吡嗪(TPTZ)、原儿茶酸 美国 Sigma 公司; 甲醇、无水乙醇、无水碳酸钠、氯化铁、醋酸铵、考马斯亮蓝 G-250、钨酸钠、钼酸钠、浓磷酸、浓盐酸和溴水 天津化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机 北京博医康技术公司; 电子分析

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 陕西省科技计划项目(2010K01-22); 陕西省教育厅科研计划项目(11JK0623)

作者简介: 高慧(1977—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为蜂产品质量控制。E-mail: gaohui0815@nwu.edu.cn

* 通信作者: 曹炜(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为蜂产品深加工及质量控制。E-mail: caowei@nwu.edu.cn

天平 北京赛多利斯天平有限公司; KQ-100B 型超声波发生器 昆山市超声仪器有限公司; TGL-16G 高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂; HH-2 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; UV751-GWD 紫外-可见分光光度计 上海分析仪器总厂。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将 5g 蜂王浆冻干粉加入 100mL 去离子水中, 充分振荡混匀, 超声波辅助提取 60min 后于 $12000 \times g$ 离心 15min, 取上清液置于 4℃ 冰箱, 用于各项指标的测定。

1.3.2 水溶性蛋白质含量的测定

参考 Lowry 等^[9]的方法, 以牛血清白蛋白为标准物质。

标准曲线: 准确移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8mL 的 $110\mu\text{g/mL}$ 小牛血清白蛋白标准溶液于刻度试管中, 再分别移取 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2mL 的蒸馏水于对应的刻度试管, 最后加入 0.1mg/mL 的考马斯亮蓝 G-250 溶液 5mL, 摇匀, 反应 2min 后于波长 595nm 处测吸光度。以吸光度和小牛血清白蛋白质量进行线性回归, 得到线性范围在 $0\sim 88\mu\text{g}$ 的小牛血清白蛋白标准曲线, $y = 1.1608x + 0.3489$, $R^2 = 0.9934$ 。

样品测定: 移取 0.1mL 蜂王浆冻干粉水提物, 加 0.9mL 蒸馏水, 5mL 考马斯亮蓝 G-250 混合, 反应 2min, 在波长 595nm 处测吸光度, 根据标准曲线计算蜂王浆冻干粉中水溶性蛋白的含量。

1.3.3 总酚含量的测定

参考 Hinneburg 等^[10]的方法测定, 总酚含量以原儿茶酸计。

标准曲线: 准确移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 的原儿茶酸溶液($100\mu\text{g/mL}$)于刻度试管中, 之后各加入 1mL 福林-酚显色剂和 5mL 1mol/L 的碳酸钠水溶液, 最后用蒸馏水定容至 10mL。混合均匀, 在室温下避光放置 1h 后于波长 760nm 处测定吸光度。以吸光度和原儿茶酸的质量进行线性回归, 得到线性范围在 $0\sim 100\mu\text{g}$ 的原儿茶酸标准曲线, $y = 1.3729x + 0.0890$, $R^2 = 0.9959$ 。

样品测定: 准确移取蜂王浆冻干粉水提物 0.4mL, 加入 1mL 福林-酚显色剂, 混匀。然后加入 5mL 1mol/L 碳酸钠溶液, 用蒸馏水定容至 10mL, 混合均匀。在室温避光条件下放置 1h 后于波长 760nm 处测定吸光度。根据吸光度计算总酚含量。

1.3.4 10-HDA 含量的测定

参考董彩霞等^[11]的方法测定。

标准曲线: 配制 $10\mu\text{g/mL}$ 的 10-HDA 甲醇溶液于波长 210nm 处测吸光度, 作标准曲线。

样品测定: 取 100~200mg 蜂王浆, 以甲醇定容至

100mL 后过滤, 取滤液 1mL 甲醇定容至 10mL, 以甲醇为空白, 于波长 210nm 处测定吸光度, 并将吸光度换算为百分率。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力的测定

参考 Singh 等^[12]的方法并稍有改进。移取 0.5mL 的样品溶液于 25mL 的刻度试管中, 分别加入 0.2mmol/L 的 DPPH 溶液 2mL, 甲醇定容, 摇匀, 室温下避光放置 40min 后, 于波长 517nm 处测定吸光度 A_1 , 同时测定 DPPH 初始浓度的吸光度 A_0 , 按照下式计算样品的 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} \% = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

1.3.6 总抗氧化活性的测定

采用总抗氧化能力(ferric reducing ability of plasma, FRAP)法测定^[13]。

标准曲线制备: 分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 的 Trolox(1mmol/L), 加入 4.0mL 的 TPTZ 工作液(由 300mmol/L pH3.6 的醋酸缓冲液 25mL, 10mmol/L TPTZ 溶液 2.5mL 和 20mmol/L FeCl_3 溶液 2.5mL)于波长 539nm 处测吸光度。以吸光度与 Trolox 的微摩尔数进行线性回归, 得标准曲线: $y = 3.3857x + 0.7106$, $R^2 = 0.9900$ 。

样品测定: 取 0.1mL 的各待测样品, 加入 4.0mL 的 TPTZ 工作液, 混匀后 37℃ 反应 10min, 于波长 593nm 处测定吸光度。对照标准曲线, 得到样品的总抗氧化活性, 以 Trolox 计。

2 结果与分析

2.1 蜂王浆冻干粉的水溶性蛋白、总酚和 10-HDA 含量

表 1 蜂王浆冻干粉的水溶性蛋白、总酚和 10-HDA 含量
Table 1 Water-soluble proteins, total phenol and 10-HDA contents in lyophilized royal jelly

项目	青海	陕西	安徽	浙江
蛋白质含量(mg/g)	190.32 ± 0.03	145.68 ± 0.01	101.05 ± 0.04	88.73 ± 0.02
总酚含量(mg/g)	5.98 ± 0.14	5.83 ± 0.05	5.74 ± 0.12	5.64 ± 0.22
10-HDA 含量/%	3.39 ± 0.38	4.28 ± 0.17	3.61 ± 0.14	3.75 ± 0.21

由表 1 可见, 不同产地油菜蜂王浆冻干粉的水溶性蛋白含量为 $88.73\sim 190.32\text{mg/g}$, 其中水溶性蛋白含量最低的是安徽产油菜蜂王浆的冻干粉, 为 88.73mg/g , 而青海产油菜蜂王浆的冻干粉中水溶性蛋白含量最高, 是安徽产油菜蜂王浆的 2.15 倍。造成水溶性蛋白含量变化的原因可能是蜜蜂、蜂群本身, 也可能是保存时间、条件等存在差异的结果。众所周知, 蛋白质是蜂王浆最重要组分之一, 且其中 46%~89% 为水溶性蛋白质。有研究表明, 水溶性蛋白含量的高低与蜂王浆的抗氧化活性紧密相关^[18], 也是蜂王浆品质优劣的评价指标。

蜂王浆中含有少量的酚类物质, 这些酚类物质主要来源于植物, 特别是植物的次级代谢产物^[14]。本研究中, 不同产地油菜蜂王浆的冻干粉中均含有一定量的酚类物质, 但由于工蜂自身的代谢平衡, 各样品的总酚含量差异极不显著(表1)。Liu等^[3]曾测定了蜂王浆的总酚含量, 但因为蜜源种类、生产季节、工蜂的年龄等存在差异, 无法与本实验结果进行比较。但该研究认为虽然蜂王浆中酚类物质含量不高, 但可能是蜂王浆抗氧化作用的重要成分之一。

10-HDA 是蜂王浆中独有的一种不饱和脂肪酸, 是我国现行的行业标准中衡量蜂王浆质量优劣的重要指标。依照我国农业部的相关标准, 若鲜王浆中 10-HDA 含量 $> 1.4\%$, 冻干粉中 10-HDA 含量 $> 4.2\%$, 则蜂王浆质量合格。本实验中, 仅陕西产油菜蜂王浆的冻干粉中 10-HDA 含量满足上述标准, 为 4.28% (表1)。出现这种情况的原因可能与产地不同有关; 也可能与蜜蜂是否为高产蜂种有关; 还可能为了除去蜂王浆中的杂质(蜡片、幼虫等)而对其进行过滤处理的结果^[15]。10-HDA 具有抗癌、抗菌和免疫调节等生物活性, 故蜂王浆中若含有较高的 10-HDA 则可能表现出较高的生物活性。

2.2 蜂王浆冻干粉的 DPPH 自由基清除能力

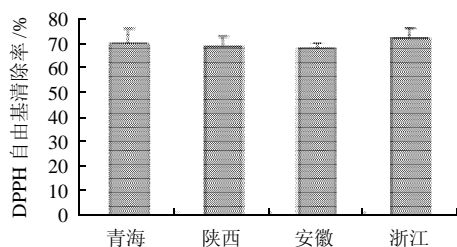


图1 蜂王浆冻干粉的 DPPH 自由基清除能力

Fig.1 DPPH radical scavenging activity of lyophilized royal jelly

由图1可见, 不同产地油菜蜂王浆的冻干粉均有较强的 DPPH 自由基清除能力, 但它们的 DPPH 自由基清除率差异极不显著。而且除浙江产油菜蜂王浆的冻干粉外, 其余3产地油菜蜂王浆的冻干粉的 DPPH 自由基清除率均与其水溶性蛋白质含量和总酚含量呈显著的正相关, 相关系数分别为 $r = 0.97$ 和 $r = 0.99$ 。这表明蜂王浆中的水溶性蛋白和酚类物质均具有良好的抗氧化活性, 但酚类物质较水溶性蛋白质更具 DPPH 自由基的清除活性。有浙江产油菜蜂王浆的冻干粉虽然含有较低的水溶性蛋白和总酚含量, 但其 DPPH 自由基清除率仍高于其他3个样品, 为 72.75% , 究其原因, 可能与样品中水溶性蛋白或酚类物质的种类或结构不同有关。

2.3 蜂王浆冻干粉的总抗氧化能力

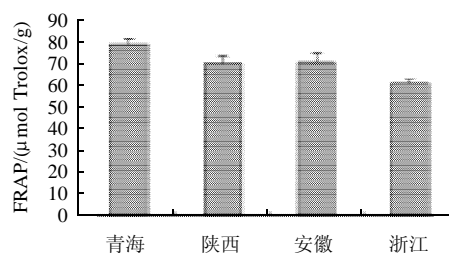


图2 蜂王浆冻干粉的总抗氧化能力

Fig.2 Total antioxidant capacity of lyophilized royal jelly

由图2可见, 不同产地油菜蜂王浆的冻干粉均有较强的总抗氧化能力, 其中青海产油菜蜂王浆的冻干粉的总抗氧化能力最强, 浙江的最弱, 陕西和安徽产油菜蜂王浆的冻干粉的总抗氧化能力相近。结合各样品的水溶性蛋白和总酚含量发现, 油菜蜂王浆冻干粉的总抗氧化能力与其所含有的水溶性蛋白($r = 0.88$)和总酚含量($r = 0.95$)间呈显著的正相关。但不同产地油菜蜂王浆的冻干粉其总抗氧化能力与 DPPH 自由基清除率间相关性低($r = 0.47$), 这可能是由于蜂王浆中存在一些有络合位点的酚类物质, 这些酚类物质通过络合铁离子而影响了蜂王浆对 TPTZ 的还原能力^[16]。

3 结 论

油菜蜂王浆冻干粉的水溶性蛋白质和 10-HDA 含量上因产地不同有一定差异, 但总酚含量不受地域限制, 实验表明差异极不显著。

油菜蜂王浆冻干粉具有良好的抗氧化活性。除浙江产油菜蜂王浆的冻干粉外, 其余产地油菜蜂王浆的冻干粉的 DPPH 自由基清除率与其水溶性蛋白含量和总酚含量呈显著的正相关, 相关系数分别为 $r = 0.97$ 和 $r = 0.99$; 青海、陕西、安徽和浙江产油菜蜂王浆的冻干粉的总抗氧化能力与其所含有的水溶性蛋白和总酚含量间呈显著的正相关, 相关系数分别为 $r = 0.88$ 和 $r = 0.95$ 。

水溶性蛋白和酚类物质是油菜蜂王浆冻干粉中主要的抗氧化物质, 且酚类物质较水溶性蛋白质更具抗氧化活性。

参考文献:

- [1] TAKENAKA T. Chemical compositions of royal jelly[J]. Honeybee Sci, 1982, 3(1): 69-74.
- [2] 黄盟盟, 薄文飞, 张林军, 等. 蜂王浆的主要活性成分及其保健作用[J]. 中国酿造, 2009(2): 152-154.
- [3] LIU J R, YANG Yuanchang, SHI L S, et al. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(23): 11447-11452.

- [4] STOCKER A, ROSSMANN A, KETTRUP A, et al. Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(2): 181-185.
- [5] SMITH J. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoul brood factor[J]. *Apidologie*, 2001, 32(1): 69-72.
- [6] NAGAI T, SAKAI M, INOUE R, et al. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis[J]. *Food Chemistry*, 2001, 75(2): 237-240.
- [7] GUO H, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Isolation and properties of antioxidative peptides from water soluble royal jelly protein hysrolysate [J]. *Food Science Technological Research*, 2005, 11(2): 222-230.
- [8] NAGAI T, INOUE R, SUZUKI N, et al. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(2): 181-186.
- [9] LOWRY O D, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [10] HINNEBURG I, DORMAN H J D, HILTUNEN R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices[J]. *Food Chemistry*, 2006, 97(1): 122-129.
- [11] 董彩霞, 谷永庆, 尚冰冰, 等. 分光光度法测定蜂王浆中 10-HDA 含量[J]. *光谱实验室*, 2008, 25(2): 176-179.
- [12] SINGH N, RAJINI P S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel[J]. *Food Chemistry*, 2004, 85: 611-616.
- [13] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239: 70-76.
- [14] BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance[J]. *Nutrition Review*, 1998, 56: 317-333.
- [15] 吴小波, 王英丽, 曾志将. 过滤处理对不同厂家蜂王浆中 10-HDA 含量的影响[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(1): 186-187.
- [16] AZEVEDO J, FERNANDES I, FARIA A, et al. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins [J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(2): 518-523.