

doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2014.01.007

青海沙棘果粉抗氧化活性的研究

强伟^{1,2}, 朱丽娜^{1,2}, 史俊友^{1,2}, 索有瑞^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 为了深入了解青海沙棘果粉的品质, 助其实现规模化生产, 从1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·)体系、羟基自由基(·OH)体系、超氧阴离子自由基(O₂⁻·)体系和亚硝酸盐(NO₂⁻)的清除效果方面着手, 研究了其体外清除自由基活性。结果表明, 青海沙棘果粉对DPPH·、·OH、O₂⁻·和NO₂⁻均有清除作用, 且对DPPH·、·OH的清除能力优于O₂⁻·和NO₂⁻。

关键词 青海沙棘果粉; 1,1-二苯基苦基苯肼自由基; 羟基自由基; 超氧阴离子; 亚硝酸盐; 自由基清除

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-9690(2014)01-0024-04

Study on Antioxidant Activity of Fruit Powder from Qinghai's *Hippophae rhamnoides* L.

Qiang Wei^{1,2}, Zhu Lina^{1,2}, Shi Junyou^{1,2}, Suo Yourui^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In order to study the quality of the fruit powder from Qinghai's *Hippophae rhamnoides* L., and realize large-scale production, the free radical scavenging activities from the fruit powder of Qinghai's *Hippophae rhamnoides* L. *in vitro* were studied in DPPH·, hydroxyl radical (·OH), superoxide anion (O₂⁻·) and nitrite (NO₂⁻) systems. The results showed that the fruit powder possessed scavenging effects against DPPH·, ·OH, O₂⁻· and NO₂⁻. The scavenging capacities of fruit powder for DPPH· and ·OH were comparable to those of O₂⁻· and NO₂⁻.

Key words Fruit powder of Qinghai's *Hippophae rhamnoides* L.; DPPH·; hydroxyl radical; superoxide anion; nitrite; free radical scavenging

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.) , 俗称醋柳、酸刺, 又名酸柳果、其察日嘎察(蒙名)、达普(藏名)、吉汉(维吾尔名)^[1], 为胡颓子科沙棘属的落叶灌木或小乔木, 是我国西部重要的经济林和生态林。在我国青海、西藏、甘肃、山西、内蒙等欠发达地区广泛分布, 用于减少水土流失、恢复植被、改善生态环境。由于沙棘具有生态适应性宽、抗逆性强、耐干旱的性质, 近年来在青海广泛种植, 目前已达到400万亩(1亩约为667 m²)。沙棘果实和叶片中含有丰富的营养成分和生物活性, 使其具备了开发抗疲劳、抗衰老、降血脂、防止动脉硬化、抗辐射、治疗胃溃疡、抗坏血病的药品或保健食品的物质基础, 成为国内外

科研、企业和消费者关注的可食植物资源和具有明显功能作用的药食两用植物资源。沙棘果实中含有黄酮、维生素、多酚类等物质, 其中维生素C含量极高, 每100 g果汁中, 维生素C含量可达到825~1100 mg, 是猕猴桃的2~3倍, 素有“维生素C之王”的美称^[2]。同时, 青藏高原的沙棘鲜果中V_C几乎比低海拔地区高出2倍。目前, 以富含V_C的沙棘原汁通过喷雾干燥技术制成的沙棘果粉不仅便于运输与储藏, 还便于产品开发, 可作为药品载体、食品、保健食品以及化妆品的原料和辅料。但在果粉的制备过程中, 某些天然营养成分会遭到破坏和流失, 为了综合评定果粉成品的质量, 本文从DPPH·、

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 中国科学院知识创新方向性项目资助

作者简介: 强伟(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: qiangwei0407@126.com

* 通讯作者: 索有瑞(1960-), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: yrsuo@nwpb.ac.cn

•OH、O₂⁻和NO₂⁻等方面探讨了沙棘果粉的抗氧化性,以期为果粉的开发和产业化利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·,Sigma公司);无水乙醇、硫酸亚铁、水杨酸、盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、邻苯三酚(焦性没食子酸)、亚硝酸钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘己二胺等均为国产市售分析纯;精密电子天平、电子恒温不锈钢水浴锅、101型电热鼓风干燥箱、Cary300型紫外可见分光光度计(美国Varian公司)。

1.2 沙棘果粉的制备

果粉由本课题组提供,生产流程为:原料采收→果汁验收→果汁灭菌→果汁沉降→果汁过滤→果粉喷雾干燥工艺→产品检验与保存。

1.3 实验过程与方法

1.3.1 沙棘果粉对DPPH·抑制率测定^[3]

1,1-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·)是一种很稳定的以氮为中心的自由基,若受试物能将其清除,则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧化氢自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用。DPPH·有个单电子,其乙醇水溶液呈紫色,加入受试物后λ 517 nm吸收值下降则表示其对自由基有消除能力^[4]。

精确吸取不同质量浓度的沙棘果粉水溶液2 mL,加入4 mL 5 × 10⁻⁵ mol/L DPPH·(用无水乙醇溶解)溶液,摇匀后静置30 min,以样品溶液做对照,测517 nm处的吸光光度值A,同时测定样品溶液在517 nm处的A₀,空白对照液溶液在517 nm的A₁,按下列公式计算其清除率。

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100\%$$

式中,A:样品加上DPPH·的吸光度;A₀:样品本身的吸光度,以蒸馏水代替显色剂;A₁:空白对照液,以蒸馏水代替样品

1.3.2 沙棘果粉对•OH抑制率的测定

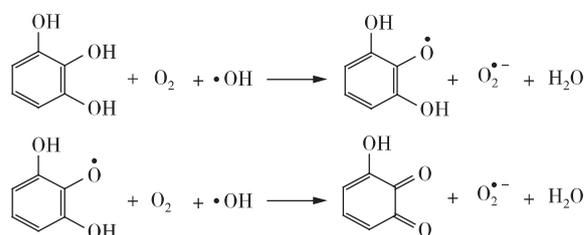
Feton反应产生•OH,反应式为:H₂O₂ + Fe²⁺ → •OH + H₂O + Fe³⁺。羟自由基氧化水杨酸得到2,3-二羟基苯甲酸,用其在525 nm处的吸光值表示•OH的多少。吸光值与•OH的量成正比。反应体系中加入具有清除•OH作用的物质即可降低该吸光值^[5]。

水杨酸法:取若干支比色管,依次加入9 mmol/L FeSO₄ 0.25 mL,9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液

0.25 mL,不同质量浓度的沙棘果粉溶液5 mL,最后加8.8 mmol/L H₂O₂ 0.25 mL启动反应,于室温下反应1 h,以蒸馏水做空白对照,525 nm测A,同时测定样品溶液在525 nm处的A₀,空白对照液在525 nm的A₁,按1.3.1计算方法计算清除率。

1.3.3 沙棘果粉对O₂⁻抑制率的测定

邻苯三酚在碱性条件下,能迅速氧化,释放出O₂⁻,生成有色的中间反应物如下:



邻苯三酚在碱性条件下的自氧化经两步单电子氧化过程:第一步是邻苯三酚氧化成半醌自由基,第二步是氧化成醌。在这一过程中伴随生成超氧自由基。邻苯三酚在1~4 min自氧化时间间隔内,由于本身的自氧化产物的累积,使得322 nm处的吸收峰随着反应进程呈线性增加。测定的是初始阶段,当有抗氧化物质存在时,它能催化O₂⁻与H⁺结合生成O₂和H₂O₂,阻止了中间产物的积累^[6]。

在25 mL的比色管中加入3 mL Tris-HCl缓冲液(pH 8.2),1 mL不同质量浓度的沙棘果粉溶液,25℃ ± 0.5℃水浴平衡20 min后,加入0.3 mL 7 mmol/L的邻苯三酚准确反应4 min,加入1 mL 10 mol/L的HCl终止反应,在322 nm处测A。同时测定样品溶液在322 nm处的A₀,空白对照液在322 nm的A₁,按1.3.1计算方法计算清除率。

1.3.4 沙棘果粉对NO₂⁻抑制率的测定^[7]

当加入沙棘果粉溶液时,溶液中的有效成分与NaNO₂作用将NaNO₂消耗掉,剩余亚硝酸根在酸性条件下,能使对氨基苯磺酸重氮化,再使其与盐酸萘己二胺偶合生成红色偶联化合物,测定溶液吸光度,计算亚硝酸盐清除率^[8]。

将0.5 mol/L的柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 3.0) 5.0 mL置于25 mL比色管中,加入1 mL质量分数0.01%的NaNO₂溶液,再分别加入10 mL不同浓度的沙棘果粉溶液,定容至刻度。37℃反应1 h。取1 mL反应液于50 mL容量瓶中,加入0.4%对氨基苯磺酸溶液2 mL,0.2%的盐酸萘己二胺1 mL,摇匀放置15 min后,用分光光度计在544 nm处测A,同时测定样品溶液在544 nm处的A₀,空白对照液在322 nm的A₁,按1.3.1计算方法计算清除率。

2 结果与讨论

2.1 对 DPPH·自由基的清除作用

不同浓度沙棘果粉溶液加入到 5×10^{-5} mol/L DPPH·乙醇溶液,反应 30 min 后,其清除能力如图 1 所示。沙棘果粉对 DPPH·有很好的清除作用,随着果粉浓度的增大,对 DPPH·的清除作用迅速增强。但当果粉用量超过 0.4 mg/mL 时,对 DPPH·的清除作用变化很小,当果粉浓度为 0.4 mg/mL 时,对 DPPH·清除率为 96.78%。沙棘果粉清除 DPPH·的 IC_{50} 值为 0.22 mg/mL 左右。

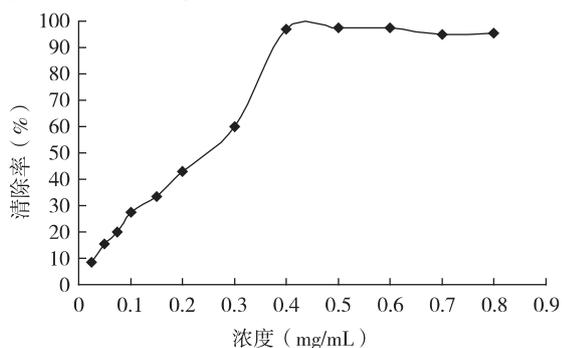


图1 沙棘果粉对 DPPH·的清除率

2.2 对·OH 清除作用

羟基自由基($\cdot OH$)是最活泼、毒性最大的自由基,它可与活细胞中的任何分子发生反应,引发组织细胞病变,导致各种疾病发生和加速机体衰老,且反应速度非常快。沙棘果粉对 $\cdot OH$ 的清除效果见图 2。由图 2 可知,随着果粉浓度的增大,清除效果增加,当浓度增大为 0.8 mg/mL 时,对 $\cdot OH$ 清除率为 56.40%。超过此浓度时,对 $\cdot OH$ 清除变化很小。沙棘果粉清除 $\cdot OH$ 的 IC_{50} 值为 0.72 mg/mL 左右。

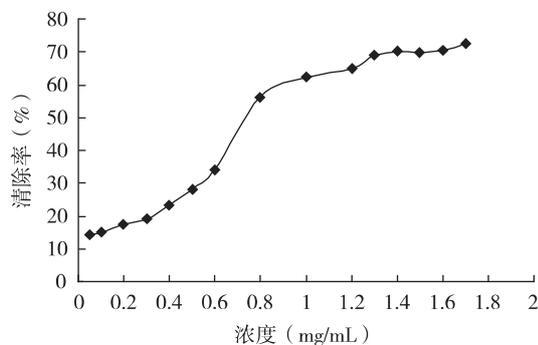


图2 沙棘果粉对·OH 的清除率

2.3 对碱性邻苯三酚体系产生的 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用

生物体内氧化还原反应中,大约有 2%~5% 的氧会产生 $O_2^{\cdot -}$, $O_2^{\cdot -}$ 是活性氧的一种,是机体内寿命最长的自由基,通常作为自由基链式反应的引发剂,产生活性更强的 $H\cdot$ 自由基,进一步给机体造成危

害。本文通过邻苯三酚自氧化产生 $O_2^{\cdot -}$, 来考察沙棘果粉在体外对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用,结果如图 3 所示。当沙棘果粉浓度增加到 5 mg/mL 时,其清除率为 69.57%, IC_{50} 值为 3.5 mg/mL 左右。

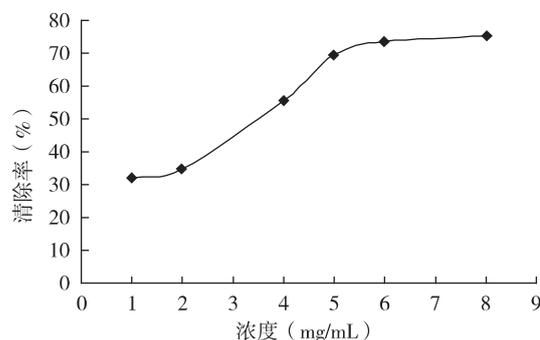


图3 沙棘果粉对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率

2.4 对亚硝酸盐清除率的测定

亚硝酸盐与仲胺在人体中易合成强致癌物质亚硝胺,沙棘果粉清除亚硝酸盐的效果如图 4 所示。在 0.5~8 mg/mL,沙棘果粉对羟基自由基的清除率分别为 11.37%~43.50%。沙棘果粉清除亚硝酸盐的 IC_{50} 未达到 50。这也表明沙棘果粉对亚硝酸盐清除效果不如 DPPH·、 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 。

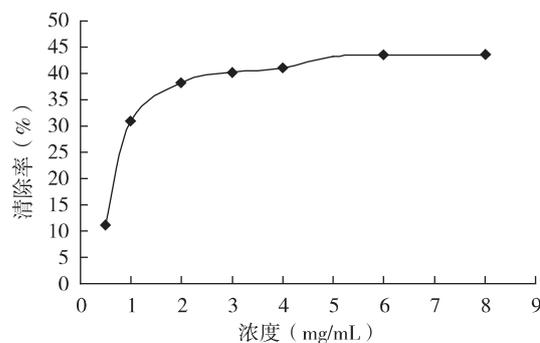


图4 沙棘果粉对亚硝酸盐的清除率

3 结语

本文通过对自由基体系和亚硝酸盐体系研究表明,沙棘果粉有较好的抗氧化性能,能有效清除 DPPH· 和 $\cdot OH$,其最高清除率分别达 95.35% 和 71.26%;在增大沙棘果粉浓度时,对 $O_2^{\cdot -}$ 和亚硝酸盐的最高清除率分别达到 75.02% 和 43.49%。由此可见沙棘果粉是一种良好的天然自由基清除剂。

参考文献:

- [1] 付媛,李金梅,张霞,等.沙棘的化学成分及其保健功能研究进展[J].内蒙古石油化工,2008,23:13-14.
- [2] 鲁长征,山永凯,刘洪智,等.天然维生素之王-沙棘在食品配料中的应用[J].中国食品添加剂,2008:229-235.
- [3] 吴雪辉,张喜梅,李廷群,等.板栗花粗提物的抗氧化活性研究

- [J]. 现代食品科技 2008 24(1) :14 - 16.
- [4] Suzuki M ,Mori M. Antioxidant mechanisms of catechins on DPPH radical [J] , J Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu , 2000 40: 631 - 636.
- [5] Nicholas S , Quinton J C. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry ,1989 28:1057 - 1060.
- [6] 金春英 张小勇 崔胜云. DPPH 及邻苯三酚法对牛蒡和小根蒜提取液及其他氧化剂的清除自由基能力的比较研究 [J]. 延边大学学报: 自然科学版 2008 34(1) :43 - 46.
- [7] 冯翠萍 洪建华 张弋凡. 果汁对亚硝酸盐清除作用的研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版 2009 29(3) :261 - 264.
- [8] Concepción S M , José A L. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines , grape juices and related poly-phenolic constituents [J]. Food Res Int ,1999 32: 407 - 412.

2014 年《腐植酸》征订启事

《腐植酸》杂志创刊于 1979 年 ,由中国腐植酸工业协会主办 ,是《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,《中国学术期刊(光盘版)》、《中国核心期刊(遴选)数据库》入编期刊。杂志集学术、专业、实用性于一身 ,内容丰富、信息广泛、指导性较强。主要栏目有:卷首语、专题评述、研究论文、译文、腐植酸文摘、腐植酸专利简介、腐植酸环保应用、协会(专业)标准讨论、“两会”动态、信息传真、“乌金杯”采风等。

2014 年 ,本刊将继续以“高扬绿色 关注民生”为指导 ,积极宣传腐植酸绿色低碳产业思想 ,以及腐植酸在节能减排、循环经济、生态环境、开发新材料等领域的新成果、新思想和行业新资讯 ,为推动我国腐植酸产业的发展做好服务工作。

双月刊 国际标准大 16 开 ,内设 60 页。国际标准刊号:ISSN1671 - 9212;国内统一刊号:CN11 - 4736/TQ。每期定价 20.00 元 ,全年 6 期 ,年定价 120.00 元(含邮费)。

邮局汇款

地址:北京市西城区六铺炕街 1 号 邮编:100120 收款人:《腐植酸》编辑部

银行汇款

账号:0200 0223 0901 4405 144 开户名:中国腐植酸工业协会 银行:中国工商银行北京六铺炕支行

联系方式

电话:010 - 82784950 010 - 82035180 传真:010 - 82784970

E-mail: chaia@126.com 网址: www.chinaha.org

《中国野生植物资源》投稿须知

1. 《中国野生植物资源》是由中华全国供销合作总社主管 ,南京野生植物综合利用研究院主办的综合性科技双月刊 ,1982 年创刊 ,面向国内外公开发行人。其宗旨是报道野生经济植物最新科研成果 ,介绍野生植物综合利用 ,栽培、引种技术。主要栏目包括综述、研究报告、资源研究、应用开发、栽培技术、信息报道等。

2. 主要读者对象为农、林、食品、医药、土特产、轻化工等部门科研、教学及生产决策人员。

3. 投稿须知。参考文献选择主要的近期出版的著录 ,一般不超过 20 篇。著录时项目要齐全。量和单位按国家标准规定 ,不用“亩”、“斤”等已废止的单位 ,改用 hm^2 (公顷)、 kg (千克)等。其它已废除的单位有:克分子浓度(M)、当量浓度(N)、毫米汞柱(mmHg)、标准大气压(atm)、卡(cal)等。量和单位间相隔 1/3 字距。植物名称属及其以下的拉丁文学名用斜体。

4. 来稿中标明基金项目名称及编号。标明第一作者简介 格式为姓名(出生年 -) ,性别 ,主要研究方向等。

5. 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》、《中文科技期刊数据库》和“万方数据——数字化期刊群” ,所刊文章进入因特网提供信息服务。凡不同意加入者 ,请来稿时声明 ,本刊将作适当处理。

6. 请作者写明通讯地址、单位、邮编、电话、E-mail 等 ,以便联系。稿件不退 ,请自备底稿。

7. 电子稿发至: yszw2009@163.com ,电话: 025 - 85472153。地址:南京市蒋王庙街 4 号 ,《中国野生植物资源》编辑部。 邮编: 210042