

青藏高原油菜蜂花粉醇提物 体外清除自由基活性研究

王小艳^{1,2}, 曹越^{1,2}, 张蕊^{1,2}, 索有瑞^{1,*}

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

摘要:为探讨青藏高原油菜蜂花粉醇提物的体外清除自由基活性, 研究了其对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)体系、羟基自由基($\cdot OH$)体系和二苯代苦味酰基自由基(DPPH $\cdot$)体系的清除效果, 并以抗坏血酸(V_C)作为阳性对照。结果表明, 油菜蜂花粉醇提物对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 和DPPH $\cdot$ 均具有一定清除作用, 且与浓度呈量效关系, 并且对 $\cdot OH$ 和DPPH $\cdot$ 清除效果相对较好, 略优于 V_C 。

关键词:青藏高原油菜蜂花粉, 醇提物, 自由基清除

Study on free radical scavenging activities of ethanol extract from rape bee-pollen in Qinghai-Tibet plateau

WANG Xiao-yan^{1,2}, CAO Yue^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, SUO You-rui^{1,*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810001, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The free radical scavenging activities of ethanol extract from rape bee pollen in Qinghai-Tibet plateau was studied in superoxide anion free radical($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical($\cdot OH$) and DPPH $\cdot$ systems, with V_C used as positive control. The results showed that the ethanol extract from rape bee pollen possess remarkable scavenging effects against $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and DPPH $\cdot$ in a dose dependent manner. The scavenging capacities of the ethanol extract for $\cdot OH$ and DPPH $\cdot$ were slightly higher than that of V_C .

Key words: rape bee-pollen in Qinghai-Tibet plateau; ethanol extract; free radical scavenging

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)012-0115-04

自由基是生物体内生化反应产生的中间产物, 是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。由各种自由基所引发的氧化作用是导致身体中各组分和器官损伤、病变的重要原因之一^[1]。研究表明, 自由基的产生和机体对自由基清除功能之间的动态平衡, 是与人体的生理、病理生长发育及疾病、衰老密切相关的。适当补充外源性抗氧化剂, 可以捕捉自由基以避免其对活细胞的伤害^[2]。目前食品中常添加的抗氧化剂如 BHA、BHT、PG 等由于毒性或致癌作用已被许多国家停用或限用。因此, 寻找和开发高效、无毒、天然、价廉的自由基清除剂具有重要意义。蜂花粉(bee pollen)为蜜蜂所采集雄蕊花药的粉状物质, 含有丰富的氨基酸、不饱和脂肪

酸、黄酮类、维生素等各种营养及活性物质^[3]。据笔者测定, 青海产油菜蜂花粉总黄酮的含量高达 3.8%^[4]。研究证明, 黄酮类化合物具有显著的清除自由基功能, 是一类极具开发前景的天然抗氧化剂^[5]。蜂花粉清除自由基过程中黄酮类起到了重要作用, 表现为清除自由基能力强的花粉往往含有高水平的黄酮类化合物和酚酸衍生物^[6]。蜂花粉种类不同, 则所含成分的种类及含量不同导致其抗氧化活性有很大区别^[7]。本文采用分光光度法研究了青藏高原油菜蜂花粉醇提物对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 和 DPPH $\cdot$ 自由基体系的清除效果, 以期为油菜蜂花粉的深度应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

二苯代苦味酰基自由基(DPPH $\cdot$) Sigma 公司; 芦丁标准品 江西本草天工生物公司; AB-8 大孔吸附树脂 沧州宝恩化工有限公司; 邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、邻二氮菲、七水合硫酸亚铁、抗坏血酸等其它试剂 均为国产分析纯。

CRAY300Bio 紫外可见分光光度计 美国

收稿日期: 2008-04-17 * 通讯联系人

作者简介: 王小艳(1981-), 女, 博士生, 从事天然产物化学和特色药用资源开发利用研究。

基金项目: 中科院院长奖学金资助项目(2006); 中科院“科技支青工程”项目(2006-02)。

Varian 公司;ALC-1104 电子天平 德国 Sartorius 公司;RE52-98 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;HH-4 恒温水浴锅 国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

1.2.1.1 乙醇粗提物 油菜蜂花粉采自青海省海北州门源县,于 45℃ 烘干并粉碎过 40 目筛。称取一定量放入索氏抽提器中,用石油醚回流脱脂 8h,再用 85% 乙醇在 75℃ 下回流提取 3 次,每次 2h,合并提取液,减压浓缩并干燥,得油菜蜂花粉乙醇粗提物粉末,备用^[4]。

1.2.1.2 纯化精制物 按上述方法制得乙醇粗提物后,用蒸馏水溶解并加入到 AB-8 大孔吸附树脂中做静态吸附。先用蒸馏水洗脱杂质,再以 95% 的乙醇静态洗脱,解析液减压浓缩并干燥,得黄褐色纯化精制物粉末,备用^[8]。

1.2.2 样品的定性检测和定量分析

1.2.2.1 定性检测 盐酸-锌粉显色反应。分别称取上述两种醇提物样品适量,用甲醇溶解配制成不同浓度的试样液。分别取试样液 1mL 加入到 a、b 两支试管中,在 a 管中加入少许锌粉而 b 管中不加,再分别向两管中加浓盐酸 4~5 滴,然后在沸水浴中加热 2~3min,观察颜色变化。

1.2.2.2 定量分析 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色反应^[4]。

1.2.3 超氧阴离子自由基体系^[9] 邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化释放出 $\text{O}_2^- \cdot$,生成有色的中间产物,可用分光光度法测定。当加入清除剂时可清除 $\text{O}_2^- \cdot$,阻止产物积累。故可通过测定加入抑制剂前后其吸光值的变化来判断受试物对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除效果。而关于有色中间产物的最大吸收波长,所参考的文献报道不一致^[10,11],为此先对其最大吸收波长进行扫描测定。取于 25℃ 水浴中预热 20min 的 0.05mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5mL,依次加入 1mL 蒸馏水及 0.4mL 25mmol/L 邻苯三酚溶液,立即混匀置 25℃ 水浴中准确反应 5min,然后加入 8mol/L 的 HCl 1.0mL 终止反应。以 Tris-HCl 缓冲液作参比,紫外可见分光光度计扫描,得邻苯三酚自氧化产物的吸收谱图,见图 1。

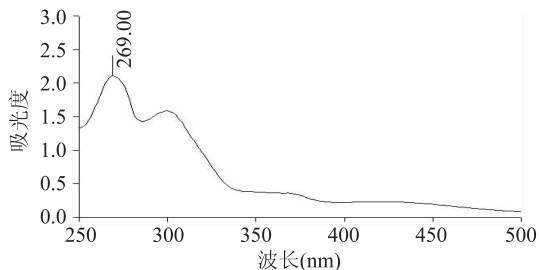


图 1 邻苯三酚自氧化产物的紫外扫描图

由图 1 结果确定超氧阴离子自由基体系的测定波长为 269nm。以 1mL 样品液代替蒸馏水,按上述方法测吸光值。同浓度 V_c 作阳性对照,且每个处理均做三个重复。清除率的计算公式:

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100\%$$

式中, A_1 : Tris-HCl 缓冲液 4.5mL 加蒸馏水 1mL 加邻苯三酚溶液 0.4mL; A_2 : 以 10mmol/L 盐酸代替 A_1 中的邻苯三酚; A_3 : 以试样液代替 A_1 中的蒸馏水; A_4 : 以 10mmol/L 盐酸代替 A_3 中的邻苯三酚。

1.2.4 羟基自由基体系^[1] 通过 Fenton 反应产生的 $\cdot \text{OH}$, 可使邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} , 从而使邻二氮菲- Fe^{2+} 在 536nm 处的最大吸收峰消失, 据此可推知系统中 $\cdot \text{OH}$ 的量的变化。

取 0.75mmol/L 邻二氮菲溶液 1mL 于试管中, 依次加入 0.2mmol/mL (pH = 7.4) 的磷酸盐缓冲液 2mL 和蒸馏水 1mL, 充分混匀后, 加入 0.75mmol/L 硫酸亚铁溶液 1mL, 混匀再加 1mL 0.01% H_2O_2 后在 37℃ 下水浴 60min, 于 536nm 处测吸光度得 A_p 值; 将上述方法中的 H_2O_2 用 1mL 蒸馏水代替, 测吸光度得 A_b 值; 用试样溶液代替 1mL 蒸馏水, 测吸光度得 A_s 值。同时分别对每个样品做本底组, 同浓度 V_c 作阳性对照。以甲醇调零, 测吸光值并按如下公式计算清除率:

$$(\cdot \text{OH}) \text{清除率}(\%) = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100\%$$

1.2.5 DPPH $\cdot$ 体系^[9] 二苯代苦味酰基自由基 (DPPH $\cdot$) 是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 有个单电子, 在 517nm 处有强吸收, 其乙醇水溶液呈紫色。加入受试物后, 若有清除剂存在, 则 DPPH $\cdot$ 的单电子被配对, 使其颜色变浅, 且这种颜色变浅程度与配对电子数成化学计量关系。

取 0.2mL 甲醇, 加入 7.8mL 浓度为 0.0025mg/mL DPPH $\cdot$ 甲醇溶液, 立即混匀, 避光室温放置 30min, 以甲醇调零, 测定在 515nm 处的吸光度, 得 A_0 值; 以不同浓度的试样溶液代替 A_0 中的 0.2mL 甲醇, 测吸光度得 A_1 值; 以甲醇代替 A_1 中的 7.8mL DPPH $\cdot$ 溶液, 测吸光度得 A_2 值。同浓度 V_c 作阳性对照。按下式计算 (DPPH $\cdot$) 的清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 样品的定性、定量结果与分析

盐酸-锌粉反应结果为, 乙醇粗提物和纯化精制物均呈阳性, 且颜色变化规律一致: 反应后 a 管 (样品 + HCl + Zn) 均变为橙红色, 说明试样中含有游离黄酮或黄酮甙, 并且从显色较明显这一点推断, 可能含有 3 位羟基的酮醇类; 反应后 b 管 (样品 + HCl) 也均变为橙红色, 则可能含有花色素, 继续向 b 管中追加碳酸至变成碱性环境, 此时 b 管又变成紫蓝色, 说明试样中含有花色素。由上述特征颜色反应可知, 油菜蜂花粉乙醇粗提物和纯化精制物中均含有黄酮类化合物, 且经定量分析证实, 乙醇粗提物和纯化精制物中的总黄酮含量分别为 47mg/g 和 96mg/g。

2.2 样品对超氧阴离子自由基的清除作用

不同浓度的油菜蜂花粉醇提物溶液及对照物 V_c 对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除能力见图 2。

由图 2 可见, 油菜蜂花粉醇提物与 V_c 对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除效果均随其质量浓度增大而增大。纯化精制物浓度为 0.5mg/mL 时清除率就达到 56.9%, 清除效果

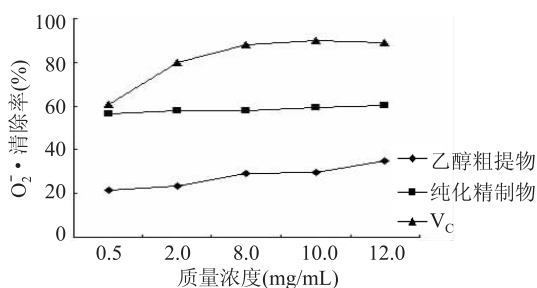


图2 油菜蜂花粉醇提物和V_c对O₂⁻·的清除作用

明显优于乙醇粗提物,但较V_c低。据笔者前期测定,槲皮素为油菜蜂花粉中的主要黄酮苷元。槲皮素的B环上含有二个邻酚羟基,与邻苯三酚的结构具有一定的类似性,因而在碱性条件下由于槲皮素(3,3',4'-)三个位置上的羟基对碱敏感,易发生自氧化作用,且浓度增大其自氧化作用增强,从而清除O₂⁻·的能力就会受到一定的抑制^[12]。这有可能是油菜蜂花粉醇提物的清除效果低于V_c,且浓度增大清除率增幅不大甚至稍有下降的原因之一。

2.3 样品对羟基自由基的清除作用

在所有氧自由基中,·OH是最活泼也是最具危害性的自由基,往往更难消除。由图3可见,油菜蜂花粉醇提物对由Fenton反应所产生的·OH有较强的清除作用,且醇提物和V_c均与浓度呈显著的量效关系。在8~12 mg/mL的浓度范围内,纯化精制物对·OH的清除能力强于同浓度的乙醇粗提物,并且当浓度为11 mg/mL时,纯化精制物的清除率为68.1%,优于V_c。有研究表明,Fenton反应产生·OH的体系中溶液pH为7.4,此时槲皮素较稳定,不发生自氧化作用,表现出较强的·OH清除能力,并且不会出现浓度高时清除能力反而下降的现象^[12]。本实验结果与此结论一致。

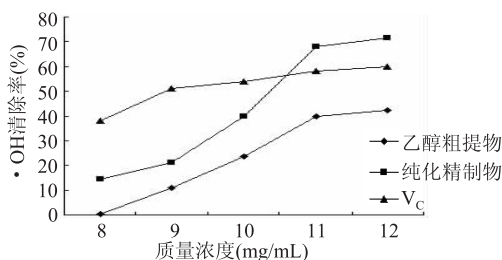


图3 油菜蜂花粉醇提物和V_c对·OH的清除作用

2.4 样品对DPPH·的清除作用

油菜蜂花粉醇提物、V_c溶液对DPPH·的清除率随浓度变化如图4。

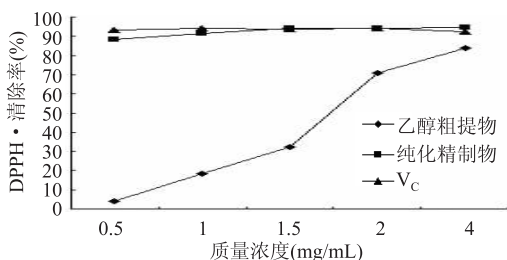


图4 油菜蜂花粉醇提物和V_c对DPPH·的清除作用

由图4可知,纯化精制物在极低浓度时就能显著清除DPPH·,即0.5 mg/mL时清除率为88.3%。

在0.5~4 mg/mL的范围内,纯化精制物与V_c的清除率相当,且随浓度变化不大;乙醇粗提物的清除效果与浓度呈显著的量效关系,但清除能力明显低于同浓度V_c和纯化精制物。有研究表明,若受试物将DPPH·清除,则其对·OH、H₂O₂等也有一定的抑制作用。本实验结果证实了这一规律。

3 结论

青藏高原油菜蜂花粉资源丰富,年产400~600t,从资源量和品质上都占有绝对优势,对此资源的深度开发利用,具有重要的经济意义和社会意义。本研究表明,青藏高原油菜蜂花粉醇提物对O₂⁻·、·OH和DPPH·均具有良好的清除作用,且在这三个自由基体系中,纯化精制物的清除效果显著大于同浓度乙醇粗提物。因此,油菜蜂花粉醇提后的纯化精制物,可作为一种良好的天然自由基清除剂,可直接添加到食品或功能食品中,应用开发前景良好。

有研究表明黄酮类化合物具有较好的抗氧化活性,并且羟基化的程度和羟基的位置是决定其抗氧化活性大小的结构因素。一般,B环中的邻二羟基对黄酮类化合物的抗氧化活性起主要作用,C₃位羟基和C₅位羟基也影响黄酮类化合物的抗氧化能力^[13]。本研究定性实验推断出,油菜蜂花粉醇提物中含有3位羟基的酮醇类、花色素等黄酮类化合物。由此推断,这些化合物与油菜蜂花粉醇提物的良好自由基清除能力有着很大的相关性。

此外,从本实验结果看,阳性对照物V_c对O₂⁻·、·OH的清除作用较油菜蜂花粉醇提物稍强。据文献[14]报道,新鲜的蜂花粉抗氧化活性高,其后随着贮存年头的增加而减少,经过3年以上的活性就会减少到50%。本实验所用材料为自然贮存一年的油菜蜂花粉,其醇提物的自由基清除能力是否比当年采收的蜂花粉有所降低,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京:化学工业出版社,2004. 344.
- [2] 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. 17.
- [3] 毛礼米. 花粉资源的应用及研究进展[J]. 自然科学杂志,1998,20(5):271~275.
- [4] 王小艳,王洪伦,索有瑞. 油菜蜂花粉总黄酮几种提取方法的研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:317~321.
- [5] 周晓丽,邵震,李婷婷,等. 木瓜黄酮的提取及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2007,28(8):170~172.
- [6] Kroyer GA, Hegedus NA. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2001 (2): 171~174.
- [7] 张红城,董捷,等. 六种蜂花粉多酚和黄酮类物质含量测定及抗氧化性的研究[J]. 食品科学,2007,28(9):500~504.
- [8] 王小艳,王洪伦,等. 大孔吸附树脂分离纯化油菜蜂花粉总黄酮的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(2):113~116.

(下转第171页)

2.1.4 葡萄糖添加量的单因素实验 测定结果见表4。

表4 葡萄糖的添加量对大豆蛋白凝胶特性的影响

样品序号	葡萄糖的添加量(%)	凝胶力(g)	时间(s)	距离(mm)	感官
1	0.7	1468.9	3.022	21.577	光滑、弹性较好
2	0.9	1532.6	3.210	22.815	光滑,弹性很好
3	1.1	1653.2	3.424	22.942	光滑,弹性很好
4	1.3	1591.6	3.362	22.573	光滑,弹性很好
5	1.5	1524.5	3.287	22.363	光滑,弹性很好
6	1.7	1452.4	2.960	21.690	光滑,弹性很好
7	1.9	1467.0	2.843	21.585	光滑,弹性软好
8	2.1	1432.8	2.791	20.986	光滑,弹性软好

葡萄糖在肉制品加工中主要作为调味品,同时具有调节 pH 和氧化还原的作用。由表4可见,混和物凝胶强度随葡萄糖添加量增加呈上升趋势,在添加量为1.1%时达到高峰,而后又开始下降,且添加量继续增加时,凝胶硬度、持续时间和压迫距离均呈明显下降趋势,但总体来讲,凝胶块的感官状态与空白样相比差异不大,弹性比空白样都稍好,凝胶强度的各测定值也比较接近。糖成分的添加,增加了体系的粘稠度,更有利于乳化状态的形成与保持^[7],并在蛋白质的表面形成一层保护层,阻碍蛋白质发生聚集,且蛋白质与糖之间不完全是静电交互作用,有可能形成一种刚性的、以氢键连接的蛋白质与糖胶束结构。因此,在分离蛋白应用中添加部分糖,不但起到肉制品调味作用,对凝胶性能也有提高。

综合凝胶指标及感官状态,最适添加量为1.1%。

2.2 四因素正交实验

在单因素结论基础上,对四因素进行正交实验,因素水平表见表5,正交结果见表6。

表5 影响大豆分离蛋白凝胶因素的正交实验表

水平	因素			
	A 食盐 (%)	B 卡拉胶 (%)	C 复合磷酸盐 (%)	D 葡萄糖 (%)
1	0.9	0.08	0.05	0.9
2	1.1	0.10	0.07	1.1
3	1.3	0.12	0.09	1.3

由极差值可知,四个因素对大豆分离蛋白凝胶性能的影响趋势为 A > C > D > B,即食盐对大豆蛋白凝胶硬度影响最显著,其次为复合磷酸盐,再次为葡萄糖,最后是卡拉胶;最佳参数组合为 A₁B₁C₁D₃,即食盐的添加量为0.9%、卡拉胶添加量为0.08%、复合磷酸盐的添加量为0.05%、葡萄糖添加量为1.3%。

3 结论

3.1 单因素实验可知,食盐的最适添加量为1.1%,卡拉胶的最适添加量为0.1%,复合磷酸盐的最适添

(上接第117页)

[9] 徐建国,胡青平. 决明子水提物体外清除自由基活性的研究[J]. 食品科学,2006,27(6):73~76.
[10] 汪河滨,白红进,等. 黑果枸杞色素清除自由基活性的研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(11):8~10.
[11] 徐建国,胡平青. 决明子水提物体外清除自由基活性的研究[J]. 食品科学,2006,27(6):73~76.

表6 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	凝胶力(g)
1	1	1	1	1	1676.4
2	1	2	2	2	1333.5
3	1	3	3	3	1448.9
4	2	1	2	3	1445.0
5	2	2	3	1	1320.2
6	2	3	1	2	1389.0
7	3	1	3	2	1174.4
8	3	2	1	3	1328.7
9	3	3	2	1	1185.4
K ₁	4458.8	4295.8	4394.1	4182.0	
K ₂	4154.2	3982.4	3963.9	3896.9	
K ₃	3688.5	4023.3	3943.5	4222.6	
k ₁	1486.3	1431.9	1464.7	1394.0	
k ₂	1384.7	1327.5	1321.3	1298.9	
k ₃	1229.5	1341.1	1314.5	1407.5	
极差 R	256.8	104.4	150.2	108.6	
优水平	A ₁	B ₁	C ₁	D ₃	

加量为0.07%,葡萄糖的最适添加量为1.1%。
3.2 正交实验结论显示:四种辅料同时添加时工艺比例的最佳搭配如下:食盐0.9%、卡拉胶0.08%、葡萄糖1.3%、复合磷酸盐0.05%。

对于众多的辅料成分,包括大宗辅料大豆蛋白,添加到肉制品的整个体系中时,混合物的稳定性及质构特性在多种分子交互作用下,状态往往是多变的,这就需要付诸更多的实验探索原因,总结规律,为辅料更恰当地运用于产品做出经验的积累。

参考文献:

[1] 石彦国,任莉. 大豆制品工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993. 32.
[2] 薄玉红,崔东善. 用物性测定仪测定大豆分离蛋白的凝胶性[J]. 大豆通报,2001(3):25.
[3] 夏文水. 肉制品加工原理与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 57.
[4] 唐传核,李琳,杨晓泉. 商用大豆分离蛋白可絮凝物的制备及其性能研究[J]. 食品科学,2006,27(6):23~28.
[5] 吴晖,唐传核,李琳,杨晓泉. 盐浓度对商用大豆分离蛋白凝胶的胶凝过程及动态粘弹性的影响[J]. 食品科学,2006,27(7):9.
[6] 刘国琴,李琳,桂林. 卡拉胶对大豆分离蛋白功能特性影响的研究[J]. 郑州工程学院学报,2004,25(3):20~22.
[7] 管建军,裘爱泳,周瑞宝. 糖对大豆分离蛋白及其改性物乳化性能的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(1):74~76.
[12] 俞梅兰,等. 槲皮素自氧化作用影响其超氧阴离子自由基清除能力的研究[J]. 食品工业科技,2006,27(3):75~78.
[13] 张琳,陆维敏. 黄酮类化合物抗氧化性能与其结构的关系[J]. 浙江大学学报(理学版),2006,33(2):187~191.
[14] 池野久美子,柿本佳名子,等. 蜂花粉的抗氧化作用与其它蜂产品的比较[J]. 蜜蜂科学(日本),2004,25(3):113~118.