

山西老陈醋多酚提取物抗氧化活性研究

陈树俊¹, 冯 斌¹, 刘 诚², 苏 静¹, 张海英³, 刘亚斌¹, 吴夏花¹

(1.山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006; 2.北京市食品研究所, 北京 100162;

3.山西省食品工业研究所, 山西 太原 030024)

摘 要: 采用不同体系研究山西老陈醋多酚提取物的体外抗氧化活性, 并与没食子酸和抗坏血酸做比较。结果显示: 老陈醋多酚提取物具有抗氧化功能, 并且存在一定的剂量关系, 但在不同的体外抗氧化体系中活性有所差异。还原能力以及对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力强弱顺序均为老陈醋多酚提取物>没食子酸>抗坏血酸; 清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)能力顺序为老陈醋多酚提取物>抗坏血酸>没食子酸; 清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH 自由基)能力顺序为没食子酸>老陈醋多酚提取物>抗坏血酸; 老陈醋多酚提取物清除亚硝酸盐的能力低于抗坏血酸; 总抗氧化能力(同质量浓度比较时)的顺序为没食子酸>抗坏血酸>老陈醋多酚提取物。

关键词: 山西老陈醋; 多酚; 提取物; 抗氧化性

Antioxidant Activity of Polyphenolic Extract from Shanxi Aged Vinegar

CHEN Shu-jun¹, FENG Bin¹, LIU Cheng², SU Jing¹, ZHANG Hai-ying³, LIU Ya-bin¹, WU Xia-hua¹

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Beijing Food Research Institute,

Beijing 100162, China; 3. Shanxi Food Industrial Research Institute, Taiyuan 030024, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant activity of polyphenolic extract from Shanxi aged vinegar was investigated using different antioxidant evaluation systems and compared with that of gallic acid and vitamin C. The results showed that the polyphenolic extract possessed antioxidant activity in a dosage-dependent manner which varied with the type of model systems. The reducing power and hydroxyl free radical scavenging activity of the samples under investigation were found to decrease in the following order: the polyphenolic extract > gallic acid > vitamin C. The decreasing order of superoxide anion radical scavenging activity among the samples was the polyphenolic extract > vitamin C > gallic acid. The DPPH radical scavenging activity was in the decreasing order of gallic acid > the polyphenolic extract > vitamin C. The nitrite scavenging activity of the extract was poorer than that of vitamin C. The samples decreased in total antioxidant capacity (at the same concentration) in the order of gallic acid > vitamin C > the polyphenolic extract.

Key words: Shanxi aged vinegar; polyphenol; extract; antioxidant activity

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)01-0031-04

山西老陈醋是全国知名的食醋品牌, 是具有悠久历史和独特地方特色的传统精品。几百年来凭“选料上乘、工艺独特、品质优良、营养丰富、色香味俱佳”而位列中国四大名醋之首, 素有“天下第一醋”的盛誉^[1]。山西老陈醋中含有许多对人体有益的活性物质, 多酚是其中重要的一类。酚类物质由于能提供活泼的氢质子故而能有效地清除自由基; 同时还能够与过氧化自由基结合成稳定的化合物; 另外它还可以通过抑制氧化酶和络合金属离子等起到抗氧化作用^[2]。由于体外测定抗氧化活性的方法众多, 且在不同的测定体系中同一抗氧化剂会表现出不同的活性, 所以对于一种抗氧化剂的

活性进行综合性的评价就需要使用多种评价方法^[3]。

目前老陈醋多酚类物质的生理功能研究报道较少。本实验利用多种不同的体外评价体系对山西老陈醋多酚提取物的抗氧化活性进行研究, 以期能为山西老陈醋的抗氧化保健功能研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山西老陈醋 山西老陈醋集团有限公司。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国 Sigma 公司; 总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、羟自由基

收稿日期: 2011-02-19

作者简介: 陈树俊(1964—), 男, 副教授, 学士, 研究方向为食品新工艺与食品安全。E-mail: chenshuj@sohu.com

($\cdot\text{OH}$)试剂盒、抑制与产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)试剂盒 南京建成生物工程有限公司; 没食子酸、抗坏血酸、铁氰化钾、三氯乙酸(TCA)、亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺等试剂均为分析纯。Folin-Ciocalteu 试剂为实验室自制^[4-5]。

1.2 仪器与设备

UV-2800 型紫外分光光度计 美国尤尼柯仪器有限公司; JA1203N 型精密电子天平 上海良平仪器仪表有限公司; HRHS24 Haier 电热恒温水浴锅 青岛海尔医用低温科技有限公司; TDL-5 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂; DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 老陈醋多酚提取物的制备

老陈醋在真空旋转蒸发仪(40℃)中真空浓缩至黏稠。用乙醇作为溶剂, 超声波辅助提取老陈醋多酚类物质。提取条件: 乙醇体积分数为 50%, 提取时间为 15min, 温度为 40℃, 料液比 1:2, 提取一次^[6]。

$$\text{提取率} \% = \frac{\text{提取物中多酚含量}}{\text{样品中多酚含量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 总酚含量的测定

按照参考文献[7]的方法进行测定。

1.3.3 还原能力的测定

把样品配制成一定的质量浓度, 均加 1mL 于 10mL 具塞刻度试管中。加入 2.5mL PBS 缓冲液(0.2mol/L, pH6.6), 1% 铁氰化钾溶液 2.5mL, 混匀, 50℃水浴条件下反应 20min。迅速冷却, 立即加入 10% TCA 溶液 2.5mL 终止反应, 3000r/min 离心 10min, 取上清液 2.5mL, 加 2.5mL 蒸馏水, 0.1% FeCl_3 溶液 0.5mL 混匀, 反应 10min 后于波长 700nm 处测定吸光度^[8]。以抗坏血酸、没食子酸作为对照品。

1.3.4 对亚硝酸盐清除能力的测定

参照参考文献[9]的方法。实验重复 3 次。按式(2)计算待测物对 NO_2^- 的清除率。

$$\text{清除率} \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为不加待测液时反应体系的吸光度; A 为加入待测液时反应体系的吸光度。

测定波长为 540nm; 根据清除率作曲线求出半数清除率质量浓度(IC_{50})。

1.3.5 DPPH 自由基清除活性的测定

参照参考文献[10]的方法。准确的将老陈醋多酚提

取物配成一系列质量浓度溶液, 以没食子酸、抗坏血酸为对照。按式(3)计算清除率。

$$\text{清除率} \% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: A_i 为 2mL DPPH 溶液 + 2mL 待测定样品液的吸光度; A_j 为 2mL 无水乙醇 + 2mL 待测定样品液的吸光度; A_c 为 2mL DPPH 溶液 + 2mL 无水乙醇的吸光度。

测定波长为 517nm, 根据清除率作曲线求出 IC_{50} 。

1.3.6 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性测定

准确的将老陈醋多酚提取物配成一系列质量浓度, 具体操作按照 $\cdot\text{OH}$ 测定试剂盒说明书进行。以没食子酸、抗坏血酸为对照品。

1.3.7 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性测定

准确的将老陈醋多酚提取物配成一系列质量浓度, 具体按照抗 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 试剂盒说明书操作, 并以没食子酸和抗坏血酸为对照品。

1.3.8 总抗氧化能力检测

准确的将老陈醋多酚提取物配成一系列质量浓度, 具体按照总抗氧化能力检测试剂盒说明书操作。计算方法: 在 37℃ 温度条件下, 以每分钟每毫升样品液使反应体系 OD 值每增加 0.01 时为一个抗氧化能力单位, 按式(4)计算总抗氧化能力(T-AOC)。

$$\text{T-AOC}/(\text{单位}/\text{mL}) = (\text{OD}_{\text{测定管}} - \text{OD}_{\text{对照管}}) \times \text{反应液用量}/\text{mL} \times \text{样品测定前稀释倍数} \div 0.01 \div 30 \div \text{取样体积}/\text{mL} \quad (4)$$

1.3.9 数据处理

所有实验均重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 老陈醋中多酚物质的提取结果

按照本实验室建立的最佳提取工艺, 对 1 年陈酿手工老陈醋中的多酚物质进行提取, 提取率为 96.13%, 多酚含量 2.6mg/mL。

2.2 还原能力的测定结果

物质的还原能力是评价其潜在抗氧化活力的重要指标。还原力强弱与抗氧化能力大小呈正比。还原能力强的样品是良好的电子和氢的供体, 可以通过提供电子使自由基变为稳定的物质, 终止自由基的链式反应; 同时, 可与过氧化物的前体物质相作用, 阻止过氧化物的产生, 从而起到抗氧化的作用^[11-12]。反应体系中样品将 Fe^{3+} (铁氰化钾)还原为 Fe^{2+} (亚铁氰化钾), 然后再与 Fe^{3+} 生成普鲁士蓝, 在波长 700nm 处的吸光度越高, 表示还原力越强。

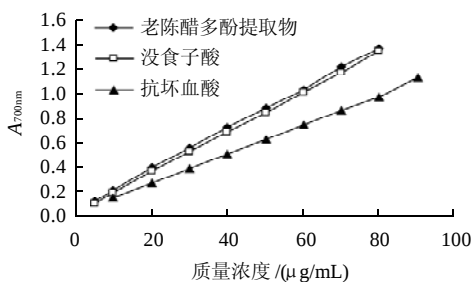


图1 老陈醋多酚提取物、没食子酸及抗坏血酸还原能力
Fig.1 Reducing power of the polyphenolic extract, gallic acid and vitamin C

从图1可见, 所测样品的还原能力均随着质量浓度的增加而增强, 并呈现出显著的量效关系, 老陈醋多酚提取物、没食子酸、抗坏血酸质量浓度与还原力的线性方程分别为 $y = 0.0166x + 0.0501$ ($R^2 = 0.9995$)、 $y = 0.0165x + 0.0236$ ($R^2 = 0.9996$)、 $y = 0.0121x + 0.0261$ ($R^2 = 0.9992$)。表明供试样品都具有显著的还原能力。从 EC_{50} (吸光度 0.5 时样品的质量浓度) 的结果可以看出, 提取物的还原力是最强的。还原能力从强到弱的顺序是老陈醋多酚提取物 ($EC_{50} = 27.10 \mu\text{g/mL}$) > 没食子酸 ($EC_{50} = 28.87 \mu\text{g/mL}$) > 抗坏血酸 ($EC_{50} = 39.16 \mu\text{g/mL}$)。

2.3 对亚硝酸盐清除能力的测定结果

弱酸性条件下, NO_2^- 与对氨基苯磺酸发生重氮化反应, 生成的重氮盐与 N -1-萘基乙二胺盐酸盐偶合生成紫红色络合物, 可用分光光度法测定其在波长 540nm 处的吸光度。亚硝酸盐浓度与吸光度成良好的线性关系^[13]。

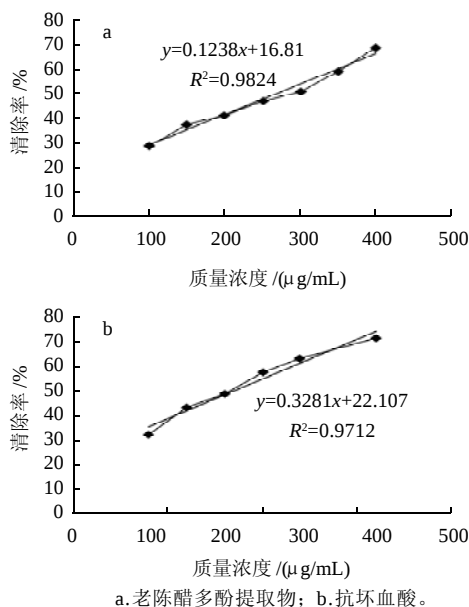


图2 老陈醋多酚提取物及抗坏血酸对亚硝酸盐的清除能力
Fig.2 Nitrite scavenging capacity of the polyphenolic extract and vitamin C

从图2可见, 所测样品清除亚硝酸盐的能力与样品质量浓度呈现显著的量效关系。清除亚硝酸盐的能力抗坏血酸 ($IC_{50} = 85.01 \mu\text{g/mL}$) > 老陈醋多酚提取物 ($IC_{50} = 269.72 \mu\text{g/mL}$)。

2.4 DPPH 自由基清除活性的测定结果

DPPH 自由基是一种很稳定的自由基, 在乙醇溶液中呈深紫色, 在波长 517nm 处有最大吸收峰; 当有自由基清除剂存在时, 其颜色减退, 褪色程度与清除剂的清除能力及浓度相关^[14]。

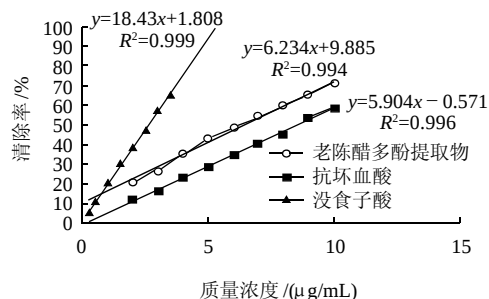
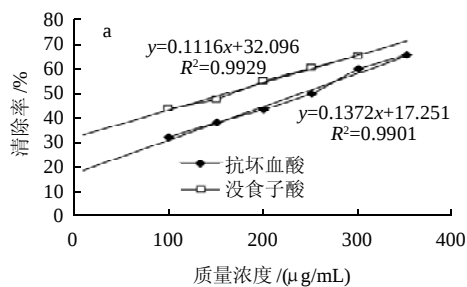


图3 老陈醋多酚提取物、没食子酸及抗坏血酸对 DPPH 自由基清除活性
Fig.3 DPPH radical scavenging capacity of the polyphenolic extract, gallic acid and vitamin C

由图3可见, 不同质量浓度的老陈醋多酚提取物、没食子酸、抗坏血酸对 DPPH 自由基均有清除能力, 且清除率与剂量相关。对 DPPH 自由基清除活性的高低顺序为: 没食子酸 ($IC_{50} = 2.61 \mu\text{g/mL}$) > 老陈醋多酚提取物 ($IC_{50} = 6.43 \mu\text{g/mL}$) > 抗坏血酸 ($IC_{50} = 8.57 \mu\text{g/mL}$)。

2.5 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性测定结果

$\cdot\text{OH}$ 带有一个不成对电子, 性质极活泼, 其反应性和毒性都很强, 对生物体的损害最大。它可和活细胞中的任何分子发生反应而造成损伤, 而且反应速度极快。



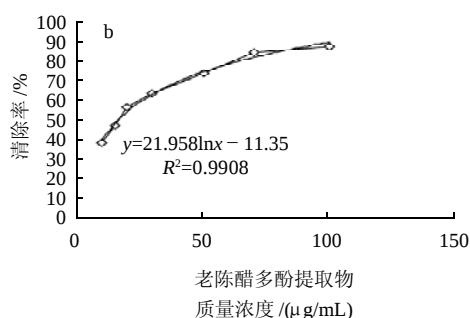


图4 老陈醋多酚提取物、没食子酸及抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging capacity of the polyphenolic extract, gallic acid and vitamin C

由图4可见,老陈醋多酚提取物、没食子酸、抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率与剂量相关。对 $\cdot\text{OH}$ 清除活性的顺序为:老陈醋多酚提取物($\text{IC}_{50} = 16.28 \mu\text{g/mL}$)>没食子酸($\text{IC}_{50} = 160.43 \mu\text{g/mL}$)>抗坏血酸($\text{IC}_{50} = 238.70 \mu\text{g/mL}$)。

2.6 清除 O_2^- ·活性测定结果

O_2^- ·可以转化为其他氧自由基。因此,对 O_2^- ·的抑制可以有效地减少氧自由基的生成,具有非常重要的意义。

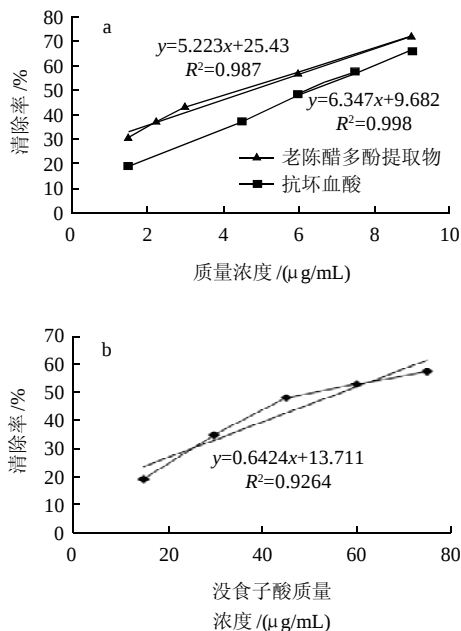


图5 老陈醋多酚提取物、没食子酸及抗坏血酸清除 O_2^- ·的能力

Fig.5 Superoxide anion radical scavenging capacity of the polyphenolic extract, gallic acid and vitamin C

从图5可见,3种物质对 O_2^- ·均表现出较强的清除效果,且随着质量浓度的增加,清除率也逐渐增强。对 O_2^- ·清除活性的高低顺序为:老陈醋多酚提取物($\text{IC}_{50} =$

$4.70 \mu\text{g/mL}$)>抗坏血酸($\text{IC}_{50} = 6.35 \mu\text{g/mL}$)>没食子酸($\text{IC}_{50} = 56.49 \mu\text{g/mL}$)。

2.7 总抗氧化能力测定结果

按照南京建成试剂盒方法对样品的总抗氧化能力进行测定。没食子酸及抗坏血酸质量浓度均为 1mg/mL ,老陈醋多酚提取物中多酚质量浓度为 1mg/mL 。

表1 老陈醋多酚提取物、没食子酸及抗坏血酸的总抗氧化能力
Table 1 Total antioxidant capacity of the polyphenolic extract, gallic acid and vitamin C

样品	老陈醋多酚提取物	没食子酸	抗坏血酸
T-AOC/(单位/mL)	167.11 ± 0.031	976.16 ± 0.024	347.17 ± 0.0921

由表1可见,质量浓度相同的各样品的总抗氧化能力各不相同,总抗氧化能力高低顺序为:没食子酸>抗坏血酸>老陈醋多酚提取物。

3 结论

老陈醋多酚提取物的还原能力以及对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- ·的清除活性均低于没食子酸和抗坏血酸;对DPPH自由基清除活性低于没食子酸,强于抗坏血酸。清除亚硝酸盐的能力低于抗坏血酸;总抗氧化能力低于抗坏血酸和没食子酸。结果表明,老陈醋多酚有较强的体外抗氧化活性,老陈醋的保健价值值得进一步研究和扩展。

参考文献:

- [1] 沙文革. 创新是传统产业发 展的命脉[J]. 山西食品工业, 2005(1): 35-36.
- [2] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 124.
- [3] 翁新楚, 吴侯. 抗氧化剂的抗氧化活性的测定方法及其评价[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 119-122.
- [4] 李静, 聂继云, 李海飞, 等. Folin-酚法测定水果及其制品中总多酚含量的条件[J]. 果树学报, 2008, 25(1): 126-131.
- [5] 曹伟, 索志荣. Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂蜜中总酚酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2003(12): 80-83.
- [6] 苏静, 陈树俊, 马海英, 等. 山西老陈醋多酚类物质提取工艺的研究[J]. 农产品加工: 创新版, 2010(5): 32-35.
- [7] 陈树俊, 苏静, 刘诚, 等. 老陈醋生产过程中总多酚、总黄酮含量及清除 DPPH 自由基能力的分析[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 158-162.
- [8] OYAZU M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [9] 赵二芳, 梁泽, 张海容. 沙棘叶对亚硝酸盐清除能力的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 81-82.
- [10] 徐清萍, 敖宗华, 陶文沂. 恒顺香醋 DPPH 自由基清除活性成分研究[J]. 中国调味品, 2004(7): 19-23.
- [11] GORDON M F. Food antioxidant[M]. London: Elsevier Applied Science, 1990: 1-18.
- [12] MEIR S, KANNER J, AKIR B, et al. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 1813-1815.
- [13] 李炳焕, 杨怡, 郭佳. 大蒜对亚硝酸盐消除作用的实验研究[J]. 微量元素与健康研究, 2007(5): 27-28.
- [14] ARUOMA OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants[J]. Food Chemistry Toxicology, 1994, 32(7): 671-683.