

文章编号:1673-1689(2005)04-0076-05

食醋醇沉上清液的生物活性

徐清萍, 陶文沂*, 敖宗华

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对食醋的体外抗氧化活性进行了研究. 浓缩食醋在用乙酸乙酯萃取后加入乙醇, 收集乙醇沉淀上清液, 用 Sephadex G25 将其分成不同相对分子质量组分. 测定不同分离组分对二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)的清除活性、还原力、酚质量分数、对羟自由基和超氧阴离子自由基的抑制活性. 结果表明: 食醋提取物(醇沉上清液)在所有的测试体系中都表现出抗氧化性. 在食醋提取物及各分离组分中, 总酚质量分数较高的组分具有较强的 DPPH 自由基清除活性和还原力. 在羟自由基体系和超氧阴离子自由基体系中的抗氧化活性与酚质量分数相关性较小. 这些结果表明食醋中含有有益于人体健康的抗氧化活性成分.

关键词: 抗氧化活性; 食醋; 还原力; DPPH; 羟自由基; 超氧阴离子自由基

中图分类号: TS 264. 22

文献标识码: A

Bioactivity of Ethanol Supernate of Vinegar

XU Qing-ping, TAO Wen-yi*, AO Zong-hua

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The antioxidant activities of extracts from brewed vinegar were evaluated using different in vitro tests. Adding ethanol after extracting the concentrated vinegar with acetacetic ester, then the ethanol supernate of vinegar (HVE) was collected. The HVE was separated into different fractions according to molecular weight by Sephadex G25. The DPPH radical scavenging activities, the reducing powers, the amount of total phenolic compounds, the inhibitory effect on hydroxyl radical and superoxide anion radical of the vinegar extract (HVE), and individual vinegar fractions were evaluated in this study. The HVE was found to have antioxidant activities in all the model systems tested. The result showed that the fractions with higher amounts of phenolic compounds have stronger DPPH radical scavenging activities and reducing powers. Antioxidant activities in hydroxyl radical and superoxide anion radical system were not correlated with phenolic content. The present results support the concept that brewed vinegar contains several kinds of antioxidants with healthy promotion activities in potential.

Key words: antioxidant activity; vinegar; reducing power; DPPH; hydroxyl radical; superoxide anion radical

食醋在我国历史悠久, 用于医疗已有 2000 多年. 酿造醋含有丰富的营养成分, 并且具有多种生

理调节作用(如抗疲劳, 调节血糖、血压, 助消化, 刺激食欲, 促进钙的吸收), 这种作用逐步引起了人们

收稿日期: 2004-09-13; 修回日期: 2004-10-20.

作者简介: 徐清萍(1975-), 女, 山西太原人, 发酵工程博士研究生. * 通讯作者.

广泛的重视^[1,2]。恒顺香醋以糯米为原料,经过醋酸固态深层发酵而成,是我国传统酿造食醋之一。

许多研究认为食用抗氧化性成分有益健康,但到目前为止,有关食醋的抗氧化活性的研究还很少。Shoko Nishidai 等发现日本黑醋(Kurosu)的乙酸乙酯提取物在亚油酸自氧化体系和 DPPH 自由基体系中具有抗氧化性,Yumi Shimoji 等从中分离出其具有抗氧化成分为二氢阿魏酸和二氢芥子酸。从 DPPH 自由基清除体系对食醋各极性部位的抗氧化研究中发现:我国酿造的食醋的抗氧化活性不同于日本黑醋,食醋乙酸乙酯萃取物的自由基清除活性相对较低,乙醇沉淀上清液 DPPH 自由基清除活性较强^[3]。作者研究了食醋(镇江恒顺香醋厂提供的醋样)醇沉上清液的抗氧化性和它各分离组分对 DPPH 自由基的清除活性,并评价了其各分离组分的还原性、酚含量和对羟自由基、超氧阴离子自由基的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

食醋:镇江恒顺香醋厂提供;Sephadex G25、二苯代苦味酰肼自由基(DPPH,纯度90%),购自Sigma公司;其它化学试剂均为市售分析纯。

1.2 实验仪器

旋转蒸发器:上海申玻仪器公司制造;721型分光光度计:上海湖光仪器有限公司制造;玻璃层析柱:1.6 cm×100 cm;HD-3紫外检测器:上海沪西分析仪器厂制造;XWT-S小型台式记录仪:上海自动化仪表三厂制造。

1.3 实验方法

1.3.1 食醋提取物及各分离组分的制备

1) 食醋提取物(HVE):醋样浓缩,用乙酸乙酯萃取后于乙酸乙酯萃取物中加入乙醇,收集乙醇沉淀上清液,真空浓缩,依次用无水丙酮和无水乙醇处理后,50℃真空干燥。

2) 食醋提取物不同相对分子质量组分的制备:称2g HVE溶于20 mL蒸馏水。取4 mL上Sephadex G25,蒸馏水洗脱,体积流量1 mL/min,280 nm波长下检测。XWT-S小型台式记录仪记录,走纸速度30 mm/h,量程100 mV。按照洗脱次序依次收集HF1、HF2、HF3和HF4,见图1。将收集的4个洗脱组分进行真空浓缩和真空干燥。

1.3.2 样品总酚质量分数的测定 取200 μL样品,依次加入1.0 mL Folin-Ciocalteu试剂(稀释10倍),1.0 mL 7.5% Na₂CO₃溶液,蒸馏水定容至5

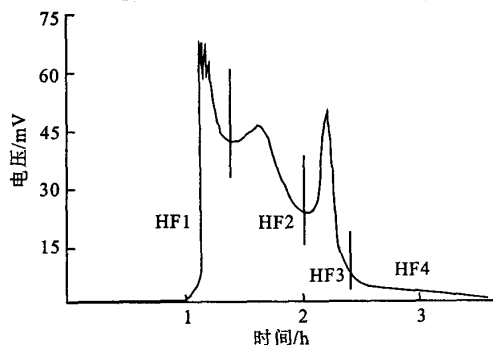


图1 食醋提取物凝胶过滤洗脱图

Fig. 1 Gel filtration chromatogram of vinegar

mL,室温下静置30 min,0.5 cm光径比色杯于765 nm比色测定,试剂空白作为参比。总酚质量分数以没食子酸等价物(μg)表示,根据没食子酸标准曲线线性方程 $A=0.0077C+0.0105$, $R^2=0.9994$ 来计算总酚质量分数。其中A为吸光度,C为没食子酸等价物(μg)^[4]。

1.3.3 食醋提取物及其各分离组分还原力的测定

不同浓度提取物0.4 mL,与1 mL磷酸缓冲液(PBS)(0.2 mol/L,pH 6.6),1 mL 1% K₃Fe(CN)₆混合,将混合物于50℃保温30 min,然后在混合物中加入1 mL 10%三氯乙酸。最后取上清液1 mL与1 mL蒸馏水和0.2 mL三氯化铁(0.1%)混合,测定700 nm处吸光度。反应混合液的吸光度越高则还原性越高^[5]。

1.3.4 食醋提取物及其各分离组分DPPH自由基清除活性 配制0.2 mmol/L DPPH乙醇溶液。取待测样1 mL(以100 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl缓冲液溶解)及等体积0.2 mmol/L DPPH溶液加入同一具塞试管中,摇匀,室温下于暗处放置30 min后,用无水乙醇作参比测定其吸光度A_i。同时测定0.2 mmol/L DPPH溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度A_c,以及待测液与等体积100 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)混合液的吸光度A_j^[6]。计算清除率:

$$\text{DPPH清除率}\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

其中:A_c为未加待测样时DPPH溶液的吸光度;A_i为加待测样时DPPH溶液的吸光度;A_j为待测样在测定波长吸光度;测定波长为517 nm。

1.3.5 食醋各分离组分对羟自由基抑制活性的测定 羟自由基抑制活性的测定参照Klein等人的方法^[7,8]。取不同浓度提取物各0.6 mL,加入0.8 mL Fe-EDTA溶液(0.021%硫酸亚铁铵,0.037% EDTA),0.4 mL EDTA(0.022%),0.8 mL二甲亚砜(DMSO)(0.88 mL溶于100 mL 0.1 mol/L的

PBS, pH 7.4), 混合。加入 0.4 mL 0.264% 抗坏血酸诱发反应, 盖紧试管, 于 80~90 °C 水浴加热 15 min, 加入 1 mL 冰三氯乙酸 TCA (17.5 g/dL) 终止反应。在所有的试管中加入 3 mL Nash 试剂 (75.0 g 醋酸铵, 3 mL 冰醋酸, 2 mL 乙酰丙酮混合, 用蒸馏水稀释至 1 L), 置室温下 15 min 后显色, 以试剂空白为对照测定 412 nm 处吸光度。羟自由基抑制率的计算公式为:

$$\text{羟自由基抑制率}\% = [1 - (A_1 - A_{1(t=0)}) / (A_0 - A_{0(t=0)})] \times 100\%$$

其中 A_1 为样品吸光度, $A_{1(t=0)}$ 为样品在反应时间 $t=0$ 的吸光度; A_0 为空白吸光度, $A_{0(t=0)}$ 为空白在反应时间 $t=0$ 时的吸光度。

1.3.6 食醋各分离组分对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率的测定 每支试管加入 3 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2), 0.5 mL 不同浓度提取物, (25±0.5) °C 水浴平衡 20 min 后, 加入 0.3 mL 7 mmol/L 邻苯三酚, 反应 4 min 后, 各加入 100 μ L 10 mol/L 盐酸终止反应, 420 nm 测吸光度 A , 计算抑制率^[9]。

$$\text{超氧阴离子自由基抑制率}\% = [1 - (A_2 - A_0) / A_1] \times 100\%$$

A_1 表示对照组的吸光度, A_2 表示加提取物组的吸光度, A_0 表示加提取物组在 $t=0$ 时刻的吸光度。

1.3.7 数据处理 数据均以 $\bar{x}(n=3) \pm s$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 总酚质量分数

食醋提取物及各分离组分所占比例及总酚质量分数见表 1。

表 1 食醋提取物及各分离组分总酚质量分数

Tab.1 Amount of total phenolic compounds in vinegar extract and individual vinegar fractions

样品	质量分数/%	总酚质量分数 / (μ g/mg)
HVE	100	53.7
HF1	11.26	70.3
HF2	39.35	52.4
HF3	15.61	39.5
HF4	0.92	118.3
损失	32.86	—

由表 1 可见, 中等相对分子质量组分 HF2 和 HF3 所占比例远高于高相对分子质量组分 HF1, 低相对分子质量组分 HF4 所占比例最低。HVE、HF1、HF2、HF3、HF4 的总酚质量分数分别相当于

万方数据

含没食子酸 53.7, 70.3, 52.4, 39.5, 118.3 μ g/mg。低相对分子质量组分 HF4 的总酚质量分数远高于食醋的其它分离组分, 其次为高相对分子质量组分 HF1。

2.2 还原力

食用抗氧化剂抗氧化效率测定的方法主要基于不同抗氧化防御体系机理, 即活性氧和羟自由基的清除、过氧化脂质自由基的减少、脂质过氧化的抑制、金属离子的螯合。在大多数情况, 抗氧化作用与氧化链反应的阶段无关, 大多数非酶抗氧化作用 (自由基的清除, 脂质过氧化的抑制等) 受氧化还原反应的调节。作者研究了不同食醋组分对铁离子的还原力。在食醋提取物中具有最高还原力的为 HVE、HF4 和 HF2, 其次为 HF1 和 HF3, 见图 2。

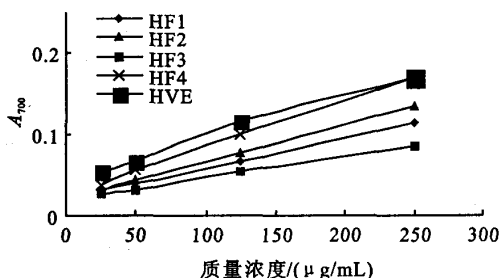


图 2 食醋提取物及其各分离组分还原力

Fig.2 Reducing powers of vinegar extract and individual vinegar fractions

作者以抗坏血酸和没食子酸为参比测定了各分离组分的还原力。测定的食醋提取物 (HVE)、食醋提取物各分离组分 (HF1~HF4)、抗坏血酸和没食子酸质量浓度均为 250 μ g/mL, 取样量均为 0.4 mL; 以不加任何提取物时测定值为空白, 反应液吸光度值越高表示还原力越高, 结果见表 2。食醋各分离组分的还原力远低于抗坏血酸和没食子酸。还原力较高组分 HF4 和 HF2 的还原力仅约为抗坏血酸的 15%, 没食子酸的 12%。

表 2 抗坏血酸, 没食子酸和食醋提取物还原力的比较

Tab.2 Comparison of reducing powers of ascorbic acid, gallic acid and vinegar extracts

样品	A_{700}
空白	0.014
抗坏血酸	1.187
没食子酸	1.358
HVE	0.170
HF1	0.113
HF2	0.134
HF3	0.084
HF4	0.170

2.3 DPPH 自由基清除活性

DPPH 自由基是一种稳定的自由基,在可见光区 517 nm 有最大吸收峰(紫色),抗氧化剂与 DPPH 反应,DPPH 溶液变色的程度反应了抗氧化提取物的清除能力,这一反应已被广泛用于测试化合物自由基清除能力和评价食品、植物提取物的抗氧化活性。选用抗坏血酸和没食子酸作阳性对照,食醋提取物和所分离的 4 个组分对 DPPH 自由基的清除活性见图 3。可见各测试样品对 DPPH 自由基的清除率和剂量相关。HF4 对 DPPH 自由基具有最高清除活性,其次为 HF1 和 HF2, HF3 对 DPPH 自由基的清除活性最低。相应地, HF4 的酚质量分数也是最高的,依次为 HVE 和 HF1, HF2、HF3 的酚质量分数最低。基于上述现象,推测总酚质量分数和 DPPH 自由基清除活性之间存在相关性。

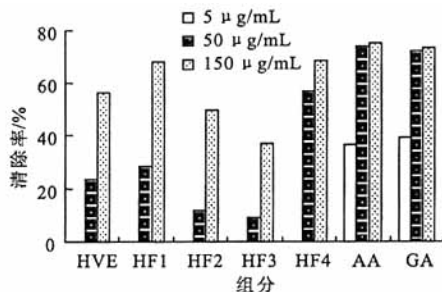


图3 食醋提取物及各分离组分 DPPH 自由基清除活性

Fig. 3 Percent DPPH scavenging activities of vinegar extract and individual vinegar fractions

2.4 对羟自由基抑制活性

羟自由基是一种强氧化剂,对生物体系有很强的毒性。这种自由基能和 DNA 中的核苷交联,引起 DNA 断链,引发癌变、突变和细胞毒性。另外,羟自由基是脂质过氧化过程的快速引发剂。作者采用抗坏血酸-Fe-EDTA 产生羟自由基体系来评价样品对羟自由基的抑制活性。通过 DMSO 氧化反应生成羟自由基法,同时产物中产生甲醛,这样就可通过用 Nash 试剂处理法来方便地检测羟自由基。食醋提取物及其各分离组分对羟自由基的清除活性见图 4。HVE 及其 4 个分离组分对羟自由基的抑制率与剂量相关。在质量浓度为 100 µg/mL 时, HF1、HF2、HF3 和 HF4 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 47.85%, 57.95%, 53.52%, 55.08%。

2.5 对超氧阴离子自由基的清除活性

这一方法是基于邻苯三酚自氧化(420 nm)产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的方法。HVE 及其 4 个分离组分对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制活性见图 5。HVE、HF1、HF2 和 HF3 对

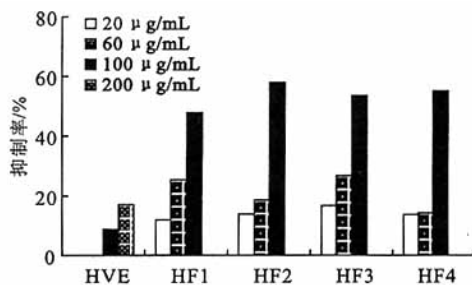


图4 食醋提取物及各分离组分对羟自由基的抑制活性

Fig. 4 Inhibition of $\cdot\text{OH}$ of vinegar extract and individual vinegar fractions

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制活性与剂量相关。与 DPPH 自由基清除活性和 $\cdot\text{OH}$ 抑制活性不同的是, HF4 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 没有抑制活性,而是有促进其产生的作用。邻苯三酚自氧化反应机理复杂,并不适用于所有物质的抗氧化性测定。据报道 Cu(II)、Fe(III) 和 Mn(II、III) 的 SOD 模型化合物与多酚氧化酶活性部位结构相似,具有多酚氧化酶活性,使促进邻苯三酚氧化的作用超过抑制作用^[10],因此推测 HF4 中含有一些不适用于邻苯三酚自氧化法检测清除超氧阴离子自由基活性的抗氧化性成分。

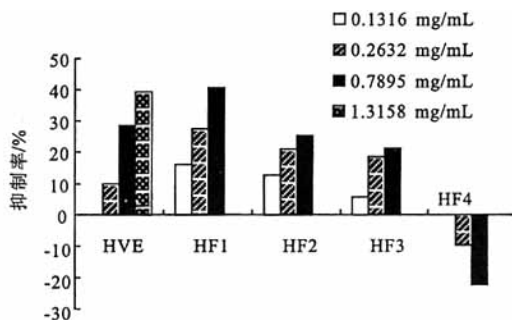


图5 食醋提取物及各分离组分对超氧阴离子自由基的抑制活性

Fig. 5 Inhibition of $\text{O}_2^{\cdot-}$ of vinegar extract and individual vinegar fractions

酿造醋中的抗氧化性成分主要有两个来源:一是来源于原料,如原料中含有酚酸类化合物(阿魏酸,香草酸,多酚等),氨基酸(Met、His、Tyr 等)等具有抗氧化性的成分,二是来源于生产加工过程,食醋中的各种成分在酿造过程中经历了复杂的生化反应过程。如美拉德反应就是一种在胺类(通常来源于蛋白和羰基化合物)和糖类化合物(尤其是葡萄糖,果糖,麦芽糖,乳糖)之间发生的一种复杂的反应过程,这一反应产生了一系列产物,包括还原性化合物。

3 结 论

食醋在体外抗氧化体系——DPPH 自由基体系、还原力、酚质量分数、羟自由基和超氧阴离子自由基体系中的抗氧化性研究表明:食醋(酿造醋)提取物在这些体系中均具有抗氧化性。食醋 DPPH 自由基清除活性、还原力与酚质量分数相关,羟自由

基清除活性和超氧阴离子自由基清除活性与酚质量分数相关性较小。将食醋提取物(醇沉上清液)用 Sephadex G25 分离成 4 个不同相对分子质量组分,除低相对分子质量组分 HF4 外,各分离组分在所选定的抗氧化体系中均具有抗氧化活性。HF4 对超氧阴离子自由基有促进作用,推测其中含有不适用于该方法检测的化合物,具体原因尚待研究。

参考文献:

- [1] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 食醋功能研究进展(上)[J]. 中国调味品,2003,298(12):11—12,42.
- [2] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 食醋功能研究进展(下)[J]. 中国调味品,2004,299(1):19—23.
- [3] 徐清萍,敖宗华,陶文沂. 恒顺香醋 DPPH 自由基清除活性[J]. 中国调味品,2004,305(7):19—23.
- [4] Ock-sook Yi, Anne S. Neyer, *et al.* Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system[J]. *JAACS*, 1997, 74(10):1301—1307.
- [5] Francisco J. Morales, Salvio Jiménez-Pérez. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence[J]. *Food Chemistry*, 2001, 72(1):119—125.
- [6] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, *et al.* In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(6):2143—2150.
- [7] Shelley M Klein, Gerald Cohen, Arthur I Cederbaum. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(21):6006—6012.
- [8] Singh R P, Chidambara K N Murthy, Jayaprakasha G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(1):81—86.
- [9] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *Eur J Biochem*, 1974, 47(1):469—474.
- [10] 廖展如, 陈文学, 艾常春, 等. 邻苯三酚自氧化法适于测定 SOD 活性吗? [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2003, 37(1):59—64.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 75 页)

参考文献:

- [1] 白秀英,李平风. 甲状旁腺素, IGF-1 可加速成骨样细胞 ROS17/2.8 增殖周期的进程[J]. 细胞生物学杂志. 1999, 21(2):75—78.
- [2] 许光武,俞茂华,叶红英. 小剂量牛初乳短链胰岛素样生长因子-1 可改善糖尿病大鼠周围神经病变[J]. 中华内分泌代谢杂志. 2000, 16(4):231—234.
- [3] B A M, Shooter G K. Insulin-like growth factor 1 and its binding proteins: a study of the binding interface using b-domain analogues[J]. *Biochemistry*, 1999, 38, 15863—15870.
- [4] Pfeifle B, Maier V, Ditschuneit H. Insulin-like growth factor 1/somatomedin-C: a rapid isolation procedure with FPLC [J]. *Preparative Biochemistry*, 1985, 15(5), 291—307.
- [5] Bang P, Ahlsen M, Berg U, *et al.* Carlsson-Skwirut C. Free insulin-like growth factor-1: Are we hunting a ghost[J]. *Horm Res*, 2001, 55:84—93.

(责任编辑:杨萌)