

采用荧光化学发光法研究甜菜红色素的抗氧化作用

吕晓玲 孔德莉 姚秀玲 张佳宜

(天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津,300457)

摘要 用精制后生产出的甜菜红色素粉末进行抗氧化性研究,用荧光化学发光法测定了色素对活性氧自由基(ROS)的清除作用。实验中,采用 Vc 作对照,结果表明,甜菜红色素能显著清除机体外产生的超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2),并呈量效关系。

关键词 荧光化学发光法,甜菜红色素,抗氧化

自由基是生物体生命活动过程中由其机体生物化学反应所产生的中间产物,由各种氧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]。随着自由基研究的不断深入,人们认识到,超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)等自由基与衰老、癌症、心脑血管疾病和炎症的发生与发展密切相关。因此人们开始对具有清除自由基作用的保健食品越来越重视。

甜菜红色素(red beet pigment)是世界上广泛使用的一种食用天然色素,它是从红甜菜(*Beta vulgaris* L var rab)块茎中提取的水溶性色素。红甜菜价格便宜,含色素多(每 100g 鲜组织含甜菜苷约 0.1~0.5g)^[2]。Joseph Kanner 等人用脂质过氧化反应验证了甜菜红色素具有很强的抗氧化功效。Joseph Kanner 在实验中发现了一类新型食用阳离子抗氧化剂——甜菜红碱。红甜菜中甜菜红碱的主要成分为甜菜苷,它是甜菜红素的 5-O- β -葡萄糖苷,包含一个酚基和环胺基团^[3,4]。经证实甜菜苷是很好的电子供体,可以作为抗氧化剂使用^[5]。国内对甜菜红色素抗氧化性的报道较少,王威的研究显示甜菜红色素的抗氧化性非常低^[6],分析其原因可能与实验中使用色素的甜菜苷含量过低有关。

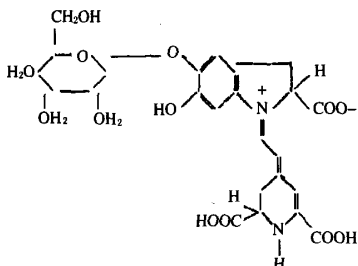


图1 甜菜苷

第一作者:硕士,教授。

收稿日期:2006-05-17,改回日期:2006-09-06

目前国外进行甜菜红色素抗氧化实验所用体系基本上采用可见分光光度法进行测定,但色素的颜色可能对结果产生一定的干扰,而且工业化生产工艺是否影响产品的抗氧化活性也有待探讨。本文采用荧光化学发光法进一步研究了工业化生产的甜菜红色素产品对活性氧自由基的清除作用,为该产品的深度研究与开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

红甜菜,市场购买;鲁米诺(luminol)(美国 ACROS ORGANIC 公司),邻苯三酚,抗坏血酸,过氧化氢,硫酸铜均为国产分析纯试剂;其余均为实验室常用试剂。

1.2 主要仪器与设备

Beckman Avanti J-25 离心机(德国 Beckman 公司),RE52-1 旋转蒸发器(上海沪西分析仪器厂),UV-9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),H.H.S11-B 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂),FA2004 分析天平(上海精科天平公司),SK-1 快速混匀器(金坛市荣华仪器制造有限公司),荧光化学发光仪(美国 Thermo labsystems 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 甜菜红色素生产工艺流程

红甜菜→清洗→蒸煮→榨汁→过滤→精制→真空浓缩→喷雾干燥→成品→色价测定→备用

此实验使用的色素产品色价为 33.7(样品浓度:1%,测定波长:535 nm)

1.3.2 $O_2^{\cdot-}$ 的产生及清除^[7]

用化学发光法测定产品对碱性连苯三酚体系(非酶体系)产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用。具体方法:在反应池中加入 5 mmol/L 的鲁米诺溶液 800 μL (用 pH=10.16,0.1 mmol/L 的 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液配

制),加入不同浓度的供试液 100 μL,混匀后,加入 6 mmol/L 的连苯三酚溶液 100 μL(用 10 mmol/L 的 HCl 配制),迅速置于发光仪测定室中,启动反应,测定 10 s 内发光强度 CP_1 ,用去离子水做空白对照,测其 CP_0 ,计算样品液对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率(%)。

$$\text{清除率}/\% = (CP_0 - CP_1)/CP_1 \times 100$$

1.3.3 ·OH 的产生及清除

1.3.3.1 鲁米诺化学发光法^[8]

·OH 是由 Fenton 型反应产生:向反应池中依次加入 2 mmol/L 的新配制的抗坏血酸 200 μL,2 mmol/L 的 CuSO₄ 400 μL,10⁻² mol/L 的鲁米诺溶液 50 μL,pH 7.8 的 PBS 缓冲液 600 μL 以及 100 μL 供试液,用 68 mmol/L 的 H₂O₂ 的磷酸缓冲液 600 μL 启动反应,同时记录每 6 s 发光强度的积分,至出现峰值(CP_1)。用去离子水做空白对照,测其 CP_0 ,计算羟自由基清除率(%)的方法同 1.3.2。

1.3.3.2 苯甲酸荧光分析法^[9,10]

取含 30 mmol/L 苯甲酸的磷酸缓冲液(150 mmol/L, pH = 7.0) 2.0 mL,依次加入 20 mmol/L EDTA 和 12 mmol/L FeSO₄ 混合液 0.1 mL、0.5 mL 不同浓度的供试液、100 mmol/L H₂O₂ 溶液 0.1 mL,并用磷酸缓冲液稀释至 4 mL,混匀,置 37℃ 水浴保温 1 h 后,以荧光化学发光分析仪($E_x = 320\text{ nm}$, $E_m = 410\text{ nm}$)测其荧光强度(F_s),空白管以 0.5 mL 蒸馏水代替 0.5 mL 样品,操作方法同样品管,可测得空白管的荧光强度(F_c),计算羟自由基清除率(%)。

$$\text{清除率}/\% = (F_c - F_s)/F_c \times 100$$

1.3.4 H₂O₂ 的产生及清除^[11]

采用 H₂O₂-鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 9.5)体系检测 H₂O₂:向反应池中加入 50 μL 供试液(或 50 μL 蒸馏水作空白),50 μL 1 mmol/L 鲁米诺溶液,800 μL pH 9.5 碳酸缓冲液,最后加体积分数 0.15% H₂O₂ 50 μL,启动发光反应,连续测定反应强度 6 s,至出现峰值,记录发光强度(I),发光抑制率按下式计算:

$$\text{发光抑制率}/\% = [(I_{\text{对照}} - I_{\text{样品}})/I_{\text{对照}}] \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 对碱性邻苯三酚体系产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

邻苯三酚在自氧化反应中产生氧自由基,氧自由基氧化鲁米诺产生化学发光,碱性条件下发光信号更强,用发光计可以测出发光强度,一定的浓度范围内,发光强度与 $O_2^{\cdot-}$ 的数量呈线性关系,通过测定发光强度可以间接地反映活性氧的含量。实验结果如

表 1。

表 1 甜菜红色素对碱性邻苯三酚体系产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率

溶液浓度 /mg·mL ⁻¹	0.05	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10
甜菜红样品液清除率/%	6.6	20.0	24.5	61.9	64.4	68.5	94.1
Vc 清除率/%	21.8	31.1	38.9	48.3	58.3	84.0	94.3

不同浓度的甜菜红色素样品溶液及标准抗氧化剂对照物抗坏血酸加入到 $O_2^{\cdot-}$ 发生体系后,其对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力见图 2。

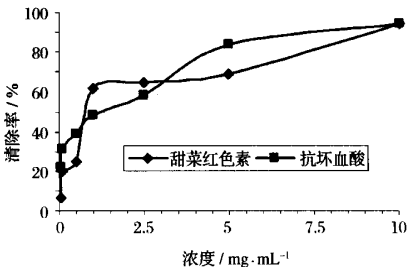


图 2 甜菜红色素和抗坏血酸对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用的比较

由图 2 可见,甜菜红色素与抗坏血酸对由碱性邻苯三酚体系产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果均随其质量浓度的增大而增大,甜菜红色素浓度在 0.7~3.2 mg/mL 范围内时,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力略高于抗坏血酸,浓度为 1.0 mg/mL 时,清除率为 61.9%,而相同浓度的抗坏血酸的清除率为 48.3%。且甜菜红色素在低浓度时就表现出一定的清除能力,在浓度为 0.5 mg/mL 时,清除率达到 24.5%。当甜菜红浓度为 10 mg/mL 时,其清除率与抗坏血酸基本相当。

2.2 对·OH 的清除作用的结果

2.2.1 鲁米诺化学发光法

Cu²⁺ 用抗坏血酸作还原剂,能与 H₂O₂ 反应生成·OH,羟自由基攻击发光剂鲁米诺使其氧化发光。发光强度的下降程度可以表示·OH 清除剂清除自由基的能力。实验结果如表 2。

表 2 甜菜红色素对·OH 的清除率(鲁米诺化学发光法)

溶液浓度/mg·mL ⁻¹	0.005	0.05	0.1	0.5	1.0
甜菜红样品液清除率/%	10.2	44.6	83.3	92.8	97.8
Vc 清除率/%	38.7	80.9	90.4	97.2	98.5

不同浓度的甜菜红色素样品溶液及标准抗氧化剂对照物抗坏血酸加入到体系后,其清除·OH 的能

力如图3所示。

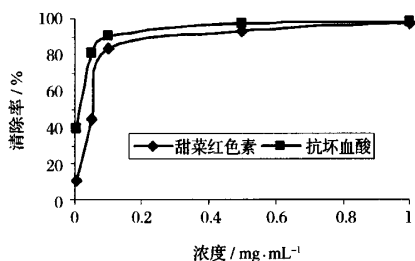


图3 甜菜红色素和抗坏血酸对·OH清除作用的比较
(鲁米诺化学发光法)

由图3可知,鲁米诺-抗坏血酸- H_2O_2 化学发光体系中加入甜菜红色素后,对羟自由基有显著的清除作用,随着样品浓度的增加,在0.005~0.1 mg/mL范围内,其清除率显著增大,浓度为0.1 mg/mL时,清除率达到83.3%,存在着明显的量效关系,当浓度增大到一定程度时,清除率随浓度升高而变化不大,可能的原因是此时体系中产生的羟自由基中的大部分已经被清除而导致此时的清除率变化不大。在浓度>0.1 mg/mL时,甜菜红清除羟自由基的能力与抗坏血酸基本相当,1.0 mg/mL时清除率高达97.8%,表现出很强的清除自由基能力。

2.2.2 苯甲酸荧光分光光度法

H_2O_2 在 Fe^{2+} 存在下生成·OH,反应如下: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ 。·OH是反应性很强的自由基,·OH可攻击芳环化合物(如水杨酸)产生羟基化产物(2,3-二羟基苯甲酸等),它的存在寿命极短,故需要加入各种捕获剂。本实验在该反应体系中加入苯甲酸,苯甲酸是一种荧光很弱的物质,生成的·OH用过量的苯甲酸捕捉,且·OH可以和其发生反应,生成具有强荧光的产物羟苯甲酸。当甜菜红溶液加入到含有·OH的溶液中时,可以和·OH结合,从而将其清除,这样产物的生成量就会减少,造成其荧光强度降低。荧光强度越低,·OH清除能力越高。因此,其荧光强度(F)可代表·OH生成的相对量。实验结果见表3。

表3 甜菜红色素对·OH的清除率
(苯甲酸荧光分光法)

溶液浓度/ $mg \cdot mL^{-1}$	0.5	1.0	2.5	5.0	8.0	10
甜菜红样品液的清除率/%	25.4	49.1	62.9	84.1	86.2	93.8
Vc的清除率/%	42.1	52.6	73.7	91.1	97.7	98.2

不同浓度的甜菜红色素样品溶液及标准抗氧化剂对照物抗坏血酸加入到体系后,其清除·OH的能

力如图4所示。

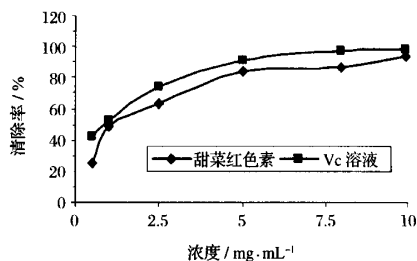


图4 甜菜红色素和抗坏血酸对·OH清除作用的比较
(苯甲酸荧光分光法)

由图4可知,甜菜红样品对苯甲酸荧光分光这一体系产生的羟基自由基有明显的清除作用。随着样品浓度的增加,其清除率也显著增大,存在着明显的量效关系。在1.0 mg/mL的浓度时,清除率可达49.1%,在浓度为10 mg/mL时,清除率可达93.8%。同浓度的甜菜红样品对羟自由基的清除能力均略低于抗坏血酸。由数据说明,甜菜红色素具有较强的清除·OH的作用。

2.3 对 H_2O_2 的清除作用结果

H_2O_2 能在有 O_2 和碱性条件下氧化鲁米诺产生化学发光, H_2O_2 的清除剂,可以分解 H_2O_2 ,降低氧化剂的浓度,使发光强度下降,借此可筛选 H_2O_2 的清除剂。实验结果如表4。

表4 甜菜红色素对 H_2O_2 的清除率

溶液浓度/ $mg \cdot mL^{-1}$	0.0001	0.0005	0.01	0.001	0.005	0.05	0.1
甜菜红样品液的清除能力/%	39.8	42.9	77.3	43.5	63.4	94.4	96.1
Vc的清除能力/%	26.2	41.8	71.1	47.7	59.8	86.1	98.9

不同浓度的甜菜红色素样品溶液及标准抗氧化剂对照物抗坏血酸加入到体系后,其对 H_2O_2 的清除能力见图5。

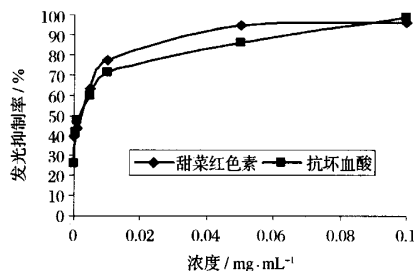


图5 甜菜红色素和抗坏血酸对 H_2O_2 清除作用的比较

由图5可见,甜菜红色素和抗坏血酸对 H_2O_2 的清除率均随二者质量浓度的增大而增大,结果显示,

甜菜红在很低浓度时已经对 H_2O_2 有一定的清除作用,在浓度为 0.0005 mg/mL 时,清除率达到 42.9% ,浓度为 0.05 mg/mL 时,清除率有显著提高,为 94.4% ,在 $0.05 \sim 0.09 \text{ mg/mL}$ 范围内,甜菜红色素的清除能力强于抗坏血酸,在浓度为 0.1 mg/mL 时,清除率略低于抗坏血酸,为 96.1% 。

3 结 论

采用荧光化学发光法实验结果表明,工业化生产的甜菜红色素产品对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 等活性氧(ROS)均具有较强的清除作用,可以作为功能性食品添加剂或配料使用。

甜菜红色素不属于黄酮类化合物,但包含一个葡萄糖苷化的酚羟基。现今研究证实了甜菜红色素的强抗氧化功效。由此可见,甜菜红色素也是一种很好的天然抗氧化剂,可广泛用于食品、化工产品等的着色,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.1~58
- 郑同安, 于立民. 天然食用色素—甜菜红的国外发展动态[J]. 丹东化工, 1992, 1: 19~24
- Belitz H D, Grosch W. Food Chemistry[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1987. 177
- Lin J C, Olcott H S. Ethoxyquin nitroxide. [J]. Agric Food Chem, 1975, 23: 798~800
- Joseph Kanner, Stela Harel. Betalains-A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. [J]. Agric Food Chem, 2001, 49: 5 178~5 185
- 王 威. 常用天然色素抗氧化活性的研究[J]. 食品科学 2003, 24(6): 96~99
- 胡博路, 杭 瑚. 核桃壳抗氧化和清除活性氧自由基的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(3): 15~16
- 曹伟, 尉亚辉, 郭斌. 用化学发光法研究蜂胶对氧自由基的清除作用[J]. 光子学报, 2002, 31(2): 162~164
- 鲁纯素, 付萍, 邹安庆. 阿糖胞苷对羟自由基的清除作用[J]. 药学报, 1987, 22(7): 337
- 孟庆国等. 薤白水提取物对羟自由基的清除作用[J]. 潍坊医学院学报, 1998, 20(1): 33~34
- 王晓, 张红侠. 加杨雄花序提取物体外抗氧化及对 DNA 损伤的保护作用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 216~219

Study on Antioxidation of Beet Red Pigment by Fluorescence and Chemiluminescence

Lv Xiaoling Kong Deli Yao Xiuling Zhang Jiayi

(The Institute of Food & Technology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT The refining beet red pigment powder was used as raw material. The scavenging ability on ROS was evaluated by means of fluorescence and chemiluminescence. Contrasting to Vc, the result showed that red beet pigment can remove superoxide anion, hydroxyl radicals and peroxide which are produced outside the body, and the scavenging ability was changed with the changes of concentration.

Key words fluorescence and chemiluminescence, beet red pigment, antioxidation

行 业 动 态

太古饮料公司将收购厦门太古可口可乐公司

由太古集团股份有限公司持有 87.5% 股份的太古饮料公司宣布, 将以 4.19 亿元人民币现金收购厦门太古可口可乐公司 49% 的股权。收购完成后, 太古集团在厦门太古可口可乐公司的持股比例将增至 93.625%。

太古饮料公司是一家由太古集团和美国可口可乐公司合资经营的企业, 是太古在中国大陆和中国香港特区经营汽水业务的主要持股公司。太古饮料目前拥有在中国大陆 7 省、中国香港特区、中国台湾地区和美国 10 个州制造、推广及分销可口可乐产品的专营权, 覆盖超过 4 亿人口的消费群。

太古饮料公司是美国可口可乐公司的长期策略性业务伙伴之一, 后者指定其为“主要特约制造商”, 太古一直与美国可口可乐公司紧密合作, 共同进行品牌发展及市场推广工作。