

冷藏对马齿苋榨汁抗氧化能力的影响

陈 凌, 骆卢佳, 曹巧巧

(嘉兴职业技术学院农业与环境学院, 嘉兴 314036)

摘 要: 通过比较马齿苋鲜榨汁和冷藏 1 年后的马齿苋榨汁的抗氧化性, 探究冷藏对马齿苋榨汁抗氧化性的影响。将冷藏 1 年的马齿苋榨汁和马齿苋鲜榨汁, 采用 DPPH 自由基清除法 (DPPH 法) 和铈离子还原比色法 (CERAC 法) 来评价其抗氧化性的变化, 利用半数有效浓度 (EC_{50}) 比较抗氧化性。4℃ 储存 1 年的马齿苋榨汁清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 21.0%, 马齿苋鲜榨汁清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 19.7%; 储存 1 年的马齿苋榨汁对还原 Ce(IV) 的 EC_{50} 为 35.0%, 马齿苋鲜榨汁还原 Ce(IV) 的 EC_{50} 为 28.3%。因此冷藏对马齿苋榨汁的抗氧化活性的有着一定的影响, 使其抗氧化性降低。

关键词: 马齿苋榨汁; DPPH·; Ce(IV); 抗氧化性; 冷藏

中图分类号: S567.219

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0510-05

Effect of cold storage on antioxidant capacity of *Portulaca oleracea* juice

CHEN Ling, LUO Lujia, CAO Qiaoqiao

(Jaxing Vocational and Technical College of Agriculture and Environment, Jiaxing 314036)

Abstract: The antioxidant activity of purslane juice was compared with that of purslane juice after keeping in cold storage for one year. The juice of *Portulaca oleracea* and fresh juice of *Portulaca oleracea* were extracted after one year of cold storage, and the changes of antioxidant activity were evaluated by DPPH radical scavenging method (DPPH) and cerium ion reduction colorimetry (CERAC). Median effective concentration (EC_{50}) was used to compare the antioxidant activity. The EC_{50} of purslane juice stored at 4℃ for one year to scavenge DPPH free radical was 21.0%; the EC_{50} of purslane fresh juice scavenging DPPH free radical was 19.7%; the EC_{50} of purslane juice reduced to Ce (IV) after storage for one year was 35.0%, and the EC_{50} of purslane fresh juice reduction to Ce (IV) was 28.3%. Therefore, cold storage had a certain effect on the antioxidant activity of purslane juice, which could decrease the antioxidant activity of *Portulaca oleracea* juice.

Key words: purslane juice; DPPH·; Ce(IV); resistance to oxidation; cold storage

人体衰老的机制非常复杂, 衰老的自由基学说认为机体衰老和多种慢性疾病的发生发展是由于体内的氧自由基产生过多和机体抗氧化能力下降以及二者之间的关系失衡而引起^[1]。当前在食品工业中使用的各种合成抗氧化剂对肝脏的损伤和致癌作用已成为不容忽视的问题。因此, 为了减小自由基对人体的危害, 开发具有低毒、高效的天然抗氧化剂已成为当前研究的热点之一。马齿苋是我国卫生部划定的 78 种药食同源的野生植物之一^[2], 它含有多种对人体有益的营养成分和抗氧化成分, 具有很高的营养价值和药用价值, 许多研究表明马齿苋提取

物具有很强的自由基清除能力。陈莉萍等^[3]研究比较了鲜、干马齿苋在化学成分以及质量浓度、抗菌作用方面均有明显不同, 鲜、干马齿苋中黄酮质量浓度分别为 0.075 和 0.041 mg·mL⁻¹, 鲜马齿苋的抗菌作用明显优于干马齿苋。但有关冷藏过程中马齿苋榨汁抗氧化成分含量的变化还鲜见报道。因此, 本研究以鲜马齿苋为原料, 探讨冷藏对马齿苋榨汁抗氧化性能的影响, 为野生马齿苋的进一步开发利用和储藏提供理论依据。

收稿日期: 2018-09-24

基金项目: 浙江省嘉兴市科技局项目 (2018AY11013) 资助。

作者简介: 陈 凌, 教授, E-mail: chenlingjx@163.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 马齿苋分别于 2017 年 7 月和 2018 年 7 月采自本学院生物基地。无水酒精、葡萄糖、浓硫酸、苯酚、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠和碳酸氢钠均为国产分析纯, 上海联试化工试剂有限公司; 维生素 C, 天津博迪化工股份有限公司; 芦丁, 国药集团化学试剂有限公司; DPPH (即 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼), 东京化成工业株式会社; $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 北京康普汇科技有限公司; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 江苏强盛功能化学股份有限公司; Na_2SO_4 , 兰溪中星化工试剂有限公司。

1.1.2 仪器 DK-S24 型恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; UV-1800PC 紫外可见分光光度计, 上海色谱仪器有限公司; ATY224 分析天平, 日本岛津; 贝尔斯顿原汁机, 江门市贝尔斯顿电器有限公司; Synergy UV 超纯水仪、Merck Millipore (美国) 等。

1.2 方 法

1.2.1 马齿苋榨汁 新鲜马齿苋用清水洗净, 纯净水过一遍, 杀青 (100°C 、 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 压力下蒸汽杀青 4 min), 趁热用开水杀菌后的螺旋榨汁机榨汁, 灌装于 105°C 杀菌后的试剂瓶里并加盖密封, 储藏 4°C 冰箱备用。

1.2.2 DPPH 标准曲线绘制 配制浓度为 $86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 标准母液, 70%乙醇稀释为 4/5、3/5、2/5、1/5 和 1/10 倍数的 DPPH 溶液, 于 λ_{max} (DPPH) 处测定其吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 Ce(IV)标准曲线绘制 配制浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ce(IV)标准母液, 用配制的 Na_2SO_4 溶液稀释为 4/5、3/5、2/5、1/5 和 1/10 倍数的 Ce(IV)溶液, 于 $\lambda_{\text{max}}[\text{Ce}(\text{IV})]$ 处测定其吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.4 抗氧化活性测定 马齿苋榨汁的抗氧化性以对 Ce(IV)的还原能力和对 DPPH 自由基清除能力为指标来衡量。

(1) DPPH 自由基清除率的测定。利用 DPPH 溶液的紫红色, 在加入抗氧化剂后颜色变淡来表示其对自由基的清除能力。准确称取 17.2 mg DPPH, 用 70%乙醇溶解后定容于 200 mL 容量瓶, 储藏在棕色瓶于 4°C 的冰箱中保存, 用时取出。移取一定量的样品加入 10.00 mL DPPH 乙醇溶液, 摇匀, 37°C 避光反应 15 min 后, 在 λ_{max} (DPPH) 波

长处测定其吸光度 (以 70%乙醇为空白调零), 空白样对照用纯水代替抗氧化剂溶液, 重复测定 3 次, 取平均值。根据下列公式计算样品对 DPPH 自由基的清除率:

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

式中, A_0 表示 0.50 mL 水和 10.00 mL DPPH 自由基反应液的吸光值; A_i 表示 0.50 mL 样品和 10.00 mL DPPH 自由基反应液的吸光值。

(2) 还原能力测定。采用 CERAC 法利用 Ce(IV)/Ce(III)之间的转化度, 评价样品的总还原能力。称取 0.080 9 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 加入 25 mL 超纯水, 17 mL 浓 H_2SO_4 , 搅拌直至完全溶解, 转移到 100 mL 容量瓶中, 用超纯水稀释至刻度, 得浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 溶液。精确称取 30.40 g Na_2SO_4 于 100 mL 烧杯中, 加水溶解, 定容至 250 mL 后, 缓慢加入 54 mL 的浓硫酸, 摇匀, 冷却, 得到 Na_2SO_4 溶液。检测试剂由 9 mL Na_2SO_4 溶液和 1 mL Ce(IV)溶液组成, 此时体系含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 , $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2SO_4 , Ce 浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。移取一定体积稀释到一定浓度的样品加入 10.00 mL 检测试剂, 摇匀, 静置, 在 37°C 避光反应 30 min 后, 以超纯水为参比, 于 $\lambda_{\text{max}}[\text{Ce}(\text{IV})]$ 波长处测定吸光度。所有样品测试 3 次。按下列公式计算样品对 Ce(IV)的还原率:

$$\text{Ce}(\text{IV}) \text{的还原率} (\%) = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100\%$$

(3) 半数有效浓度 (EC_{50}) 的测定。样品对 DPPH 自由基清除能力和对 Ce(IV)的还原能力评价指标为吸光度或 EC_{50} 值。半数有效浓度 (median effective concentration, EC_{50}) 是指清除 50% 的 DPPH 自由基所需要的抗氧化物的浓度^[4-5]。按照 1.2.4 中 (1) 和 (2) 的测定方法计算 DPPH 清除率和 Ce(IV)还原率, 以浓度为横坐标, 清除率或还原率为纵坐标绘图, 求回归方程, 根据回归方程计算马齿苋榨汁清除 DPPH 自由基和还原 Ce(IV)半数有效浓度 (EC_{50})。

2 结果与分析

2.1 吸收曲线及测定波长的确定

DPPH 溶液在可见光区有吸收峰 (图 1), 因此选此峰波长 523 nm 为测量波长。

在 200 ~ 800 nm 对 Ce(IV)测试液进行扫描, 在紫外光区有最大吸收峰 (图 2), 因此选最大吸收波长 320 nm 为测量波长。

2.2 DPPH 标准曲线的绘制

按照 1.2.2 中的方法绘制标准曲线, 结果见图 3。

$R^2 = 1$ (极显著相关),在 $8.6 \sim 86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 DPPH 自由基浓度与吸光度之间有很好的线性关系。

2.3 Ce(IV) 标准曲线的绘制

按照 1.2.3 的方法绘制标准曲线,结果见图 4, $R^2 = 0.9987$,在 $20 \sim 200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 Ce(IV)浓度与吸光度之间有较好的线性关系。

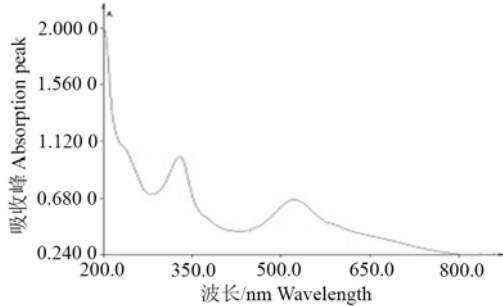


图 1 DPPH 溶液吸收曲线
Figure 1 DPPH solution absorption curve

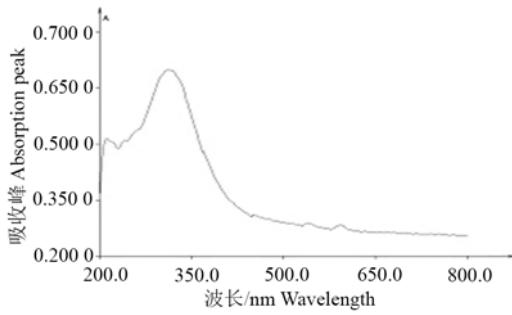


图 2 Ce(IV)体系的吸收曲线
Figure 2 Absorption curve of Ce(IV) system

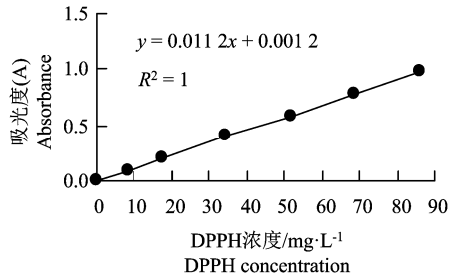


图 3 DPPH 的标准曲线
Figure 3 Standard curve of DPPH

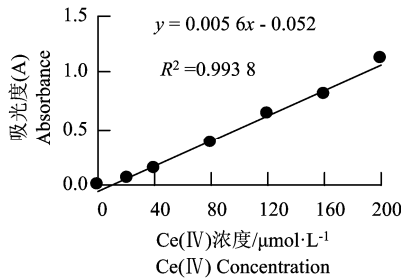


图 4 Ce(IV)的标准曲线
Figure 4 Standard curve of Ce(IV)

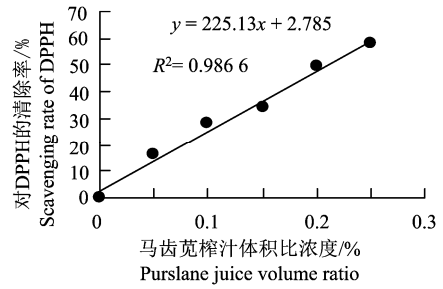


图 5 冷藏 1 年后马齿苋榨汁对 DPPH· 的清除率
Figure 5 Clearance rate of purslane juice to DPPH· after cold storage for one year

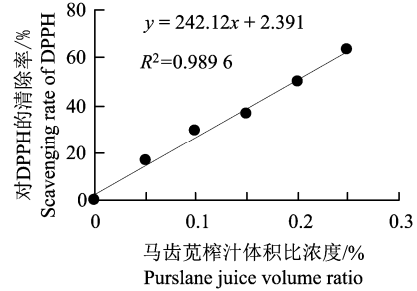


图 6 马齿苋鲜榨汁对 DPPH· 的清除率
Figure 6 Clearance rate of DPPH· by fresh juice of *Portulaca Oleracea*

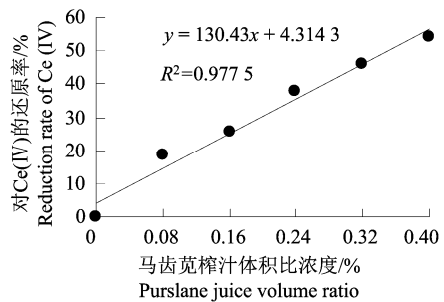


图 7 冷藏 1 年后马齿苋榨汁对 Ce(IV)还原率
Figure 7 Reduction rate of Ce(IV) by purslane juice after one-year cold storage

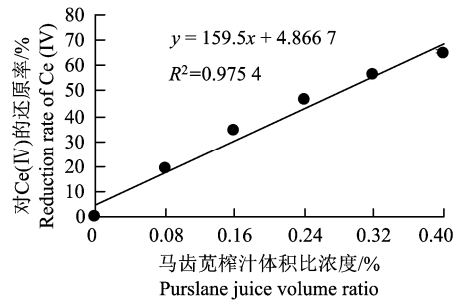


图 8 马齿苋鲜榨汁对 Ce(IV)还原率
Figure 8 Reduction rate of Ce(IV) by fresh juice of *Portulaca oleracea*

2.4 冷藏对 DPPH 清除率的影响

分别移取在 4°C 冰箱里冷藏 1 年的马齿苋榨汁和马齿苋鲜榨汁 0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 mL

于 10 mL 比色管中, 加超纯水定容, 摇匀后分别移取此系列稀释液 0.50 mL 加入到 10.00 mL DPPH 溶液中, 混匀, 按 1.2.4 (1) 的方法进行操作, 结果见图 5 和图 6。

DPPH 自由基清除能力常被用来测定抗氧化物质的自由基清除能力。反应液的吸光度或 EC_{50} 值越低, 清除 DPPH 自由基的能力越强, 抗氧化活性越高^[6-7]。由图 5 可见, 清除率随马齿苋榨汁浓度的增加逐渐增高, 当马齿苋榨汁浓度为 0.25%

时, 清除率达到 57.9%, 由图 5 的回归方程计算 4 °C 储存 1 年的马齿苋榨汁清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 21.0%。

由图 6 可见, 清除率随马齿苋榨汁浓度的增加逐渐增高, 当马齿苋榨汁浓度为 0.25% 时, 清除率达到 63.7%, 由图 6 的回归方程计算得马齿苋鲜榨汁清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 19.7%。冷藏 1 年后马齿苋榨汁清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 升高 1.3 %, 其抗氧化性低于马齿苋鲜榨汁。

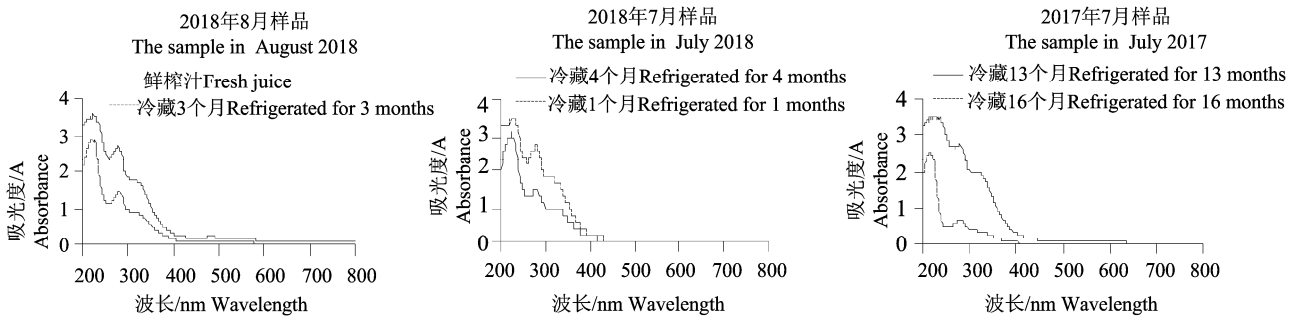


图 9 马齿苋榨汁吸收光谱
Figure 9 Absorption spectrum of purslane juice

表 1 冷藏对马齿苋榨汁中黄酮浓度的影响
Table 1 Effects of cold storage on flavonoids concentration in purslane juice

榨汁样品 The juice sample	年-月 Year-month					
	2018-08		2017-07			
冷藏时间/月 Refrigeration time (month)	0	2	3	13	15	16
黄酮含量/g·L ⁻¹ Flavonoid concentration	5.76	3.93	3.58	2.58	1.24	1.16

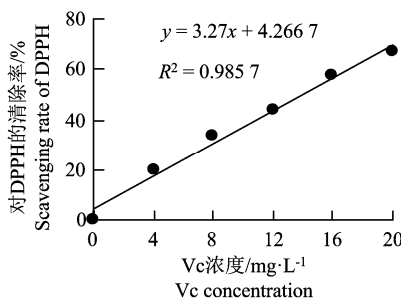


图 10 Vc 对 DPPH· 的清除率
Figure 10 Clearance of DPPH· by Vc

2.5 冷藏对 Ce(IV) 还原能力的影响

分别移取在 4 °C 的冰箱里冷藏 1 年的马齿苋榨汁和马齿苋鲜榨汁 0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 mL 于 10 mL 比色管中, 用超纯水定容摇匀后, 分别移取此系列溶液 0.40 mL 加入到 10.00 mL Ce(IV) 溶液中, 摇匀, 按 1.2.4 (2) 的方法进行操作, 结果见图 7 和图 8。

铈还原比色法常被用来测定抗氧化物质还原 Ce(IV) 的能力。反应液的吸光度或 EC_{50} 值越低, 样

品还原 Ce(IV) 的能力越强, 其抗氧化活性越高。由图 7 得知, 还原率随马齿苋榨汁浓度的增加逐渐增高, 当马齿苋榨汁浓度为 0.4% 时, 还原率达到 54.2%, 由其回归方程求得 4 °C 储存 1 年的马齿苋榨汁对 Ce(IV) 的半数还原率 (EC_{50}) 为 35.0 %。

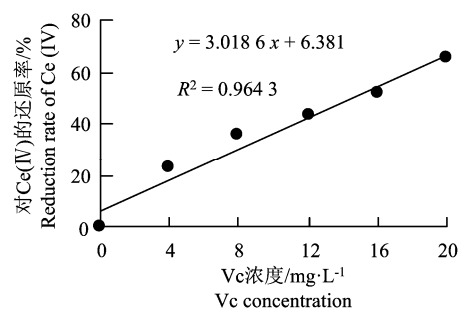


图 11 Vc 对 Ce(IV) 还原率

Figure 11 Reduction rate of Ce (IV) by Vc

由图 8 得知, 还原率随马齿苋榨汁浓度的增加逐渐增高, 当马齿苋鲜榨汁浓度为 0.4% 时, 还原率可达到 64.4%; 由图 8 的回归方程求得马齿苋鲜榨汁还原 Ce(IV) 的 EC_{50} 为 28.3%。冷藏 1 年后马齿

苋榨汁还原 Ce(IV)的 EC_{50} 升高 6.7%，因此其还原能力低于马齿苋鲜榨汁。

2.6 冷藏对马齿苋榨汁活性成分的影响

图 9 是稀释相同倍数的 3 个马齿苋榨汁样品冷藏不同时间的光谱扫描图。从图 9 中可以看出，3 个样品随冷藏时间的延长吸光度都降低，即活性物质的浓度减少。马齿苋榨汁中黄酮浓度的变化结果（表 1）显示，2018 年 8 月和 2017 年 7 月这 2 个样品都随冷藏时间的增加黄酮浓度减少，说明冷藏损失了部分活性物质，冷藏时间越长损失越多。

2.7 与 Vc 抗氧化能力的比较

分别移取 0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 mL $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Vc 溶液于 10 mL 比色管中，加超纯水定容到刻度，然后移取此稀释液 0.40 mL 分别加入到 10.00 mL DPPH 溶液和 10.00 mL Ce(IV)溶液中，混匀按 1.2.4 (1) 和 1.2.4 (2) 方法操作，结果见图 10 和图 11。

由图 10 可知，清除率随马齿苋榨汁浓度的增加逐渐增大，当 Vc 浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，清除率达到 67%，由图 10 的回归方程计算清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 $14.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 11 可知，还原率随 Vc 浓度的增加逐渐增大，当 Vc 的浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，还原率达到 65.6%，由图 11 的回归方程求得 Vc 对 Ce(IV)的 EC_{50} 为 $14.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

马齿苋鲜榨汁对 Ce(IV)的还原能力比 Vc 弱，对 DPPH·的清除率也比 Vc 差；冷藏 1 年的马齿苋榨汁对 Ce(IV)的还原能力和对 DPPH·的清除率都比 Vc 和鲜榨汁差。

3 结论

冷藏 1 年的马齿苋榨汁和马齿苋鲜榨汁对 DPPH·均具有较强的清除能力，且马齿苋鲜榨汁的清除 DPPH 的能力强于冷藏 1 年的马齿苋榨汁；对 Ce(IV)均具有较强的还原能力，且马齿苋鲜榨汁还

原 Ce(IV)的能力强于冷藏 1 年的马齿苋榨汁。两者综合马齿苋鲜榨汁的抗氧化性优于冷藏 1 年的马齿苋榨汁。

在所试浓度范围，马齿苋榨汁对 DPPH·的清除率和对 Ce(IV)的还原率随其浓度的增加而增大，冷藏 1 年后抗氧化能力下降。

马齿苋鲜榨汁、冷藏 1 年和 Vc 清除 DPPH·反应和还原 Ce(IV)的反应都属一级反应，在室温下即能快速进行。在所试浓度范围 Vc 的抗氧化能力最强，其次是马齿苋鲜榨汁，冷藏 1 年的抗氧化能力最弱。

马齿苋榨汁随着冷藏时间的延长，抗氧化能力减弱，活性物质损失越多。

参考文献：

- [1] 皮小芳, 李玉萍, 吴光杰, 等. 贮存时间及温度对马齿苋多糖体外抗氧化活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 164-165.
- [2] 王立珍, 袁志翔, 徐超群, 等. 马齿苋醇提物和当归醇提物的抗氧化活性研究[J]. 华西药杂志, 2013, 28(2): 144-146.
- [3] 陈莉萍, 余杰, 陈玲琳, 等. 鲜与干马齿苋药材品质及抗菌作用对比研究[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2016, 35(6): 89-91.
- [4] 蒋海萍, 廖丹葵, 孙建华, 等. 抗氧化肽 HDHPVC 和 HEKVC 的反应动力学及抗氧化能力评价方法[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 109-113.
- [5] 冯学珍, 伍善广, 韦啟球, 等. 网地藻多糖清除 DPPH·自由基活性的动力学研究[J]. 广西植物, 2017, 37(5): 647-652.
- [6] OZGEN M, REESE R N, TULLIO A Z, et al. Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(4): 1151-1157.
- [7] 赵慧芳, 方亮, 吴文龙, 等. 黑莓品种 'Boysen' 果实水提物和色素对 DPPH·的反应动力学特性及清除能力研究[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1): 10-16.