

苦瓜膳食纤维的抗氧化活性研究

张志旭¹, 陈岳文², 刘东波^{1,2}

(1. 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南长沙 410128)

(2. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 采用分光光度法研究了苦瓜膳食纤维的体外抗氧化作用, 并与 Vc 进行比较。结果表明其具有较强的抗氧化能力, 在清除 DPPH· 的体系中和总抗氧化力体系中, 样品的清除能力均超过 Vc, 但在羟基自由基·OH 和超氧阴离子 O₂⁻ 体系中, 其清除能力低于对照 Vc, 说明苦瓜膳食纤维中含有多种抗氧化物质, 因此显示出与 Vc 不同的抗氧化活性。

关键词: 膳食纤维; 苦瓜; 氧自由基; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2012)8-933-935

Antioxidant Activity of Dietary Fiber from *Balsam Pear*

ZHANG Zhi-xu¹, CHEN Yue-wen², LIU Dong-bo^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Subhealth Intervene Technology, Changsha 410128, China)

(2. College of Horticulture and Gardening of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The in vitro antioxidant activity of dietary fiber from *Balsam pear* (DFBP) and Vc were compared by using spectrophotometry. The results showed that DFBP had strong antioxidation ability. The DPPH·-scavenging and total antioxidation capacities of the sample was superior to Vc. But it was inferior to Vc in hydroxyl radical and superoxide anion containing systems. It indicated that there were various antioxidant substance in DFBP.

Key words: dietary fiber; *Balsam Pear*; oxygen radical; antioxidant activity

膳食纤维是指不被人体消化的多糖类碳水化合物和木质素的总称, 被称为继水、蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质、维生素之外的“第七大营养素”, 营养调查资料表明, 膳食纤维能有效减少和预防冠心病、糖尿病、高血压、肥胖症、心肌梗塞、结肠炎、便秘等疾病的发生。随着对膳食纤维(dietary fiber, DF)研究的深入发现这些功能与膳食纤维的抗氧化性紧密相关, 1998 年 Saura-Calixto 率先提出了“抗氧化膳食纤维(Antioxidant Dietary Fiber, ADF)”的概念, 研究者陆续发现膳食纤维中的多酚类、多糖类以及结合在多糖上的一些成分都具有抗氧化作用, 因此不同来源抗氧化膳食纤维所含抗氧化物质和含量的不同造成其营养价值不同, 其应用方式和功效作用也不尽相同^[1-3]。

苦瓜是人们喜爱的一种蔬菜, 有增进食欲、明目、助消化、清凉解毒、利尿等多种功效, 吴茂玉等采用酶处理法提取苦瓜膳食纤维, 发现膳食纤维纯度高达

70%^[4], 因此对苦瓜膳食纤维抗氧化性的研究有助于苦瓜资源的开发利用, 提高综合利用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苦瓜膳食纤维由湖南农业大学亚健康干预技术实验室制备, 主要制备过程如下:

苦瓜 (1:8加水) → 粉碎 → 调pH 9.0 → 淀粉酶水解 → 沸水浴灭活, 调pH 4.0 → 蛋白酶水解 → 过滤 → 漂洗 → 干燥 → 膳食纤维

所得膳食纤维采用酶-重量法(AOAC)进行测定, 总膳食纤维含量达到 46.2%, 其中可溶性膳食纤维(SDF)占 19.8%, 不溶性膳食纤维(IDF)占 78.1%。

称取苦瓜膳食纤维 5 g 1000 mL 的三角锥瓶中, 加水 400 mL 搅拌均匀, 浸泡 1 h, 加热至沸腾后保持 20 min, 于 13000 r/min 下乳化 1 min, 将乳浊液移至 500 mL 容量瓶中定容, 使用时根据需要配制不同浓度的溶液。

1.2 主要试剂

无水乙醇、三氯甲烷、邻二氮菲、硫酸亚铁、过氧化氢、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、盐酸萘乙二胺、邻苯三酚、三羟基胺基甲烷(*TriS*)。

FRAP 工作液(Fe³⁺-三吡啶三吡嗪, Tripyridyl-Tirazine, TPTZ)用现配: 由 25 mL 300 mmol/L pH 3.6

收稿日期: 2012-04-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD33B11), 湖南省教育厅科研项目(11C0667)

作者简介: 张志旭(1972-), 男, 助理研究员, 研究方向为功能性产品研究与开发

通讯作者: 刘东波, 男, 教授

的醋酸盐缓冲液、2.5 mL 10mmol/L TPTZ 溶液、2.5 mL 20mmol/L FeCl₃ 溶液混合而成。

DPPH, 蛋白酶购于 Sigma 公司; 淀粉酶购于北京双旋微生物培养基制品厂。

1.3 主要仪器

紫外分光光度计, 日立 UV-3310。

1.4 抗氧化测定

1.4.1 试剂的配制

1.4.1.1 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液的配制: 将无水磷酸氢二钠和磷酸二氢钾在 115±5 °C 干燥 2~3 h, 分别称取 8.606 g 与 2.358 g, 加水使其充分溶解后, 并稀释, 定容至 2000 mL。

1.4.1.2 50 mmol/L, pH 8.2 Tris-HCl 缓冲溶液的配制: 取 25 mL 0.1 mol/L Tris 与 15 mL 0.1 mol/L HCl 混匀, 加水定容到 50 mL, 即可得到 pH 8.2 的缓冲溶液, 用酸度计测其 pH 值。若该缓冲溶液的 pH 值误差不在 0.02 范围之内就必须重新调 pH 值。

1.4.1.3 8 mol/L 的 HCl 溶液的配制: 取 144 mL 分析纯的 HCl 用蒸馏水定容至 200 mL。

1.4.2 清除羟基自由基 OH 能力的测定^[5]

首先取浓度为 2.5 mmol/L 的邻二氮菲溶液 3 mL, 然后取 2.0 mL pH=7.4 的磷酸盐缓冲液, 将两者充分混匀, 加入 15 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 0.5 mL 后, 立即混匀, 再加入 1.0 mL/L 的 H₂O₂ 1.0 mL, 最后使用蒸馏水将剩余体积补充至 10.0 mL, 在温度为 37 °C 条件下保温, 1 h 后取出, 在 510 nm 处测定吸光度 (此为损伤管吸光度); 之后分别加入浓度不同的试样溶液 1 mL, 再加 1.0 mL/L 的 H₂O₂ 1.0 mL, 未损伤管不需要加提取物和 H₂O₂。按下式计算清除率:

$$\text{OH 清除率}(\%) = (A_2 - A_1) \times 100\% / (A_0 - A_1)$$

式中: A₀ 未损伤管的吸光度, A₁-损伤管的吸光度, A₂-加提取物的吸光度。

1.4.3 清除超氧阴离子自由基(O₂⁻)能力的测定^[6]

取 4.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液, 于 20 °C 水浴中进行预热, 20 min 后, 分别加入 1 mL 不同浓度的试样溶液和 0.4 mL 浓度为 25 mmol/L 的邻苯三酚溶液, 充分混匀后, 于 25 °C 水浴中反应 5 min, 然后加入 1 mL 浓度为 8 mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 最后在 299 nm 处测定吸光度 A₁, 空白则以蒸馏水代替样品液, 测定吸光度 A₀。按下式计算清除率:

$$\text{O}_2\text{-清除率}(\%) = (A_0 - A_1) \times 100\% / A_0$$

1.4.4 清除 DPPH 能力的测定^[7]

分别取 2 mL 浓度不同的样品液放置于试管中, 加入 2 mL 2×10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 溶液, 混合均匀, 反应 30 min, 在 517 nm 处测定其吸光度, 同时测定样品空

白的吸光度, 以及不加样品液的空白样的吸光度。按下式计算其对 DPPH 抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] \times 100\% / A_0$$

式中: A₁-2 mL DPPH·溶液+2 mL 样品液的吸光度; A₂-2 mL 样品液+2 mL 无水乙醇的吸光度; A₀-2 mL DPPH·溶液+2 mL 无水乙醇的吸光度。

1.4.5 总抗氧化能力的测定^[8]

1.4.5.1 标准曲线的绘制

分别吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 FeSO₄ 标准液, 加入 3 mL FRAP 工作液, 再加入 0.3 mL 超纯水, 混匀, 37 °C 下准确反应 5 min, 于 593 nm 处测定其吸光度, 用超纯水调零, 绘制标准曲线。样品的抗氧化活性(FRAP 值)以达到相同吸光度所需 FeSO₄ 的毫摩尔数表示。

1.4.5.2 样品的测定

量取 0.1 mL 的样品溶液, 加入 3 mL FRAP 工作液, 再加入 0.3 mL 超纯水, 混匀, 37 °C 准确反应 5 min, 于 593 nm 处测定其吸光度, 用超纯水调零。

2 结果与分析

2.1 苦瓜膳食纤维对羟基自由基·OH 的清除作用

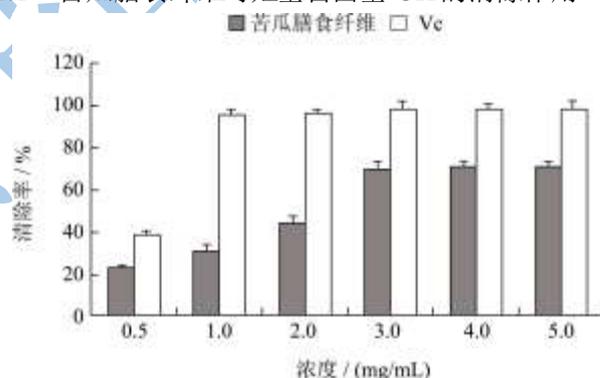


图 1 不同浓度的苦瓜膳食纤维溶液对·OH 的清除作用

Fig.1 ·OH Scavenging capability of dietary fiber from Balsam pear with different concentrations

羟基自由基是化学性质非常活泼的一种自由基, 能和大多数的生物大分子发生不同类型的反应, 并有非常高的反应速率。羟基自由基是进攻性最强的化学物质之一, 在活性氧中, 它的危害性最大。因此, 研究苦瓜膳食纤维对羟基自由基的清除作用是样品抗氧化性研究中重要的一部分。如图 1 所示, 试验用 Fenton 法考察样品溶液和 Vc 对·OH 清除效果, 与对照组比较 P<0.01。样品的清除率在试验浓度范围内与样品浓度呈正相关, 均低于对照样 Vc, 当样品浓度为 3 mg/mL 时, 清除率在 70% 左右趋于平缓, 而 Vc 在浓度为 1 mg/mL 即达到 90% 以上。

2.2 苦瓜膳食纤维对超氧阴离子(O₂⁻)的清除作用

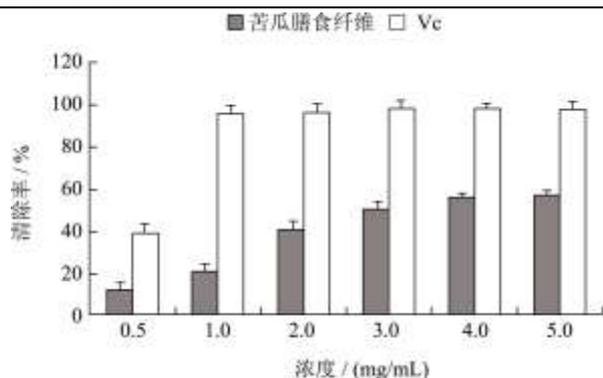


图2 不同浓度的苦瓜膳食纤维溶液对 O_2^- 的清除作用

Fig.2 O_2^- scavenging capability of dietary fiber from *Balsam pear* with different concentrations

在生物体内氧化还原反应中, 大约有 2%~5% 的氧会变成超氧阴离子, 这些阴离子会产生超氧阴离子自由基, 这种自由基能随着生命活动代谢而产生, 其氧化能力很强, 机体发生氧中毒往往是由该种自由基的毒性导致。因此清除超氧阴离子自由基的能力也是检验抗氧化物质的活性的主要指标。如图 2 所示, 样品在试验浓度范围内, 清除率与样品浓度呈正相关, 与对照组比较 $P < 0.01$ 。清除率低于对照品 Vc, 而且一直低于 60%。在 3 mg/mL 时基本趋于平缓, 低于 60% 左右, 而 Vc 在浓度为 1 mg/mL 即达到 95% 以上。

2.3 苦瓜膳食纤维对 DPPH· 的清除作用

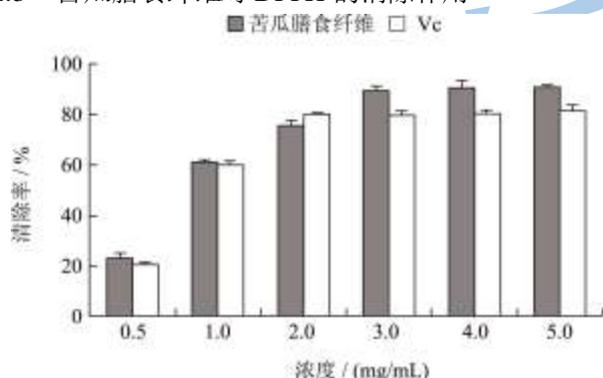


图3 不同浓度的苦瓜膳食纤维对 DPPH· 的清除作用

Fig.3 DPPH· scavenging capability of dietary fiber from *Balsam pear* with different concentrations

一般而言, 自由基的化学性质是十分活泼, 而且其寿命也是极短, 当然也有例外, 例如, DPPH· 是一种化学性质很稳定的自由基, 它具有很多稳定的特点, 在乙醇溶液中能呈深紫色, 而且在 517 nm 处有最大的吸收峰; 因此当有自由基清除剂存在时, 其颜色随着二苯代苦味肼基自由基含量的减少而开始减褪, 这样就可以利用褪色程度, 对清除剂的清除能力进行定量的评价。如图 3 所示, 清除率在一定的实验浓度范围内与样品浓度呈正相关, 与对照组比较 $P < 0.01$ 。样品浓度大于 0.5 mg/mL 时, 其清除率大于 Vc。样品浓度

大于 3 mg/mL 后, 样品清除率达到 90% 左右, 而且增长趋于平缓。Vc 随着浓度增加, DPPH 清除率增加, 达到 80% 左右后趋于稳定, 但清除能力始终低于样品。

2.4 苦瓜膳食纤维总抗氧化能力的测定

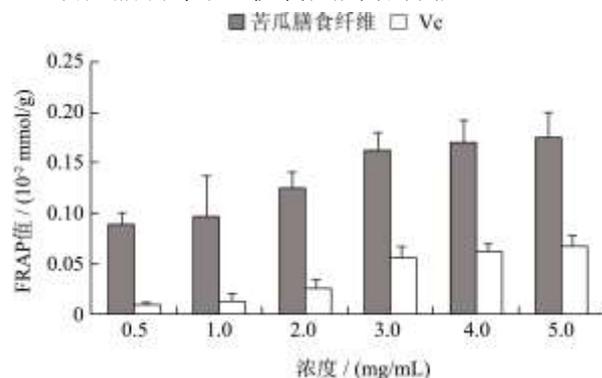


图4 不同浓度的苦瓜膳食纤维的总抗氧化能力

Fig.4 Total antioxidant capacity of dietary fiber from *Balsam pear* with different concentrations

对于评价抗氧化剂抗氧化活性的强弱, 可以通过判断其的还原力高低来确定, 两者之间的联系很密切。抗氧化剂是一种良好的电子供应者, 它能给出电子主要是通过自身的还原作用, 其供应的电子能力很强, 例如将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 甚至还能与自由基相结合, 成为较惰性的物质, 这种反应能中断自氧化链锁反应。如图 4 所示, 样品的总抗氧化能力在试验浓度范围内与样品浓度呈正相关, 与对照组比较 $P < 0.01$ 。当样品浓度大于 3 mg/mL 时, 达到 1.6×10^{-2} mmol/g 左右后趋于平缓。而 Vc 的总抗氧化力虽然随着浓度增加而增长, 但始终远远低于样品。

3 结论

通过对不同的体系自由基清除率和总抗氧化力的测定, 研究了苦瓜膳食纤维的抗氧化性能力。结果表明, 苦瓜膳食纤维具有较强的抗氧化能力和抗氧化的多样性。根据食物成分表, 苦瓜膳食纤维的 Vc 含量为 0.56 mg/g, 因此在羟基自由基·OH 和超氧阴离子 O_2^- 体系中表现出相似的抗氧化性, 但清除能力低于对照样 Vc。但在清除 DPPH 的体系和总抗氧化力体系中, 样品的清除能力均超过 Vc, 这两个体系中, 自由基的基础基团为有机大分子, 苦瓜膳食纤维中其他抗氧化物质如多酚类或者结合与糖键上的其它基团开始起作用, 通过接近捕获自由基并与其结合, 因此显示出较强的自由基清除能力。随着浓度的升高, 溶液中大分子基团增加, 基团分子之间距离增大而使作用力减弱, 对于自由基的捕获能力下降, 清除能力达到饱和。这也从另一方面证明了苦瓜膳食纤维中其它抗氧化物质的存在, 而且用酶法提取比碱法提取能更多地保留其抗

氧化力,提升苦瓜膳食纤维的营养价值,但是其作用机理还需进一步研究。本文通过体外试验证明了苦瓜膳食纤维的抗氧化特性,为苦瓜膳食纤维进一步开发成特异性的抗氧化功能产品提供了理论依据^[9~11]。

参考文献

- [1] 曹银,杨芳,周露.碱法与酶法提取大麦糟膳食纤维的比较[J].现代食品科技,2011,27(3):317-320
- [2] 赵全利,吉欣,吕奇,等.芹菜膳食纤维制备工艺的探讨[J].现代食品科技,2006,22(4):142-144
- [3] 程安玮,杜方岭.膳食纤维抗氧化作用及其机理的研究[J].农产品加工,2009,1:67-68,71
- [4] 吴茂玉.高活性苦瓜膳食纤维粉的研究[J].食品研究与开发,2007,2:4-7
- [5] Nieole Cotelle, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones [J]. Free Rad Bio Med., 1998, 20(1): 35-43
- [6] 张建民,肖小年,易醒,等.车前草可溶性膳食纤维的提取及其对自由基清除能力的研究[J].天然产物研究与开发,2007,19: 667-670
- [7] 李继仁,赵玉英.三种松果菊化学成分与生物活性研究进展[J].中国中药杂志,2002,27(5):334-337
- [8] 郭长江,杨继军,李云峰,等.FRAP法测定水果不同部分抗氧化活性[J].中国公共卫生,2003,7:841-843
- [9] Nagendran B, et al. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products:Anti-oxidant activity, occurrence, and potential uses [J]. Foodchem., 2005, 10: 1-13
- [10] 李燮昕,蒲彪.锦橙皮抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2010, 3:166-168
- [11] Saura-Calixto F, Goni I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet [J]. Food Chemistry, 2006, 94: 442-447