

超微粉碎对莲子心活性成分提取率及抗氧化能力的影响

陈铭¹, 薛琪¹, 沈婷¹, 王新风¹, 强倩¹, 罗海青¹, 朱翠玲¹, 吴海峰², 吴磊³, 李鹏霞⁴, 胡卫成¹

(1. 淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300) (2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193) (3. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457) (4. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 为评价超微粉碎对莲子心粒径、微观结构、总黄酮和总酚提取率及抗氧化能力的影响, 分别采用亚硝酸钠-硝酸铝法和福林法测定莲子心中总黄酮和总酚的含量, 采用还原能力、DPPH 自由基清除、ABTS⁺自由基清除能力、总氧自由基吸收能力以及细胞内抗氧化活性系统评价其抗氧化能力。结果表明: 莲子心超微粉的中位粒径减小, 细胞破壁率增加, 总黄酮提取率提高了 21.82%, 总酚提取率提高了 24.09%。抗氧化能力评价中, 超微粉碎能明显提高莲子心的还原能力、DPPH 和 ABTS⁺自由基清除能力、总氧自由基吸收能力以及细胞内抗氧化活性。超微粉碎技术可以改善莲子心粉体的理化性质, 提高莲子心抗氧化活性物质(总酚和总黄酮)的溶出率, 同时超微粉碎处理显著提高抗氧化能力, 可作为以莲子心为原料开发功能性食品的一种前处理手段。

关键词: 超微粉碎; 莲子心; 自由基; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)11-228-234

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.035

Effects of Ultrafine Grinding on the Extraction Rate and

Antioxidant Properties of the Active Ingredients of Lotus Plumule

CHEN Ming¹, XUE Qi¹, SHEN Ting¹, WANG Xin-feng¹, QIANG Qian¹, LUO Hai-qing¹, ZHU Cui-ling¹,
WU Hai-feng², WU Lei³, LI Peng-xia⁴, HU Wei-cheng¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China) (2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China) (3. College of Materials Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (4. Institute of Agro-food Science and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To evaluate the effect of ultrafine grinding on the particle size, microstructure, extraction rates of total phenolics and flavonoids, and antioxidant capacity of lotus plumule, the total phenolic and flavonoid contents were measured using NaNO₂-Al(NO₃)₃ and Folin-phenol reagent methods, respectively. Antioxidant activity was evaluated by 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical-scavenging activity, reducing power assay, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) scavenging activity, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and cellular antioxidant activity (CAA) assay. The results showed that for the samples treated by ultrafine grinding, the median particle size reduced, the cell wall-breaking rate increased, and the extraction rates of total flavonoids and phenolics increased by 21.82% and 24.09%, respectively. In terms of antioxidant capacity, ultrafine grinding treatment significantly enhanced DPPH free radical-scavenging activity, reducing power, ABTS scavenging activity, ORAC, and CAA. In conclusion, ultrafine grinding could improve the physicochemical properties of lotus plumule powder and increase the dissolution rates of the active ingredients (total phenolics and total flavonoids) in lotus plumule. Meanwhile, ultrafine grinding significantly increased antioxidant capacity and could serve as a pretreatment method in the development of functional food products with lotus plumule as the raw material.

Key words: ultrafine grinding technique; lotus plumule; free radicals; antioxidant capacity

收稿日期: 2015-12-09。基金项目: 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A018); 江苏省高校自然科学基金 (14KJB550002); 江苏省自然科学基金 (BK20150414); 国家科技支撑计划项目 (2015BAD29B00); 作者简介: 陈铭 (1994-), 女, 研究方向: 食品化学。通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士后, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品分子营养学; 吴磊 (1985-), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 天然产物化学

莲 (*Nelumbonucifera Gaertn*) 为睡莲科植物, 主要产于湖南、湖北、福建、江苏和浙江等地。莲全身部位均可使用, 如荷叶用于治疗心烦暑热; 莲子心可用于治疗失眠多梦; 莲子具有养心安神等作用; 莲藕为日常食用蔬菜。莲子心是莲成熟种子中间的绿色的胚根, 性味苦寒。据《本草纲目》记载, 莲子心具有清心安神、交通心肾与涩精止血之功效^[1]。莲子心中含有大量生物活性物质, 包括生物碱, 芦丁、金丝桃苷与木犀草素等黄酮类和酚类物质。大量研究表明, 莲子心中的黄酮类、酚类化合物具有抗菌、抗炎、抗氧化和抗癌等作用^[2], 在心血管疾病药物、保健食品和化妆品研究开发中具有重要的价值。因此, 如何快速有效的提高莲子心活性物质的溶出率, 是目前加工技术研究的关键问题。

近年来, 超微粉碎技术在食品和药品中的应用越来越广泛, 该技术被国际食品业公认为 21 世纪十大食品科学技术之一^[3]。超微粉碎技术的原理是利用粉碎设备对物料进行挤压、冲击、摩擦、碰撞和剪切等, 得到粒径为 1 nm~100 μm 的微小固相颗粒, 有利于其中营养成分的释放和吸收。和一般的粉碎技术相比, 超微粉末的表面具有一系列重要的特性, 如高溶解性、分散性、吸附性、化学反应性和流动性^[4]。超微粉碎后样品无论是在物理性能还是在功能性特性上面都发生了显著变化。本研究采用机械粉碎和超微粉碎两种方式处理莲子心, 比较其在有效成分及其生物活性方面的差异性。不仅为莲子心的开发应用探究新的途径, 同时也为超微粉碎技术在食品及医药中的应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莲子心由金湖县老龙窝农副产品专业合作社提供; 芦丁标准品、没食子酸标准品、二苯基苦味酰基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、水溶性维生素 E (Trolox)、槲皮素 (Quercetin)、荧光素 (FL)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (ABAP) 与 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 购于 Sigma 公司; 福林试剂、碳酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、氯化铁、铁氰化钾、三氯乙酸、过硫酸钾、无水乙醇与甲醇均为分析纯; 人肝肿瘤细胞 HepG2 购买于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。DMEM 培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司。

1.2 仪器与设备

NLD-6A 型超微粉碎机, 济南纳力德超微粉碎技术有限公司; Q-250B3 高速多功能粉碎机, 上海冰都电器有限公司; 分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; Tecan infinite M200PRO 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; KQ-500B; Mastersizer 2000 激光粒径仪, 英国马尔文公司; 二氧化碳培养箱, 日本 SANYO 公司; FEI Quanta 450FEG 场发射扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

新鲜莲子心, 放入烘箱 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重, 将干燥的莲子心放入普通粉碎机粉碎, 得到莲子心机械粉; 粗粉碎的莲子心经 NLD-6A 型超微粉碎机粉碎 10 min 后, 得到莲子心超微粉。

1.3.2 莲子心粉粒度测定

取 25 mg 莲子心机械粉与超微粉分散于 10 mL 蒸馏水中, 悬浮液在室温下搅拌 30 min, 使样品与分散剂充分混合。使用激光粒径仪在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测定莲子心粉的粒度。

1.3.3 莲子心粉微观形态观察

取适量莲子心样品机械粉和超微粉样品铺于电镜铜台上, 喷金镀膜后置于 FEI Quanta 450FEG 型扫描电子显微镜下观察并照相。

1.3.4 莲子心 (乙醇) 提取液的制备

称取莲子心机械粉和超微粉各 1.00 g, 加入 75% 的乙醇 25 mL, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴提取 30 min, 离心和过滤, 滤液用 75% 的乙醇定容至 25 mL 作为样液。

1.3.5 莲子心提取液中总黄酮含量的测定

(1) 标准曲线的制作: 准确称取芦丁标准品 0.05 g, 80%乙醇定容至 50 mL, 得到 1 mg/mL 芦丁标准溶液。准确吸取芦丁标准溶液 0、25、50、100、200、300、400 与 500 μL , 加入 80%乙醇至 1 mL, 加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 避光反应 5 min, 加入 10%硝酸铝 0.3 mL, 4%氢氧化钠 2 mL, 混匀放置 15 min, 测定 510 nm 处吸光度值, 绘制芦丁标准曲线。 $Y=0.0022X-0.0475$, $R^2=0.9998$ 。式中 Y 为吸光度; X 为黄酮质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

(2) 样品测定: 取制备好的莲子心乙醇提取液 1 mL, 按照标准曲线的测定方法, 测定 510 nm 处吸光度值。样品总黄酮含量以 100 g 样品中所含芦丁的毫克数表示 ($\text{mg/RU eq}/100\text{g}$)。

1.3.6 莲子心提取液中多酚含量的测定

(1) 标准曲线的制作: 精确称取没食子酸标准品 0.02 g, 80%乙醇定容至 50 mL, 得到 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没食子酸标准溶液。准确吸取没食子酸标准溶液 0、12.5、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400 μL , 分别置于 2 mL 离心管中, 各加入 80%乙醇至 0.2 mL。依次加入蒸馏水 1 mL, 福林试剂 0.2 mL, 混匀静置 3 min, 加入 7.5%碳酸钠 0.6 mL, 混匀静置 40 min 后, 测定 765 nm 处吸光度。绘制没食子酸标准曲线, $Y=0.0057X-0.0127$, $R^2=0.9988$ 。式中 Y 为吸光度; X 为多酚质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(2) 样品测定: 取制备好的莲子心乙醇提取液 1 mL, 按照标准曲线的测定方法, 测定 765 nm 处吸光度。计算莲子心中多酚含量, 以 100 g 样品中所含没食子酸的毫克数表示($\text{mg}/\text{GA eq}/100 \text{ g}$)。

1.3.7 体外抗氧化能力的测定

1.3.7.1 清除 DPPH 自由基的测定

将不同浓度莲子心提取液 100 μL 加到 96 孔透明板中, 加入 100 μL 、0.2 mM 的 DPPH 溶液。以提取液与甲醇混合为空白组, DPPH 与甲醇混合为对照组, 室温避光放置 30 min 后, 测定 517 nm 吸光度值。DPPH 自由基清除率按下式计算:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} (\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \right) \times 100\%$$

式中, A_1 , DPPH 溶液与样品液的吸光度值; A_2 , 样品液与提取溶剂的吸光度值; A_3 , DPPH 溶液与提取溶剂的吸光度值。

1.3.7.2 Fe^{3+} 还原能力的测定

取不同浓度莲子心提取液 0.2 mL, 加入 0.5 mL、0.2 M、pH 6.6 磷酸缓冲液和 0.5 mL、1%铁氰化钾溶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 加入 0.5 mL、10%的三氯乙酸溶液, 离心, 取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL 蒸馏水和 0.1 mL、0.1%氯化铁溶液, 混合均匀, 静置 10 min。测定 700 nm 处吸光度, 计算莲子心提取液的还原能力。

1.3.7.3 清除 ABTS⁺ 自由基的测定^[5]

用 PBS (pH=7.4) 配制 7 mM 的 ABTS 溶液, 将 7 mM 的 ABTS 和 2.45 mM 过硫酸钾等体积混匀, 在室温下避光反应 12~16 h 生成 ABTS⁺ 储备液, 使用前用 PBS 稀释到 734 nm 波长处吸光度为 0.66 \pm 0.03 的工作液。取不同浓度莲子心提取液 20 μL 加到 96 孔透明板中, 加入 150 μL 、0.2 mM ABTS⁺ 储备液, 以 PBS 作为对照, 室温下反应 10 min, 测定 517 nm 处吸光度。ABTS⁺ 自由基清除率按下式计算:

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率} (\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

式中, A_0 , ABTS⁺ 工作液与 PBS 的吸光度值; A , ABTS⁺ 工作液与样品液的吸光度值。

1.3.7.4 氧自由基吸收能力 (ORAC) 的测定^[6]

取不同浓度莲子心提取液和 Trolox 标准液 (用 pH=7.4 的 75 mM PBS 稀释) 20 μL 加到 96 孔黑色酶标板中, 加入 180 μL FL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 加入 20 μL 、119 mM 的 ABAP 溶液。以激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 测定荧光强度, 测定间隔 5 min, 连续测定 35 次。ORAC 值以 Trolox 当量表达, 单位为 $\mu\text{mol TE}/\text{g DW}$ 。

1.3.8 细胞抗氧化能力 (CAA) 的测定

1.3.8.1 细胞培养

HepG2 细胞培养于含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液 (4.5 g/L D-glucose, L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate) 中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。当细胞生长至 80%时进行传代, 传代三次待细胞稳定后, 取对数生长细胞进行试验。

1.3.8.2 细胞抗氧化 (CAA) 活性实验^[7]

在 96 孔板中分别接种 5×10^4 个 HepG2 细胞, 用 100 μL 完全培养基培养 24 h。去除培养液并用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 PBS 冲洗。样品用 25 μM 的 DCFH-DA 稀释成不同浓度, 细胞加样后培养 1 h。加入 100 μL 、600 μM ABAP, 以激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 测定荧光强度, 测定间隔为 5 min, 连续测定 1 h。CAA 值为每 100 g 干物质 (DM) 相当于 quercetin 的量, 单位为 $\times 10^{-2} \mu\text{mol QE}/\text{g DM}$ 。

1.3.9 结果分析

所有实验均重复 3 次, 各实验数据均以平均值 \pm 标准差表示, 数据采用 SPSS 20.0 软件进行处理, 各组间两两比较采用 SNK-q 检验, $p < 0.05$ 表示组间比较差异显著。

2 结果与讨论

2.1 莲子心粒度测定结果

超微粉碎是一种动态的不断破损、不断聚集的过程, 由图 1 可知, 超微粉碎莲子心的粒径在 17~40 μm 之间, 中位粒径 D_{50} 为 20.12 μm ; 机械粉碎莲子心的粒径在 316~478 μm 之间, 中位粒径 D_{50} 为 198.14 μm ; 与机械粉碎相比莲子心超微粉碎后平均粒径降低达

9.85 倍, 粒径范围相对集中, 分布较均匀, 比表面积增加。这些特征表明其分散性、溶解度和流动性的提高。

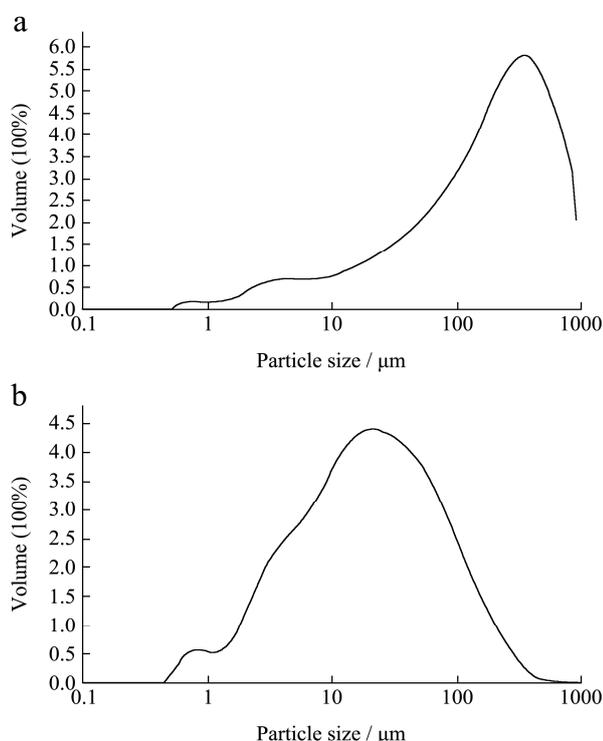


图1 莲子心粒径分布图(a)机械粉碎, (b)超微粉碎

Fig.1 Particle size distribution of lotus plumule treated with (a) mechanical grinding and (b) ultrafine grinding.

2.2 莲子心微观形态观察

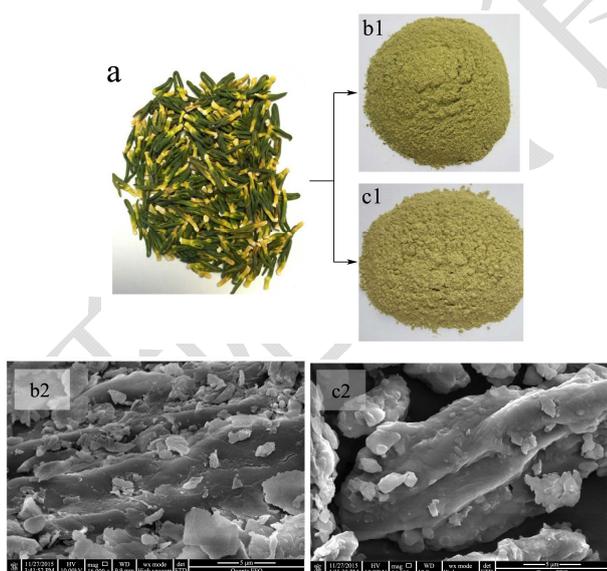


图2 机械粉碎与超微粉碎粒莲子心电镜扫描图

Fig.2 SEM images of lotus plumule samples treated by mechanical grinding (b) and ultrafine grinding (c)

注: a, 莲子心; b1, 机械粉碎样品粉末; b2, 机械粉碎样品 SEM 图; c1, 超微粉碎粉末; c2, 超微粉碎样品 SEM 图。

图2为机械粉和超微粉于16000倍电镜扫描图, 由图2b2可知, 莲子心机械粉存在较大组织碎块, 细胞结构相对完整且表面光滑, 有一定的破损, 而超微莲子心细胞破损严重, 表面粗糙, 几乎看不到完整的细胞结构和组织碎片(如图c2), 所以有助于莲子心多酚等活性物质的溶出。

2.3 超微粉碎对莲子心提取液多酚及黄酮含量的影响

多酚, 黄酮类物质具有很强的抗氧化和抗癌活性, 在食品医药中具有广泛的应用。其提取率不仅与溶剂种类、溶剂用量、提取时间与提取温度等条件有关而且与物料的粉碎粒度有关。超微粉碎可使植物细胞破壁率达95%, 植物细胞经超微粉碎后, 不仅破坏细胞之间的胞间层, 而且将细胞打碎, 粉碎后得到植物颗粒的粒径可以达到几十微米, 更有助于植物细胞活性成分的溶出。由表1可以看出, 超微粉碎莲子心提取液多酚和黄酮含量均显著高于机械粉碎。超微粉碎莲子心提取液多酚和黄酮含量分别为13.6633 mg/GA eq/g DW 和10.9690 /RU eq/g DW, 而机械粉碎莲子心提取液多酚和黄酮含量分别为10.3634 mg/GA eq/g DW 和8.6136 mg/RU eq/g DW。超微粉碎能促使植物细胞的破碎, 有助于莲子心多酚和黄酮等活性物质的溶出。代红飞等人^[8]的研究结果显示莲子心超微粉碎黄酮和多酚含量分别为8.1700 mg/RU eq/g DW 和2.6200 mg/GA eq/g DW, 本实验无论总黄酮还是多酚含量较之有很大的提高, 这可能与超微粒径大小不同, 导致莲子心中活性成分的溶出量不同, 此外和莲子心样品种类和提取条件也有一定的关系, 但总的来看, 超微粉碎均比机械粉碎显示出更高的活性成分溶出率。

表1 机械粉碎与超微粉碎粒莲子心中多酚与黄酮含量
Table 1 Total phenolic and total flavonoid contents of lotus plumule samples treated by mechanical grinding and ultrafine grinding (Mean±SD, n=3)

处理方法	总黄酮含量 /(×10 ⁻² mg/g DW)	多酚含量 /(×10 ⁻² mg/g DW)
机械	861.36±0.04	1036.34±0.08
超微	1096.90±0.05*	1366.33±0.07*

注: 与机械粉碎相比, *: p<0.05。

2.4 抗氧化活性

单一的抗氧化方法不足以评价莲子心活性物质的抗氧化能力, 虽然这些方法存在着相同的地方, 都以

反应中发生电子转移为基础,以此来反映物质的抗氧化能力,多种方法的共同使用才能更有效的评价莲子心在不同的方面的抗氧化能力。

2.4.1 莲子心提取液对 DPPH·的清除效果

DPPH·作为一种稳定自由基被广泛用于检测生物试样和食品的抗氧化能力,其褪色程度与抗氧化剂含量成定量关系,因而可用分光光度计进行快速的定量分析。

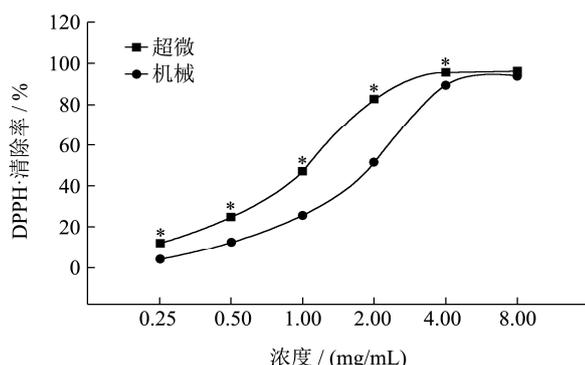


图3 不同处理方式的莲子心对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.3 DPPH radical scavenging activity of lotus plumule samples treated by different methods

由图3可知,超微粉碎和机械粉碎莲子心提取液对 DPPH·都有很强的清除能力。随着莲子心提取液浓度的增加,对 DPPH·的清除率逐渐增大,半抑制浓度 IC₅₀ (指对 DPPH 自由基清除率达到 50%时所需样品的浓度)分别为 1.16 mg/mL 和 2.15 mg/mL。这与代洪飞^[8]报道的莲子心超微粉清除率相比,显示出更强的清除效果。一方面可能与莲子心的粒径大小有关,从而导致了黄酮、多酚类等抗氧化物质的溶出率提高;另一方面莲子心的超微粉本身可能是一种自由基抑制剂^[9],能与 DPPH 自由基发生简单的氧化还原反应,从而达到清除 DPPH 自由基的目的。

2.4.2 莲子心提取液还原力的测定

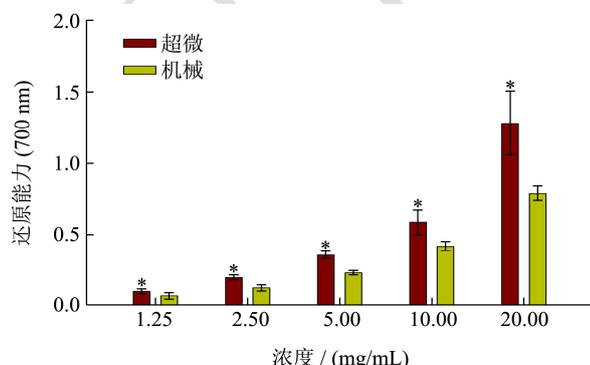


图4 不同粉碎方式的莲子心的还原力

Fig.4 Reducing power ability of lotus plumule samples treated by different grinding methods

样品还原力的测定是根据本身的还原作用,给出

电子而清除自由基的,样品作为一种还原剂,还原能力越强,抗氧化能力越强,反之越弱。通过测定样品的还原能力,可以用来评价莲子心样品的抗氧化能力,从而间接反应莲子心中抗氧化成分的溶出率,进而评价两种粉碎方式的好坏。

图4显示了不同质量浓度下超微粉碎和机械粉碎莲子心提取液还原能力的强弱,相同浓度下超微粉碎莲子心提取液的还原力明显高于机械粉碎,随着莲子心提取液浓度的升高,还原能力也逐渐升高。当浓度达到 20 mg/mL 时,超微粉碎莲子心还原力为机械粉碎的 1.63 倍,相关文献报道样品的还原能力强弱与样品中所含的多酚类物质呈正相关性^[9],本实验中,超微莲子心提取液总酚的含量达到 13.6633 mg/g DW,而机械粉碎莲子心总酚含量为 10.3634 mg/g DW。超微粉碎莲子心的还原能力强于机械粉碎,进而说明,超微粉碎更有利于莲子心中多酚等抗氧化物质的溶出。

2.4.3 莲子心提取液对 ABTS⁺自由基的清除

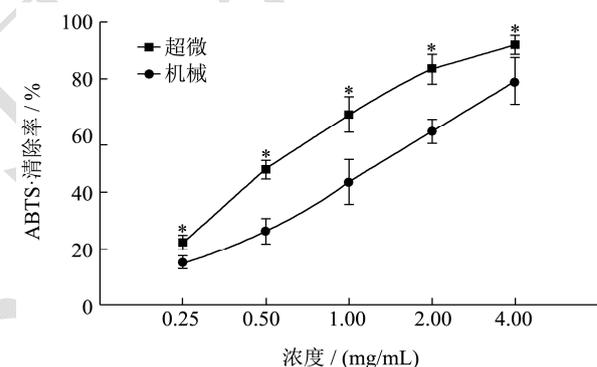


图5 不同粉碎方式的莲子心对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.5 ABTS radical scavenging activity of lotus plumule samples treated by different grinding methods

由图5可知,莲子心提取液的 ABTS⁺清除能力与浓度呈正相关性,即随着提取液浓度的增加,清除率逐渐升高,而超微粉碎莲子心提取液的 ABTS⁺清除率明显高于机械粉碎,且随着浓度的增大二者的清除能力差别明显,在浓度为 0.25 mg/mL 时,超微粉碎莲子心提取液的清除率为 22.46%,机械粉碎为 15.34%,当浓度达到 2 mg/mL 时,超微粉碎莲子心提取液的清除率为 83.24%,而机械粉碎的清除率只有 61.43%,二者的清除能力差异显著。当达到 4 mg/mL 时,差距缩小为 11.91%,这可能是由于提取液浓度的增大,超微粉碎和机械粉碎莲子心中的活性成分含量都很高,逐渐趋于清除极限,因此差异逐渐减小。超微粉碎莲子心提取液的 ABTS⁺自由基的清除能力明显优于机械粉碎,这与杨丽报道^[10]的超微粉碎葡萄籽与 ABTS⁺自由基清除无相关性相反,一方面与样品不同的有关,

另一方面与多酚的形态有关,因为之前文献报道^[11]超微粉碎后游离多酚类物质具有很强的 ABTS⁺自由基清除能力,而结合多酚并无明显变化。

2.4.4 莲子心提取液对氧自由基的清除能力

ORAC 的抗氧化能力评价是通过自由基通过氢原子转移反应氧化荧光探针,使荧光强度产生变化,荧光强度的变化大小反应自由基的破坏的程度。抗氧化剂可有效的阻止自由基产生荧光变化,抑制程度反应了对自由基的抗氧化能力^[12]。ORAC 方法对抗氧化剂评价具有较高的特异性,反应了样品的总抗氧化能力,结果以 Trolox 的当量表示。之前文献大多集中在对莲子心对羟自由基、超氧阴离子自由基,过氧化氢自由基的清除的报道,而 ORAC 法评价莲子心的抗氧化能力未见报道,图 4 为莲子心提取液的氧自由基清除能力,无论是超微还是机械粉碎莲子心样品均显示出很强的氧自由基清除能力,这与 DPPH·, FRAP 表达的结果是一致的,这与莲子心本身含有大量的多酚、黄酮类物质有关,另一方面,超微粉碎莲子心的氧自由基吸收能力达到了 1437.65 $\mu\text{mol TE/DM}$,机械粉碎的吸收能力达为 879.32 $\mu\text{mol TE/DM}$,明显低于超微粉碎,由此可见超微粉碎莲子心在抗氧化能力方面远远强于机械粉碎,进一步证实超微粉碎能促使莲子心中抗氧化物质的溶出。

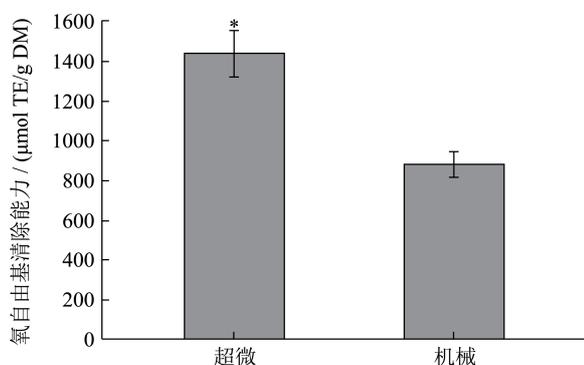


图 6 不同粉碎方式的莲子心对氧自由基的清除

Fig.6 ORAC values of lotus plumule samples treated by different grinding methods

2.4.5 莲子心提取液的细胞抗氧化能力

由于体外化学抗氧化评价方法反映的是受试物对于各种氧化物的直接清除能力,而受试物在细胞水平上吸收、分布、代谢的情况不可能在化学评价体系下得到体现。细胞是生物体内发生氧化应激的基本场所,受试物在细胞水平所表现出的抗氧化能力更具有生物学意义^[13]。为进一步验证莲子心的抗氧化能力和抗氧化机理,采用细胞抗氧化(CAA)法测定其细胞抗氧化能力。

图 5 为莲子心的细胞抗氧化活性,结果用斛皮素

当量(Quercetin Equivalents)表示。超微粉碎和机械粉碎莲子心均表现出较高的细胞抗氧化能力,超微粉碎莲子心的细胞抗氧化能力为 2.4167 $\mu\text{mol QE/g DW}$,机械粉碎莲子心的细胞抗氧化能力为 1.6574 $\mu\text{mol QE/g DW}$,超微粉碎莲子心的细胞抗氧化能力明显高于机械粉碎。由于超微粉碎更有利于莲子心细胞膜的破碎,使细胞内抗氧化活性物质的释放增加,可与 ROS 和 ROO·结合,防止 DCFH 氧化成 DCF,使得细胞的荧光性减弱,从而抑制细胞氧化。比起体外化学实验,细胞抗氧化实验模型能够更好地模拟复杂的生物系统,适用于筛选具有潜在体内抗氧化活性的食物、膳食补充剂和植物化学物。Song^[14]等比较研究了 27 种常见蔬菜的细胞抗氧化效果,发现甜菜的 CAA 值为 $(41.90 \pm 6.20) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$; 红辣椒的 CAA 值为 $(41.40 \pm 1.80) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$; 茄子的 CAA 值为 $(37.90 \pm 2.40) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$; 西兰花的 CAA 值为 $(30.40 \pm 3.00) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$; 卷心菜 CAA 值为 $(21.00 \pm 2.40) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$; 菠菜的 CAA 值为 $(10.60 \pm 0.60) \times 10^{-2} \mu\text{mol QE/g DW}$ 等,可以看出莲子心的细胞抗氧化活性比大多数常见的蔬菜都强。

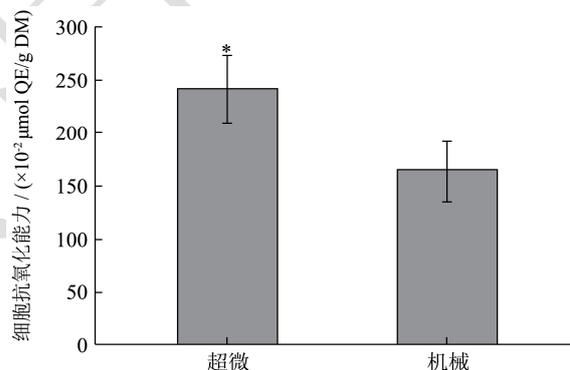


图 7 不同粉碎方式的莲子心细胞抗氧化能力

Fig.7 Cellular antioxidant activities of lotus plumule samples treated by different grinding methods

3 结论

莲子心超微粉碎后中位粒径降低,粒径范围相对集中,分布较均匀,比表面积增加,改变了许多莲子心的理化性质,同时提高了活性物质如多酚、黄酮的溶出率,通过还原能力、DPPH、ABTS 与氧自由基清除能力测定莲子心提取液的抗氧化能力,与机械粉碎莲子心提取液相比,超微粉碎莲子心提取液表现出更强的抗氧化活性。研究以 HepG₂ 人肝癌细胞为对象,分析莲子心的细胞抗氧化(CAA)能力,结果表明,莲子心具有很强的细胞抗氧化活性,其 CAA 值为超微粉碎莲子心的细胞抗氧化能力高达 2.4167 $\mu\text{mol QE/g DW}$,机械粉碎莲子心的细胞抗氧化能力为 1.6574

$\mu\text{mol QE/g DW}$ 。本文对进一步从莲子心中分离提取抗氧化活性物质及深入研究超微粉碎技术具有指导意义,也为合理开发利用莲子心提供了科学依据。

参考文献

- [1] 蔡定建,柳茶花,钟鸿鸣,等.莲子心中黄酮类物质的提取和测定[J].中国酿造,2010,1:132-135
CAI Ding-jian, LIU Cha-hua, ZENG Hong-ming, et al. Extraction and determination of flavonoid from plumule *Nelumbinis* [J]. China Brewing, 2010, 1: 132-135
- [2] 曾绍校,林志钦,陈玲,等.莲子心总黄酮的大孔吸附树脂纯化及其抑菌活性[J].福建农林大学学报(自然科学版),2013,42(6): 660-664
ZENG Shao-xiao, LIN Zhi-qin, CHEN Ling, et al. Macroporous resin purification and bacteriostasis of total flavonoids from lotus-seed plumule [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2013, 42(6): 660-664
- [3] 郭武汉,关二旗,卞科.超微粉碎技术应用研究进展[J].粮食与饲料工业,2015,5:38-40
GUO Wu-han, GUAN Er-qi, BIAN Ke. Review on application of superfine grinding technology [J]. Cereal and Feed Industry, 2015, 5: 38-40
- [4] Xiao-yan Zhao, Zai-bin Yang, Guo-sheng Gai, et al. Effect of superfine grinding on properties of ginger powder [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 91(2): 217-222
- [5] 白海娜,王振宇,刘瑞海,等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014,30(3): 64-68
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, LIU Rui-hai, et al. Synergistic ABTS radical scavenging activity of resveratrol with *Auricularia auricular* Polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 64-68
- [6] Lauren Renee Brewer, Jittawan Kubola, Sirithon Siriamornpun, et al. Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 483-490
- [7] Shumin Liu, Huihua Huang. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 1095-1105
- [8] 代红飞,傅茂润,曲清莉.超微粉碎对莲子理化性质和抗氧化活性的影响[J].食品安全质量检测学报, 2015,6(3): 787-793
DAI Hong-fei, FU Mao-run, QU Qing-li. Effects of superfine grinding on physicochemical characteristics and antioxidant activity of lotus plumule [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(3): 787-793
- [9] Ke-xue Zhu, Sheng Huang, Wei Peng, et al. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 943-948
- [10] 杨丽,袁春龙,马婧,等.不同粉碎条件的葡萄籽超微粉功能性成分及抗氧化性研究[J].食品工业科技,2014,35(20): 178-181
YANG Li, YUAN Chun-long, MA Jing, et al. Study on effect of milling conditions on the functional components and antioxidant capacity of grape seeds superfine powder [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 178-181
- [11] 蔡亭,汪丽萍,刘明,等.超微粉碎对苦荞多酚及抗氧化活性的影响研究[J].中国粮油学报,2015,30(10):95-99
CAI Ting, WANG Li-ping, LIU Ming, et al. The influence of micronization on polyphenols and antioxidant activity of buckwheat powder [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(10): 95-99
- [12] 周端,刘淑敏,黄惠华.发酵程度不同的茶浸提液抗氧化能力比较及茶多酚细胞抗氧化活性研究[J].食品科技,2014,39(9):216-222
ZHOU Duan, LIU Shu-min, HUANG Hui-hua. Comparative study on anti-oxidant capacity of extracts prepared from differently-fermented tea and the cellular antioxidant activity assay of tea polyphenol [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(9): 216-222
- [13] 张迪,籍保平,周峰,等.食品体外抗氧化能力评价方法探讨[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(1):20-25
ZHANG Di, JI Bao-ping, ZHOU Feng, et al. Advances in antioxidant activity assessment assays for food [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012, 30(1): 20-25
- [14] Wei Song, Christopher M Derito, M Keshu Liu, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 6621-6622