

山西老陈醋生产过程中挥发性提取物的 抗氧化活性分析

朱宏¹, 张彩¹, 任长忠², 李再贵¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083) (2. 吉林省白城市农业科学院, 吉林白城 137000)

摘要: 本文研究了山西陈醋在酒精发酵, 醋酸发酵和熏醅开始和结束时的挥发性成分, 并采用 DPPH 自由基清除率法, 醛/酸法 (ACA 法) 和 HepG2 细胞氧化损伤模型来评价其抗氧化活性。DPPH 法结果表明, 陈醋挥发性提取物具有清除 DPPH 自由基能力, 并且呈明显的剂量依存关系。醋酸发酵开始时的提取物达到最高的清除率 (93.02%), 其次为熏醅结束时 (86.52%)。ACA 法结果表明, 挥发性提取物具有抑制己醛氧化的能力。熏醅结束时提取物抑制己醛氧化的能力最强, 其次为醋酸发酵开始和结束时的提取物。除熏醅开始样品外, 其他老陈醋挥发性提取物对 HepG2 细胞氧化损伤无保护作用, 甚至成为促氧化物。结果表明, 山西老陈醋挥发性提取物有较强的体外抗氧化活性, 但是对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用微弱。

关键词: 山西老陈醋; 挥发性物质; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)10-131-137

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.021

Determination of Antioxidant Activities of Volatile Extracts from Shanxi Aged Vinegar during Production

ZHU Hong¹, ZHANG Cai¹, REN Chang-zhong², LI Zai-gui¹

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. Engineering and Technology Research Center of Oats, Baicheng Academy of Agricultural Sciences, Baicheng 137000, China)

Abstract: The volatile extracts of Shanxi aged vinegar (SAV) from alcoholic fermentation, acetic acid fermentation, and thermal processing were determined, and their antioxidant activities were investigated by DPPH assay, aldehyde/carboxylic acid assay, and cellular assay. The results of DPPH assays showed that SAV volatile extracts exhibited high and dose-dependent antioxidant activity. The highest antioxidant activity was obtained at the beginning of acetic acid fermentation, followed by that measured at the end of thermal processing. The aldehyde/carboxylic acid assay also demonstrated relatively high and dose-dependent antioxidant activity in SAV volatile extracts, with the highest antioxidant activity observed at the end of thermal processing. The levels of reactive oxygen species increased during the cellular assay, indicating that SAV volatile extracts became pro-oxidant in HepG2 cells. These results suggested that SAV volatile extracts showed strong *in vitro* antioxidant activities, but minimal *in vivo* antioxidant activities.

Key words: Shanxi aged vinegar; volatile compounds; antioxidant

山西老陈醋是中国四大名醋之一, 由固体发酵工艺制成。固体发酵是自发的微生物发酵过程, 包括两个连续的阶段-酒精发酵和醋酸发酵。首先, 原料 (本实验为苦荞麦) 蒸煮半小时, 冷却后与大曲混合。混合物放入密封的地缸中, 进行酒精发酵。十天左右的酒精发酵后, 将混合物与小麦、小米等谷物的麸皮混

收稿日期: 2015-10-01

基金项目: 现代农业产业技术体系 (CARS-08-D-03)

作者简介: 朱宏 (1988-), 男, 博士生, 研究方向: 山西老陈醋挥发性物质

通讯作者: 李再贵 (1964-), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向: 谷物科学

与利用

合。并接入少量经过醋酸发酵的醋醅, 开始醋酸发酵。约九天的醋酸发酵结束后, 进行山西陈醋的特有加工工艺过程-熏醅。即醋醅放入大缸中, 加热六天, 温度保持在 85 °C 左右。在苦荞山西老陈醋中已发现了 45 种挥发性物质, 包括酸类、醛类、吡嗪类、酮类、酯类、醇类等。其中, 乙酸、呋喃、四甲基吡嗪、乙酸乙酯、2,3-丁二酮、3-羟基-2-丁酮、三甲基吡嗪的含量较高^[1]。

近年来对食品和植物中挥发性物质的研究受到重视, 因为这类物质可以作为新型的抗氧化活性物质^[2]。研究证明, 植物 (如豆子)、发酵产品 (如乌龙茶和啤

酒)的挥发性提取物具有抗氧化活性^[2-4]。抗氧化活性可能来自杂环类化合物,包括吡咯、呋喃、噻吩、噻唑以及含有双键的烷烃类物质^[4]。山西老陈醋具有独特的香气,同时具有良好的生理功能活性。例如,山西老陈醋的甲醇提取物被认为具有抗血栓的功能^[5]。其风味物质与老陈醋整体抗氧化活性相关,包括2,3-二甲基吡嗪、糠醛、2-乙酰基呋喃、苯甲醛和5-甲基呋喃^[6]。但是,山西老陈醋挥发性物质抗氧化活性的研究尚未见报道。

评价挥发性提取物抗氧化活性的方法,主要包括DPPH自由基清除率法、醛/酸法(Aldehyde/carboxylic acid assay, ACA法)和细胞法。其中,ACA法是专门评价抗氧化物质抑制食品贮藏期间氧化反应的能力,已广泛应用于评价植物或食品挥发性提取物的抗氧化能力^[2]。相比化学评价法,细胞法更加真实的模拟了抗氧化物质在生物体内的抗氧化能力^[7]。细胞法原理是分析细胞内氧化自由基(Reactive oxygen species, ROS)水平的变化情况。本文使用过氧化氢刺激细胞产生氧化应激,采用探针DCFH-DA测定ROS水平。探针被ROS氧化后产生荧光,荧光信号的强弱由流式细胞仪测定。荧光信号越强,说明ROS水平越高。

本研究采用同时蒸馏萃取法提取苦荞山西老陈醋酒精发酵、醋酸发酵和熏醅开始和结束时的挥发性成分,采用DPPH法、ACA法和细胞法评价挥发性提取物的抗氧化活性。目的是评价苦荞山西老陈醋在生产过程中挥发性物质的抗氧化活性。由于老陈醋功能性的研究都针对其非挥发性成分,本文旨在为山西老陈醋功能性评价提供一种新的思路,并为优化产品品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

分别在以苦荞为主要原料生产山西老陈醋的酒精发酵、醋酸发酵和熏醅的第1 d和最后1 d结束后采样。样品编号依次为:ALI、ALF、ACI、ACF、TI和TF。样品均来自山西紫苑微生物研发有限责任公司。

挥发性物质标准品:乙酸,3-甲基丁酸,己酸,丙酸,丁酸,戊酸,糠醛,5-甲基糠醛,苯甲醛,苯乙醛,乙酸乙酯,戊酸乙酯,乙酸苯乙酯,十四酸酯,苯甲醇, β -苯乙醇,2,3-丁二酮,3-羟基-2-丁酮,2,3,5-三甲基吡嗪,四甲基吡嗪,二甲基三硫醚,苯乙烯,苯并吡唑,三甲基恶唑和苯,酚购自上海Sigma-Aldrich公司。己醛,二甲基亚砜(DMSO),2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)购买自

上海Sigma-Aldrich公司。内标:正辛醇和十一烷,亦购自上海Sigma-Aldrich公司。超纯水由Milli-Q (Millipore, Billerica, MA USA)净化系统中制得。二氯甲烷,氯化钠和无水硫酸钠购自北京化学试剂公司。

1.2 同时蒸馏萃取法提取挥发性成分

参考Lee^[4]的方法,略有修改(装置如图1)。将50 g样品、5 g NaCl和250 mL蒸馏水加入烧瓶(A),40 mL二氯甲烷放入烧瓶(B)。60 °C蒸馏6 h。提取液中加入过量无水硫酸钠,冷藏过夜后,旋转蒸发至约2 mL。转移至离心管中,氮吹至0.6 mL,即为挥发性提取物。平行测定3次。

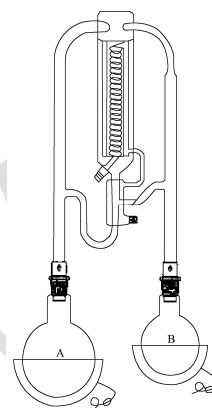


图1 同时蒸馏萃取装置

Fig.1 Simultaneous distillation-extraction apparatus

1.3 GC-MS 测定

挥发性物质采用安捷伦 6890-5975 气相色谱质谱联用仪测定。色谱柱为 DB-WAX (30 m \times 0.25 mm \times 0.25)。载气为高纯氦(1.2 mL/min)。升温程序:初温40 °C,保持5 min,以10 °C/min的速度升温至105 °C并保持1 min。再以5 °C/min的速度升温至230 °C,保持5 min。四极杆,离子源和质谱接口温度分别为150、230和250 °C。溶剂延迟为3 min。每个样品测定3次。

1.4 抗氧化活性的评价

DPPH法,将不同浓度的挥发性提取物(5、10、25、50 mg/mL)加入到1 mL配制好的DPPH甲醇溶液(6×10^{-5} M)中,立即振荡混匀后室温静置30 min。在517 nm处测定吸光度值。以2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)作为对照物质,每组3个平行。自由基清除率由下式计算得到:

$$\text{清除率} = [(A_B - A_A) / A_B] * 100\%$$

式中 A_B 为空白吸光度值($t=0$ min); A_A 为样品吸光度值($t=30$ min)。

ACA 法参照 Yanagimoto 的操作方法^[2], 略有改动。不同浓度的挥发性提取物(625、1250、2500 和 5000 $\mu\text{g/mL}$)加入到己醛的二氯甲烷溶液(3 mg/mL)中。再加入终浓度为 0.2 mg/mL 十一烷作内标。将此溶液体系封闭于离心管中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后, 在室温下贮藏 5 周。贮藏的第 1 周, 每天在离心管的顶空中注入流速为 1.5 L/min 的新鲜空气 3 s。以新配制的己醛溶液为空白, BHT 为对照物质。结果以剩余己醛的百分含量表示。己醛含量采用气相色谱测定, 气相条件亦参考 Yanagimoto 的方法^[2]。

挥发性提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。HepG2 细胞株培养: 25 cm^2 培养皿, DMEM 培养基(含 10%胎牛血清 和 1%青-链双抗), 培养条件: 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温。HepG2 细胞(10^5 个/ mL)加入六孔板中培养 24 h。将 1.2 方法中获得的挥发性提取物溶解在培养基后(终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$), 加入六孔板, 24 h 后去除。为测定 HepG2 细胞中的 ROS, 使用终浓度 25 μm 的探针(DCFH-DA)浸润细胞 30 min 后清洗。加入 500 μm H_2O_2 培养 2 h, 诱导细胞产生 ROS。产生的 ROS 将 DCFH-DA 氧化成为 DCF。离心细胞液(2000 r/min , 5 min), 收集沉淀, 加入 1 mL PBS。细胞中 DCF 的荧光信号采用流式细胞仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司)测定。测定条件为: 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 过滤器: 520/20 nm; 每次计数 1×10^4 个细胞。

1.5 数据处理

数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 数据间的比较采用 Duncan 模型进行显著性分析, 显著性水平为 $p < 0.05$, 作图采用 Origin 8 软件。

2 结果与讨论

2.1 挥发性成分提取和测定

表 1 为老陈醋在酒精发酵、醋酸发酵和熏醋三个阶段开始和结束时样品的挥发性物质组成。共发现 32 种挥发性物质, 包括酸(7 种)、醛(5 种)、酯(5 种)、醇(6 种)、酮(2 种)、吡嗪类(2 种)等。其中 25 种挥发性物质通过定性分析得到鉴定。醇类是酒精发酵阶段的主要产物。总醇类和总酯类含量在酒精发酵期间明显上升。其中, 乙酸乙酯、乙醇和 3-甲基丁醇的含量上升最大。醋酸发酵过程中产生了丰富的酸类。乙酸的含量最高, 其次为 3-甲基丁酸。醇类的含量随着醋酸发酵的进行而显著降低。酒精发酵中产生的大量醇类物质, 尤其是乙醇, 作为底物与酸反应生产了丰富的酯类。除酸类外, 山西老陈醋中酯类的含量远高于其它挥发性组分。此外, 醋酸发酵过程中还产生了一部分羰基化合物, 如醛类和酮类等。在醋酸发酵结束的时候, 大部分挥发性物质含量已经达到峰值。糠醛在熏醋期间快速升高, 同时大量的吡嗪类物质也产生于此阶段。

表 1 山西老陈醋酒精发酵、醋酸发酵和熏醋开始及结束的挥发性物质含量 ($\times 10^{-2}$ $\mu\text{g/g}$ 醋醋)

Table 1 Content of volatile compounds from Shanxi aged vinegar during alcoholic fermentation, acetic acid fermentation, and thermal processing ($\times 10^{-2}$ $\mu\text{g/g}$ sample)

No.	物质	ALI	ALF	ACI	ACF	TI	TF
酸							
1	乙酸*	n.d.	37.30 \pm 2.24 ^e	85.38 \pm 4.27 ^d	2430.17 \pm 25.81 ^a	379.50 \pm 2.02 ^b	163.50 \pm 0.87 ^c
2	2-甲基丁酸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	3-甲基丁酸*	0.23 \pm 0.01 ^e	1.25 \pm 0.08 ^e	9.02 \pm 0.63 ^d	39.95 \pm 2.80 ^b	27.53 \pm 0.96 ^c	163.50 \pm 5.73 ^a
4	己酸*	4.09 \pm 0.25 ^e	1.26 \pm 0.08 ^f	5.11 \pm 0.26 ^c	4.77 \pm 0.24 ^d	5.49 \pm 0.13 ^b	14.67 \pm 0.37 ^a
5	丙酸*	n.d.	n.d.	2.19 \pm 0.11 ^c	5.20 \pm 0.26 ^a	4.55 \pm 0.11 ^b	1.98 \pm 0.05 ^e
6	丁酸*	n.d.	n.d.	n.d.	1.76 \pm 0.11 ^b	1.54 \pm 0.05 ^b	12.76 \pm 0.40 ^a
7	戊酸*	n.d.	n.d.	n.d.	1.96 \pm 0.12 ^b	2.19 \pm 0.07 ^a	1.97 \pm 0.06 ^b
	酸总量	4.32 \pm 0.14 ^f	39.81 \pm 1.20 ^e	101.7 \pm 2.64 ^d	2483.76 \pm 14.67 ^a	420.80 \pm 3.35 ^b	358.38 \pm 7.48 ^c
醛							
8	3-甲基丁醛	n.d.	1.80 \pm 0.09 ^d	5.16 \pm 0.31 ^c	n.d.	95.73 \pm 3.33 ^a	10.21 \pm 0.36 ^b
9	糠醛*	n.d.	25.08 \pm 1.50 ^c	56.02 \pm 3.36 ^b	n.d.	89.06 \pm 0.31 ^a	1.98 \pm 0.01 ^d
10	5-甲基糠醛*	n.d.	3.64 \pm 0.18 ^b	n.d.	n.d.	3.78 \pm 0.13 ^b	15.07 \pm 0.53 ^a
11	苯甲醛*	5.60 \pm 0.34 ^d	1.36 \pm 0.07 ^f	9.76 \pm 0.59 ^c	2.13 \pm 0.15 ^e	22.91 \pm 0.81 ^b	46.12 \pm 1.62 ^a

转下页

接上页							
12	苯乙醛	3.70±0.19 ^a	0.73±0.04 ^d	3.08±0.18 ^b	1.94±0.14 ^c	0.34±0.01 ^f	0.50±0.02 ^e
	醛总量	9.30±0.27 ^d	32.61±0.94 ^c	74.02±2.22 ^b	4.07±0.14 ^e	211.82±4.60 ^a	73.88±2.53 ^b
酯							
13	乙酸乙酯*	362.11±18.11 ^a	253.34±15.20 ^b	242.30±16.96 ^{bc}	179.08±12.54 ^d	168.90±5.91 ^d	237.33±8.31 ^c
14	丁二酸二乙酯	1.61±0.08 ^d	7.50±0.45 ^b	4.02±0.28 ^c	11.49±0.80 ^a	0.86±0.03 ^e	n.d.
15	戊酸乙酯*	5.36±0.32 ^c	6.08±0.36 ^a	n.d.	10.09±0.071 ^a	3.08±0.01 ^d	n.d.
16	乙酸苯乙酯*	10.93±0.66 ^b	2.80±0.17 ^d	17.10±1.03 ^a	9.12±0.64 ^c	11.11±0.39 ^b	2.41±0.08 ^d
17	十四酸酯*	4.32±0.30 ^a	0.67±0.04 ^{cd}	2.08±0.12 ^b	0.71±0.05 ^c	0.55±0.02 ^{de}	0.48±0.02 ^e
	酯总量	384.33±9.74 ^a	270.39±8.11 ^b	265.5±9.19 ^b	210.49±7.05 ^d	184.50±6.36 ^e	240.22±8.41 ^c
醇							
18	乙醇	269.51±16.17 ^b	847.61±59.33 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	3-甲基丁醇	197.88±13.85 ^b	323.66±22.66 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	正戊醇	24.00±1.44 ^a	6.38±0.38 ^b	3.03±0.18 ^c	n.d.	n.d.	2.13±0.07 ^d
21	丁二醇*	1.02±0.05 ^c	11.22±0.67 ^b	0.63±0.04 ^c	13.10±0.92 ^a	n.d.	n.d.
22	苯甲醇*	0.98±0.06 ^b	0.21±0.01 ^f	0.57±0.04 ^d	0.35±0.02 ^e	0.70±0.02 ^c	0.169±0.05 ^a
23	β-苯乙醇*	17.02±0.85 ^c	71.47±3.57 ^a	15.27±0.92 ^d	29.70±2.08 ^b	5.68±0.20 ^e	2.68±0.09 ^f
	醇总量	510.41±16.21 ^b	1260.55±43.31 ^a	19.50±0.59 ^{cd}	43.15±1.51 ^c	6.38±0.22 ^d	6.5±0.22 ^d
酮							
24	2,3-丁二酮*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	61.23±2.15 ^a	34.08±1.20 ^b
25	3-羟基-2-丁酮*	3.89±0.23 ^c	2.78±0.14 ^d	n.d.	n.d.	5.69±0.16 ^b	6.95±0.20 ^a
	酮总量	3.89±0.11 ^c	3.51±0.43 ^c	n.d.	n.d.	68.32±2.31 ^a	42.98±1.40 ^b
吡嗪							
26	2,3,5-三甲基吡嗪*	n.d.	10.51±0.53 ^c	n.d.	n.d.	28.03±0.80 ^b	89.00±2.54 ^a
27	四甲基吡嗪*	1.05±0.05 ^e	28.68±1.43 ^b	5.62±0.34 ^d	3.25±0.23 ^{de}	23.66±0.83 ^c	146.50±5.13 ^a
	吡嗪总量	1.05±0.02 ^d	39.19±0.98 ^c	5.62±0.17 ^d	3.25±0.11 ^d	51.69±1.63 ^b	235.50±7.67 ^a
其他							
28	二甲基三硫醚*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.25±0.04 ^a	n.d.
29	苯乙烯	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	苯并噻唑*	0.79±0.05 ^d	0.37±0.02 ^f	0.91±0.05 ^c	1.45±0.10 ^b	0.50±0.01 ^e	2.20±0.06 ^a
31	三甲基恶唑*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.73±0.03 ^b	24.02±0.84 ^a
32	苯酚*	8.02±0.48 ^a	1.70±0.09 ^b	1.10±0.07 ^c	0.49±0.02 ^d	n.d.	n.d.
	挥发性物质总量	922.11±26.49 ^c	1648.13±54.61 ^b	468.35±14.81 ^d	2746.66±23.49 ^a	945.99±18.47 ^c	983.68±27.70 ^c

注: 1、显著性水平 $p < 0.05$, 同一行的不同小写字母表示差异显著; 2、*为与标准品在同样条件下定性比较。

2.2 DPPH 自由基清除率

当 DPPH 自由基和带有氢离子的抗氧化物质反应, DPPH 自由基被清除。溶液颜色的改变, 由紫外分光光度计测定。对照物质 BHT 浓度为 5 mg/mL 时的清除率为 89.21%。所有山西陈醋挥发性物质提取物在测试浓度下(5、10、25、50 mg/mL)均具有抗氧化活性(图 2)。除了 ALI 和 ALF, 所有提取物的抗氧化活性均呈剂量依存关系, 即提取物浓度增加, 其活性增加。在所有样品中, 浓度为 50 mg/mL 的 ACI 提取物的清除率(93.02%)最高。醋酸发酵结束时, 自由基

清除率降为 72.63%。挥发性提取物的自由基清除率在经过熏醅过程后略有升高(86.52%)。王爱莉等发现苦荞老陈醋中有 8 种挥发性物质与其 DPPH 和示差脉冲法测定的抗氧化活性相关, 包括 2-乙酰基咪唑、3-甲基-1-丁醇酯、戊酸乙酯、四甲基吡嗪、苯并噻唑、3-甲基丁酸、3-羟基-2-丁酮和苯基丙酮^[6]。本文中, 除去醋酸发酵开始样品外, 熏醅结束时样品的清除率最高。同时, 在熏醅结束时样品中, 戊酸乙酯、四甲基吡嗪、苯并噻唑和 3-甲基丁酸的含量最高。因此, 苦荞老陈醋挥发性提取物的 DPPH 清除能力可能来自这 4 种挥发性物质。然而, 醋酸发酵开始时样品 DPPH

清除能力最高的原因还需要进一步研究。这可能由于在醋酸发酵开始前, 醋醅中会添加大量的麸皮, 因为麸皮中通常含有抗氧化物质。

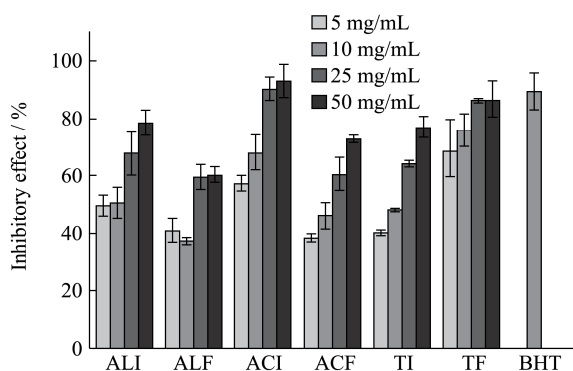


图2 山西老陈醋酒精发酵、醋酸发酵和熏醋开始及结束时挥发性提取物的DPPH 自由基清除率

Fig.2 Results of DPPH antioxidant assay on volatile extracts prepared from Shanxi aged vinegar during alcoholic fermentation, acetic acid fermentation, and thermal processing

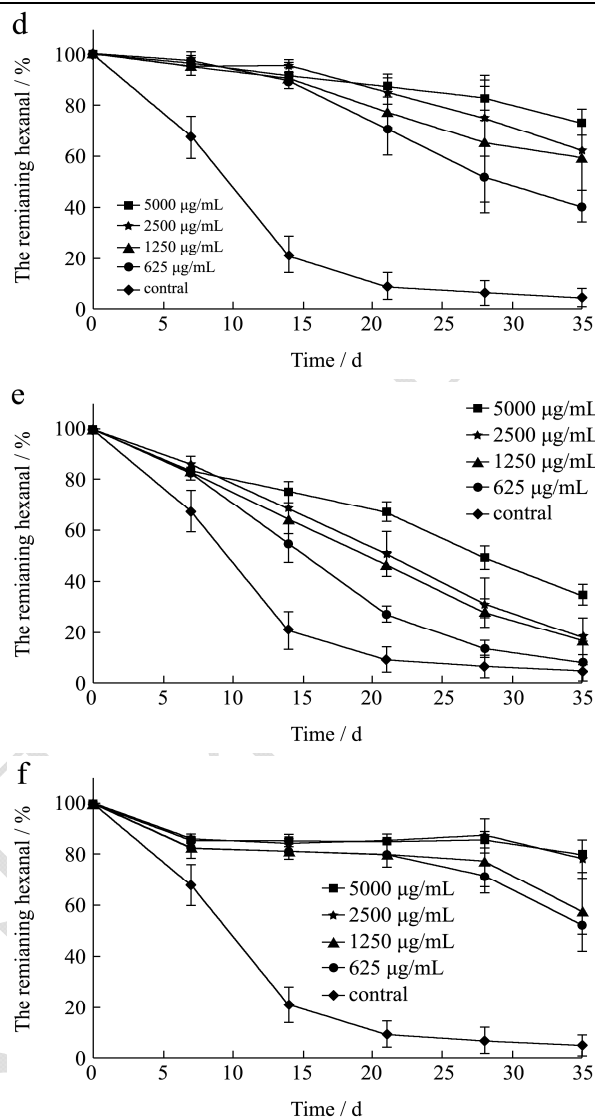
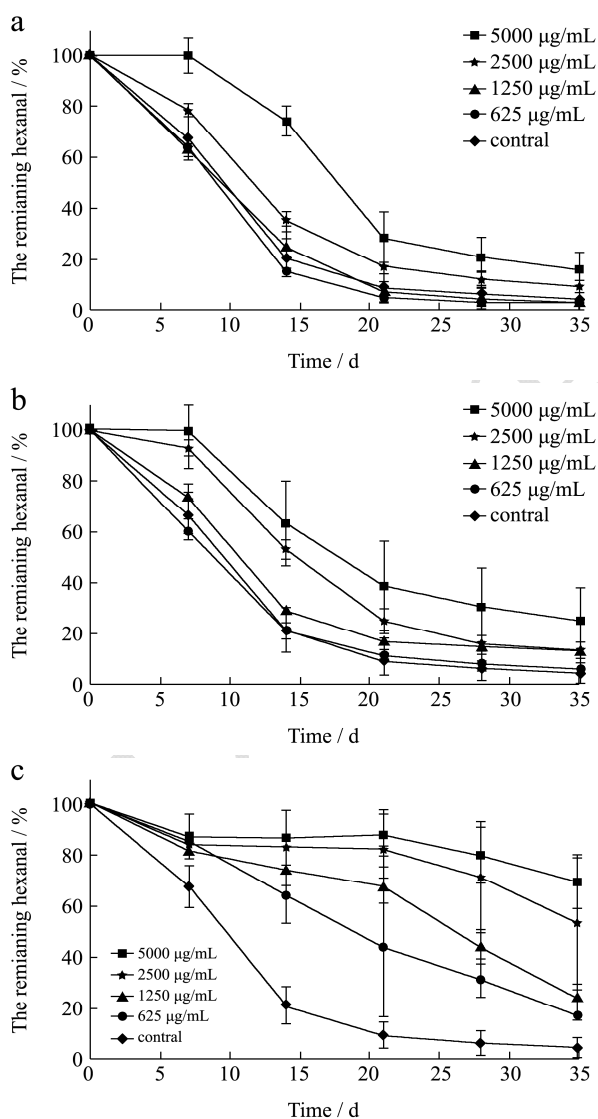


图3 山西老陈醋酒精发酵、醋酸发酵和熏醋开始及结束时挥发性提取物抑制己醛氧化的活性

Fig.3 Percentage of remaining hexanal in samples containing volatile extracts from Shanxi aged vinegar

注: a, 酒精发酵开始; b, 酒精发酵结束; c, 醋酸发酵开始; d, 醋酸发酵结束; e, 熏醋开始; f, 熏醋结束。

2.3 ACA 法测定抗氧化活性

本文为验证 ACA 法的有效性, 测定了对照物 BHT 在浓度为 625 µg/mL 时的抗氧化活性。结果显示, 5 周后己醛剩余为 97.69%, 说明此法有效。图 3 为 ACA 法测定的抗氧化活性。对照组为没有加入提取物的己醛溶液, 贮藏 35 d 后己醛几乎全部被氧化。图 3a 和 b 所示, 陈醋酒精发酵阶段的挥发性提取物有较弱的抗氧化活性。5 周后, 在加入 ALI 和 ALF 提取物的溶液体系中, 己醛几乎全部被氧化。醋酸发酵阶段提取物抗氧化活性变强 (图 3c 和 d)。5 周后, 在 ACI

和 ACF 挥发性提取物浓度为 5000 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液体系中, 均约有 70% 己醛剩余。其他浓度剂量均可在 1 周内完全抑制己醛的氧化。熏醅阶段的 2 个样品呈现不同的抗氧化性 (图 3e 和 f)。TI 的挥发性提取物的抗氧化性较弱, 与 ALF 相似。但熏醅结束时, 抗氧化活性显著升高, 超过其他样品的抗氧化活性。5 周后, 在 5000 和 2500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度梯度的溶液体系中, 己醛仍剩余 79% 以上。

ACA 法评价了豆类、炒青绿茶 (Roasted green tea) 和美拉德反应产物挥发性提取物的抗氧化活性^[2,4,8]。在添加大豆或四季豆挥发性提取物浓度为 250 $\mu\text{L/mL}$ 的体系中, 5 周后乙醛几乎没有被氧化, 说明大豆或四季豆挥发性提取物具有抗氧化活性^[4]。在添加炒青绿茶挥发性提取物浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的体系中, 10 d 内没有己醛被氧化, 说明炒青绿茶的挥发性物质具有抗氧化活性^[2]。此研究报道, 炒青绿茶的挥发性物质主要包括苯甲醇、苯甲醛、三甲基恶唑、二甲基吡嗪、三甲基吡嗪、呋喃和 3-羟基-2-丁酮等。这些挥发性成分也是苦荞山西老陈醋的主要挥发性成分。美拉德产物的挥发性提取物在浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可以使己醛在 40 天内不被氧化, 说明此提取物抗氧化活性更强^[8]。此文献提出在美拉德产物的挥发性成分中, 发现了大量的吡嗪类物质和 3-羟基-2-丁酮。老陈醋在熏醅期间, 由于持续高温加热, 也会发生美拉德反应。因此, 本文推测山西老陈醋挥发性提取物的抗氧化活性来自: 苯甲醇、苯甲醛、三甲基恶唑、3-羟基-2-丁酮、吡嗪和呋喃类物质。同时, 熏醅结束时吡嗪类物质含量显著增加导致其抗氧化活性增加。另外, 有研究认为 2-乙酰基呋喃、异戊酸酯、戊酸乙酯和苯并噻唑也与陈醋整体抗氧化活性相关^[6]。ACA 法的结果说明陈醋挥发性成分具有抗氧化活性, 可以延长山西老陈醋的货架期。

2.4 对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

图 4 为山西老陈醋挥发性提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。本实验中, HepG2 细胞中的 ROS 水平通过荧光探针 DCFH-DA 测定。该探针浸润细胞后, 可以穿过细胞膜, 但是本身不具有荧光。进入细胞膜后, 探针被细胞内的 ROS 氧化成为 DCF。DCF 是具有荧光的分子, 它在细胞内的荧光信号可以被流式细胞仪测定。荧光信号越强, 说明 ROS 水平越高。对照组的 HepG2 细胞内的 ROS 水平最低。在加入过氧化氢后, ROS 水平显著升高, 说明过氧化氢在细胞内引起了氧化应激。在所有挥发性提取物中, 只有 TI 在细胞内降低了 ROS 的水平, 表现出抗氧化活性。其

他样品均不对细胞氧化损伤具有保护作用, 甚至升高了细胞内 ROS 的水平。

研究结果表明, 老陈醋挥发性提取物没有保护 HepG2 细胞氧化损伤的作用, 甚至在细胞中成为促氧化剂。微弱的促氧化活性可能来源于挥发性提取物中, 一些可以引起细胞氧化应激的物质, 例如呋喃类物质和苯甲醛。1.9 mg/mL 呋喃类物质在细胞内可以通过降低谷胱甘肽的含量, 使 ROS 水平显著升高^[9]。研究认为, 呋喃类物质具有细胞毒性, 可以抑制细胞和微生物的增长^[10]。250 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲醛可以显著增加真核细胞内 ROS 的含量, 因为它可以使细胞内的谷胱甘肽过氧化物歧化酶失活^[11]。本实验中, 添加挥发性提取物的总浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 因此二者的添加量均低于文献报道中的含量, 故只产生了微弱的促氧化作用。另外, 老陈醋挥发性提取物中也有对细胞氧化损伤具有保护作用的物质。很多研究认为吡嗪类物质是一类功能性成分, 10 $\mu\text{g/mL}$ 四甲基吡嗪对体外血管内皮祖细胞氧化损伤有保护作用^[12]。作用机理与细胞中的硫氧还蛋白系统有关, 硫氧还蛋白可以应对多种形式的氧化应激, 为细胞提供保护^[13-14]。然而, 很难用量效关系来评价老陈醋挥发性提取物活性的变化规律。这也许因为挥发性物质之间的协同作用以及细胞内复杂的氧化还原平衡。在复杂的食品体系中, 协同或拮抗作用决定了一个物质潜在的生理活性。总体来看, 山西老陈醋挥发性提取物有微弱的促氧化作用。

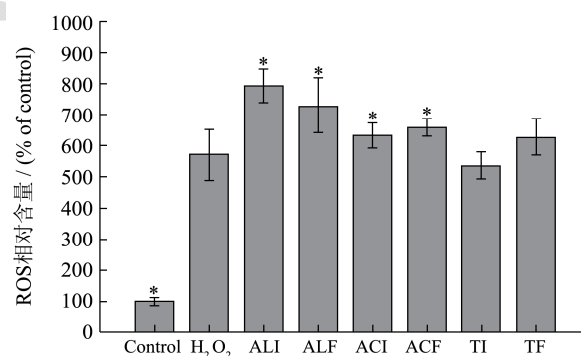


图 4 山西老陈醋酒精发酵、醋酸发酵和熏醅开始和结束时挥发性提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

Fig.4 Effect on ROS levels in the presence of H₂O₂ and volatile extracts from Shanxi aged vinegar

注: Means±SD, n=3, **p*<0.05 vs H₂O₂ 组。

3 结论

本文研究了苦荞山西老陈醋在酒精发酵、醋酸发酵和熏醅三个阶段开始和结束时的挥发性成分的抗氧化活性。DPPH 法结果表明, 挥发性提取物具有清除自由基的能力, 并且表现明显的剂量依存关系。醋酸

发酵开始时的清除率最高(93.02%),其次为熏醅结束时(86.52%)。ACA法结果表明,陈醋挥发性提取物具有抑制己醛氧化的能力,且表现剂量依存关系。熏醅结束时抑制己醛氧化的能力最强,其次为醋酸发酵(开始和结束时)。除熏醅开始样品外,挥发性提取物对HepG2细胞氧化损伤没有保护作用,甚至成为促氧化物。本文认为,山西老陈醋挥发性提取物有较强的体外抗氧化活性,但是对HepG2细胞氧化损伤的保护作用微弱。

参考文献

- [1] Wang A, Song H, Ren C, et al. Key aroma compounds in Shanxi aged tartary buckwheat vinegar and changes during its thermal processing [J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2012, 27(1): 47-53
- [2] Yanagimoto K, Ochi H, Lee K-G, et al. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(25): 7396-7401
- [3] Wei A, Mura K, Shibamoto T. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(8): 4097-4101
- [4] Lee K G, Mitchell A E, Shibamoto T. Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(10): 4817-4820
- [5] Fan J, Zhang Y, Chang X, et al. Antithrombotic and fibrinolytic activities of methanolic extract of aged sorghum vinegar [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8683-8687
- [6] Wang A, Zhang J, Li Z. Correlation of volatile and nonvolatile components with the total antioxidant capacity of tartary buckwheat vinegar: Influence of the thermal processing [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 65-71
- [7] 刘静波,刘文超,徐梦蕾,等.基于PC12细胞模型分析大豆蛋白水解物对神经元氧化损伤的保护作用[J].*现代食品科技*,2015,31(4):8-12,57
- [8] LIU Jing-bo, LIU Wen-chao, XU Meng-lei, et al. Neuroprotective effects of soybean protein isolate hydrolysates against neuronal oxidative damage in PC12 neuronal cells [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(4): 8-12, 57
- [8] Osada Y, Shibamoto T. Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems [J]. *Food Chemistry*, 2006, 98(3): 522-528
- [9] Kim D, Hahn J S. Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5069-5077
- [10] Almeida J R, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund M F, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(4): 625-638
- [11] Tabatabaie T, Floyd R A. Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1996, 141(2): 389-393
- [12] 李岚,姚玉宇,马根山,等.川芎嗪对体外血管内皮祖细胞氧化损伤的保护作用[J].*东南大学学报:医学版*,2009,28(3): 180-184
- [12] LI Lan, YAO Yu-yu, MA Gen-shan, et al. Protective effects of tetramethylpyrazine on the cultured endothelial progenitor cells following oxidative injury by hydrogen peroxide in vitro [J]. *Journal of Southeast University (Medical Science Edition)*, 2009, 28(3): 180-184
- [13] Jia J, Zhang X, Hu Y-S, et al. Protective effect of tetraethyl pyrazine against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: therapeutic time window and its mechanism [J]. *Thrombosis research*, 2009, 123(5): 727-730
- [14] Andoh T, Chock P B, Chiueh C C. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(12): 9655-9660