

β -乳球蛋白与邻苯醌类物质反应效率分析

李晓彤^{1,2}, 刘琦², 沈洁惠², 徐振林¹, 余祥英², 李琳², 李玉婷^{2*}

(1. 广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(2. 东莞理工学院食品营养健康工程与智能化加工研究中心, 化学工程与能源技术学院, 广东东莞 523808)

摘要: 乳清蛋白作为营养健康食品的重要原料或成分, 可能与多酚氧化形成的邻苯醌类物质反应, 即发生蛋白-多酚共价相互作用。乳清蛋白与邻苯醌类物质的反应效率是阐明两者反应行为的重要科学依据。以乳清蛋白主要成分 β -乳球蛋白(β -Lactoglobulin, β -LG)作为研究对象, 利用循环伏安技术研究了不同条件下 β -LG与邻苯醌类物质的反应效率。结果表明: 在pH值7.0, 扫描速率50 mV/s条件下, β -LG(0.03 mmol/L)与非黄酮型邻苯醌的反应效率顺序为: 原儿茶酸(54.72%)>咖啡酸(47.01%)>迷迭香酸(41.86%)>绿原酸(39.29%)>邻苯二酚(27.36%)>4-甲基邻苯二酚(22.51%)>原儿茶酸乙酯(19.24%), 与黄酮型邻苯醌的反应效率的顺序为: 木犀草素(19.34%)>槲皮素(14.68%)>芦丁(12.50%) \approx 儿茶素(11.97%)>表儿茶素(6.66%)。研究表明: 邻苯醌类物质的结构会影响其与 β -LG的反应效率, 醌环上含有给电子基团的邻苯醌类物质反应效率高于醌环上含有吸电子基团的邻苯醌类物质; 此外, 醌环上取代基的空间位阻会削弱邻苯醌类物质与 β -LG的反应效率。

关键词: 循环伏安; β -乳球蛋白; 邻苯醌; 反应效率

文章编号: 1673-9078(2023)06-44-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0760

Efficiency of Reaction between β -Lactoglobulin and *o*-Benzoquinones

LI Xiaotong^{1,2}, LIU Qi², SHEN Jiehui², XU Zhenlin¹, YU Xiangying², LI Lin², LI Yuting^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

Abstract: As an important raw material and component of nutritious and healthy food, interactions between whey proteins and *o*-benzoquinone, a result of polyphenol oxidation, are thought likely to affect the structure and function of the proteins. The reaction efficiency between whey proteins with *o*-benzoquinones is a useful scientific basis upon which the reaction behavior can be elucidated; thus, the reactions between β -lactoglobulin (β -LG), the main component of whey proteins, and different *o*-benzoquinones were investigated by cyclic voltammetry under different conditions. The reaction between β -LG (0.03 mmol/L) and non-flavonoid *o*-benzoquinones was thus examined under conditions of pH value 7.0 and a scan rate of 50 mV/s, resulting in the following efficiencies, in descending order: protocatechuic acid (54.72%) > caffeic acid (47.01%) > rosmarinic acid (41.86%) > chlorogenic acid (39.29%) > catechol (27.36%) > 4-methylcatechol (22.51%) > protocatechuic acid ethyl ester (19.24%), while reaction efficiencies of: luteolin (19.34%) > quercetin (14.68%) > rutin (12.50%) \approx (+)-catechin (11.97%) > (-)-epicatechin (6.66%) were obtained for flavonoid *o*-benzoquinones (0.60 mmol/L), in descending order. These results prove that *o*-benzoquinone structure affects the efficiency of the reaction with β -LG, with the reactivity of *o*-benzoquinones and β -LG weakened by electron-donating groups and strengthened by the electron-withdrawing groups on the *o*-benzoquinone rings. The steric hindrance of the *o*-benzoquinone ring substituents also reduces the reactivity.

引文格式:

李晓彤,刘琦,沈洁惠,等. β -乳球蛋白与邻苯醌类物质反应效率分析[J].现代食品科技,2023,39(6):44-52.

LI Xiaotong, LIU Qi, SHEN Jiehui, et al. Efficiency of reaction between β -lactoglobulin and *o*-benzoquinones [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 44-52.

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272320); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701727); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A151110950); 东莞理工学院引进人才科研启动专项经费项目(GC300502-36; GC300502-35); 东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)

作者简介: 李晓彤(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: lxt66@163.com

通讯作者: 李玉婷(1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: liyt@dgut.edu.cn

Key words: cyclic voltammetry; β -lactoglobulin; *o*-benzoquinones; reaction efficiency

乳清蛋白是牛奶中的一种高营养优质蛋白, 约占牛奶总蛋白含量的 20%^[1], 其由多种蛋白组分构成: β -乳球蛋白 (β -Lactoglobulin, β -LG, 约占 50%~55%)、 α -乳白蛋白、及乳铁蛋白等^[2]。乳清蛋白含有丰富的必需氨基酸, 且易被消化吸收^[3], 作为营养健康食品的重要原料或成分^[4], 在食品加工中应用广泛。

多酚类物质因其卓越的抗氧化特性, 被广泛应用于营养健康食品。具有邻苯二酚结构单元的多酚类物质在发挥抗氧化作用的同时, 自身会被氧化形成相应的邻苯醌类物质^[5-7]。邻苯醌类物质具有强亲电性, 易于与蛋白质侧链亲核基团 (如-SH、-NH₂) 发生迈克尔加成反应或席夫碱反应^[8], 即发生多酚-蛋白质共价互作, 从而影响蛋白质的结构和功能。如, 在碱性或酶催化条件下, 乳铁蛋白与表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 形成的醌反应后, 其抗氧化性及乳化稳定性均显著提高^[9]。Liu 等^[10]发现乳铁蛋白-绿原酸共价加和物比乳铁蛋白具有更好的乳化特性, 且可以增强水包油乳化体系中 β -胡萝卜素的化学稳定性。要探索邻苯醌类物质与蛋白质反应对蛋白质结构及功能的影响机制, 必须研究不同条件下两者的反应行为, 而反应效率是两者反应行为的重要科学数据。现有反应效率测定均需要先获得邻苯醌类物质, 而后再研究其与亲核物质的反应。由 4-甲基邻苯二酚 (4-Methylcatechol, 4MC) 氧化形成的 4-甲基邻苯二醌 (4-Methylbenzoquinone, 4MBQ) 因其高稳定性已成为与亲核物质反应动力学测定过程中应用最为成熟的邻苯醌类物质。例如 Li 等^[11]利用控制电位电解库伦法制备了 4MBQ, 而后利用停流光谱技术研究了 4MBQ 与牛血清白蛋白等的反应动力学。然而对于大部分多酚而言, 例如儿茶素、槲皮素、芦丁等它们氧化形成的邻苯醌类物质易发生化学重排、聚合等副反应, 无法采用上述方法制备较纯的醌类物质应用于后续互作效率的测定^[12-14]。

利用循环伏安技术可以同步监控邻苯醌类物质的生成及其与亲核物质的反应。当在含有亲核物质的溶液中对多酚-邻苯醌进行循环伏安测量时, 亲核物质将消耗部分邻苯醌类物质, 从而降低还原峰的峰值电流^[15]。因此, 依据添加亲核物质前后多酚类物质还原峰峰值电流的变化, 理论上可以获得邻苯醌类物质与亲核物质的反应效率。本课题组已初步利用上述技术成功获得了槲皮素醌与牛血清白蛋白等亲核物质的反应效率^[16]。

本文选取乳清蛋白中含量最高的蛋白组分 β -LG 作为研究对象, 采用循环伏安技术研究 β -LG 与含有邻苯二酚结构单元的 4MC、邻苯二酚、咖啡酸 (Caffeic Acid, CA)、原儿茶酸 (Protocatechuic Acid, PCA)、原儿茶酸乙酯 (Protocatechuic Acid Ethyl Ester, PCE)、绿原酸 (Chlorogenic Acid, CGA)、迷迭香酸 (Rosmarinic Acid, RA)、没食子酸 (Gallic Acid, GA)、槲皮素、木犀草素、(-)-表儿茶素 ((-)-Epicatechin, EC)、(+)-儿茶素 ((+)-Catechin, C) 和芦丁氧化形成的邻苯醌类物质的反应效率, 所得结果对阐明邻苯醌类物质与 β -LG 反应机制有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

4-甲基邻苯二酚 (4MC, $\geq 96\%$)、邻苯二酚 ($\geq 99.5\%$), 上海麦克林生化科技有限公司; 咖啡酸 (CA, $\geq 99\%$)、原儿茶酸 (PCA, $\geq 97\%$)、芦丁 ($\geq 95\%$)、木犀草素 ($\geq 98\%$)、无水乙醇 (HPLC 级)、甲醇 (HPLC 级), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; β -乳球蛋白 (β -LG, $\geq 90\%$)、原儿茶酸乙酯 (PCE, $\geq 97\%$)、迷迭香酸 (RA, $\geq 96\%$)、没食子酸 (GA, $\geq 97\%$)、绿原酸 (CGA, $\geq 95\%$)、槲皮素 ($\geq 95\%$)、表儿茶素 (EC, $\geq 90\%$)、儿茶素 (C, $\geq 98\%$), 美国 Sigma 试剂公司; 无水磷酸二氢钠 ($\geq 99\%$)、无水磷酸氢二钠 ($\geq 99\%$), 上海罗恩试剂公司。

1.2 仪器与设备

CHI660E 电化学工作站、Ag/AgCl (3.3 mol/L KCl, CHI 111) 参比电极、铂丝对电极 (D=0.5 mm, L=35 mm, CHI 115), 上海辰华仪器有限公司; 玻璃碳工作电极 (D=3 mm), 美国 BAS 有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 上海予华仪器设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 4MC 循环伏安行为测试浓度的优化

将 4MC 溶于 0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 7.0) 中, 配制 2.00 mmol/L 4MC 储备液, 而后取一定量储备液加入 0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 7.0) 中使最终浓度分别为 0.00、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 或 1.00 mmol/L。通氮气除氧, 而后进行循环伏安行为测试。

1.3.2 β -LG 浓度对 β -LG 与邻苯醌类物质反应的影响

取一定量 4MC 储备液加入 0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 5.0、7.0 或 8.0) 中使最终浓度为 0.60 mmol/L。随后添加 β -LG 使其最终浓度为 0.000、0.015、0.030、0.060、0.090 或 0.120 mmol/L。通氮气除氧,而后进行循环伏安行为测试。

1.3.3 非黄酮型邻苯醌与 β -LG 的反应

将 4MC、邻苯二酚或 GA 溶于 pH 值 7.0、0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中配制 2.00 mmol/L 非黄酮型多酚储备液;将 CA、RA、CGA、PCA 或 PCE 溶解在甲醇中,配制 50 mmol/L 非黄酮型多酚储备液。取一定量非黄酮型多酚储备液加入 pH 值 7.0、0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液使其最终浓度为 0.60 mmol/L,添加 β -LG 使其终浓度为 0.03 mmol/L。通氮气除氧,而后进行循环伏安行为测试。

1.3.4 黄酮型邻苯醌与 β -LG 的反应

将 C、EC 或芦丁溶解在甲醇中,配制 50 mmol/L 黄酮型多酚储备液,取一定量上述储备液加入 pH 值 7.0、0.20 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中使其最终浓度为 0.60 mmol/L。将槲皮素或木犀草素溶解在乙醇中,配制 50 mmol/L 黄酮型多酚储备液,取一定量上述储备液添加到磷酸盐缓冲液 (0.20 mol/L、pH 值 7.0) / 乙醇 (4:1, V/V) 混合物中,使其最终浓度为 0.60 mmol/L,并添加 β -LG 使其浓度为 0.03 mmol/L。通氮气除氧,而后进行循环伏安行为测试。

1.3.5 循环伏安行为测试

电化学工作站循环伏安行为测试工作参数如下:电位扫描范围-0.4~0.8 V,初始扫描极性为正极,扫描速率为 10、50、100 mV/s,扫描圈数为 2 圈,采样间隔为 0.001 V。所有测量均在 (25±1) °C 下进行,并进行至少 3 次重复实验。氧化峰电压记为 E_{pA} ,还原峰电压记为 E_{pC} ,氧化峰值电流记为 I_{pA} ,还原峰值电流记为 I_{pC} ,利用公式 (1) 计算多酚类物质还原峰峰值电流减少率,并取平均值。每次测试前工作电极用氧化铝浆料打磨,并用去离子水冲洗至电极表面无氧化铝浆料残留。

$$R = \frac{I_{pC1} - I_{pC2}}{I_{pC1}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——还原峰峰值电流减少率, %;

I_{pC1} ——添加亲核物质前的多酚类物质还原峰峰值电流, μ A;

I_{pC2} ——添加亲核物质后的多酚类物质还原峰峰值电流, μ A。

1.4 数据分析

数据以平均数±标准差来表示,采用 SPSS 26 软件进行显著性统计分析,通过 Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表明有统计学显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 4MC 循环伏安行为测试浓度的优化

由图 1 可知,不同浓度的 4MC 在正向扫描过程中,均出现氧化峰 A_1 ,表示 4MC 被氧化生成 4MBQ,在随后的负向扫描过程中,均出现对应的还原峰 C_1 ,即正向扫描生成的 4MBQ 被还原生成 4MC。在循环伏安测试过程中,生成的 4MBQ 可以快速形成其他副产物,如 4MBQ 会与体系中未反应的 4MC 发生偶联反应形成聚合物^[7],因此,4MC 的 I_{pC1} 值会小于 I_{pA1} 值。例如,当扫描速率为 50 mV/s,4MC 浓度为 0.05 mmol/L 时,其 I_{pC1} 值为 -1.59 μ A, I_{pA1} 值为 1.67 μ A,其他实验条件下所得结果也均符合上述规律。另外,4MC 的 I_{pC1}/I_{pA1} 值越接近 1 时,表明 4MBQ 发生副反应的程度越低。 β -LG 与 4MBQ 的反应效率是根据添加 β -LG 前后 4MC 的 I_{pC1} 值减少率来表示的,因此,4MC 的 I_{pC1}/I_{pA1} 的比值越接近 1 且 I_{pC1} 值较大,将有利于后续反应效率的测定。当 4MC 浓度相同时,提高扫描速率,将缩短循环伏安测试时间,进而减少 4MBQ 副反应发生的程度,所以 4MC 的 I_{pC1} 值及 I_{pC1}/I_{pA1} 值均会显著提高。在 pH 值 7.0 时,4MC 浓度为 1.00 mmol/L 条件下,扫描速率为 10 mV/s 时,4MC 的 I_{pC1} 值及 I_{pC1}/I_{pA1} 值分别为 -11.08 μ A 和 0.81;扫描速率为 50 mV/s 时,4MC 的 I_{pC1} 值及 I_{pC1}/I_{pA1} 值分别为 -29.41 μ A 和 0.98;扫描速率为 100 mV/s 时,4MC 的 I_{pC1} 值及 I_{pC1}/I_{pA1} 值分别为 -42.53 μ A 和 0.99,由此可知,在扫描速率为 50 和 100 mV/s 条件下,4MC 的 I_{pC1}/I_{pA1} 值无显著性差异 ($P > 0.05$),且均显著大于扫描速率为 10 mV/s 时的 I_{pC1}/I_{pA1} 值 ($P < 0.05$)。此外,扫描速率 50 mV/s 条件下,4MC 的 I_{pC1} 值约为扫描速率 10 mV/s 条件下的 2.7 倍,虽然仍显著低于扫描速率 100 mV/s 条件下的 I_{pC1} 值,但已经可以满足后续测试需求,且扫描速率过快也会影响 4MBQ 与 β -LG 的反应测试,因此,后续测定过程中扫描速率选择 50 mV/s。

在扫描速率为 50 mV/s 的条件下,4MC 的 I_{pA1} 值及 I_{pC1} 值均随 4MC 浓度的增加而增加 (图 1)。当 4MC 浓度为 0.60 mmol/L 时,其 I_{pC1}/I_{pA1} 值为 1.00,显著高于 0.05 (0.95)、0.10 (0.95)、0.20 (0.95) 及 0.40 (0.96) mmol/L,且与 0.80 (0.98) 及 1.00 (0.98) mmol/L 无显著性差异。此外,当 4MC 浓度为 0.60 mmol/L 时,其 I_{pC1} 值约为 0.05 mmol/L 时的 14 倍,虽然仍低于 0.80 及

1.00 mmol/L时的 I_{pCl} 值,但已可以满足后续测试需求,因此后续测定过程 4MC 的浓度选择 0.60 mmol/L。

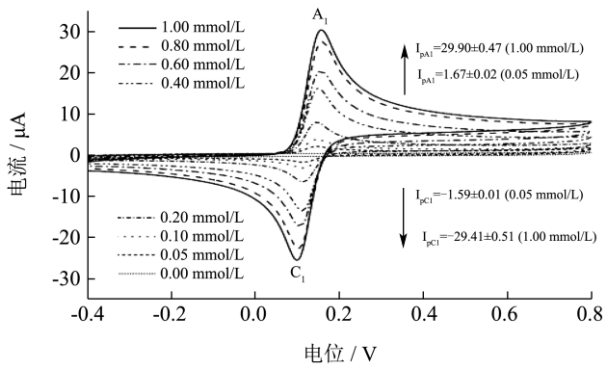


图1 不同浓度下 4MC 在玻碳电极表面的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammogram of 4MC at the surface of a glassy carbon electrode at different concentrations

注: 扫描速率为 50 mV/s, pH 值 7.0, 温度为 (25±1) °C。

2.2 β-LG 浓度对 β-LG 与邻苯醌类物质反应的影响

如图 2a 所示, 在 pH 值 7.0, 4MC 浓度为 0.60 mmol/L, 扫描速率为 50 mV/s 的条件下, 4MC 的 E_{pA1} 值为 0.16 V、 E_{pC1} 值为 0.11 V、 I_{pA1} 值为 21.51 μA、 I_{pC1} 值为 -21.44 μA。β-LG 在所述实验条件下没有电化学活性, 将其添加到 4MC 溶液中, 可以显著降低 4MC 的 I_{pC1} 值, 即表明, β-LG 可以与 4MC 氧化形成的 4MBQ 反应。β-LG 与 4MBQ 的反应效率随着 β-LG 浓度的增加而增加, 从 19.74% (0.015 mmol/L) 增加至 35.60% (0.120 mmol/L), 并且呈现良好的线性关系 (图 2b, $R^2=0.98$)。由此可知, 随着添加的 β-LG 浓度的升高, 邻苯醌类物质消耗量将会增加, 4MC 和 β-LG 混合体系在循环伏安行为测试中还原峰峰值电流会降低。当 β-LG 浓度为 0.03 mmol/L 时其与 4MBQ 的反应效率为 22.51%, 已能满足后续实验需求, 因此 β-LG 浓度选择 0.03 mmol/L。

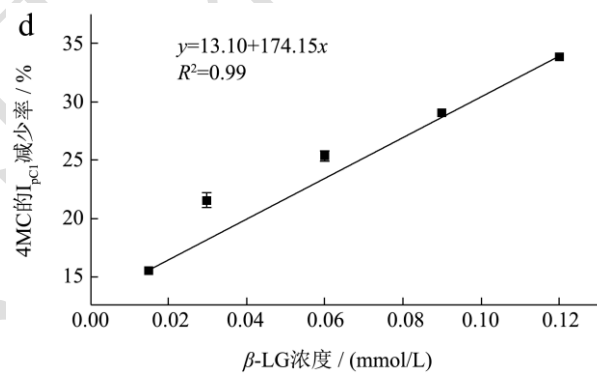
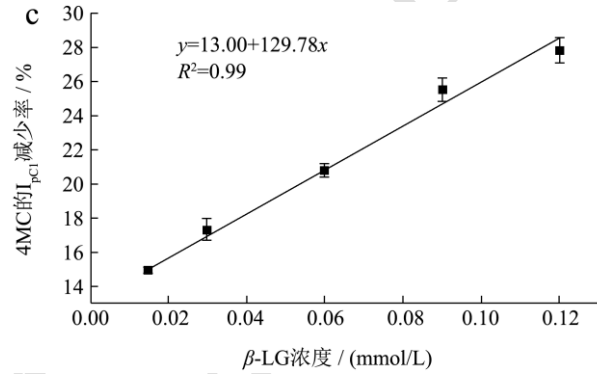
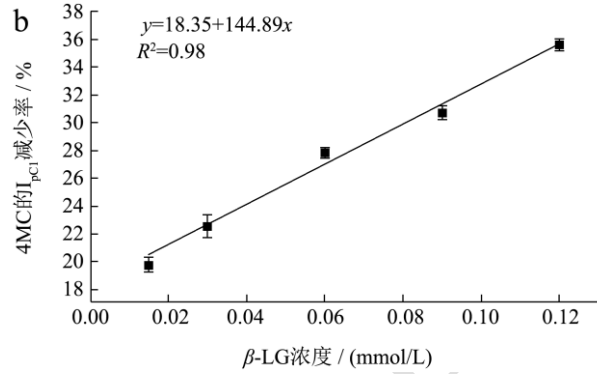
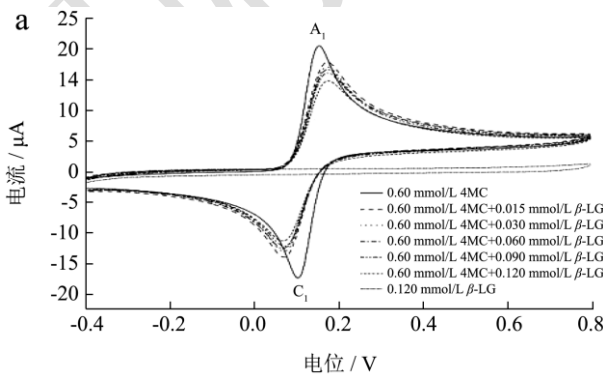


图2 4MC (0.60 mmol/L) 与 0.015~0.120 mmol/L β-LG 相互作用的循环伏安图 (a); 不同浓度的 β-LG 与 I_{pC1} 减少率之间的关系 (b~d)

Fig.2 Cyclic voltammograms of 4MC (0.60 mmol/L) in the presence of 0.015~0.120 mmol/L β-LG at the surface of glassy carbon electrode (a); Correlation of I_{pC1} reduction of 4MC with β-LG concentration (b~d)

注: (b) pH 值 7.0, (c) pH 值 5.0, (d) pH 值 8.0。扫描速率为 50 mV/s, 温度为 (25±1) °C。

在扫描速率为 50 mV/s, β-LG 浓度为 0.03 mmol/L 时, 在 pH 值 7.0 及 pH 值 8.0 的条件下, β-LG 与 4MBQ 的反应效率分别为 22.51% 和 21.55%, 均显著高于 pH 值 5.0 时的反应效率 (17.33%), 此与之前文献报道结论相似^[16]。这是由于随着体系 pH 值的升高, 亲核基团如 -SH、-NH₂ 的去质子化程度增加, 增加了其亲核性^[18], 因此中性 (pH 值 7.0) 或者碱性 (pH 值 8.0)

条件下 4MBQ 与 β -LG 的反应速率高于酸性条件 (pH 值 5.0)。在所选 β -LG 浓度下 (0.015~0.120 mmol/L), 均符合上述规律。此外, 在扫描速率 50 mV/s, pH 值 5.0 或 8.0 时, β -LG 与 4MBQ 的反应效率也随着 β -LG 浓度的增加而增加, 且均呈现良好的线性关系, pH 值 5.0 ($y=13.00+129.78x$, $R^2=0.99$, 图 2c)、pH 值 8.0 ($y=13.10+174.15x$, $R^2=0.99$, 图 2d), 后续实验中, 选择了食品体系中更为常见的中性条件 (pH 值 7.0) 进行研究。

2.3 非黄酮型邻苯醌与 β -LG 的反应

如图 3h 所示, GA 的循环伏安图显示出 2 个氧化峰, 且无对应还原峰, 这与 GA 在玻璃碳电极上的不可逆氧化有关^[19], 因此, 在本文所述实验条件下未获得 β -LG 与 GA 醌的反应效率。在 pH 值 7.0, 50 mV/s 扫描速率条件下, 添加 β -LG 可以显著降低所选具有邻苯二酚结构单元的非黄酮型多酚的 I_{pCl} 值, 即表明这些多酚氧化形成的非黄酮型邻苯醌均可与 β -LG 反应 (图 3)。邻苯二酚、PCA 及 4MC 三种多酚氧化形成的邻苯醌结构差异在于醌环取代基。PCA 醌环上的吸电子基团-COOH 能增强其亲电性, 促进 PCA 醌与 β -LG 亲核残基的反应效率^[20,21]。4MC 氧化形成的

4MBQ 醌环具有给电子取代基-CH₃, 削弱了 4MBQ 的亲电性^[17], 降低了 4MBQ 与 β -LG 亲核残基的反应效率。因此, β -LG 与上述三种多酚氧化形成的醌的反应效率顺序为: PCA (54.72%) > 邻苯二酚 (27.36%) > 4MC (22.51%)。PCA 醌环上的-COOH 酯化削弱了其吸电子能力^[22], 因此 β -LG 与 PCE 醌的反应效率 (19.24%) 小于其与 PCA 醌 (54.72%)。CGA 是 CA 与奎尼酸生成的缩酚酸, 因此 CGA 醌醌环取代基空间位阻效应大于 CA 醌, 所以 β -LG 与 CGA 醌的反应效率 (39.29%) 低于其与 CA 醌 (47.01%)。RA 分子中含有两个邻苯二酚结构单元, 但由于其苯环取代基空间位阻效应, β -LG 与 RA 醌的反应效率 (41.86%) 小于其与 PCA 醌 (54.72%) 与 CA 醌 (47.01%)。

此外, 如表 1 所示, 添加 β -LG, 会导致 4MC、邻苯二酚、PCA、PCE、CA、CGA、RA 和 GA 的 E_{pAl} 值正移 (0.01~0.10 V, $P<0.05$), 这可能是由于在 β -LG 存在情况下, 非黄酮型多酚在循环伏安行为过程中, 玻璃碳电极表面形成了一层薄膜^[23]。与此同时, 添加 β -LG, 也导致所选非黄酮型多酚的 I_{pAl} 值下降 (7.62%~51.66%), E_{pCl} 值负移 (0.01~0.11 V), 这些现象也说明了 β -LG 与所选非黄酮型多酚氧化形成的非黄酮型邻苯醌发生了反应。

表 1 β -LG (0.03 mmol/L) 对不同非黄酮型多酚 (0.60 mmol/L) E_{pAl} 值、 E_{pCl} 值、 I_{pAl} 值和 I_{pCl} 值的影响

Table 1 E_{pAl} , E_{pCl} , I_{pAl} and I_{pCl} of non-flavonoids catechols (0.60 mmol/L) in the absence and presence of β -LG (0.03 mmol/L) during cyclic voltammetry analysis

项目	E_{pAl}/V	E_{pCl}/V	$I_{pAl}/\mu A$	$I_{pCl}/\mu A$
邻苯多酚	0.20±0.00 ^e	0.15±0.00 ^d	20.43±0.42	-18.92±0.29
邻苯多酚+ β -LG	0.21±0.00 [*]	0.13±0.00 [*]	15.58±0.36 [*]	-13.75±0.28 [*]
4MC	0.16±0.00 ^g	0.11±0.00 ^g	20.32±0.37	-20.11±0.33
4MC+ β -LG	0.18±0.00 [*]	0.07±0.00 [*]	16.93±0.07 [*]	-15.58±0.18 [*]
PCA	0.24±0.00 ^b	0.19±0.00 ^b	12.05±0.35	-11.40±0.09
PCA+ β -LG	0.34±0.01 [*]	0.09±0.00 [*]	8.28±0.16 [*]	-5.16±0.01 [*]
PCE	0.29±0.00 ^a	0.24±0.00 ^a	18.50±0.35	-4.08±0.11
PCE+ β -LG	0.30±0.00 [*]	0.23±0.00 [*]	17.09±0.28 [*]	-3.30±0.03 [*]
CA	0.19±0.00 ^f	0.15±0.00 ^e	14.82±0.09	-11.13±0.33
CA+ β -LG	0.22±0.00 [*]	0.08±0.00 [*]	9.40±0.09 [*]	-5.90±0.13 [*]
CGA	0.22±0.00 ^c	0.18±0.00 ^c	13.23±0.37	-9.59±0.16
CGA+ β -LG	0.23±0.00 [*]	0.15±0.00 [*]	10.15±0.31 [*]	-5.83±0.01 [*]
RA	0.22±0.00 ^d	0.13±0.00 ^f	18.60±0.75	-12.97±0.34
RA+ β -LG	0.23±0.00 [*]	0.12±0.00 [*]	16.83±0.30 [*]	-7.54±0.03 [*]
GA	0.20±0.00 ^e	-	24.75±0.28	-
GA+ β -LG	0.26±0.00 [*]	-	11.96±0.17 [*]	-

注: 扫描速率为 50 mV/s, pH 值 7.0, 温度为 (25±1) °C。不同的小写字母表示不同的非黄酮型多酚在同一条件下 E_{pAl} 、 E_{pCl} 存在显著性差异 ($P<0.05$); “*”表示在有 β -LG 存在下不同的非黄酮型多酚的 E_{pAl} 、 E_{pCl} 、 I_{pAl} 和 I_{pCl} 与没有 β -LG 存在时不同的非黄酮型多酚的 E_{pAl} 、 E_{pCl} 、 I_{pAl} 和 I_{pCl} 存在显著性差异 ($P<0.05$); “-”表示没有可用数据。

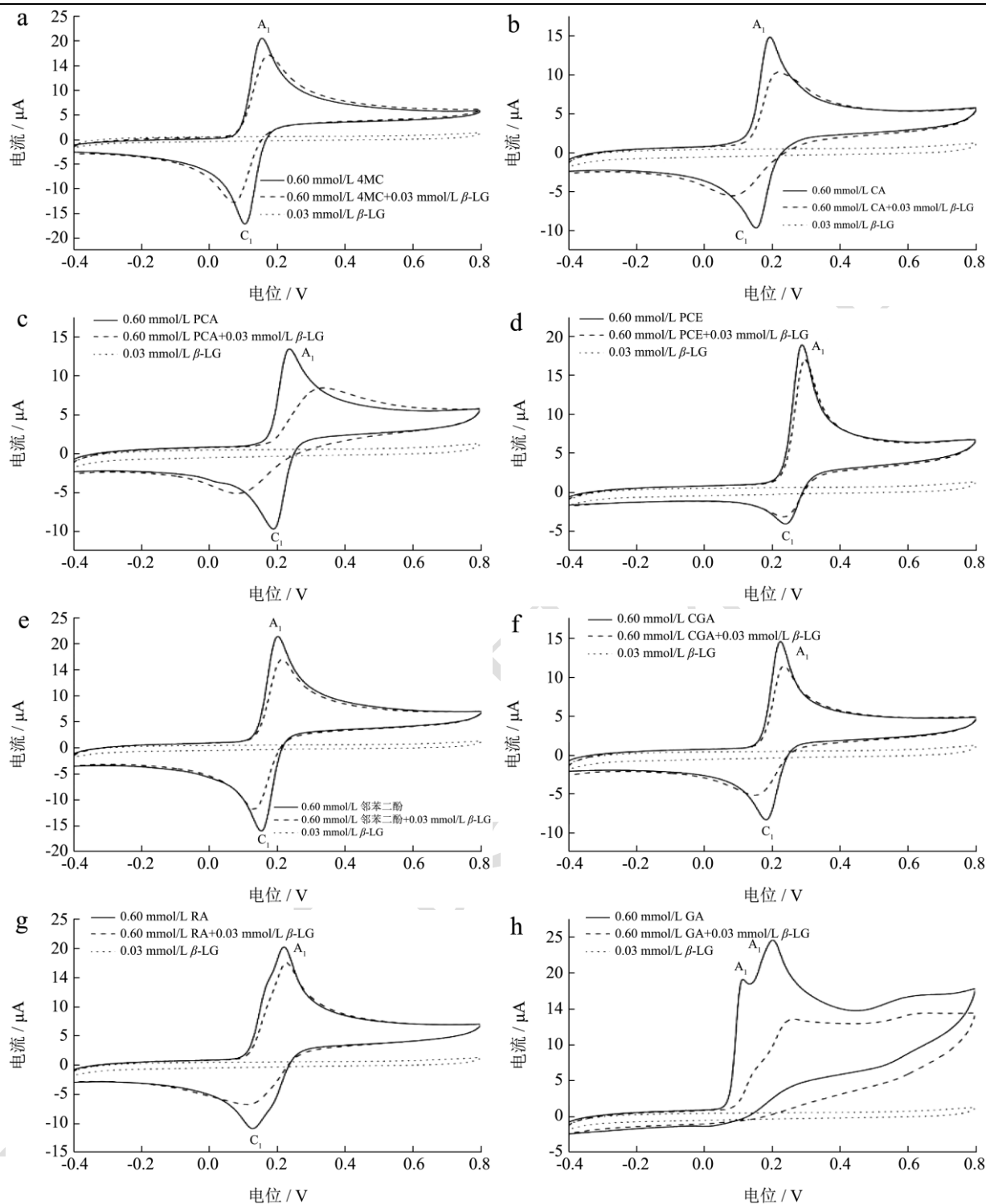


图3 0.60 mmol/L 非黄酮型邻苯酚(实线)和0.60 mmol/L 非黄酮型邻苯酚与0.03 mmol/L β-LG(虚线)循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of non-flavonoids catechols (0.60 mmol/L) in the absence (solid line) and presence (dashed line) of 0.03 mmol/L β-LG

注: a为4MC; b为CA; c为PCA; d为PCE; e为邻苯二酚; f为CGA; g为RA; h为GA。扫描速率为50 mV/s, pH值7.0, 温度为(25±1)℃。

2.4 黄酮型邻苯醌与 β-LG 的反应

如图4所示, 槲皮素和 EC、C 的循环伏安图显示出一对氧化还原峰 A₁、C₁ 和一个氧化峰 A₂。氧化

峰 A₁ 及还原峰 C₁ 对应于上述黄酮型邻苯二酚环上的 3',4'-二羟基部分的氧化还原过程, 氧化峰 A₂ 则对应上述黄酮类化合物 C 环上 3 位羟基或 A 环上 5、7 位羟基部分的氧化^[12,13,24]。槲皮素的氧化峰 A₂ 对应于 C

环上 3 位羟基的氧化^[12], 木犀草素 C 环上无羟基, 芦丁为槲皮素的 3-O-芸香糖苷, 因此木犀草素和芦丁仅显示出其邻苯二酚结构单元的氧化峰 A₁ 及还原峰 C₁。

在 pH 值 7.0, 扫描速率为 50 mV/s 时, 添加 β-LG 后, EC 和 C 的 I_{PC1} 值显著降低, 反应效率分别为 6.66% 和 11.97%, 显著低于相同条件下 β-LG 与邻苯二醌的反应效率 (27.36%)。EC、C 和邻苯二醌的 I_{PC1}/I_{PA1} 值分别为~0.10、~0.12 和~0.92, 儿茶素类物质易于与通过正电位扫描过程中生成的邻苯醌发生亲核加成形成聚合物^[25,26], 导致儿茶素类物质的 I_{PC1}/I_{PA1} 值减少。另外, 儿茶素类物质氧化形成黄酮型邻苯醌与 β-LG 的反应与上述儿茶素类物质的聚合反应之间存在竞争关系, 因此 β-LG 与 EC 和 C 氧化形成的黄酮型邻苯醌的反应效率显著低于邻苯二醌 (P<0.05)。

由图 4 及表 2 可知, 在 pH 值 7.0, 扫描速率为 50 mV/s 时, 木犀草素的 E_{pA1} 值 0.26 V 大于槲皮素的 E_{pA1} 值 0.12 V, 表明木犀草素醌的亲电性大于槲皮素醌^[27], 因此, β-LG 与木犀草素醌的反应效率 (19.34%) 大于其与槲皮素醌 (14.68%)。虽然, 芦丁的 E_{pA1} 值 0.27 V 大于槲皮素的 E_{pA1} 值 0.12 V, 但是由于芦丁与槲皮素相比, 芦丁的 C 环上含有 3-O-芸香糖苷, 增大了芦丁的空间位阻, 影响了其与 β-LG 的反应效率。因此, β-LG 与槲皮素醌的反应效率 (14.68%) 高于其与芦丁醌 (12.50%)。

在相同实验条件下, 除了 β-LG 与木犀草素醌的反应效率 (19.34%) 和其与 PCE 醌 (19.24%) 无显著性差异 (P>0.05) 外, β-LG 与其它黄酮型邻苯醌的反应效率均显著低于非黄酮型邻苯醌 (P<0.05), 例如, β-LG 与槲皮素醌的反应效率 (14.68%) 低于其与邻苯二醌的反应效率 (27.36%)。黄酮型邻苯醌相较于非黄酮型邻苯醌稳定性更差, 其发生副反应的效率高于非黄酮型多酚, 因此, β-LG 与所选的非黄酮型邻苯醌的反应效率更高。

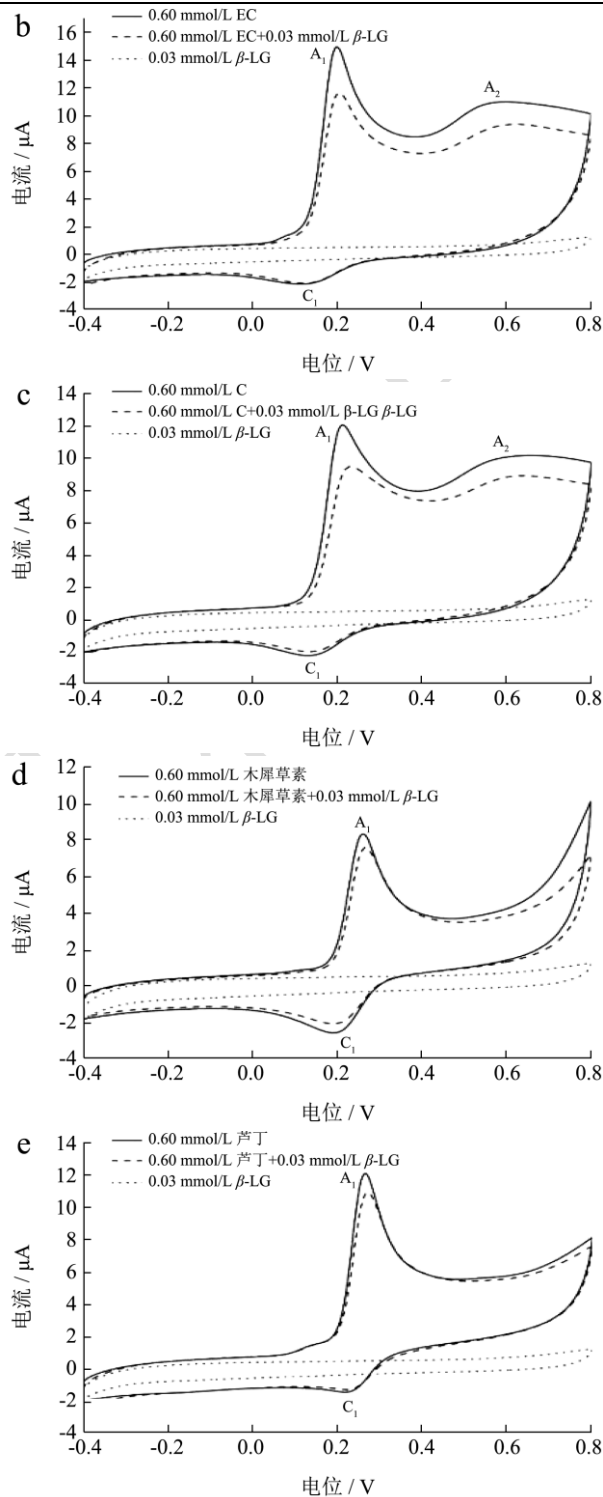
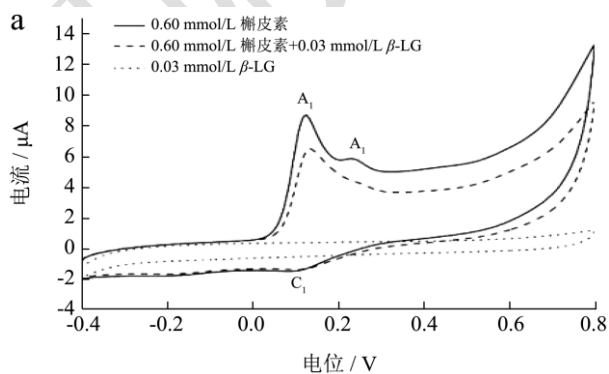


图 4 0.60 mmol/L 黄酮型邻苯醌 (实线) 和 0.60 mmol/L 黄酮型邻苯醌与 0.03 mmol/L β-LG 混合体系 (虚线) 循环伏安图
Fig.4 Cyclic voltammograms of flavonoids catechols (0.60 mmol/L) in the absence (solid line) and presence (dashed line) of 0.03 mmol/L β-LG

注: (a) 槲皮素; (b) EC; (c) C; (d) 木犀草素; (e) 芦丁。扫描速率为 50 mV/s, pH 值 7.0, 温度为 (25±1) °C。

表2 β -LG (0.03 mmol/L) 对不同黄酮型多酚 (0.60 mmol/L) E_{pA1} 值、 E_{pC1} 值、 I_{pA1} 值和 I_{pC1} 值的影响Table 2 E_{pA1} , E_{pC1} , I_{pA1} and I_{pC1} of flavonoids catechols (0.60 mmol/L) in the absence and presence of β -LG (0.03 mmol/L) during cyclic voltammetry analysis

项目	E_{pA1}/V	E_{pC1}/V	$I_{pA1}/\mu A$	$I_{pC1}/\mu A$
EC	0.20±0.00 ^d	0.13±0.00 ^d	13.79±0.21	-1.39±0.04
EC+ β -LG	0.21±0.00*	0.13±0.00	10.47±0.26*	-1.30±0.02*
C	0.21±0.00 ^e	0.14±0.00 ^e	11.07±0.05	-1.36±0.03
C+ β -LG	0.23±0.00*	0.15±0.00*	8.50±0.13*	-1.19±0.01*
槲皮素	0.12±0.00 ^e	0.10±0.00 ^e	7.85±0.12	-1.10±0.01
槲皮素+ β -LG	0.14±0.00*	0.12±0.00*	5.93±0.10*	-0.94±0.00*
芦丁	0.27±0.00 ^a	0.23±0.00 ^a	11.00±0.08	-1.92±0.01
芦丁+ β -LG	0.27±0.00*	0.23±0.00*	9.76±0.07*	-1.68±0.01*
木犀草素	0.26±0.00 ^b	0.20±0.00 ^b	8.17±0.02	-2.56±0.01
木犀草素+ β -LG	0.27±0.00*	0.20±0.00	6.71±0.03*	-2.07±0.05*

注: 扫描速率为 50 mV/s, pH 值 7.0, 温度为 (25±1) °C。不同的小写字母 a~e 表示不同黄酮型多酚在同一条件下 E_{pA1} 、 E_{pC1} 存在显著性差异 ($P<0.05$); “*”表示在有 β -LG 存在下不同黄酮型多酚的 E_{pA1} 、 E_{pC1} 、 I_{pA1} 和 I_{pC1} 与没有 β -LG 存在时不同黄酮型多酚的 E_{pA1} 和 E_{pC1} 存在显著性差异 ($P<0.05$)。

3 结论

β -LG 与邻苯醌类化合物的反应效率与邻苯醌类物质的结构密切相关, 邻苯醌环上吸电子基团增强两者反应效率, 给电子基团削弱两者的反应效率, 此外, 醌环取代基的空间位阻效应也会影响两者反应效率。在 pH 值 7.0, 扫描速率为 50 mV/s 的扫描速率下, 所选非黄酮型邻苯醌类物质与 β -LG 的反应效率顺序为 (以多酚还原峰峰值电流减少率计): PCA>CA>RA>CGA>邻苯二酚>4MC>PCE; 黄酮型邻苯醌与 β -LG 的反应效率顺序为 (以多酚还原峰峰值电流减少率计): 木犀草素>槲皮素>芦丁≈C>EC。食品体系中的 β -LG 将与多酚氧化形成的邻苯醌类物质反应, 导致蛋白质的结构与性质改变, 进而影响食品品质。

参考文献

- [1] 岳鑫, 包怡红. 基于荧光及紫外光谱法对红松种鳞多酚与乳清蛋白相互作用的研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 114-120.
- [2] 刘培玲, 张晴晴, 高增丽, 等. 乳清蛋白改性研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 333-348.
- [3] Li R, Rovers T, Jger T C, et al. Interaction between added whey protein ingredients and native milk components in non-fat acidified model systems [J]. International Dairy Journal, 2020, 115: 104946.
- [4] 蒲玲玲, 郭长江. 乳清蛋白的组成及其主要保健功能[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(6): 68-70.
- [5] Belaya N I, Belyi A V, Zarechnaya O M, et al. Spectrokinetic studies of the products of conversion of natural phenols in radical reactions [J]. Kinetics and Catalysis, 2019, 60(1): 28-36.
- [6] Flávia, Nathiely, Silveira, et al. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders [J]. Neurochemistry International, 2018, 122: 47-58.
- [7] Saito S, Okamoto Y, Kawabata J. Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2004, 68(6): 1221-1227.
- [8] Lund M N. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 241-251.
- [9] LI Xueqi, LI Moting, ZHANG Tingting, et al. Enzymatic and nonenzymatic conjugates of lactoferrin and -epigallocatechin gallate: Formation, structure, functionality, and allergenicity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(22): 6291-6302.
- [10] LIU Fuguo, WANG Di, SUN Cuixia, et al. Utilization of interfacial engineering to improve physicochemical stability of β -carotene emulsions: Multilayer coatings formed using protein and protein-polyphenol conjugates [J]. Food Chemistry, 2016, 205: 129-139.
- [11] LI Yuting, Jongberg S, Andersen M L, et al. Quinone-induced protein modifications: Kinetic preference for reaction of 1,2-benzoquinones with thiol groups in

- proteins [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 97: 148-157.
- [12] Hendrickson H P, Kaufman A D, Lunte C E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 1994, 12(3): 325-334.
- [13] Janeiro P, Brett, A M O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 518(1): 109-115.
- [14] Joyner P M. Protein adducts and protein oxidation as molecular mechanisms of flavonoid bioactivity [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 5102.
- [15] ZHANG Zhenhui, LI Lin, LI Yuting, et al. Insight on a competitive nucleophilic addition reaction of Nε-(carboxymethyl) lysine or different amino acids with 4-Methylbenzoquinone [J]. *Foods*, 2022, 11(10): 1421.
- [16] 李玉婷,范美琪,余祥英,等.基于循环伏安法研究槲皮素醌与亲核物质的相互作用[J].*中国食品学报*,2020,20(4):57-65.
- [17] Nematollahi D, Ghasemi F, Khazalpour S, et al. Kinetic study on electrochemical oxidation of catechols in the presence of cycloheptylamine and aniline: Experiments and digital simulation [J]. *Journal of Chemical Sciences*, 2016, 128(12): 1-8.
- [18] WANG T, Turhan M, Gunasekaran S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel [J]. *Polymer International*, 2004, 53(7): 911-918.
- [19] Kilmartin P A, Hsu C F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry [J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(4): 501-512.
- [20] Reis B, Martins M, Barreto B, et al. Structure-property-activity relationship of phenolic acids and derivatives. Protocatechuic acid alkyl esters [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(11): 6986-6993.
- [21] Yamashige H, Matsuo S, Kurisaki T, et al. Local structure of nitrogen atoms in a porphine ring of mesophenyl substituted porphyrin with an electron-withdrawing group using X-ray photoelectron spectroscopy and X-ray absorption spectroscopy [J]. *Analytical Sciences the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 2005, 21(6): 635-639.
- [22] TIAN Ye, YANG Baoru. Phenolic compounds in Nordic berry species and their application as potential natural food preservatives [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021: 1-33.
- [23] Nematollahi D, Rafiee M. Electrochemical oxidation of catechols in the presence of acetylacetone [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2004, 566(1): 31-37.
- [24] Naróg D, Sobkowiak A. Electrochemical investigation of some flavonoids in aprotic media [J]. *Electroanalysis*, 2022, 34: 1-10.
- [25] Elik E E, Gkmen V. Interactions between free and bound antioxidants under different conditions in food systems [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021: 1-17.
- [26] Kawazoe R, Matsuo Y, Saito Y, et al. Stereochemistry of a cyclic epicatechin trimer with C₃ symmetry produced by oxidative coupling [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2021, 2021(5): 777-781.
- [27] LI Yuting, HUANG Qiaoling, YU Xiangying, et al. Study of reactions of Nε-(carboxymethyl) lysine with o-benzoquinones by cyclic voltammetry [J]. *Food Chemistry*, 2019, 307: 125554.