

# 不同甜橙品种抗氧化能力的比较

朱玉昌<sup>1</sup>, 周大寨<sup>1</sup>, 焦必宁<sup>2\*</sup>, 付陈梅<sup>2</sup>

(1. 湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北民族学院, 湖北恩施 445000;

2. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

**摘要:** 用3种抗氧化体系综合评价了7个甜橙品种的抗氧化能力。对·OH的清除率介于47.60%-88.62%之间, 品种间存在显著的差异性, 无核雪柑和血橙的清除能力最强, 清家最弱; 对DPPH·的清除率均在50%以上, 品种间未呈现显著的差异性, 以无核雪柑清除率相对较高; 用ABTS·K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>体系测定的反映总抗氧化能力的TEAC值介于4.79-6.09之间, 血橙最高, 锦橙最低。综合比较表明, 血橙品种总抗氧化能力最强。

**关键词:** 橙汁, 抗氧化能力, DPPH, TEAC值

中图分类号: TS255.2 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)06-0195-03

柑橘汁按原料的不同分为橙汁、葡萄柚汁、柠檬汁、温州蜜柑汁等多种类型, 其中橙汁是最重要的柑橘汁, 占柑橘汁总量的95%左右。橙汁色泽鲜艳, 风味浓郁, 除富含维生素C外, 还含有丰富的维生素E、-胡萝卜素、类柠檬苦素、酚酸及类黄酮等生理活性成分<sup>[1]</sup>。在国外, 已对橙汁中抗氧化成分的检测、含量分布及生理功能有较多研究。我国橙类品种资源丰富, 但对橙汁中的抗氧化活性成分含量、分布及生理功能的研究还不十分系统、深入。加强这方面的研究, 以充分挖掘我国柑桔资源的药用价值, 不仅能为开发保健食品提供功能素材, 同时还能提高柑桔果品的附加值, 增加经济效益。本实验以甜橙为试材, 采用不同抗氧化体系对其抗氧化活性进行综合评价, 以期对橙类加工及其综合开发利用提供理论依据和实践参考。

## 1 材料与方

### 1.1 材料与设备

甜橙 均由中国农业科学院柑桔研究所种质圃提供, 包括清家、纽荷尔、447锦橙、中育7号甜橙、血橙、无核雪柑、哈姆林, 均在正常成熟期采摘;

收稿日期: 2006-10-20

作者简介: 朱玉昌(1979-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事农产品贮藏与加工的研究。

基金项目: 农业部结构调整重大技术基金项目(04-09-02B); 科技部科研院所公益基金(2004DIB4J147)。

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], Trolox [(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 色谱纯)、DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)(Sigma-Aldrich)、过硫酸钾(上海爱建德固塞引发剂有限公司)、硫酸亚铁(重庆北碚化学试剂厂)、过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司)、乙醇(武汉市江北化学试剂有限责任公司)所用试剂除特别注明外, 均为分析纯; 重蒸水用来配试剂。

Multiskan MK3 酶标仪, 平底96孔微量滴定板, MS1/MS2 迷你振荡器, Auanti30 高速冷冻离心机, KQ5200B 型超声波清洗器, 722S 分光光度计等。

### 1.2 实验方法

1.2.1 原料处理 取各品种鲜果10~20个, 洗净, 拭干, 横切成两半, 用家用榨汁器榨出果汁, 经100目干净纱布过滤盛于烧杯中, 将榨汁后的囊瓣从果皮扯下, 取出种籽后放入洁净纱布中, 再将果汁全部压出, 合并于烧杯中, 搅匀。取5mL果汁, 加入25mL50%乙醇, 旋涡振荡1min后, 用超声波处理10min, 过滤备用。

1.2.2 不同品种橙汁提取液·OH的清除能力<sup>[2]</sup> 分别配制400mmol/L, pH7.40磷酸缓冲液(PBS)、2.5mmol/L邻二氮菲、2.5mmol/L硫酸亚铁溶液(FeSO<sub>4</sub>)和20mmol/L双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 实验按表1分组, 试剂从表左至表右依次加入5mL硬质试管。

表1 ·OH清除能力实验分组

	PBS (mL)	邻菲罗 啉(mL)	去离子 水(mL)	FeSO <sub>4</sub> (mL)	果汁提取 液(mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)
A <sub>K</sub>	1.0	-	2.9	-	-	-
A <sub>0</sub>	1.0	1.0	0.9	1.0	-	-
A <sub>1</sub>	1.0	1.0	0.4	1.0	-	0.5
A <sub>2</sub>	1.0	-	2.5	-	0.4	-
A <sub>3</sub>	1.0	1.0	-	1.0	0.4	0.5

反应在37℃恒温水浴中进行, 准确反应1.5h后, 以A<sub>K</sub>为空白对照, 迅速测定536nm处的吸光值。按下式计算样品对·OH的清除率:

$$I\% = \frac{A_2 - A_3 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%$$

### 1.2.3 不同品种橙汁提取液对 DPPH· 的清除能力<sup>[3]</sup>

用 50%乙醇配制 65 μmol/L DPPH 溶液, 实验按表 2 分组, 加入 96 孔微量滴定板的每孔中。

表 2 DPPH·清除能力实验分组

	65 μmol/L DPPH 溶液(μL)	DPPH 溶液 的溶剂 (μL)	果汁提取 溶剂(μL)	果汁提取 液(μL)
A <sub>0</sub>	250	-	50	-
A <sub>i</sub>	250	-	-	50
A <sub>j</sub>	-	250	-	50

每个处理三个重复, 震荡摇匀后于室温下放置 30min, 用酶标仪测定各孔在 517nm 处吸光值, A<sub>0</sub> 为空白对照值, A<sub>i</sub> 为样品值, A<sub>j</sub> 为本底值。按下式计算样品对 DPPH· 的抑制率:

$$I\% = \left[ 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100\%$$

1.2.4 ABTS 法测定不同品种橙汁提取液的总抗氧化能力<sup>[4,5]</sup> 将 7mmol/L ABTS 和 2.45mmol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 溶液等体积混合, 在室温、避光的条件下静置过夜, 形成 ABTS·<sup>+</sup> 自由基储备液, 使用前用 80%乙醇稀释成工作液, 使其在室温下于 414nm 波长下的吸光度为 0.70 ± 0.02。测定时在 96 孔微量滴定板的每孔中加入 390 μL 的 ABTS·<sup>+</sup> 工作液, 再加入 10 μL 的果汁提取液, 以 400 μL 的 80%乙醇为空白, 混合 10s, 于 16min 后读取 414nm 波长下的吸光度。使用的 Trolox 参照物标准系列为 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mmol/L。将果汁提取液清除自由基的能力与 Trolox 清除自由基的能力相对比, 确定其相对抗氧化活性, 单位为 TEAC, 即每升果汁清除自由基能力相当于 Trolox 清除同等自由基能力的毫摩尔数。按下式计算样品 TEAC 值:

$$TEAC = \frac{\Delta A}{A_{Trolox}} \times C_{Trolox} \times V \times \frac{1000}{V}$$

式中:

TEAC- Trolox 当量值, mmol/L; A- 加入果汁提取液后反映体系吸光度变化值; C<sub>Trolox</sub>- Trolox 标准溶液浓度, mmol/mL; A<sub>Trolox</sub>- 加入相同体积 Trolox 后从其标准变化曲线上查得的吸光度变化值; V- 果汁提取液体积, mL; V<sub>0</sub>- 取用果汁总体积, L。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同甜橙品种对·OH 和 DPPH· 的清除能力

羟自由基(·OH) 是化学性质最活泼的活性氧物种, 其反应特点是无专一性, 几乎与生物体内所有物质, 如糖、蛋白质、DNA、碱基、磷脂和有机酸等都能反应, 且反应速率快, 可以使非自由基反应物变成自由基, 由氧化应激所造成的损害几乎全部是由·OH

中介的, 被公认是最活泼也是最具危害性的自由基。采用 Fenton 反应比色法测定了 7 个甜橙品种对·OH 的清除效果。由表 1 可以看出, 7 个甜橙品种对·OH 的清除率介于 47.60% -88.62%之间, 各品种间存在显著的差异, 它们对·OH 的清除能力大小顺序是无核雪柑>血橙>哈姆林 中育 7 号>纽荷尔>锦橙>清家, 最强与最弱相差 1.86 倍。

DPPH 法因具有快速、简单、灵敏、直接的优点, 在当前被广泛应用来测定物质总的抗氧化能力。从表 1 中看出, 各甜橙品种都表现出较强清除 DPPH· 的能力, 清除率均在 50%以上, 比 Malecka<sup>[6]</sup>等人报道的数据(对 DPPH· 清除率为 33% -49%)略高, 这可能与品种及品种栽培环境、活性成分提取方法有关。各品种在清除 DPPH· 时未表现出显著的差异性, 它们对 DPPH· 的清除能力相对大小顺序是无核雪柑>血橙>哈姆林 清家>纽荷尔>中育 7 号 锦橙, 与对·OH 的清除能力测定结果的排序不尽相同, 主要差别是中育 7 号、纽荷尔、锦橙和清家四个品种的排序。相关分析结果显示, 7 各甜橙品种对·OH 的清除能力与 DPPH· 的清除能力之间相关性不显著 (r=0.599, P>0.1)。

表 1 不同甜橙品种清除自由基能力的比较

品种	自由基清除率(%)	
	·OH	DPPH·
清家	47.60a	50.86
纽荷尔	58.03 b	50.58
锦橙	52.50 c	50.31
中育 7 号	63.56d	50.31
血橙	83.09e	50.91
无核雪柑	88.62f	51.14
哈姆林	63.56 d	50.86

注: 不同的字母标号表示不同的显著性差异水平。

### 2.2 不同甜橙品种的 TEAC 值

ABTS 经活性氧氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS·<sup>+</sup>, 向其中加入被测物质, 如果该物质中存在抗氧化成分, 则该物质会与 ABTS·<sup>+</sup> 发生反应而使反应体系褪色, 然后在 ABTS·<sup>+</sup> 这种自由基的最大吸光波长下检测吸光度的变化, 与含 Trolox 的对照标准体系比较, 换算出被测物质总的抗氧化能力。

所测定的 7 个甜橙品种中, 总体而言, 抗氧化活性比较好, 未表现出显著的差异性, 平均值为 5.10, 其 TEAC 值的相对大小顺序是血橙>无核雪柑>哈姆林>纽荷尔>中育 7 号>清家>锦橙, 与对·OH 和 DPPH· 两者清除能力测定结果的排序差异较大。

## 3 讨论

迄今用于评价物质抗氧化能力的体外方法主要是针对清除某一种自由基而言, 并不能反应出被测物质总的抗氧化能力, 因为总的抗氧化能力是不同的有效成分清除不同自由基的有效和, 而肌体内所

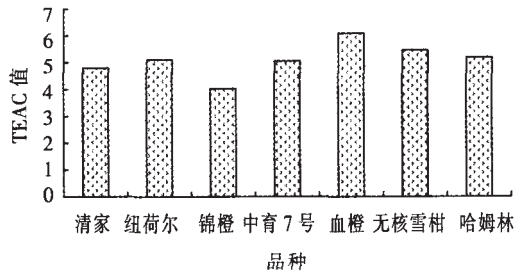


图1 不同甜橙品种 TEAC 值比较

需要的也正是物质总的抗氧化能力, 因此用总的抗氧化能力(Total antioxidant activity, TAA)对物质进行评定很有必要。当前, DPPH法和ABTS法被广泛应用于测定物质总的抗氧化能力, 其优点是快速、简单、灵敏、直接。较 DPPH·这种有机性的自由基而言, ABTS·<sup>+</sup>这种自由基可以在多种体系中由 ABTS 产生, 包括酶法(如与正铁肌红蛋白和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或辣根过氧化物酶)<sup>[7]</sup>、化学法(如与 MnO<sub>2</sub> 或 ABAP 或过二硫酸钾或过氧化物自由基)<sup>[8]</sup>电化学法, 且 ABTS·<sup>+</sup>能溶于水相和酸性的乙醇介质中, 因此, ABTS法既可测定亲水性, 又可测定亲脂性物质是否具有抗氧化能力, 已广泛应用于蔬菜、水果抗氧化活性的评价研究和天然抗氧化物质的筛选。

在本研究中我们选用了 Fenton 反应比色法、DPPH 法及 ABTS 法三种方法比较了 7 个甜橙品种对·OH 和 DPPH·两种自由基的清除能力及其 TEAC 值, 综合比较, 发现血橙品种清除效果较好, TEAC 值

最高, 这可能是国内外对其研究较多的原因之一。

## 参考文献:

- [1] 凌关庭主编. 抗氧化食品与健康 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.4.292
- [2] Kurowska E M, Ph D, Borradaile N M, et al. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits[J]. Nutrition Research, 2000, 20 (1): 121-129.
- [3] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (6): 658-661.
- [4] Nicoletta Pellegrini, Mauro Serafini, Barbara Colombi, et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonyl) acid radical cation decolorization assay[J]. Methods Enzymol, 1999, 299: 379-389.
- [5] 韩光亮, 李翠梅, Eduardo Cacace, 等. 改良的 ABTS<sup>+</sup>法及其在优化抗氧化活性物质提取中的应用 [J]. 卫生研究, 2004, 33(5): 620-622.
- [6] Matecka M, Słachta M, Samotyja U. Antioxidant activity of different fruit juices. In Proceedings of the 7th International Commodity Science Conference [J]. The Poznań University of Economics Publishing House, Poland, 2002: 573-579.
- [7] Arnao M B, Cano A, Alcolea J F, Acosta M. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigments extracts [J]. Phytochemical analysis, 2001(12): 138-143.

(上接第 245 页)

reaction to caseins and to skim milk power I Protein hydrolysis and plastein formation[J]. Journal of Dairy Research, 49:265-278.

[16] 张雅丽, 王凤翼, 宋世廉, 等. 蛋白质酶法修饰的初步探讨 1: 大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白质研究 [J]. 食品与发酵工业, 1994(2): 8-13

[17] 张雅丽, 王凤翼, 宋世廉, 等. 蛋白质酶法修饰的初步探讨 2: 大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白质营养评定[J]. 食品与发酵工业, 1994(5): 67-68

[18] Fujimaki M, Arai S, Yamashita M. Enzymic protein degradation and resynthesis for protein improvement in food proteins [M]. Washington DC USA: American chemical society, 1977.156-187.

[19] Fujimaki M. Plastein reaction, it's application to debittering of hydrolyzates[J]. Agric Biol Chem, 1970, 34(3): 483-484.

[20] J Synowiecki, R Jagielka, F Shahidi. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering

following plastein reaction[J]. Food Chemistry, 1996, 57(3): 435-439.

[21] Eriksens Fagersonis. The plastein reaction and its application: a review[J]. Food Science, 1976, 41: 490-493.

[22] V L Brownsell, R J H Williams, A T Andrews. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I Plastein properties [J]. Food Chemistry, 2001, 72: 337-346

[23] Yamashita M, Arai S, Kokubo S, et al. A Plastein with an Extremely High Amount of Glutamic Acid [J]. Agric Biol Chem, 1974, 38(6): 1269-1271.

[24] Michiko W, Atsuko S, Etsuko Y, et al. Proteinaceous Surfants Produced Gelatin by Enzymatic Modification: Application to Preparation of Food Items [J]. Journal of Food Science, 1981, 46: 1738-1740.

[25] 安广杰, 王璋. 类蛋白反应法水解明胶的条件[J]. 食品发酵工业, 2005(3): 83-86.