

水杨酸酰化对胭脂萝卜天竺葵素稳定性和抗氧化活性的影响

梁 珊*, 刘 欢

长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100

摘要:为探究水杨酸作为酰化剂对胭脂萝卜天竺葵素的稳定性和抗氧化活性的影响,以保留率为指标,分析光、温度、金属离子、pH及氧化剂对酰化天竺葵素稳定性的影响,探究酰化天竺葵素对羟自由基、DPPH自由基和ABTS自由基的清除能力。结果表明:酰化天竺葵素对光、温度、 Al^{3+} 、pH的稳定性显著提高,对 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 以及氧化剂 H_2O_2 的稳定性无显著差影响。酰化天竺葵素对羟自由基、DPPH自由基和ABTS自由基的清除能力与未酰化天竺葵素无显著差异。以上结果表明采用水杨酸酰化胭脂萝卜天竺葵素不影响其抗氧化活性,还能提高其对光照、温度、pH及铝离子的稳定性。

关键词:胭脂萝卜;水杨酸天竺葵素;酰化;抗氧化活性

中图分类号:R914

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1392-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.013

Stability and antioxidant activity of salicylate acylated pelargonidin from carmine radish

LIANG Shan*, LIU Huan

College of modern agriculture and bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

Abstract: To explore the stability and antioxidant activity of carmine radish pelargonidin which acylated by salicylic acid, retention rate taken as the index, a series of element have taken to analyzed such as light, temperature, metal ions, pH and H_2O_2 . To demonstrate the scavenging ability of acylated pelargonidin, hydroxyl, DPPH and ABTS radicals had been detected. The results showed that the stability of acylated pelargonium was significantly improved in light, temperature, Al^{3+} and pH, but remained no significant difference in Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and H_2O_2 . The scavenging capacity of acylated pelargonium on hydroxyl, DPPH and ABTS free radicals was no significantly different from that of normal pelargonium. These results indicated that acylation had no impact on the antioxidant activity of pelargonium, but also improved its stability to light temperature, Al^{3+} and pH.

Key words: carmine radish; pelargonidin; acylation; antioxidant activity

花青素 (anthocyanin) 是黄酮属的天然色素,广泛的存在于具有不同颜色的植物中,如蓝莓、黑莓和紫甘薯等,在自然状态下往往与各种糖苷形成花青苷^[1,2]。研究表明,花青素具有清除自由基、保护心血管系统、抗癌、皮肤保健和抗衰老等功能^[3-5]。从植物中提取天然花青素的技术较成熟,但花青素容易受到金属离子、二次色素、温度、光照、pH值等因素的影响,导致色素降解及活性降低^[6-8]。研究发现酰化可以改善对花青素的颜色保护,提高青素的稳

定性。朱玉良等^[9]发现对黑枸杞花青素进行苹果酸酰基化改性使其半衰期和保留率均显著上升。赵立仪等^[10]发现酰化蓝莓花青素及矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对温度、光照、强氧化剂、食品添加剂的稳定性有显著提高。胭脂萝卜 (carmine radish) 是重庆市涪陵区特有的蔬菜品种,主要用于制备食用红色素,研究发现其红色素为花青素类天竺葵素,具有良好的抗氧化、抑菌性,但其稳定性较差,如何进一步提高其稳定性成为该色素开发和利用的关键^[11-13]。本研究采用水杨酸酰化分离自胭脂萝卜的天竺葵素,探讨其对光照、温度、pH、抗氧化性等的稳定性,为该色素的进一步开发和利用提供理论依据。

收稿日期:2018-10-22 接受日期:2019-05-21

基金项目:重庆市生物工程与现代农业专业群资助项目(CSZKY1809);长江师范学院院级课题(2015KYQD01)

* 通信作者 Tel:86-23-72792193; E-mail: vmm420@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料

天竺葵素采用液相色谱仪分离自胭脂萝卜(纯度 > 95%),由长江师范学院天然产物研究实验室分离获得;无水乙醇、氢氧化钠、硫酸镁、双氧水、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸铝、盐酸、氯化钠均为国产分析纯,为重庆川东化工(集团)有限公司产品;水杨酸为上海远帆助剂厂产品;维生素 C 为上海伊卡生物技术有限公司产品。

MLtiMate 3000 XR 液相色谱仪,美国 Thermo 公司产品;Optima MAX-XP,冷冻超速离心机 德国 Beckman 公司产品;UV 3010 紫外-可见分光光度计,日本日立科学仪器有限公司产品;UPT 超纯水制造机,中国优普公司产品。

1.2 方法

1.2.1 天竺葵素的酰化处理

称取 1.0 g 水杨酸加入 2 mL 沸水溶解,溶解后的水杨酸溶液与天竺葵素溶液按照浓度比 1:1 (w/w)混合,在 28 °C 下反应 2 h,将反应液稀释后用紫外分光光度计在 200 ~ 600 nm 波长范围内进行快速扫描,结果根据在 300 ~ 350 nm 处吸收峰变化来确定酰化^[14]。

1.2.2 酰化天竺葵素保留率的测定方法

采用天竺葵素标准品(HPLC ≥ 98%, CAS:134-04-3)作标准曲线,测定胭脂萝卜天竺葵素的含量,并通过含量比计算保留率^[15]。

保留率(%) = (保存后天竺葵素含量/初始天竺葵素含量) × 100

1.2.3 各因素对酰化胭脂萝卜天竺葵素稳定性的影响

1.2.3.1 天竺葵素的光稳定性

各取未酰化和酰化 30 mL 天竺葵素装至白色透光的试剂瓶中,放在自然光照条件的坏境中,隔天定时测定其保留率的变化,共测 5 天。

1.2.3.2 天竺葵素的热稳定性

取酰化与未酰化的天竺葵素溶液各 30 mL 置于 80、100、120 °C,于 2、4、6、8、10 h 后分别测定其含量变化。

1.2.3.3 金属离子对天竺葵素的影响

各取酰化与未酰化的天竺葵素每份 30 mL,分别加入浓度为 0.01 mol/L 的硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸铝、硫酸锌溶液,于 2、4、6、8、10 h 后分别测定其含量变化。

1.2.3.4 pH 对天竺葵素的影响

将酰化与未酰化的天竺葵素分别用盐酸和氢氧化钠溶液调节酸碱度,分别测定 pH 为 2、4、6、8、10、12 含量的变化。

1.2.3.5 H₂O₂对天竺葵素的影响

各取未酰化和酰化的 30 mL 天竺葵素,分别加入浓度为 1%、2%、3% V_C 溶液和 1%、5%、10% 过氧化氢溶液,于 2、4、6、8、10 h 后分别测定其含量变化。

1.2.4 胭脂萝卜天竺葵素抗氧化活性评价

1.2.4.1 羟基自由基(·OH)的清除

取 2 mL 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液、2 mL 6 mmol/L 水杨酸溶液及 2 mL 不同浓度的天竺葵素溶液,最后加入 2 mL H₂O₂,混合均匀后 37 °C 恒温水浴中反应 30 min,4 000 rpm 冷冻离心 5 min,取上清液在 510 nm 下测吸光度作为试验组,记为 A_i;用蒸馏水代替样品作为空白组,记为 A₀;以蒸馏水代替 H₂O₂ 作为对照组,记为 A₁₀;用 V_C 作为阳性对照,按下式计算对自由基的清除率^[16]:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_{10})}{A_0} \times 100\%$$

1.2.4.2 DPPH 自由基的清除

取 2 mL 不同浓度的天竺葵素溶液,加入 2 mL 的 DPPH 溶液作为试验组,在黑暗环境下反应 30 min 后,在波长 517 nm 下测定其吸光度(A_i);以 2 mL 待测溶液加入 2 mL 的无水乙醇作对照(A₁₀),以 2 mL 的 DPPH 溶液加入 2 mL 蒸馏水中作空白(A₀),用 V_C 作阳性对照,计算对 DPPH 自由基的清除率^[17]:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_{10})}{A_0} \times 100\%$$

1.2.4.3 ABTS 自由基的清除

取 10 mL, 7 mmol/L ABTS 和 176 μL, 140 mmol/L 过硫酸钾混合均匀置于黑暗处室温反应 24 h,得到储备液。再用乙醇稀释成工作液,在 734 nm 波长下吸光度在 0.68 ~ 0.72 范围内。分别移取 0.1 mL 不同浓度的天竺葵素溶液于 25 mL 比色管中,再添加 5 mL ABTS 工作液,混合均匀后在室温下反应 30 min,于 734 nm 下测其吸光度,作为试验组记为 A_i;用蒸馏水代替天竺葵素溶液作为空白组记为 A₀;用乙醇代替 ABTS 工作液作为对照组记为 A₁₀。按下列公式计算 ABTS 自由基的清除率^[18]:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_{i_0})}{A_0} \times 100$$

2 结果

2.1 酰化胭脂萝卜天竺葵素的紫外吸收光谱

测定胭脂萝卜天竺葵素在 200~600 nm 的吸收光谱,观察在 300~350 nm 的波峰情况,如有波峰变化则说明发生了酰基化^[15]。如图 1 所见,胭脂萝卜天竺葵素与水杨酸发生酰化反应后,在紫外光谱中 317 nm 处出现吸收峰,说明胭脂萝卜天竺葵素已经酰化。

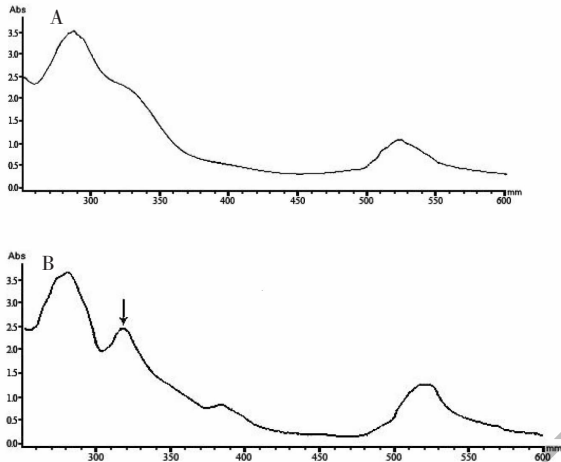


图 1 胭脂萝卜天竺葵素的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of pelargonidin

注:A:未酰化;B:酰化;↓:酰化吸收峰。Note:A:unacylation; B:acylation; ↓:acylation absorption peak.

2.2 酰化天竺葵素对光照稳定性的影响啊

由图 2 可见,10 天内随光照时间的延长,未酰化与酰化天竺葵素保留率均逐渐下降,酰化天竺葵

素的稳定性均显著高于未酰化的天竺葵素($P < 0.05$),光照第 10 天时,酰化天竺葵素的保留率在 81.28% 左右,而未酰化天竺葵素的保留率已降到 61.33% 左右。酰化后的天竺葵素的光稳定性显著高于未酰化天竺葵素($P < 0.05$)。

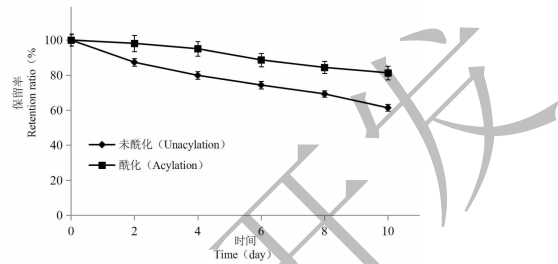


图 2 光照对天竺葵素保留率的影响

Fig. 2 The effect of illumination on the retention rate of pelargonidin

2.3 酰化天竺葵素对温度稳定性的影响

由图 3 可见,随着温度的升高和时间的延长,酰化前后天竺葵素的保留率均下降。在 80 °C 下 2 h 后,酰化天竺葵素保留率均显著大于未酰化天竺葵素($P < 0.05$)。在 100 °C 下 2~6 h,酰化天竺葵素保留率与未酰化天竺葵素没有显著性差异,在 8~10 h 时差异极显著($P < 0.01$)。120 °C 下 2~4 h,酰化与未酰化天竺葵素保留率没有显著性差异,在 6~10 h 时差异显著($P < 0.05$)。在 80、100、120 °C 加热 10 h 后酰化天竺葵素保留率分别为 81.59%、71.82%、58.03%,未酰化天竺葵素为 71.59%、60.04%、49.27%,酰化天竺葵素均显著高于未被酰化天竺葵素,说明酰化天竺葵素的热稳定性显著提高。

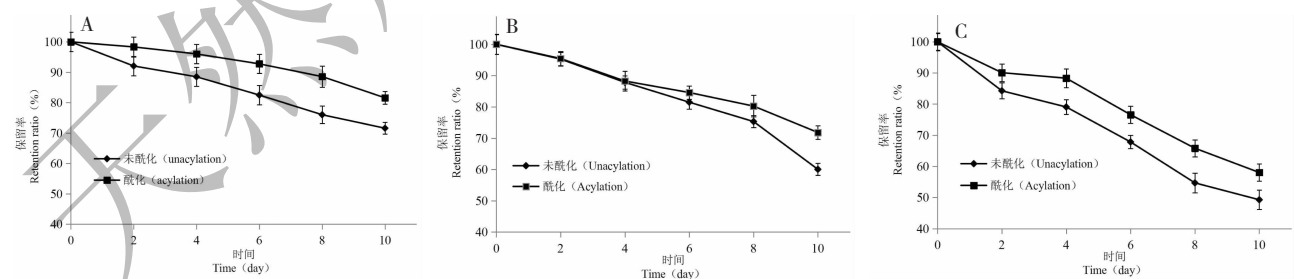


图 3 温度对天竺葵素保留率的影响

Fig. 3 The effects of temperature on the retention rate of pelargonidin

注:A:80 °C;B:100 °C;C:120 °C。Note:A:80 °C;B:100 °C;C:120 °C.

2.4 酰化天竺葵素对金属离子稳定性的影响

由图 4 可知,随着反应时间的增长,0.01 mol/L 的四种金属离子对未酰化和酰化天竺葵素的稳定性

均有显著影响($P < 0.05$)。其中 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 对未酰化与酰化天竺葵素的保留率影响差异不显著,而 Al^{3+} 对已酰化和未酰化天竺葵素的稳定性影

响有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明酰化后的天竺葵素对金属离子的稳定性和金属离子的类型有关, 对

Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 稳定性好于 Al^{3+} 。

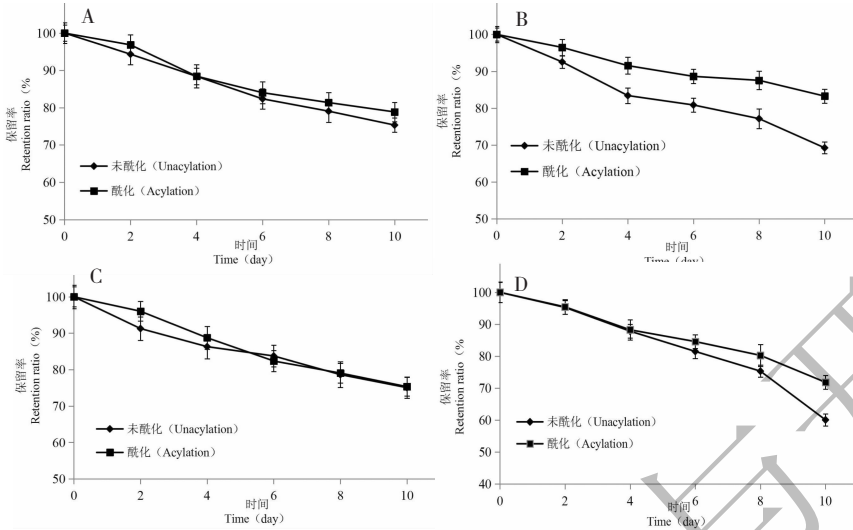


图4 金属离子对天竺葵素保留率的影响

Fig. 4 The effect of metal ion the retention rate of pelargonidin

注:A: Fe^{2+} ; B: Al^{3+} ; C: Mg^{2+} ; D: Zn^{2+} 。Note: A: Fe^{2+} ; B: Al^{3+} ; C: Mg^{2+} ; D: Zn^{2+} 。

2.5 酰化天竺葵素对 pH 稳定性的影响

天竺葵素受 pH 影响较大, 当 pH 值小于 3 时, 天竺葵素呈稳定的红色; 当 pH 值在 3 ~ 6 范围之间时, 红色变浅; 当 pH 值大于 6 时, 呈不稳定的蓝色^[19]。由图 5 可知, 胭脂萝卜天竺葵素在 $pH < 6$ 时, 即酸性条件下较为稳定, 在碱性条件下保留率下降显著 ($P < 0.05$)。酰化天竺葵素的保留率显著高于未酰化的天竺葵素 ($P < 0.05$)。

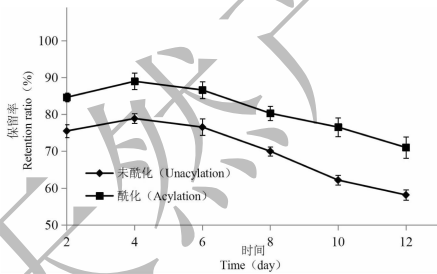


图5 pH对酰化天竺葵素保留率的影响

Fig. 5 The effect of pH on the retention rate of pelargonidin

2.6 酰化天竺葵素对 H_2O_2 稳定性的影响

由图 6 可知, 在反应 2 ~ 8 h 内, 添加 10% 过氧化氢对天竺葵素的保留率无显著影响 ($P > 0.05$), 在 8 h 后, 酰化天竺葵素的保留率显著高于未酰化天竺葵素 ($P < 0.05$), 说明在长时间反应后酰化天竺葵素对强氧化剂的稳定性提高, 而且短时间内酰化天竺葵素的优势并不显著。

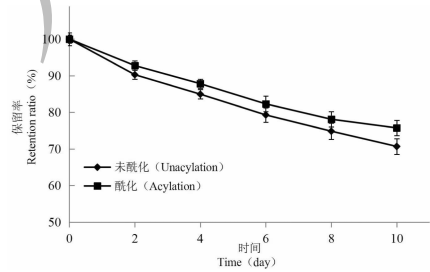


图6 H_2O_2 对天竺葵素保留率的影响

Fig. 6 The effect of H_2O_2 on the retention rate of pelargonidin

2.7 酰化天竺葵素抗氧化活性评价

2.7.1 对羟自由基 ($\cdot OH$) 的清除效果

由图 7 可知, 当酰化天竺葵素、未酰化天竺葵素与 V_C 浓度在 0.5 ~ 2.5 mg/mL 内时, 对羟基的清除率均随浓度的增加而增大。相同浓度的 V_C 对羟自由基的清除率均低于天竺葵素 ($P < 0.05$), 酰化前

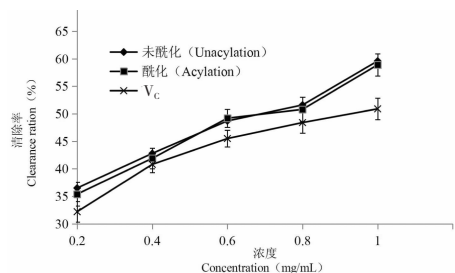


图7 天竺葵素对羟自由基的清除率

Fig. 7 Pelargonidin removal rate of hydroxyl radicals

后天竺葵素对羟自由基的清除能力未见显著差异,说明胭脂萝卜天竺葵素具有良好的羟自由基清除能力,且水杨酸酰化未影响其清除羟自由基的能力。

2.7.2 对 DPPH 自由基的清除效

如图 8 所示,当在 0.2 ~ 0.8 mg/mL 间,酰化天竺葵素、未酰化天竺葵素和 V_c 对 DPPH 自由基的清除率均随着浓度的增加而增加。当浓度达到 0.8 mg/mL 时,天竺葵素对 DPPH 清除率达到最高,但低于 V_c ($P < 0.05$),酰化前后天竺葵素对 DPPH 自由基具有相当的清除效果,说明酰化未影响天竺葵素对 DPPH 自由基的清除能力。

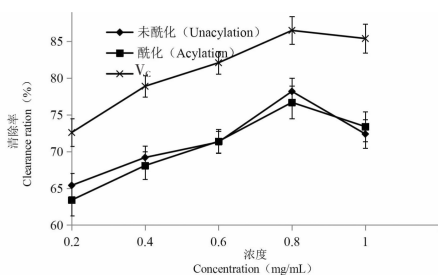


图 8 天竺葵素对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 8 Pelargonidin removal rate of DPPH radicals

2.7.3 对 ABTS 自由基清除的效果

如图 9 所示,酰化天竺葵素、未酰化天竺葵素和 V_c 均对 ABTS 自由基具有明显清除作用,当浓度在 0.2 ~ 1.0 mg/mL 范围内时,对 ABTS 自由基的清除率均随着浓度的增加而增加,同等浓度下 V_c 对 ABTS 的清除率高于天竺葵素,当浓度达到 0.8 mg/mL 后, V_c 对 ABTS 自由基清除几乎达到饱和,1 mg/mL 天竺葵素对 ABTS 自由基清除率达 75.2%,酰化前后天竺葵素对 ABTS 自由基的清除率无显著性差异,说明酰化并未影响天竺葵素对 ABTS 自由基的清除能力。

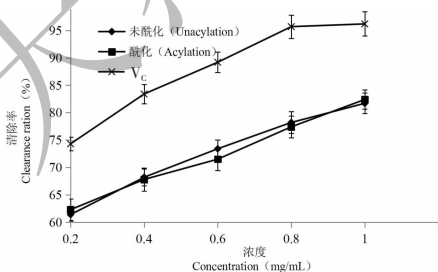


图 9 天竺葵素对 ABTS 自由基的清除率

Fig. 9 Pelargonidin removal rate for ABTS radicals

3 结论

通过对胭脂萝卜天竺葵素的稳定性进行探究,研究表明天竺葵素的稳定性在一定范围内与光照、温度呈反相关,氧化剂、金属离子、pH 对其稳定性也有较大影响。采用水杨酸为酰化剂,对胭脂萝卜天竺葵素进行酰化,发现酰化天竺葵素在温度高于 80 °C,光照 2 天、增加 Al^{3+} 及不同的 pH 条件下,稳定性均高于未酰化天竺葵素,酰化与未酰化天竺葵素对 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 以及 H_2O_2 无显著影响。说明酰化使得其耐高温、耐光性能有了较大的改良,对工业生产过程中的温度及光照有更好的耐受性。

研究还对酰化及未酰化天竺葵素进行各项抗氧化指标测定,分析水杨酸酰化对天竺葵素的体外抗氧化活性的影响,发现酰化天竺葵素对羟自由基、DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力与未酰化天竺葵素无显著差异,表明水杨酸酰化天竺葵素的稳定性优于未经修饰的天竺葵素,且对其抗氧化活性无影响影响,有较高的开发应用和研究价值,其机理及应用技术还需进一步研究。

参考文献

- 1 Khoo HE, Azlan A, Tang ST, et al. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [J]. Food Nutri Res, 2017, 1: 1361779.
- 2 Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, et al. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin [J]. J Agric Food Chem, 2002, 1: 166-171.
- 3 Meiers S, Kemény M, Weyand U, et al. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor [J]. J. Agric Food Chem, 2001, 2: 958-62.
- 4 Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables [J]. Life Sci, 2005, 13: 1465-1472.
- 5 Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, et al. Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types [J]. Cancer Letters, 2017, 393: 94-102.
- 6 Patras A, Brunton N P, O'Donnell C, et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation [J]. Tre Food Sci Tech, 2010, 1: 3-11.