

黑莓品种‘Boysen’果实水提物和色素对 DPPH· 的反应动力学特性及清除能力研究

赵慧芳, 方亮, 吴文龙, 李维林^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

摘要: 以 V_c 和 BHT 为对照, 运用反应动力学研究方法对黑莓 (*Rubus* spp.) 品种‘Boysen’果实的水提物和色素与 1, 1-二苯基-2-苦基肼自由基 (DPPH·) 的反应动力学特性和清除能力进行了研究。结果表明: V_c 、BHT、黑莓果实水提物和色素与 DPPH· 反应完全所需的时间差异较大, 其中, $0.05 \sim 0.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} V_c$ 仅为 1 min, $0.51 \sim 4.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BHT 超过 120 min, $10.00 \sim 100.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水提物为 28 ~ 100 min, $0.03 \sim 0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 色素为 10 ~ 100 min; V_c 与 DPPH· 的反应在瞬间完成, BHT 与 DPPH· 的反应可分为 2 个阶段, 而水提物或色素与 DPPH· 的反应均可分为 3 个阶段, 各阶段的反应速率常数 (k) 值均随反应时间而减小; 随 V_c 、BHT、水提物和色素质量浓度的提高, 与 DPPH· 的反应速率均逐渐增加, 整体反应时间缩短; 总体上, 水提物和色素与 DPPH· 的反应速率比 V_c 低, 但明显高于 BHT, k 值由大至小依次为 V_c 、色素、水提物、BHT。黑莓果实水提物清除 DPPH· 的半数有效浓度 (EC_{50}) 为 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 高于 BHT 和 V_c ; 总抗氧化能力值 (TCA) 和清除自由基能力 (AE) 分别为 $2.89 \mu\text{mol}$ 和 4.99×10^{-4} , 均低于 BHT 和 V_c , 说明黑莓果实水提物的抗氧化特性比 BHT 和 V_c 弱。黑莓果实色素的 EC_{50} 为 $7.16 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于 BHT 和 V_c ; TCA 为 $809 \mu\text{mol}$, 高于 BHT 和 V_c ; AE 为 1.40×10^{-1} , 低于 V_c 但明显高于 BHT, 说明黑莓果实色素的抗氧化特性比 BHT 强。研究结果显示: 黑莓果实色素是一种优良的天然抗氧化剂, 值得进一步开发应用。

关键词: 黑莓果实; 水提物; 色素; DPPH·; 反应动力学; 抗氧化性

中图分类号: S663.2; TS201.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0010-07

Study on reaction kinetic property and scavenging ability of aqueous extracts and pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Boysen’ fruit to DPPH· ZHAO Hui-fang, FANG Liang, WU Wen-long, LI Wei-lin^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 10-16

Abstract: Taking V_c and BHT as controls, reaction kinetic property and scavenging ability of aqueous extracts and pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Boysen’ fruit to 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH·) were researched by reaction kinetic method. The results show that complete reaction time of V_c , BHT, aqueous extracts and pigment to DPPH· has a great difference, in which, that of $0.05 \sim 0.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} V_c$ is only 1 min, that of $0.51 \sim 4.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BHT is over 120 min, that of $10.00 \sim 100.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ aqueous extracts and $0.03 \sim 0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pigment is 28 ~ 100 and 10 ~ 100 min, respectively. The reaction of V_c to DPPH· completes instantaneously, that of BHT to DPPH· is divided into two stages, that of aqueous extracts or pigment to DPPH· is divided into three stages, and the reaction rate constant (k) at different stages decreases with prolonging of reaction time. As enhancing of V_c , BHT, aqueous extracts and pigment concentrations, reaction rate of them to DPPH· increases gradually and whole reaction time becomes short. Generally, reaction rate of aqueous extracts and pigment to DPPH· is lower than that of V_c , but obviously higher than that of BHT. And the order of k value from big to small is V_c , pigment, aqueous extracts, BHT. Half effective concentration (EC_{50}) of aqueous extracts scavenging DPPH· with a value of $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ is higher than those of BHT and V_c ,

收稿日期: 2010-08-10

基金项目: 江苏省农业高科技项目 (BG2007311); 江苏省科技基础设施建设计划项目 (BM2009041)

作者简介: 赵慧芳 (1984—), 女, 山西临汾人, 硕士, 研究实习员, 主要从事黑莓等植物功能性营养物质的研究。

^①通信作者 E-mail: lwlcnb@mail.cnbg.net

and total antioxidative capacity (TCA) and antiradical efficiency (AE) are $2.89 \mu\text{mol}$ and 4.99×10^{-4} , respectively, and lower than those of BHT and V_C , which indicates that antioxidant property of aqueous extracts is weaker than those of BHT and V_C . EC_{50} of pigment with a value of $7.16 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ is lower than those of BHT and V_C , its TCA with a value of $809 \mu\text{mol}$ is higher than those of BHT and V_C , its AE with a value of 1.40×10^{-1} is lower than that of V_C but obviously higher than that of BHT, which indicates that antioxidant property of pigment is stronger than that of BHT. It is concluded that the pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Boysen’ fruit is an excellent natural antioxidant and further worthy to be developed and applied.

Key words: blackberry (*Rubus* spp.) fruit; aqueous extracts; pigment; DPPH·; reaction kinetics; antioxidation

近年来,抗氧化剂广泛用于食品、化妆品行业,需求量逐年增加,开发安全、高效的天然抗氧化剂成为现代工业的一项重大课题。黑莓(*Rubus* spp.)原产北美,果实柔嫩多汁、酸甜爽口、风味独特、色泽艳丽、营养丰富,富含色素等多酚类物质,具有较强的抗癌、抗衰老、抗氧化和清除自由基的作用^[1-3],其鲜果和加工品深受欧美消费者的青睐。

植物提取成分的体外抗氧化活性测定方法有很多,其中,近年来发展起来的 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH·)分光光度法简便、灵敏、稳定,在国内外已广泛应用^[4-7]。利用该法进行测定时,大部分学者采用固定反应时间的方式进行测定^[8-10]。笔者在研究中发现,在固定反应时间内(如 30 或 40 min),无论是对照品 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)还是供试样品(黑莓果实水提物),与 DPPH· 的反应并未达到终点;很多研究结果也表明,不同抗氧化剂清除 DPPH· 的速率是有差异的。因此,在定量测定合成或天然抗氧化剂对 DPPH· 的清除能力时,首先要进行反应动力学研究以确定其达到稳定态时所需的反应时间。

作者以 V_C 和 BHT 为对照,通过 DPPH· 分光光度法研究了黑莓品种‘Boysen’果实水提物及色素与 DPPH· 的反应动力学特性,并依据反应动力学结果比较二者对 DPPH· 清除能力的差异,以期在黑莓鲜果及其制品抗氧化性能的研究及深度开发提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的黑莓品种‘Boysen’果实于 2009 年采自江苏省·中国科学院植物研究所黑莓品种园,于 $-38 \text{ }^\circ\text{C}$

速冻后于 $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存、备用。

DPPH· 标准品(纯度大于 99%)由美国 Sigma 公司生产, V_C 和 BHT 均为分析纯。所用仪器有: TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、KQ-100DE 数控超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)和 PL-5-B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂)等。

1.2 方法

1.2.1 DPPH· 标准曲线的绘制 精确称取 DPPH· 标准品 4.5 mg,用无水乙醇配制浓度为 $115 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH· 标准品母液。分别吸取 2.0 mL 标准品母液,用无水乙醇稀释至浓度分别为 115、76、57、46、38 和 $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,于 517 nm 处测定吸光度。以浓度 x 为横坐标、吸光度 y 为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为 $y = 0.010 5x + 0.013 2$, $R^2 = 0.997 1$ (极显著相关),说明在 $32 \sim 115 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内 DPPH· 与吸光度具有较好的线性关系。

1.2.2 黑莓果实水提物和色素的制备 速冻果经解冻、打浆,以质量体积比 1:9 的比例将果浆和纯净水混合,于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 超声(功率 60 W)提取 40 min 后, $4 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液即为果实水提物,配制质量浓度分别为 10.00、12.50、16.67、25.00、50.00 和 $100.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用。

参照文献[11]的方法制得果实色素粉末,经 pH 示差法^[12]测得总花色苷含量为 $(18.50 \pm 0.85)\%$ 。精确称取黑莓色素制品 0.050 0 g,分别用体积分数 50% 乙醇溶解并定容至 250 mL,逐步稀释为质量浓度 0.03、0.06、0.11、0.13、0.16 和 0.21 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液备用。

1.2.3 反应动力学研究 用无水乙醇配制质量浓度 0.51、0.81、1.01、1.35、2.02 和 4.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BHT 溶液及 0.05、0.09、0.10、0.12、0.13 和 0.26 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

的 V_C 溶液。取不同质量浓度的 BHT、 V_C 、水提物和色素溶液各 200 μL ，分别加入 2.80 mL DPPH· 标准品母液，采用动力学监测法，以无水乙醇为空白，于 517 nm 处测定不同反应时间溶液的吸光度 (A_i)，其中，0 ~ 5 min 隔 30 s 测定 1 次，5 ~ 10 min 隔 60 s 测定 1 次，10 ~ 30 min 隔 5 min 测定 1 次，30 min 之后隔 10 min 测定 1 次，待吸光度基本不变 (前后 2 次差值小于 0.01%) 时视为样品与自由基反应完全，所有动力学实验均在 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。另外，按同法分别测定 200 μL 无水乙醇加 2.80 mL DPPH· 母液在 517 nm 下的吸光度 (A_c) 和 200 μL 供试溶液加 2.80 mL 无水乙醇在 517 nm 下的吸光度 (A_j)。按照公式计算自由基清除率^[7]：清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$ 。

反应速率常数 (k) 的确定：根据反应动力学原理，一级反应符合方程 $v = -dc/dt = kc$ 和 $\ln(c) = -kt$ [其中， v 为反应速率； c 为 DPPH· 浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)； t 为反应时间]，即以 $\ln(c)$ 对 t 作图，直线的斜率即为 $-k$ ，反应速率常数 k 值越大说明反应速率越快^[13-14]。根据反应速率常数确定反应到达终点所需的时间。

1.2.4 清除自由基能力的计算 根据不同质量浓度供试溶液清除 DPPH· 的曲线，计算得出 DPPH· 初始浓度减少至 50% 时所对应的供试品质量浓度即为半

数有效浓度 (EC_{50})^[15]。根据 EC_{50} 及此时对应清除 DPPH· 的量，计算总抗氧化能力值 (TCA)^[16]，即在半数有效浓度下 1 mL 供试溶液清除 DPPH· 的量。

根据 EC_{50} 及在此浓度下反应达到终点所需的时间，求得供试样品的清除自由基能力 (AE)^[5,17]，AE 值越大，表明供试品清除自由基的能力越强。

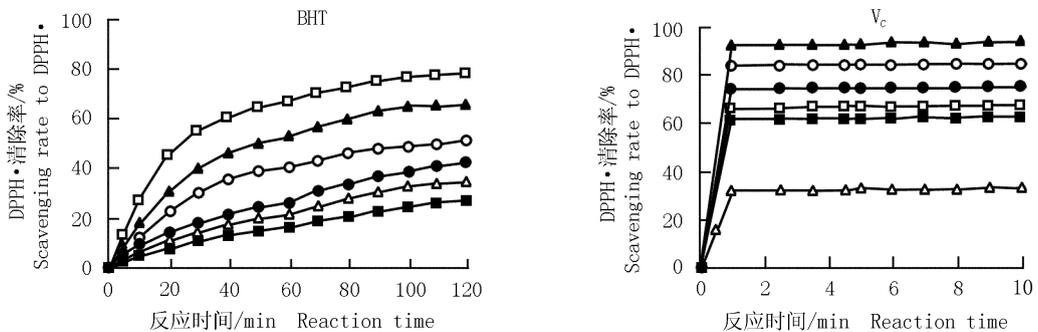
1.3 数据处理

采用 Excel 2003 分析软件进行数据的统计、计算和分析，并绘制 BHT、 V_C 、果实水提物和色素清除 DPPH· 的动力学曲线及清除率曲线。

2 结果和分析

2.1 与 DPPH· 的反应动力学特性比较

2.1.1 BHT 和 V_C 对 DPPH· 的反应动力学特性 不同质量浓度 BHT 和 V_C 对 DPPH· 的反应动力学曲线见图 1。0.51 ~ 4.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BHT 与 DPPH· 的反应在 120 min 时基本达到稳定，而 0.05 ~ 0.26 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ V_C 与 DPPH· 的反应均在 1 min 内瞬间完成，连续测定 10 min，各质量浓度 V_C 对 DPPH· 的清除率均维持不变，说明在 1 min 时反应均已结束。



BHT: \square —4.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \blacktriangle —2.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \circ —1.35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \bullet —1.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \triangle —0.81 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \blacksquare —0.51 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
 V_C : \blacktriangle —0.26 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \circ —0.13 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \bullet —0.12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \square —0.10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \blacksquare —0.09 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; \triangle —0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 1 不同质量浓度 BHT 和 V_C 对 DPPH· 的反应动力学曲线
 Fig. 1 Reaction kinetic curves of different concentrations of BHT and V_C to DPPH·

根据不同质量浓度 BHT 和 V_C 的反应动力学曲线，分别将 DPPH· 的浓度进行对数换算。以 $\ln(c)$ 对 t 作图，根据斜率计算反应速率常数 k ，结果见表 1。由表 1 可见，在 120 min 反应时间内，0.51 ~ 4.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BHT 对 DPPH· 的反应分为 2 个阶段：第 1 个阶段为

0 ~ 30 min，反应速率较快；第 2 个阶段为 30 ~ 120 min，反应速率较慢。在第 1 个反应阶段中，4.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BHT 与 DPPH· 的反应速率常数 k_1 为 0.028 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ；随着 BHT 质量浓度的降低， k_1 逐渐降低，当 BHT 质量浓度达到 0.51 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时， k_1 仅为

0.004 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在第 2 个反应阶段中,随 BHT 质量浓度的降低,反应速率常数 k_2 整体上也呈逐渐降低的趋势,但 k_2 明显低于 k_1 。由于实验条件的限制,动力学反应只持续进行了 120 min,第 2 个反应阶段的 k_2 为 0.002 3 ~ 0.008 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,均大于 0.001 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,据此推测该反应可能还存在反应速率常数更低的第 3 反应阶段,这与 Bondet 等^[18]报道的“BHT 对 DPPH· 的反应属于慢反应过程”是一致的。

表 1 不同质量浓度 V_c 和 BHT 对 DPPH· 的反应动力学特征¹⁾
Table 1 Reaction kinetic property of different concentrations of V_c and BHT to DPPH·¹⁾

供试溶液 Solution tested	k_1	t_1	k_2	t_2
0.26 g · L ⁻¹ V_c	111.590	0-1	-	-
0.13 g · L ⁻¹ V_c	94.077	0-1	-	-
0.12 g · L ⁻¹ V_c	89.346	0-1	-	-
0.10 g · L ⁻¹ V_c	79.907	0-1	-	-
0.09 g · L ⁻¹ V_c	67.407	0-1	-	-
0.05 g · L ⁻¹ V_c	38.598	0-1	-	-
4.04 g · L ⁻¹ BHT	0.028 5	0-30	0.008 1	30-120
2.02 g · L ⁻¹ BHT	0.017 7	0-30	0.006 4	30-120
1.35 g · L ⁻¹ BHT	0.012 7	0-30	0.003 7	30-120
1.01 g · L ⁻¹ BHT	0.007 0	0-30	0.004 0	30-120
0.81 g · L ⁻¹ BHT	0.005 7	0-30	0.003 2	30-120
0.51 g · L ⁻¹ BHT	0.004 1	0-30	0.002 3	30-120

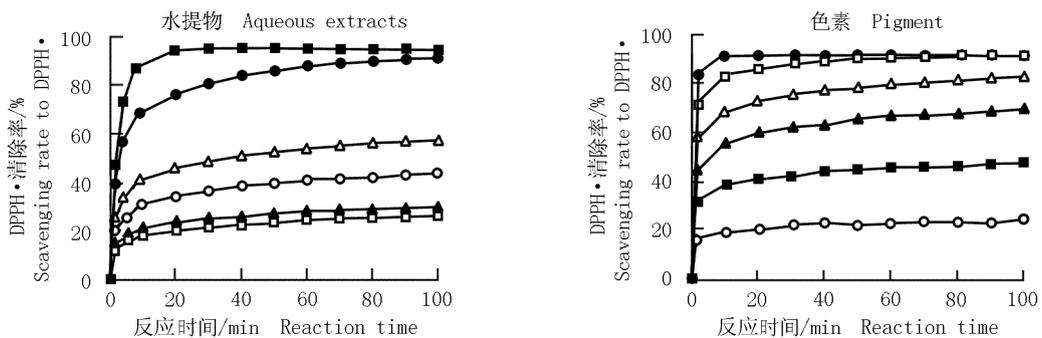
¹⁾ k_1 和 k_2 分别为第 1 和第 2 反应阶段的反应速率常数 k_1 和 k_2 are reaction rate constants at the first and second reaction stages, respectively ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$); t_1 和 t_2 分别为第 1 和第 2 反应阶段的反应时间 t_1 and t_2 are reaction time at the first and second reaction stages, respectively (min).

0.05 ~ 0.26 g · L⁻¹ V_c 对 DPPH· 反应的反应速率常数在 0 ~ 1 min 内均较大,0.05 g · L⁻¹ V_c 对 DPPH· 的反应速率常数 k_1 为 38.598 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,随着 V_c 质量浓度的提高 k_1 逐渐增大,0.26 g · L⁻¹ V_c 对 DPPH· 的 k_1 最高,达 111.590 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,表明 V_c 对 DPPH· 的清除反应为瞬时反应。

2.1.2 黑莓果实水提物和色素对 DPPH· 的反应动力学特性 黑莓品种 'Boysen' 果实的不同质量浓度水提物和色素对 DPPH· 的反应动力学曲线见图 2。10.00 ~ 100.00 g · L⁻¹ 水提物和 0.03 ~ 0.21 g · L⁻¹ 色素对 DPPH· 的反应均在 100 min 时趋于稳定。

根据水提物和色素与 DPPH· 的反应动力学曲线,可将 10.00 ~ 100.00 g · L⁻¹ 水提物或 0.03 ~ 0.21 g · L⁻¹ 色素与 DPPH· 的整个反应均分为 3 个阶段,各反应阶段的反应速率常数见表 2。

100.00 g · L⁻¹ 水提物与 DPPH· 的反应于 28 min 趋于稳定,整个反应可分为 0 ~ 4、4 ~ 10 和 10 ~ 28 min 3 个反应阶段;10.00 ~ 50.00 g · L⁻¹ 水提物与 DPPH· 的反应均在 100 min 时趋于稳定,整个反应可分为 0 ~ 4、4 ~ 30 和 30 ~ 100 min 3 个反应阶段。同一质量浓度水提物的反应速率常数由大到小依次为 k_1 、 k_2 、 k_3 ,即第 1 个反应阶段反应速率最快,第 2 个反应阶段次之,第 3 个反应阶段最慢。3 个反应阶段的反应速率常数均随水提物质量浓度的提高而增大,其中 100.00 g · L⁻¹ 水提物的反应速率常数最大。100.00 g · L⁻¹ 水提物在第 1、第 2 和第 3 反应阶段对



水提物 Aqueous extracts: —■— 100.00 g · L⁻¹; —●— 50.00 g · L⁻¹; —△— 25.00 g · L⁻¹; —○— 16.67 g · L⁻¹; —▲— 12.50 g · L⁻¹; —□— 10.00 g · L⁻¹. 色素 Pigment: —●— 0.21 g · L⁻¹; —□— 0.16 g · L⁻¹; —△— 0.13 g · L⁻¹; —▲— 0.11 g · L⁻¹; —■— 0.06 g · L⁻¹; —○— 0.03 g · L⁻¹.

图 2 黑莓品种 'Boysen' 果实的不同质量浓度水提物和色素对 DPPH· 的反应动力学曲线
Fig. 2 Reaction kinetic curves of different concentrations of aqueous extracts and pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar 'Boysen' fruit to DPPH·

表2 黑莓品种‘Boysen’果实的不同质量浓度水提物和色素对 DPPH· 的反应动力学特征¹⁾Table 2 Reaction kinetic property of different concentrations of aqueous extracts and pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Boysen’ fruit to DPPH·¹⁾

样品 Sample	质量浓度/g · L ⁻¹ Conc.	k ₁	t ₁	k ₂	t ₂	k ₃	t ₃
水提物 Aqueous extracts	100.00	0.327 9	0-4	0.152 4	4-10	0.042 8	10-28
	50.00	0.211 4	0-4	0.028 3	4-30	0.012 3	30-100
	25.00	0.104 7	0-4	0.008 6	4-30	0.002 9	30-100
	16.67	0.076 3	0-4	0.005 5	4-30	0.001 8	30-100
	12.50	0.048 7	0-4	0.003 4	4-30	0.001 0	30-100
	10.00	0.043 3	0-4	0.002 8	4-30	0.001 0	30-100
色素 Pigment	0.21	1.527 9	0-1	0.172 5	1-4	0.057 1	4-10
	0.16	1.043 5	0-1	0.099 1	1-6	0.027 5	6-20
	0.13	0.713 9	0-1	0.067 2	1-4	0.008 6	4-100
	0.11	0.520 9	0-1	0.051 9	1-4	0.005 5	4-100
	0.06	0.339 7	0-1	0.026 6	1-4	0.002 4	4-100
	0.03	0.167 5	0-1	0.014 8	1-4	0.000 9	4-100

¹⁾ k₁、k₂和k₃分别为第1、第2和第3反应阶段的反应速率常数 k₁、k₂和k₃ are reaction rate constants at the first, second and third reaction stages, respectively (μmol · L⁻¹ · min⁻¹); t₁、t₂和t₃分别为第1、第2和第3反应阶段的反应时间 t₁、t₂和t₃ are reaction time at the first, second and third reaction stages, respectively (min).

应的 k₁、k₂和k₃均最大,分别为0.327 9、0.152 4和0.042 8 μmol · L⁻¹ · min⁻¹;在28~100 min内反应速率常数仅为0.000 7 μmol · L⁻¹ · min⁻¹,小于0.001 μmol · L⁻¹ · min⁻¹,说明28 min时反应已结束。与BHT和V_c相比,黑莓果实水提物与DPPH·反应的反应时间较BHT短,但比V_c长;反应速率常数也较BHT大,而比V_c小。

由表2可见,0.21 g · L⁻¹色素与DPPH·的反应在10 min时趋于稳定,整个反应可分为0~1、1~4和4~10 min 3个阶段;0.16 g · L⁻¹色素与DPPH·的反应在20 min时趋于稳定,整个反应可分为0~1、1~6和6~20 min 3个反应阶段;0.03~0.13 g · L⁻¹色素与DPPH·的反应均在100 min时趋于稳定,整个反应均可分为0~1、1~4和4~100 min 3个阶段。随色素质量浓度的提高,第1、第2和第3反应阶段的反应速率常数逐渐增大;随反应时间的延长,不同质量浓度色素在第1、第2和第3反应阶段的反应速率常数则逐渐减小,0.21 g · L⁻¹色素在第1、第2和第3反应阶段的k₁、k₂和k₃均最大,分别为1.527 9、0.172 5和0.057 1 μmol · L⁻¹ · min⁻¹。在第1、第2和第3反应阶段,不同质量浓度黑莓色素的反应速率常数的变化趋势与黑莓果实水提物相同。

从反应速率常数和反应时间上可以看出,黑莓色素与DPPH·的反应速率较黑莓果实水提物和BHT高,但低于V_c;色素与DPPH·的反应速率为水提物的

4~7倍,质量浓度较高的色素与DPPH·的反应在10~20 min时即达到终点,而水提物最少需要28 min,这可能与黑莓果实水提物成分较为复杂有关。

2.2 对DPPH·清除作用的比较

2.2.1 BHT和V_c对DPPH·的清除作用

根据反应动力学研究结果,以反应120 min时0.51~4.04 g · L⁻¹BHT和反应1 min时0.05~0.26 g · L⁻¹V_c对DPPH·的清除率为最终清除率,分别绘制不同质量浓度BHT和V_c对DPPH·的清除率曲线,结果见图3。在0.00~1.35 g · L⁻¹质量浓度范围内,DPPH·清除率(y)和BHT质量浓度(x)的线性关系良好,回归方程为y=40.999x, R²=0.958 4,呈极显著相关。根据回归方程求得BHT的EC₅₀为1.22 g · L⁻¹,在此浓度下,TCA为47.5 μmol,AE为6.83×10⁻³。

在0.00~0.13 g · L⁻¹质量浓度范围内,DPPH·清除率(y)和V_c质量浓度(x)有较好的线性关系,回归方程为y=643.99x, R²=0.999 5,呈极显著相关。根据回归方程求得V_c的EC₅₀为7.76×10⁻² g · L⁻¹,在此浓度下,TCA为724 μmol,AE为12.9。

2.2.2 黑莓果实水提物和色素对DPPH·的清除作用

以反应100 min时10.00~100.00 g · L⁻¹果实水提物和0.03~0.21 g · L⁻¹色素对DPPH·的清除率为最终清除率,分别绘制不同质量浓度水提物和色素对DPPH·的清除率曲线,结果见图4。水提物质量浓度在0.00~25.00 g · L⁻¹范围内,DPPH·清除率(y)和果

实水提物的质量浓度(x)线性关系良好,回归方程为 $y=2.4972x$, $R^2=0.9834$,呈极显著相关。根据回归方程求得水提物的 EC_{50} 为 $20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,TCA为 $2.89\text{ }\mu\text{mol}$,AE为 4.99×10^{-4} ,其中,水提物的 EC_{50} 高于 V_c 和BHT,而其TCA和AE均较 V_c 和BHT低。

在 $0.00\sim 0.12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,DPPH·清除率(y)和黑莓果实色素质量浓度(x)的线性关系良好,回归

方程为 $y=698.19x$, $R^2=0.9868$,呈极显著相关。根据回归方程求得色素的 EC_{50} 为 $7.16\times 10^{-2}\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,远低于黑莓果实水提物和BHT,与 V_c 接近;TCA为 $809\text{ }\mu\text{mol}$,分别是 V_c 、BHT和水提物的1.1、17.0和279.9倍;AE为 1.40×10^{-1} ,低于 V_c ,仅为 V_c 的1.1%,但高于BHT和水提物,分别是BHT和水提物的20.5和280.6倍。

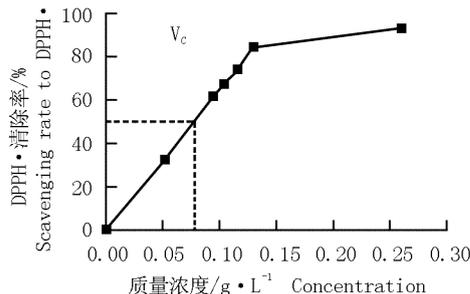
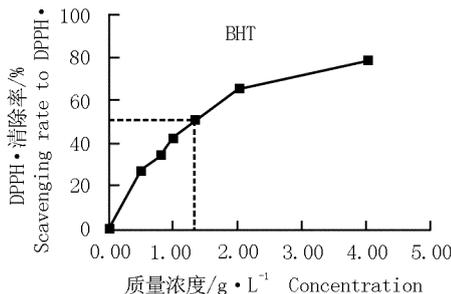


图3 不同质量浓度BHT和 V_c 对DPPH·的清除率曲线
Fig. 3 Curves of scavenging rate of different concentrations of BHT and V_c to DPPH·

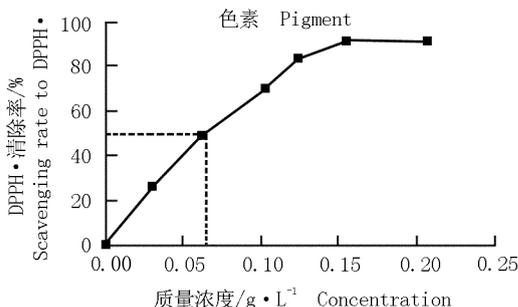
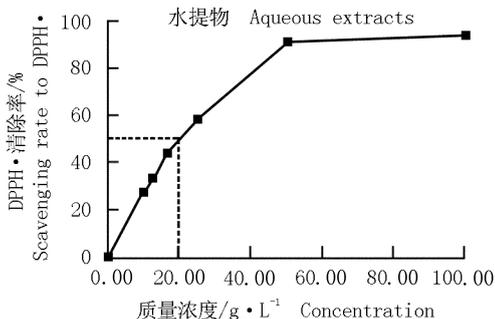


图4 黑莓品种‘Boysen’果实的不同质量浓度水提物和色素对DPPH·的清除率曲线
Fig. 4 Curves of scavenging rate of different concentrations of aqueous extracts and pigment from blackberry (*Rubus* spp.) cultivar ‘Boysen’ fruit to DPPH·

3 讨论和结论

植物体内的抗氧化体系通常是一个复合体系,不同物种间或者同一物种不同提取物的抗氧化组分间均存在差异^[19]。因此,以DPPH·清除率来表征植物的抗氧化力时应充分考虑其反应的动力学特点。本实验结果表明,不同的抗氧化剂对DPPH·的清除速率和反应达到平衡所需的时间存在很大差异。 V_c 在瞬间完成反应,反应速率常数(k)为 $38.598\sim 111.590\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$;而BHT与DPPH·的反应则为慢反

应,在 $0\sim 30\text{ min}$ 的反应时间内, $0.51\sim 4.04\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT的 k 值为 $0.0041\sim 0.0285\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$;水提物和色素对DPPH·的清除速率介于 V_c 和BHT之间,在 $0\sim 4\text{ min}$ 反应时间内 $10\sim 100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水提物的 k 值为 $0.0433\sim 0.3279\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,在 $0\sim 1\text{ min}$ 反应时间内 $0.03\sim 0.21\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 色素的 k 值为 $0.1675\sim 1.5279\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; k 值由大到小依次为 V_c 、色素、水提物、BHT。唐勇等^[16]的研究结果表明,在抗氧化剂和DPPH·反应的后期,DPPH·浓度的缓慢下降是由于自然衰减引起的。笔者在进行反应动力学研究时对空白溶液的吸光度随时间的变化

也进行了测定,未发现 DPPH· 的自然衰减现象,因此可以排除这一因素的影响。

一般情况下,在 k 小于 0.001 时,即可判定反应接近终点。根据该原理可以确定 V_c 、BHT、黑莓果实水提物和色素与 DPPH· 反应到达终点时所需要的时间, V_c 仅为 1 min, BHT 超过 120 min,水提物为 28 ~ 100 min,色素为 10 ~ 100 min。不同浓度的 V_c 、BHT、水提物和色素对 DPPH· 的清除速率也有所差异,浓度越高反应速率越大,达到反应终点所需的时间越短。

以 V_c 和 BHT 为对照,比较黑莓果实水提物和色素的抗氧化能力,结果表明,水提物的清除自由基能力较 V_c 和 BHT 低,但与 DPPH· 的反应速率明显大于 BHT,反应时间也较 BHT 短;色素的 EC_{50} 较 V_c 低,其 TCA 是 V_c 的 1.1 倍,但由于色素和 DPPH· 反应达到终点的时间较 V_c 长,因此色素的清除自由基能力较 V_c 低,但明显高于 BHT,是 BHT 的 20.5 倍。

综上所述,黑莓果实具有一定的清除自由基活性,清除效果与其浓度存在明显的量效关系。过量的自由基是人体多种疾病(如肿瘤、炎症、衰老和血液病)的元凶^[20],因此黑莓果实不仅可以作为一种保健食品,以黑莓果实为原料提取的色素清除自由基的活性也远高于人工合成的抗氧化剂 BHT,可以同 V_c 媲美,具有进一步开发利用的价值。

参考文献:

- [1] Tate P, God J, Bibb R, et al. Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts[J]. *Cancer Letters*, 2004, 212(2): 153-158.
- [2] Seeram N P, Momin R A, Nair M G, et al. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries [J]. *Phytomedicine*, 2001, 8(5): 362-369.
- [3] Boateng J, Verghese M, Shackelford L, et al. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(5): 725-732.
- [4] Dall'Acqua S, Cervellati R, Loi M C, et al. Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 745-749.
- [5] Bortolomeazzi R, Verardo G, Liessi A, et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(2): 256-265.
- [6] 申海进,郭巧生,房海灵. 野菊花 60% 乙醇提取物的酚类成分组成及其清除自由基和防霉变能力分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2010, 19(1): 20-25.
- [7] Romano C S, Abadi K, Repetto V, et al. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(2): 456-461.
- [8] 曲欢欢,李白雪,燕菲,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价连翘不同部位抗氧化作用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15(增刊): 32-34.
- [9] 徐金瑞,张名位,刘兴华,等. 黑大豆种皮花色苷的提取及其抗氧化作用研究[J]. *农业工程学报*, 2005, 21(8): 161-164.
- [10] 连喜军,王亮,王喆,等. DPPH 法研究不同品种甘薯抗性淀粉抗氧化性[J]. *粮食与油脂*, 2009(6): 26-28.
- [11] 赵慧芳,李维林,王小敏,等. 黑莓果实色素纯化及干燥工艺研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(12): 35-39.
- [12] Elisia I, Hu C, Popovich D G, et al. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 1052-1058.
- [13] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1995, 28(1): 25-30.
- [14] 程霜,崔庆新,陈玮. 毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分及其体外抗自由基活性[J]. *食品科学*, 2006, 27(5): 83-87.
- [15] Xu J, Chen S B, Hu Q H. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) [J]. *Food Chemistry*, 2005, 91(1): 79-83.
- [16] 唐勇,赵靖,徐静,等. 植物总抗氧化能力的微孔板定量测定及评价[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(6): 517-520.
- [17] Sánchez-Moreno C, Larrauti J A, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76(2): 270-276.
- [18] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method[J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1997, 30(6): 609-615.
- [19] 张丽华,童华荣. 抗氧化能力测定方法的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2004(3): 108-113.
- [20] Nair S, Li W, Kong A N. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cell[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28(4): 459-472.

(责任编辑:张明霞)