

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.04.006

pH 和缓冲体系对植物多酚抑制脂氧合酶活性的影响

The effect of pH and buffer systems on the inhibition of lipoxygenase activity by plant polyphenols

叶凤凌 贾利蓉 何强 董怡

YE Feng-ling JIA Li-rong HE Qiang DONG Yi

(四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065)

(College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

摘要:为优化紫外分光光度法测定多酚抑制脂氧合酶(LOX)活性的方法,探究缓冲体系及 pH 的选取对 LOX 酶活力的影响和多酚自氧化作用,研究了不同缓冲溶液体系及 pH 条件下,LOX 酶活力的变化及没食子酸、槲皮素、儿茶素、3,4-二羟基苯乙酸的自氧化情况。结果发现,LOX 在碱性条件下活性较强,4 种多酚在硼酸盐体系中自氧化最弱,在 Tris-HCl 体系中自氧化最强;且各体系中 pH 越高 4 种多酚自氧化作用越强,紫外光谱中反映的自氧化中间产物和终产物越多。最终确定 pH 7.5 的硼酸盐缓冲液作为检测缓冲体系。分析 4 种多酚对 LOX 酶活性的影响,发现随着多酚浓度的增大,LOX 酶活性呈先下降后上升的趋势,4 种多酚对 LOX 酶活的抑制效果依次为:槲皮素>儿茶素>没食子酸>3,4-二羟基苯乙酸。**关键词:**槲皮素;没食子酸;儿茶素;3,4-二羟基苯乙酸;自氧化;脂氧合酶

Abstract: In order to optimize the Ultraviolet (UV) spectrophotometric method for determination of polyphenols inhibiting LOX activity, and to explore the influences of the buffer systems and pH on LOX enzyme activity and polyphenol auto-oxidation, this paper studied the changes of LOX enzyme activity and the auto-oxidation of gallic acid, quercetin, catechin and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under different buffer systems and pH conditions. The results showed that the activity of LOX was stronger under alkaline conditions, and the 4 polyphenols had the

weakest self-oxidation in the borate system and the strongest self-oxidation in the Tris-HCl system. The higher the pH in each system, the stronger the self-oxidation of the 4 polyphenols, and the more intermediate and final products of auto-oxidation reflected in the UV spectrum. Finally, the pH 7.5 borate buffer was determined as the detection buffer system. It was found that LOX enzyme activity decreased first and then rised with the increase of 4 kinds of polyphenol concentration. The inhibitory effect of 4 kinds of polyphenols on LOX enzyme activity was in order: quercetin>catechin>gallic acid>3,4-Dihydroxyphenylacetic acid.

Keywords: quercetin; gallic acid; catechins; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; auto-oxidation; lipoxygenase(LOX)

脂氧合酶(Lipoxygenase, EC1.13.11.12, LOX)是一种氧化还原酶,可专门催化具有顺,顺-1,4 戊二烯结构的多不饱和脂肪酸发生分子内加氧产生脂肪酸氢过氧化物^[1],例如,植物源的 LOX 底物主要是植物油脂中广泛存在的亚油酸和亚麻酸^[2-3]。LOX 对油脂的劣变具有一定促进作用,可导致油脂和含油食品在贮藏和加工过程中氧化酸败,降低产品营养和食用特性^[4-5]。抑制脂氧合酶活性是延长油脂货架期,维持油脂营养价值的重要途径之一。已有研究证明,植物中提取得到的多酚类物质可通过螯合或还原 LOX 活性部位的亚铁离子,或与脂质自由基发生反应从而中断脂质氧化链式反应^[3],达到良好的油脂氧化抑制作用^[6-8]。

LOX 酶活的常见测定方法有分光光度法、氧电极法、量压法、同位素标记法、显色法、染色法等,其中分光光度法最简便、快速,能做到连续且精准的测定^[9]。分光光度法通过测定 LOX 催化底物反应生成具有共轭二烯结构的氢过氧化化合物的吸光度值(A_{234}),计算共轭二烯生成量,推算出酶活大小^[1]。该法已被广泛用于作物中 LOX

基金项目:四川省国际科技创新合作项目,(编号:2021YFH0043);四川大学专职科研博士后科研启动项目(编号:20826041D4060)

作者简介:叶凤凌,女,四川大学在读硕士研究生。

通信作者:董怡(1986—),女,四川大学助理研究员,博士。

E-mail: waydongyi2501779@163.com

收稿日期:2020-12-11

酶活性的检测^[10-11],且已有较多研究利用该法检测从茶叶^[12]、虎杖根^[8]、蓝莓叶^[6]等植物中提取的多酚类物质对LOX酶活的抑制作用。

植物多酚常具有邻苯三酚或邻苯二酚结构,其酚羟基具有供氢能力和供电子能力^[13],使得多酚具有较强的抗氧化性以及清除自由基的能力^[14]。常见的植物多酚如槲皮素^[15-16](quercetin, QCT)、没食子酸^[17-18](gallic acid, GA)、儿茶素^[19](catechins, C)和3,4-二羟基苯乙酸^[20](3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)等均具有抗氧化、抗衰老、抗病毒、抗肿瘤等多种活性^[21-22]。但多酚所在缓冲体系的溶剂及pH可影响多酚的活性^[23]。多酚在酸性环境中较为稳定而在碱性环境不稳定,且碱性越强稳定性越差^[24]。多酚在碱性条件下易脱下邻位酚羟基上的H离子(酸碱中和反应)发生自氧化反应生成半醌和醌类物质,从而影响其活性^[25]。多酚自氧化反应的中间产物在320 nm左右有特征吸收峰,随着反应程度加剧或反应时间延长,中间产物被氧化转变为终产物,终产物在440 nm左右出现特征吸收峰^[26-27]。在已有的利用紫外分光光度法检测多酚对LOX酶活抑制作用的研究中^[6,12],检测时所选取的缓冲体系多为硼酸盐体系,所选取的pH一般以LOX的最适pH为准,对该缓冲盐体系及pH条件是否对多酚活性造成影响未有深入探讨。

为优化紫外分光光度法检测多酚抑制LOX酶活方法中的反应体系,试验拟研究不同缓冲体系和pH对LOX酶活力的影响,并选用QCT、GA、C、DOPAC 4种常见多酚,研究在不同缓冲体系和pH条件下4种多酚的自氧化情况,旨在为缓冲体系和pH对多酚自氧化及多酚对LOX酶抑制机理的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

硼酸、十水合四硼酸钠(硼砂)、二甲基亚砜(DMSO):分析纯,成都金山化学试剂有限公司;

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠:分析纯,成都科龙化工试剂厂;

吐温20、Tris:分析纯,德国BioFroxx公司;

盐酸:分析纯,成都市科隆化学品有限公司;

亚油酸、槲皮素(QCT)、没食子酸(GA)、儿茶素(C)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC):分析纯,上海源叶生物公司;

脂氧合酶(LOX):活性5万U/mg,上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

多功能微孔板检测仪:Synergy H1型,美国BioTek公司;

电子天平:SQP型,奥多利斯科学仪器有限公司;

超声波清洗器:KQ5200D型,东莞科乔超声设备有限公司;

雷磁台式pH计:PHS-3E型,仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制

(1) 缓冲液:用0.05 mol/L Na₂B₄O₇溶液和0.2 mol/L H₃BO₃溶液混合调配得到pH分别为9.0,8.5,8.0,7.5,7.0的0.2 mol/L硼酸盐缓冲液。用0.2 mol/L NaH₂PO₄溶液和0.2 mol/L Na₂HPO₄溶液混合调配得到pH分别为8.0,7.5,7.0,6.5,6.0的0.2 mol/L磷酸盐缓冲液。向50 mL 0.4 mol/L Tris溶液中滴加浓盐酸溶液调节至所需pH后用蒸馏水定容至100 mL,得到pH分别为9.0,8.5,8.0,7.5,7.0的0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液。

(2) 多酚溶液:用DMSO溶解多酚,分别配制成0.05,0.10,0.25,0.50,1.00,10.00 mmol/L的QCT溶液、GA溶液、C溶液、DOPAC溶液。

(3) LOX酶液:将100 mg脂氧合酶溶于pH 9.0的0.2 mol/L硼酸盐缓冲液中,制得酶活约为2 500 U/mL的酶液。

(4) 底物溶液:参照吴桂玲等^[6]的方法并略作修改。将0.125 mL Tween 20与5 mL pH 9.0的0.2 mol/L硼酸盐缓冲液混合,边摇边加入0.135 mL亚油酸,混匀后边摇边加入1 mol/L NaOH溶液直至澄清,调节混合液pH至7.5,用pH 7.5的0.2 mol/L硼酸盐缓冲液定容至500 mL。

1.2.2 pH、缓冲体系和多酚浓度对LOX酶活力的影响

参照吴桂玲等^[12]的方法并略作修改。缓冲体系对LOX酶活力的影响:在96孔紫外酶标板中加入酶液20 μL、不同pH的缓冲液190 μL,放入酶标仪中在25℃下振荡1 min(1 096次/min,1 mm)后加入底物30 μL;多酚浓度对LOX酶活力的影响:在96孔紫外酶标板中加入酶液20 μL、浓度分别为0.00,0.05,0.10,0.25,0.50,1.00 mmol/L的多酚溶液5 μL,pH 7.5的硼酸盐缓冲液185 μL,放入酶标仪中在25℃下振荡1 min(1 096次/min,1 mm)后加入底物30 μL。加样完成后立即在25℃下振板10 s(1 096次/min,1 mm),并测量在234 nm处的吸光度,每10 s扫描一次,10 min共扫描60次。以溶剂做空白,进行3次平行试验。制作吸光度随时间变化的曲线,在前5 min内线性较好的区域中以234 nm处的吸光度值每分钟增加0.001个单位定义为一个酶活单位。按式(1)计算酶活力。

$$X = \frac{1\,000 \times 6 \times (A_n - A_1)}{n - 1}, \quad (1)$$

式中:

X——酶活力, U;
 A₁——线性范围内第 1 次测得的吸光度;
 A_n——线性范围内第 n 次测得的吸光度;
 n——扫描检测吸光度的次数。

1.2.3 缓冲体系和反应时长对多酚自氧化的影响 参照贾红玉等^[27]的方法并略作修改。在 25 °C 条件下, 于 96 孔紫外酶标板中添加 5 μL 多酚溶液与 235 μL 缓冲液, 混合均匀后分别在 0, 60, 120 min 扫描 280~500 nm 处光谱(步长为 2 nm), 以 5 μL 的 DMSO 与 235 μL 缓冲液混合作为空白对照。

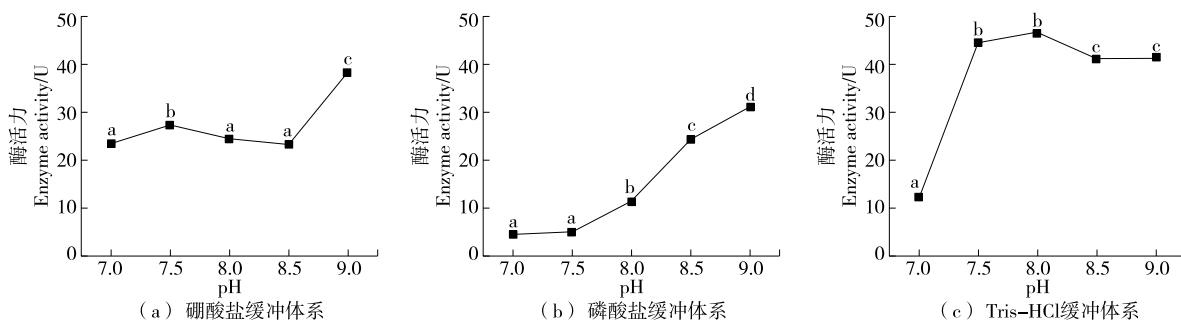
1.2.4 数据处理 所有试验均平行 3 次, 结果以平均值±标准差(SD)表示。采用 Origin 8.0 软件分析并作图。

2 结果与分析

2.1 缓冲条件对 LOX 酶活的影响

LOX 存在多种同工酶, 不同来源的 LOX 最适 pH 不同^[1, 10]。植物来源的 LOX 所耐受的 pH 值一般在 3~10, 最适 pH 一般为 6.0~9.0^[28], 同工酶 LOX-1 的最适 pH 为 9.0。通过测定不同缓冲体系、不同 pH 条件下 LOX 活性发现: 在硼酸盐缓冲体系中[图 1(a)], 酶活出现双峰结构(pH=7.5, pH≥9.0), pH 为 9.0 时酶活达 38 U, 在其他 pH 条件下酶活则在 20~30, 中性条件下酶活优于其他两组, 与刘国夫等^[11]的研究一致; 在磷酸盐体系中[图 1(b)], 酶活随 pH 值升高而显著上升(P<0.05), 而酸性条件下酶活低于 10 U; 在 Tris-HCl 缓冲体系中[图 1(c)], 碱性条件下酶活力均大于 40 U, 中性条件下酶活显著低于碱性条件(P<0.05)。综上可知, pH 和缓冲体系对酶活具有一定影响。

酶的化学本质是蛋白质, 结构上同时具有氨基和羧基, 环境 pH 的变化可以使其结构变性而活性降低, 导致其对环境 pH 极为敏感, 且不同的离子也会对酶活造成一定影响^[29], 因此在不同环境条件下 LOX 酶可显示出不同的酶活力。碱性条件下, 试验所用的 LOX 在 Tris-HCl 体系中酶活最高; 中性条件下, 则在硼酸盐体系中酶活最高。



不同 pH 条件下的字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 1 pH 和缓冲体系对 LOX 酶活力的影响

Figure 1 The effect of pH and buffer systems on LOX enzyme activity

2.2 缓冲条件对多酚自氧化的影响

2.2.1 对 QCT 自氧化的影响 在硼酸盐缓冲体系中(图 2), QCT 在中性条件下反应 120 min 内紫外光谱图没有较大变化, 在碱性条件下于 320 nm 有明显吸收峰。缓冲体系的 pH 越高、反应时间越长, 320 nm 处峰越高, 而 382~400 nm 及 440~500 nm 的峰下降, 且 382~400 nm 峰出现红移。俞梅兰等^[30]研究认为, 382~400 nm 及 440~500 nm 为 QCT 自身的特征吸收峰, 320 nm 处为其自氧化产物的特征吸收峰。因此, 在碱性条件下 QCT 会发生自氧化反应, 随着自氧化产物不断积累, 320 nm 处吸收峰升高; 而随反应时间延长, QCT 不断消耗导致自身特征吸收峰降低, 与 Zhou 等^[31]的研究结果相符。在碱性条件下, QCT 的 B 环上的邻二酚羟基对自氧化反应敏感, 可氧化形成具有半醌结构的中间产物, 并进一步氧化成终产物鞣皮素醌^[30]。

QCT 在磷酸盐体系中(图 3)反应 0 min 时, 在 370~385 nm 处的峰随着 pH 降低峰高不变但峰位蓝移。碱性条件下, QCT 在 326 nm 处出峰且碱性越强峰越高, 反应一段时间后峰下降, 但 QCT 在 pH 为 8.0 的条件下 320 nm 的峰明显增长, 表示在该条件下出现自氧化产物。因此, pH 能显著影响 QCT 稳定性, 进而影响 QCT 的功能特性。荣家闵等^[32]研究发现, pH 为 5~6 时 QCT 对自由基的清除能力约为 60%; 随着 pH 增加, 其对自由基的清除能力急剧下降, 在 pH 9.0 时清除率仅为 10%。

QCT 在中性和碱性 Tris-HCl 缓冲体系中(图 4), 反应时间越长, 360~410 nm 处的峰下降越多; 反应 60 min 相较于反应 0 min 在 320 nm 处峰值升高, 且随着 pH 越大而峰值升高越明显; 而反应 120 min 后相较于反应 60 min, pH 9.0, 8.5 的曲线在 320 nm 的峰有所下降, pH 8.0, 7.5 的曲线在 320 nm 的峰上升, 并在 476 nm 处出现新的吸收峰。推测该缓冲体系下 320 nm 处为 QCT 自氧化中间产物的特征吸收峰, 476 nm 处为 QCT 自氧化终产物的特征吸收峰。因此, QCT 在碱性 Tris-HCl 缓冲体系中可发生自氧化, 碱性弱的情况下自氧化中间产

物堆积速率大于被消解的速率,表现为 QCT 自身特征吸收峰下降而中间产物特征吸收峰上升;当碱性越强自氧化反应越快,中间产物浓度大到一定程度之后促进第二步氧化的发生,导致中间产物堆积速率小于被消解的速率,终产物累积同时中间产物含量下降,表现为 QCT 自身特征吸收峰及中间产物特征吸收峰下降,终产物特征吸收峰上升。

综上所述,QCT 在碱性条件下发生自氧化,且碱性越强自氧化程度越高。在碱性条件下,QCT 在磷酸盐缓冲

体系中的稳定性最强,硼酸盐缓冲体系次之,Tris-HCl 缓冲体系最差。硼酸盐可能与 QCT 的 B 环的酚羟基形成络合物,因此硼酸盐对 QCT 自氧化具有一定抑制作用^[33]。

2.2.2 对 GA 自氧化的影响 在硼酸盐缓冲体系中(图 5),GA 反应 0 min 时各 pH 条件下紫外吸收曲线相似;反应 60 min 后,pH 8.0~9.0 条件下在 340~360 nm 出现吸收峰,且 pH 越高峰越高。在 pH 9.0 和 pH 8.5 条件,450 nm 处亦有出峰。由此推测,340~360,450 nm 处

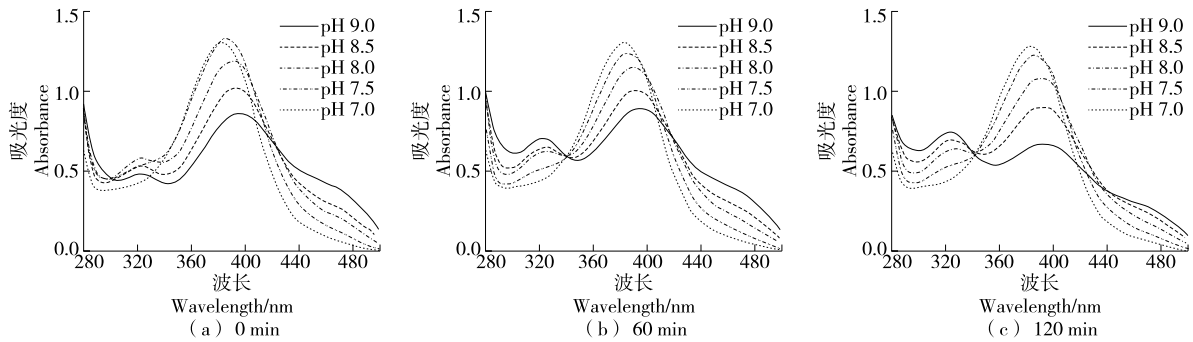


图 2 QCT 在硼酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 2 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by quercetin in borate buffer system for different time

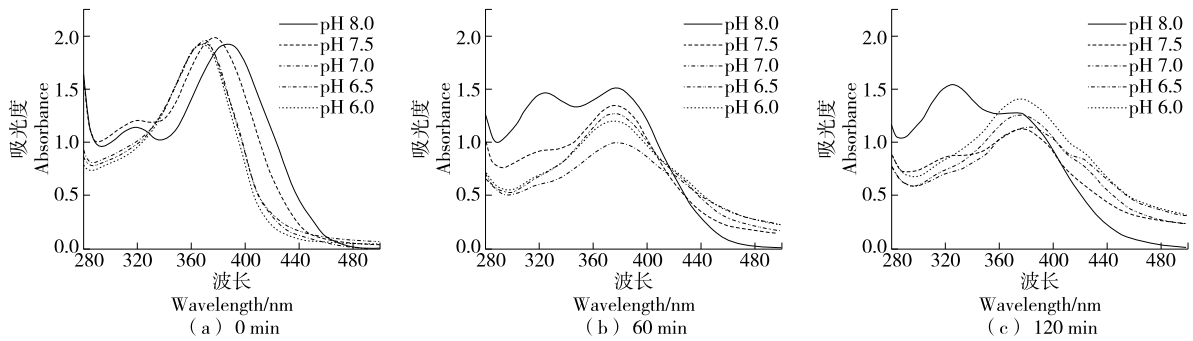


图 3 QCT 在磷酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 3 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by quercetin in phosphate buffer system for different time

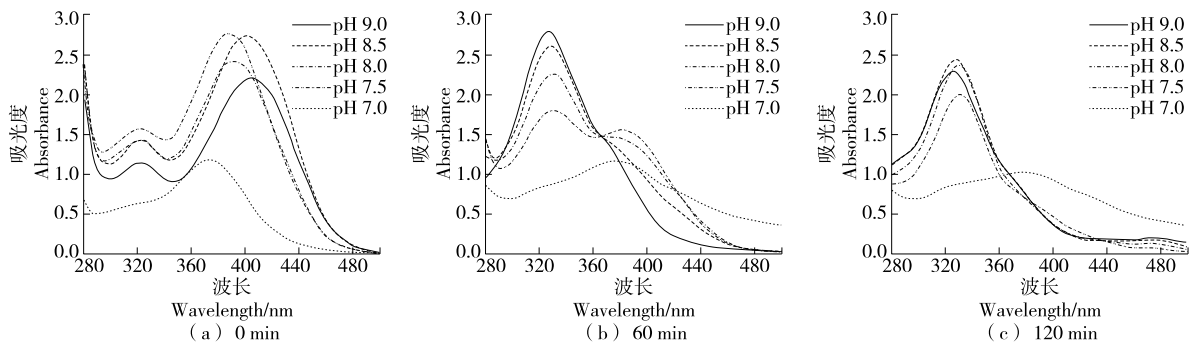


图 4 QCT 在 Tris-HCl 缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 4 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by quercetin in Tris-HCl buffer system for different time

分别为 GA 自氧化中间产物和终产物的特征吸收峰。在碱性较强的硼酸盐缓冲体系中,在 60 min 内有 GA 自氧化终产物积累,且中间产物和终产物的累积随反应时间延长和 pH 升高而增多。在 pH 7.5,7.0 条件下,340~360 nm 处也出现一个小峰,即在各碱性硼酸盐缓冲体系中反应 120 min 均发生自氧化。GA 结构中 3 个相邻的芳香族羟基易氧化,GA 可以被氧化成醌或羟基相关的衍生物^[34]。吴雪钗等^[35]研究发现,当 pH 值为 7.0~10.0 时,GA 在 50 °C 以上的条件下 3 h 内可完全降解,可见 GA 在碱性和中性条件下不稳定,与试验结论相符。

在磷酸盐缓冲体系中(图 6),GA 在碱性条件下反应时间越长,340~360 nm 处吸收峰越明显,且在中性条件下反应 120 min 时也发现吸收峰,而酸性条件下 120 min 内该处无吸收峰,说明 GA 在酸性条件下稳定。碱性条件下反应 120 min 在 446 nm 处有明显吸收峰。由此可知,GA 在碱性条件下 60 min 内、中性条件下 120 min 内,均可发生自氧化并出现自氧化中间产物堆积,而自氧化产生终产物的反应需要较长的时间或需要有较多中间产物累积才能发生。

由图 7 可知,GA 在 Tris-HCl 缓冲体系中自氧化中间产物特征吸收峰为 340 nm,终产物特征吸收峰在

446 nm。在碱性条件下,GA 反应 60 min 就已在 340,446 nm 处出现吸收峰,且随 pH 升高、反应时间延长峰值升高。由此可知,GA 自氧化反应对反应时间和 pH 条件敏感,pH 越高、反应时间越长产生的中间产物和终产物越多。中性条件下 GA 在反应 60 min 内尚未发生自氧化,而反应 120 min 时已出现自氧化中间产物。

综上所述,GA 仅在碱性条件和中性条件(较长反应时间下)发生自氧化反应。在硼酸盐缓冲体系中,60 min 仅有轻微自氧化迹象,120 min 时才明显出现中间产物,且中性和弱碱性条件下自氧化不明显;在碱性磷酸盐缓冲体系中反应 60 min 仅产生中间产物;在 Tris-HCl 缓冲体系中,反应 60 min 就已出现中间产物和终产物。相比之下,GA 在硼酸盐缓冲体系中的稳定性最强,磷酸盐缓冲体系次之,Tris-HCl 缓冲体系最差。

2.2.3 对 C 自氧化的影响 图 8 显示,除 pH 7.0 及 pH 7.5,C 在硼酸盐缓冲体系中反应 60 min 时在 328 nm 处产生吸收峰,且峰高随反应时间和 pH 的增加而增加;反应 120 min 后,除中性条件外均出现吸收峰且较 60 min 时有明显升高。反应 60 min 与 120 min 均在 452 nm 处产生非常小的吸收峰但差异不明显。因此,在硼酸盐缓冲体系中,C 在碱性条件下容易自氧化产生中间产物,但

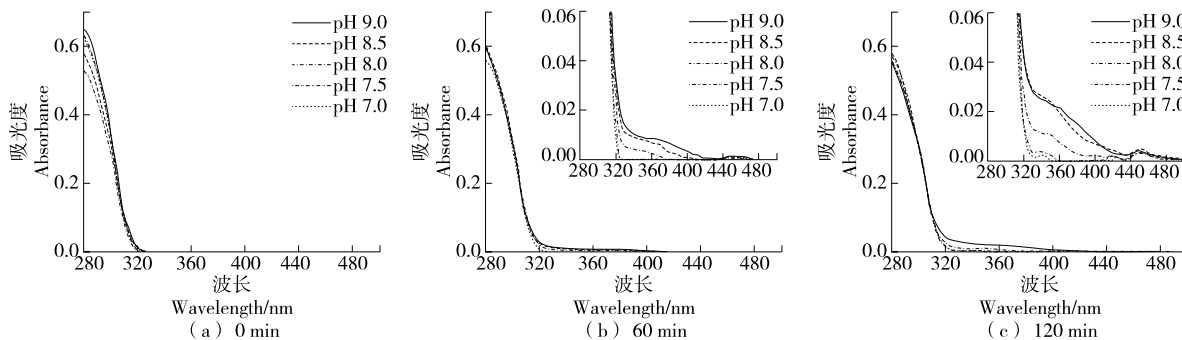


图 5 GA 在硼酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 5 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by gallic acid in borate buffer system for different time

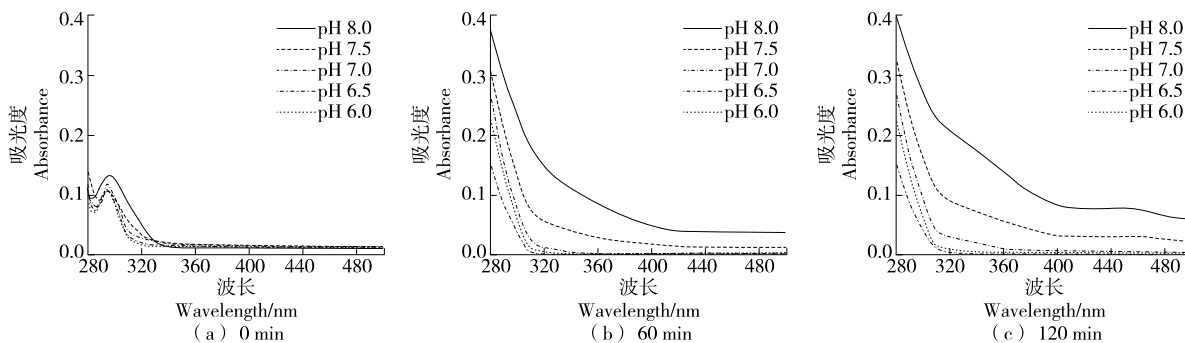


图 6 GA 在磷酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 6 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by gallic acid in phosphate buffer system for different time

终产物的生成较为缓慢。

如图9所示,C在碱性磷酸盐缓冲体系中反应60 min在430 nm处出峰,反应时间越长峰越高,碱性条件下反应60 min和120 min后,在320 nm处吸收峰均不高,说明在碱性磷酸盐缓冲体系中反应60 min后,C已经发生了自氧化,且产生的中间产物被快速反应掉形成了终产物。而在酸性磷酸盐体系中,C未发生自氧化(120 min内)。C在酸性条件下具有较强抗氧化性,在偏碱性或C浓度较高的条件下容易发生自氧化^[36],且碱性越强自氧

化速率越快^[37]。

在Tris-HCl缓冲体系中(图10),C在反应60 min后在320,430 nm处出现吸收峰,说明已经发生自氧化并生成终产物;反应120 min后,在320,430 nm的吸收峰明显增高,说明反应仍在不断进行。C由3个羟环组成,其中B环上的邻二羟基具有强大的氢供应能力,易在碱性条件下释放氢,先反应为半醌自由基中间态然后转变为邻醌结构,C邻醌还能与C发生聚合反应^[38]。

综上所述,C在酸性和中性条件下不发生自氧化。

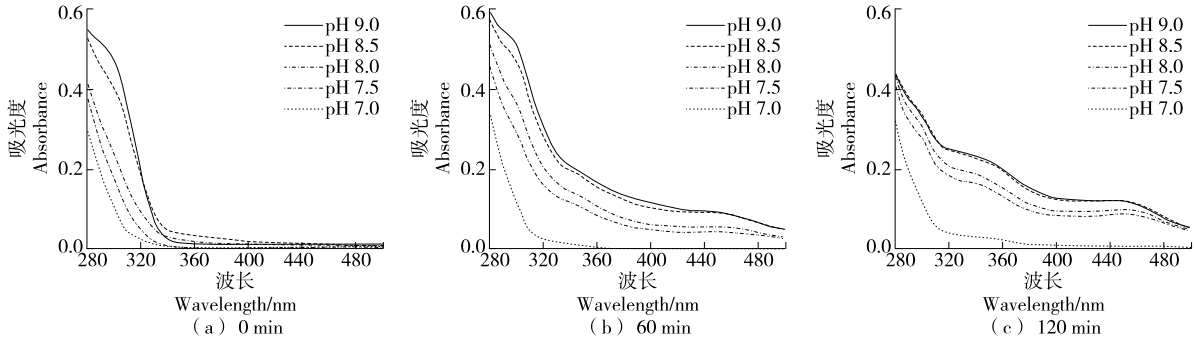


图7 GA在Tris-HCl缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 7 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by gallic acid in Tris-HCl buffer system for different time

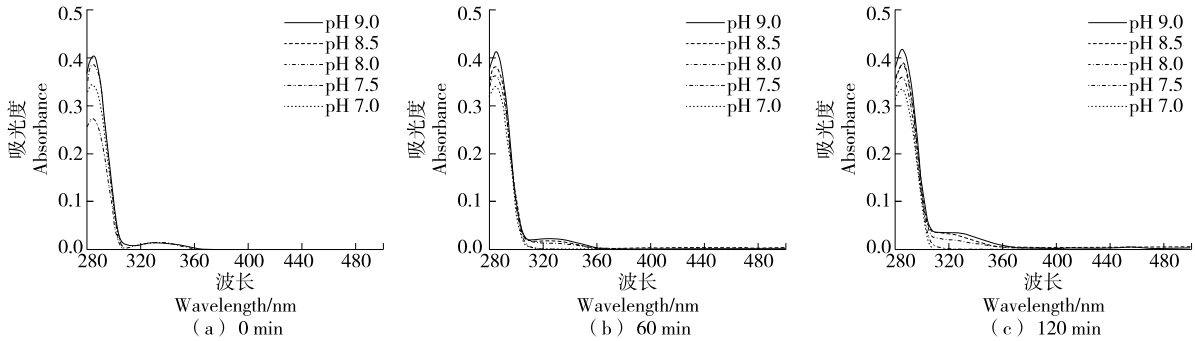


图8 C在硼酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 8 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by catechin in borate buffer system for different time

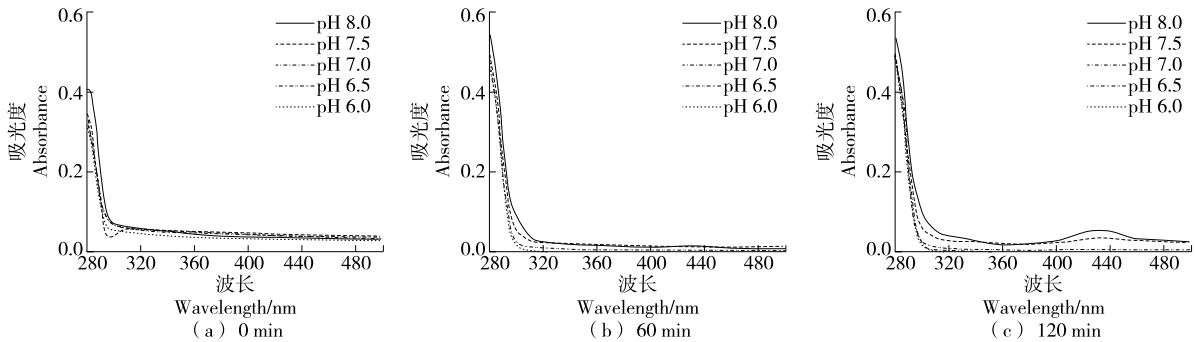


图9 C在磷酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 9 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by catechin in phosphate buffer system for different time

在碱性硼酸盐缓冲体系中仅出现中间产物;在磷酸盐缓冲体系中反应 120 min 出现终产物,中间产物不明显;而在 Tris-HCl 缓冲体系中反应 60 min 已有明显自氧化现象。因此,C 在硼酸盐和磷酸盐缓冲体系中稳定性优于 Tris-HCl 体系。

2.2.4 对 DOPAC 自氧化的影响 由图 11 可知,DOPAC 在硼酸盐缓冲体系(pH 7.0~9.0)中具有较强的稳定性,可保持 120 min 内不发生自氧化。

在磷酸盐缓冲体系中(图 12),DOPAC 在 pH 8.0

(60 min)与 pH 7.5 (120 min)条件下于 345 nm 处出现吸收峰,推测此处为自氧化中间产物的特征吸收峰。其中 pH 7.5 条件下吸收峰非常小,说明该条件下 DOPAC 发生氧化的程度较小。

DOPAC 在 Tris-HCl 体系(图 13)反应 60 min 时,碱性条件下在 346 nm 处有吸收峰,且随 pH 增大峰增高;随着时间的延长,吸收峰持续升高,说明自氧化中间产物持续生成,但均未见自氧化终产物产生。

综上所述,DOPAC 在酸性和中性条件下均不发生自

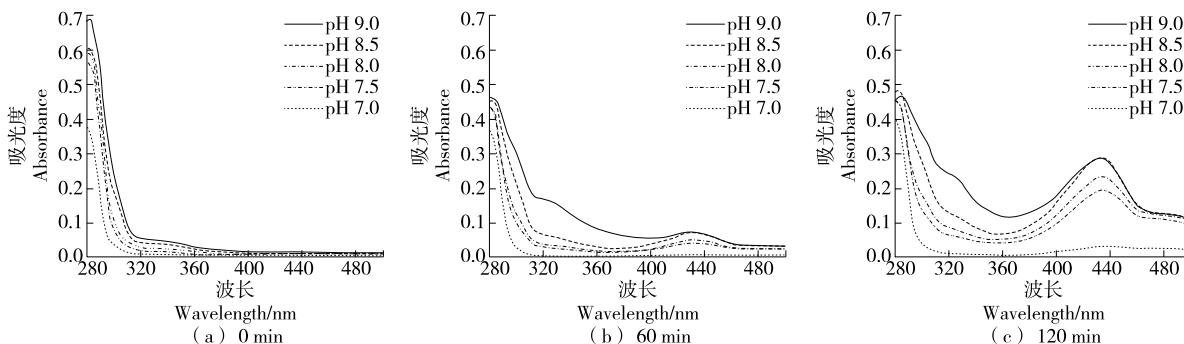


图 10 C 在 Tris-HCl 缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 10 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by catechin in Tris-HCl buffer system for different time

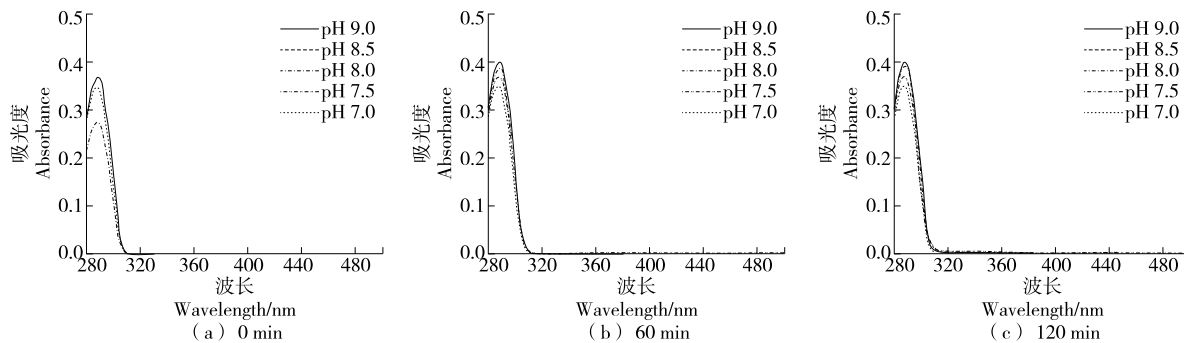


图 11 DOPAC 在硼酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 11 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in borate buffer system for different time

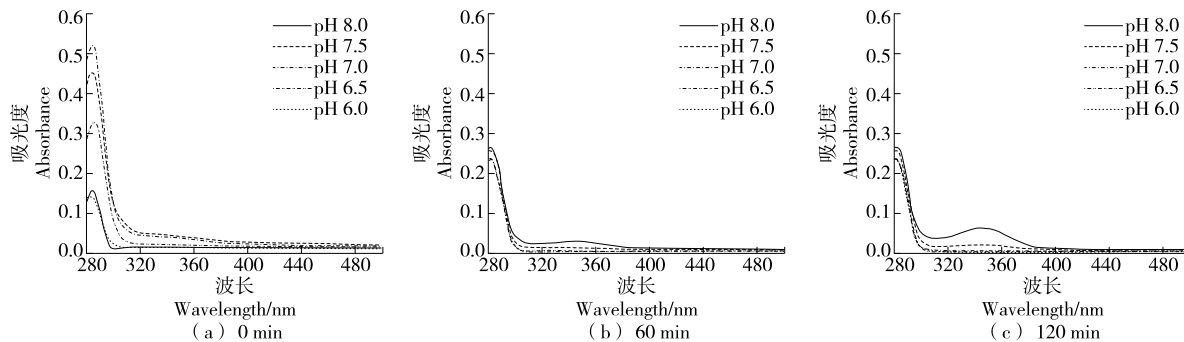


图 12 DOPAC 在磷酸盐缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 12 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in phosphate buffer system for different time

氧化,且在硼酸盐缓冲体系中,120 min 内碱性条件下也未出现自氧化;在磷酸盐缓冲体系中,在 pH 8.0 条件下反应 60 min 已有自氧化迹象,在 pH 7.5 反应 120 min 时出现了自氧化中间产物;在 Tris-HCl 缓冲体系中 60 min 出现中间产物和终产物,且反应时间越长,两种产物量均增加,说明在该体系中自氧化易发生。因此,DOPAC 在硼酸盐缓冲体系中稳定性优于磷酸盐和 Tris-HCl 体系。

综合以上可知,4 种多酚在 Tris-HCl 缓冲体系中自氧化程度均较其他两种缓冲体系更明显,因此在探究利用紫外分光光度法检测多酚对 LOX 酶活性的影响试验

中,Tris-HCl 缓冲体系不适用,而硼酸盐体系稍优于磷酸盐体系。为保证多酚的抗氧化性,应选用弱碱体系、中性或酸性体系,而为保证 LOX 酶的活性则应选择碱性条件,因此,选取 pH 7.5 的弱碱体系进行后续研究。

2.3 多酚浓度对 LOX 酶活性的影响

图 14 显示了不同浓度的 4 种多酚在 pH 7.5 的硼酸盐缓冲体系中对 LOX 酶活性的影响。浓度为 0.00~1.00 mmol/L 时,QCT、GA、C 的 LOX 酶活出现先降后增的现象,其中 QCT 与 GA 在 0.25 mmol/L、C 在 0.1 mmol/L 时抑制效果最好,且抑制效果为 QCT>C>

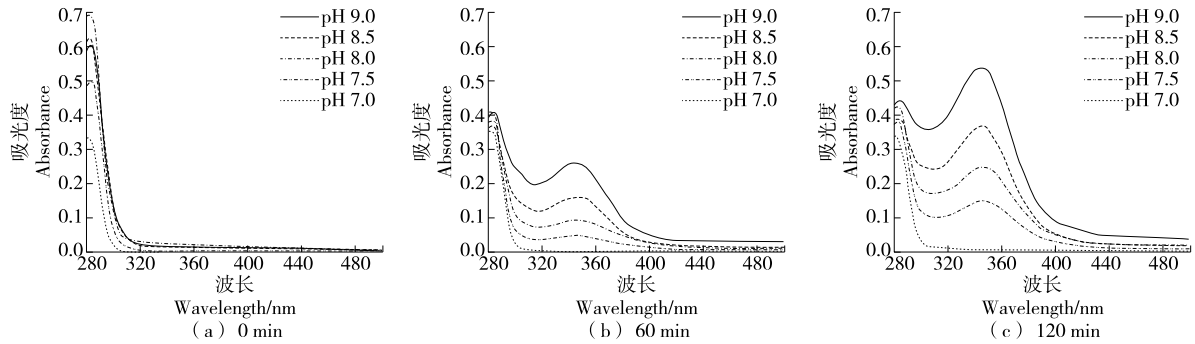
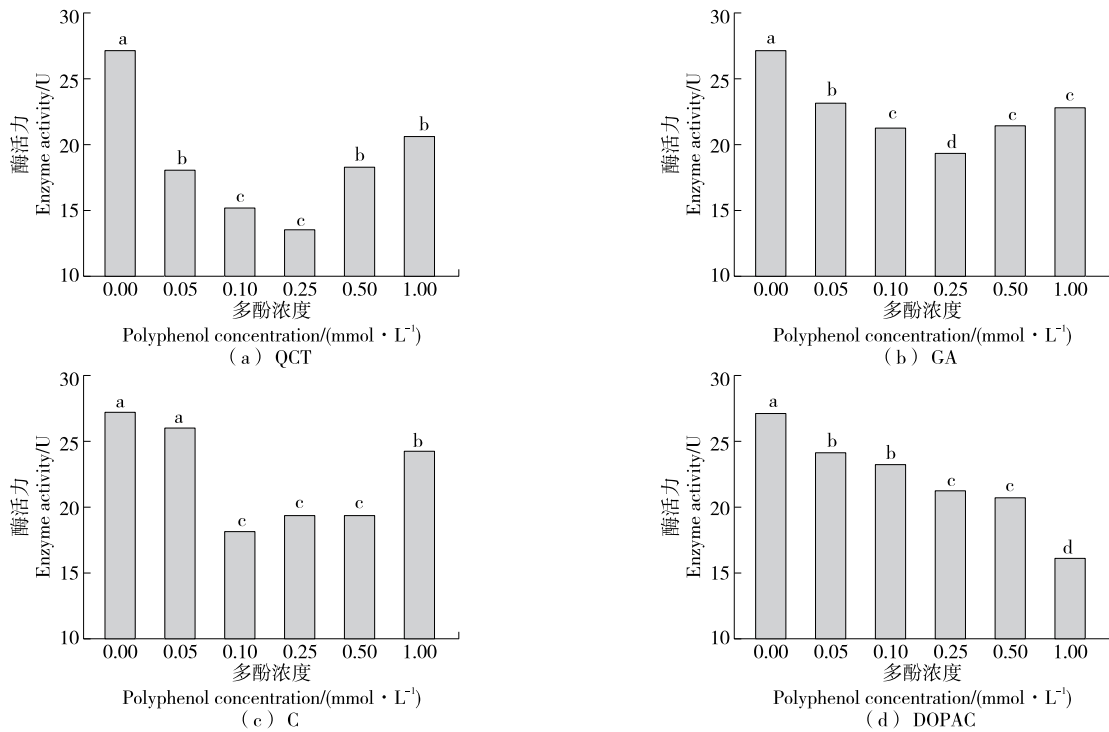


图 13 DOPAC 在 Tris-HCl 缓冲体系中反应不同时间自氧化产物的吸收光谱

Figure 13 Absorption spectrum of auto-oxidation products produced by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in Tris-HCl buffer system for different time



不同浓度下的字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 14 不同浓度 QCT、GA、C、DOPAC 添加量对 LOX 酶活性的影响

Figure 14 Effects of different concentrations of quercetin, gallic acid, catechin, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid on LOX enzyme activity

GA。说明多酚在一定浓度范围内对 LOX 酶活具有抑制作用,与 Cao 等^[39]的研究结果一致。但多酚浓度过高该抑制作用又会减弱,可能是由于多酚在高浓度条件下自氧化速率增加^[30]。在 0~1 mmol/L 范围内 DOPAC 对 LOX 酶活性的抑制效果逐步增大,在浓度为 1 mmol/L 时其酶活抑制效果优于 0.10 mmol/L 的 C,但次于 0.10 mmol/L 的 QCT。具有邻苯二酚结构的酚类可通过该结构螯合介导脂质发生过氧化的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 从而发挥抗氧化作用,多酚自身则被氧化成为具有稳定结构的苯醌类产物^[40]。 Fe^{2+} 为 LOX 的活性中心,被多酚螯合后 LOX 活性减弱。整体而言,QCT 对 LOX 酶活的抑制效果最强,C 次之,再次为 GA,DOPAC 为最差。

3 结论

研究发现,pH 和缓冲体系对脂氧合酶活性及 4 种多酚(槲皮素、没食子酸、儿茶素、3,4-二羟基苯乙酸)自身结构稳定性均有影响。4 种多酚在不同缓冲体系的弱碱、中性或酸性条件下自氧化程度小,且 pH 越小自氧化程度越小,自身结构稳定性越强,能够更好地发挥自身功能特性。综合来看,4 种多酚在硼酸盐体系中发生的自氧化程度最小,而 Tris-HCl 体系中自氧化程度最大。试验选用的脂氧合酶在碱性条件下活性较强,因此检测多酚对脂氧合酶酶活影响时选择弱碱性(pH 7.5)的硼酸盐缓冲体系。因此,在研究多酚对脂氧合酶活性影响的研究中,应对所选用脂氧合酶适用 pH 范围进行检测,若其最适 pH 处于酸性范围内则可以选择其最适 pH 作为缓冲 pH 条件,无需考虑多酚自氧化特性。

在 pH 7.5 的硼酸盐缓冲液条件下,利用紫外分光光度法检测多酚浓度对脂氧合酶酶活的影响发现,在一定浓度范围内,多酚浓度越大对脂氧合酶酶活的抑制作用越强,但浓度过高时则可能因多酚自氧化速率加快,导致对脂氧合酶酶活的抑制作用减弱。整体而言,槲皮素对脂氧合酶酶活的抑制效果最强,儿茶素次之,再次为没食子酸,3,4-二羟基苯乙酸为最差。

研究主要对植物多酚的自氧化情况和植物多酚抑制脂氧合酶的效果进行研究探讨,后续研究可以从分子结构和蛋白结构层面对不同结构的多酚对脂氧合酶抑制效果差异的机理原因进行深入研究,也可探究多酚应用于复杂体系(例如植物油、动物肉等)中时对脂氧合酶的抑制效果。

参考文献

- [1] 李彩凤,赵丽影,陈业婷,等. 高等植物脂氧合酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(10): 143-149.
- [2] 曲清莉,傅茂润,代红飞. 脂氧合酶(LOX)在脂肪酸氧化中的作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(10): 137-142.
- [3] 何婷,赵谋明,崔春. 脂肪氧合酶的酶学特性及其活性抑制机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2008(2): 291-293.
- [4] LAMPI A, YANG Zhen, MUSTONEN O, et al. Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125982.
- [5] 吴秋昊,贾利蓉,陈安特,等. 热处理对核桃仁脂氧化酶类活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 145-147, 204.
- [6] 吴桂玲,胡丽,冯定坤,等. 超声波辅助提取蓝莓叶总黄酮及对脂氧合酶的抑制[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(8): 55-60.
- [7] 吴桂玲,蒋信星,阮代锁,等. 黑米总黄酮提取工艺优化及其对茶叶脂肪氧合酶的抑制[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(11): 89-92.
- [8] 吴桂玲,孙赛兰,冯定坤,等. 虎杖根中黄酮类化合物对脂氧合酶活性抑制[J]. 广州化工, 2020, 48(3): 63-65, 94.
- [9] 候蕊. 谷子脂氧合酶(LOX)与小米储藏过程中褪色关系的研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2016; 8.
- [10] 郝瑞丽,谢仲梅,申慧芳,等. 谷子脂氧合酶(LOX)活性测定条件的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2018, 38(8): 71-76.
- [11] 刘夫国,金邦荃,牛丽影,等. 鲜食玉米脂氧合酶的酶学性质[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 198-201.
- [12] 吴桂玲,代虹镜,邓维先,等. 毛尖茶叶中的黄酮类化合物对脂氧合酶的抑制性[J]. 云南化工, 2019, 46(4): 65-67.
- [13] SHARMA R, PADWAD Y. Plant polyphenol-based second-generation synbiotic agents: Emerging concepts, challenges, and opportunities[J]. Nutrition, 2020, 77: 110785.
- [14] 郑红梅,王少英,史新娥. 植物多酚的抗氧化作用及其改善肉质的机制[J]. 动物营养学报, 2020, 32(5): 2 037-2 045.
- [15] 谢三都,林雅男,黄晓美. 莲蓬醇提取物中槲皮素的鉴定及生物活性[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 44-48.
- [16] GRANATO M, RIZZELLO C, GILARDINI MONTANI M S, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 41: 124-136.
- [17] KHATUN S, RIYAZUDEEN, YASMEEN S, et al. Calorimetric, spectroscopic and molecular modelling insight into the interaction of gallic acid with bovine serum albumin[J]. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2018, 122: 85-94.
- [18] PEREIRA A D S, DE OLIVEIRA L S, LOPES T F, et al. Effect of gallic acid on purinergic signaling in lymphocytes, platelets, and serum of diabetic rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 101: 30-36.
- [19] 王学渊,刘静宜,洪艳平,等. 不同类型江西名茶儿茶素含量及体外抗氧化能力比较[J]. 食品与机械, 2019, 35(6): 152-158.
- [20] 但飞君,田瑛,董俊兴. 3,4-二羟基苯乙酸的合成[J]. 化学试剂, 2005(10): 623-624.

- [21] 张晓婷, 王满生, 邱浩楠, 等. 青叶苕麻叶多酚超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 152-158.
- [22] 蔡霄英, 龚茵茵. 食用花卉中的多酚类成分及生物活性研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(11): 178-182, 189.
- [23] CHEN Xing, LIANG Li, HAN Cong. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 131: 109769.
- [24] ZHU Qin-yan, ZHANG An-qi, TSANG D, et al. Stability of green tea catechins[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(12): 4 624-4 628.
- [25] 肖楠, 朱永春, 宝阿敏, 等. 邻苯三酚自氧化机理的量子化学研究[J]. 计算机与应用化学, 2014, 31(10): 1 165-1 169.
- [26] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造, 2009(6): 155-157.
- [27] 贾红玉, 王亚森, 田晓辉, 等. 邻苯三酚自氧化法在 SOD 活性测定中的应用[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2018, 38(3): 284-290.
- [28] 刘夫国. 甜玉米脂氧合酶的分离纯化及与风味的关系研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2013: 6-7.
- [29] 宁晔. 影响酶活性的因素综述[J]. 科技经济导刊, 2018, 26(31): 125-127.
- [30] 俞梅兰, 余燕影, 曹树稳. 槲皮素自氧化作用影响其超氧阴离子自由基清除能力的研究[J]. 食品工业科技, 2006(3): 75-78.
- [31] ZHOU Ai-ling, SADIK O A. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: A mechanistic study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 12 081-12 091.
- [32] 荣家闵, 张仁文. 槲皮素体外抗氧化活性研究[J]. 科学技术创新, 2019(29): 43-44.
- [33] LEI Rong, XU Xiao, YU Fei, et al. A method to determine quercetin by enhanced luminol electrogenerated chemiluminescence (ECL) and quercetin autoxidation [J]. Talanta, 2008, 75(4): 1 068-1 074.
- [34] WANG Qing-yang, LEONG W F, ELIAS R J, et al. UV-C irradiated gallic acid exhibits enhanced antimicrobial activity via generation of reactive oxidative species and quinone [J]. Food Chemistry, 2019, 287: 303-312.
- [35] 吴雪钗, 于波涛, 侯艾林, 等. 没食子酸稳定性研究[J]. 西南国防医药, 2006, 16(5): 484-485.
- [36] 郭远华, 邹国林. 儿茶素对超氧阴离子自由基的清除及其自氧化作用研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001(2): 10-12.
- [37] WU Jing, WANG Hua, LIU Fu, et al. Detection of catechin based on its electrochemical autoxidation [J]. Talanta, 2005, 65(2): 511-517.
- [38] 何建波, 孟凡顺, 周园, 等. 不同 pH 值下儿茶素氧化的现场光谱电化学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 11-15.
- [39] CAO Qiong-ju, HUANG Yuan, ZHU Quan-fei, et al. The mechanism of chlorogenic acid inhibits lipid oxidation: An investigation using multi-spectroscopic methods and molecular docking [J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127528.
- [40] BOOTS A W, LI Hui, SCHINS R P F, et al. The quercetin paradox [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007, 222(1): 89-96.

(上接第 31 页)

- [24] 徐欣源. 加工精度对大米陈化过程中理化及品质特性变化的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2013: 46-47.
- [25] 古汶玉, 黄玉, 谢宇霞, 等. 稻谷水分对出糙率和整精米率的影响[J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(4): 80-81.
- [26] FANG Yong, CATRON Brittany, ZHANG Yao-fang, et al. Distribution and in vitro availability of selenium in selenium-containing storage protein from selenium-enriched rice utilizing optimized extraction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(17): 9 731-9 738.
- [27] 赵婉彤. 重庆市江津区土壤硒含量分布及影响因素的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 35-37.
- [28] 周鑫斌, 于淑惠, 赖凡. 水稻品种间吸收和转运硒特性差异机制研究[J]. 土壤学报, 2014, 51(3): 594-599.
- [29] ZHOU Xin-bin, ZHANG Cheng-ming, GAO A-xiang. Selenium speciation and distribution in the rhizosphere and selenium uptake of two rice (*Oryza sativa*) genotypes [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2018, 20(1): 136-142.
- [30] LIU Kun-lun, CAO Xiao-hong, BAI Qing-yun, et al. Relationships between physical properties of brown rice and degree of milling and loss of selenium [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 94(1): 69-74.
- [31] 国家标准化管理委员会, 国家市场监督管理总局. 粮油检验大米加工精度检验: GB/T 5502—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 3-5.
- [32] 方勇. 外源硒在水稻籽粒中的生物强化和化学形态研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 59-60.
- [33] YAO Bao-min, CHEN Peng, SUN Guo-xin. Distribution of elements and their correlation in bran, polished rice, and whole grain [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(2): 982-992.
- [34] 邢常瑞, 汤志宏, 汪金燕, 等. 稻谷不同部位多元素分布规律[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(1): 7-11.
- [35] WANG Yu-dong, WANG Xu, WONG Yu-shing. Generation of selenium-enriched rice with enhanced grain yield, selenium content and bioavailability through fertilisation with selenite [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2 385-2 393.
- [36] 胡婷, 吴文良, 赵桂慎, 等. 我国富硒农产品及食品标准体系发展与展望[J]. 中国标准化, 2019(11): 136-144.