

# 油用牡丹丹皮液对青椒丙二醛含量及抗氧化酶活性的影响

赵 奇, 李玉华, 杨玉珍, 王国霞

(郑州师范学院 生命科学院, 河南 郑州 450044)

**摘 要:**以青椒为试材,采用超声波、水煮、蒸馏3种方法提取的油用牡丹丹皮液来处理贮藏期青椒,对青椒丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性进行研究。结果表明:与对照相比,丹皮液处理提高了抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性,减少了 MDA 的积累。说明丹皮液处理通过调节抗氧化酶体系活性调节活性氧代谢,能减轻青椒膜脂过氧化伤害,利于青椒储藏。

**关键词:**油用牡丹;丹皮提取液;青椒;抗氧化酶

**中图分类号:**S 565.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0144-04

青椒属茄科辣椒属一年生或多年生草本植物,果肉厚而脆嫩,维生素 C 含量丰富,风味独特<sup>[1]</sup>,是群众一年四季喜欢的蔬菜之一。青椒生产季节性较强,淡旺季差价大,旺季腐烂损耗严重,淡季供求紧张<sup>[2-3]</sup>。为了延长青椒收获后的货架期,研究者尝试了保鲜袋处理<sup>[4]</sup>、温度条件处理<sup>[5-6]</sup>、保鲜剂处理<sup>[7]</sup>等多种方法,但是在实际应用时因操作性、经济成本、安全性等问题限制了其应用。

牡丹根皮被称为丹皮,除医药价值外,吴晓慧等<sup>[8]</sup>研究证实了丹皮有抑菌和抗氧化的生物学效果。贾小丽等<sup>[9]</sup>、崔霞等<sup>[10]</sup>研究证实了用丹皮提取物处理草莓和黄瓜取得了较好的保鲜效果,除此之外,尚鲜见其它果蔬品种中相应的研究报道,油用牡丹根皮的此类应用鲜见报道。油用牡丹因其较高的营养价值,近几年在河南省逐年扩大种植面积,在种植区有丰富的边角料。该研

究选择油用牡丹根皮提取液来处理青椒,通过对青椒 MDA 及保护酶活性的研究,拟从细胞膜保护酶水平上揭示丹皮液处理下的青椒储藏衰老机理,以期对丹皮的综合开发和青椒的储藏提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

油用牡丹丹皮由郑州师范学院黄河滩实习基地提供,为油用牡丹—丹凤移栽时剪掉的根;青椒采购于郑州毛庄蔬菜批发市场。果实为无机械伤、无病虫害、果柄果蒂新鲜饱满的绿熟果。

### 1.2 试验方法

用蒸馏、水煮、超声波3种方法制备油用牡丹丹皮液,分别浸泡青椒 10 min,设置蒸馏水为对照。捞出青椒,装入 0.03 mm 厚聚氯乙烯薄膜袋内,用打孔器处理 5 个透气孔,8℃温度储藏,每隔 3 d 取样测定。每个处理设置 3 次重复,每个重复 30 个果。选择剥离好的丹皮,28℃烘箱烘干,用电动粉碎机粉碎备用。3 种丹皮液制备方法见表 1。

### 1.3 项目测定

1.3.1 丙二醛(MDA)含量的测定 参照赵世杰等<sup>[11]</sup>的方法适当修改。取适量果肉组织,加入 4 mL 10%三氯

**作者简介:**赵奇(1979-),女,硕士,讲师,现主要从事生理生化与生物技术等研究工作。E-mail:zhq\_612@163.com.

**基金项目:**河南省科技计划资助项目(142102110178);郑州市科技计划资助项目(141PPTGG426);郑州师范学院博士基金支撑资助项目(2012080)。

**收稿日期:**2014-11-10

**Abstract:** Taking tree bark of *Juglandis mandshuricae* Cortex as the test material and the factors about the extraction by set up  $L_9(3^4)$  orthogonal test was optimized. The content of juglone was calculated by HPLC technique combined with the method called standard curve. The results showed that optimum extraction conditions of juglone from *Juglandis mandshuricae* Cortex was solid-liquid ratio of 1 : 12 g/mL, the ethanol concentration of 95%, extracted two times, each time the reflux of 50 min.

**Keywords:** tree bark of *Juglandis mandshuricae* Cortex; high performance liquid chromatography; juglone; orthogonal test

表 1 丹皮提取液的制备方法

Table 1 Methods of extracting solution of cortex peony

处理 Treatment	制备方法 Preparation method
蒸馏	取 100 g 丹皮粉,按照 1:10 料液配比装入蒸馏装置,收集乳白色蒸馏液定容至 1 000 mL 备用。
水煮	取 100 g 丹皮粉,按照 1:10 料液配比进行水煮处理 2 h,离心收集上清液定容至 1 000 mL 备用。
超声波	取 100 g 丹皮粉,按照 1:10 料液配比进行超声处理,离心收集上清液定容至 1 000 mL 备用。

乙酸溶液研磨,于 4℃ 10 000×g 离心 25 min。取上清液 1.5 mL,加入 2.5 mL 0.6% 的硫代巴比妥酸溶液,混合后 100℃ 沸水浴中加热 20 min,迅速冷却再离心 1 次,分别测定上清液在 450、532、600 nm 处的吸光度值,按以下公式计算 MDA 的浓度,然后计算出果实中 MDA 含量。重复 3 次。MDA 浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $6.45 \times (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \times \text{OD}_{450}$ ; 式中: $\text{OD}_{532}$  为 532 nm 处样品吸光度; $\text{OD}_{600}$  为 600 nm 处样品吸光度; $\text{OD}_{450}$  为 450 nm 处样品吸光度。MDA 含量( $\mu\text{mol/g FW}$ ) = (MDA 浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) × 提取液体积(mL))/植物组织鲜质量(g)。

1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 参照吕建国<sup>[12]</sup>氮蓝四唑方法。称取样品 0.5 g 于预冷的研钵中,加入 1 mL 0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液在冰浴上研磨成浆,加缓冲液至终体积 5 mL,4℃ 10 000×g 离心 20 min,留取上清液。取 5 支试管,3 支为测定管,2 支为对照管,分别加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液 1.7 mL,130 mmol/L 甲硫氨酸 0.3 mL,750  $\mu\text{mol/L}$  NBT 0.3 mL,100  $\mu\text{mol/L}$  EDTA- $\text{Na}_2$  溶液 0.3 mL,20  $\mu\text{mol/L}$  核黄素 0.3 mL,酶液 0.2 mL,对照 2 支管以缓冲液代替酶液。混匀后将 1 支对照管置于暗处,其它管置于光照强度 4 000 lx 日光灯下反应 20 min,以不照光对照管为空白,分别测定其它管在 560 nm 处的吸光值,SOD 活性以抑制 NBT 还原 50% 酶量的酶活性为 1 个酶活单位(U),计算 SOD 活性:SOD 活性(U/g FW) =  $((\text{OD}_c - \text{OD}_s) \times V) / (0.5 \times \text{OD}_c \times V_s \times t \times m)$ ; 式中: $\text{OD}_c$  为照光对照管反应混合液的吸光度; $\text{OD}_s$  为样品管反应液的吸光度; $V$  为样品提取液总体积(mL); $V_s$  为测定时所取样品提取液体积(mL); $t$  为光照反应时间(min); $m$  为样品质量(g)。

1.3.3 过氧化物酶(POD)活性的测定 参照李玲玉<sup>[13]</sup>愈创木酚法。称取材料 1 g,加入 10 mL 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  于研钵中研磨成浆,以 4 000 r/min 离心 15 min,收集上清。取比色杯 2 只,其中 1 只加入 3 mL 反应混合液(100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)5 mL,加入愈创木酚 28  $\mu\text{L}$ ,加热溶解,冷却后加入 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  19  $\mu\text{L}$ 混合摇匀,保存冰箱中)和 1 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  作为对照;另 1 只加入 3 mL 反应混合液,1 mL 酶液,立即开启秒表计时,测定 470 nm 处 OD 值,每隔 1 min 读数 1 次,

读数 4 min。以每分钟内  $\text{OD}_{470}$  变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活单位(U),计算 POD 活性:POD 酶活( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ ) =  $(\Delta \text{OD}_{470} \times V_t) / (W \times V_s \times 0.01 \times t)$ ; 式中: $\Delta \text{OD}_{470}$  为反应时间内吸光度的变化; $V_t$  为提取液总体积(mL); $W$  为样品鲜重(g); $V_s$  为测定时酶液体积(mL); $t$  为反应时间(min)。

1.3.4 过氧化氢酶(CAT)活性测定 参照李合生<sup>[14]</sup>紫外吸收法。取植物组织 0.5 g 放入预冷研钵中,加入 2~3 mL 预冷 pH 7.0 磷酸缓冲液和少量石英砂研磨匀浆,转入 25 mL 容量瓶中,冲洗研钵转移至容量瓶,定容到刻度。将容量瓶置 5℃ 冰箱中 10 min,取上清液 4 000 r/min 离心 15 min 得上清酶粗提液。取 3 支 10 mL 试管,2 支为测定管,1 支为空白管,分别加入 pH 7.8 磷酸 1.5 mL,蒸馏水 1.0 mL,粗酶液 0.2 mL。25℃ 预热,逐管加入 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{L}$ ,迅速摇匀,立即计时,1 min 后用分光光度计测定 240 nm 吸光度,每隔 1 min 读数 1 次,共测 4 次,计算酶活:CAT 酶活( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ ) =  $(\Delta A_{240} \times V_T) / (0.1 \times V_l \times t \times \text{FW})$ ; 式中: $\Delta A_{240}$  为反应时间内吸光度的变化; $V_T$  为粗酶提取液总体积(mL);0.1 为  $A_{240}$  每下降 0.1 为 1 个酶活单位; $V_l$  为测定用粗酶液体积(mL); $t$  为加过氧化氢到最后 1 次读数时间(min);FW 为样品鲜重。

#### 1.4 数据分析

数据采用 Excel 2003 和 SPSS 软件进行处理和统计分析。差异显著性分析检验中,5% 为显著水平,1% 为极显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 丹皮液处理对青椒丙二醛含量的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的产物之一,其含量的多少能够代表细胞膜脂过氧化程度,可间接反映植物组织抗氧化能力的大小<sup>[12]</sup>。由图 1 可知,随着储藏时间延长,3 种丹皮液处理青椒和对照变化趋势一致,表现为 MDA 含量不断升高,3 种丹皮液处理青椒果实 MDA 含量均低于对照,其中蒸馏液处理的青椒 MDA 含量在 9 d 后增高趋势明显减缓,在 15 d 时 MDA 含量为 5.3  $\mu\text{mol/g FW}$ ,比对照果实 MDA 含量低 29%,表明丹皮处理液能有效减少青椒果实 MDA 的积累,减轻膜损伤。处理与对照 MDA 含量差异达显著水平( $P < 0.05$ ),超声波处理与蒸馏处理间 MDA 含量差异不显著,二者与水煮处理间相比,差异显著。可见 3 种处理对青椒果实膜系统具有明显的保护作用,且超声波与蒸馏处理保护效果较好。

### 2.2 丹皮液处理对青椒 SOD 活性的影响

SOD 能够清除超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ ),与 CAT、POD 等酶协同作用来防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害,从而减少自由基对有机体的毒

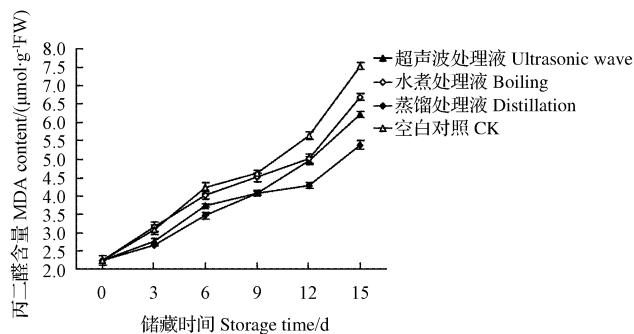


图1 丹皮液处理对青椒MDA含量的影响

Fig. 1 Effect of extract of cortex peony treatment on MDA content

害<sup>[15]</sup>。由图2可知,处理和对照青椒整个冷藏期过程中,SOD活性均表现先上升后下降的趋势,说明青椒冷藏期内,果实通过提高SOD活性来抵御自由基的伤害。对照和水煮、蒸馏处理在9d时,SOD活性达到峰值,此后下降。处理SOD活性峰值与对照差异显著( $P<0.05$ ),其中蒸馏处理与对照SOD峰值达极显著差异( $P<0.01$ )。15d时,超声波处理、水煮处理和对照SOD活性下降较多,蒸馏处理果实SOD活性较高,与其它3种处理方式SOD活性差异极显著( $P<0.01$ )。说明蒸馏处理防御自由基伤害能力显著强于其它试验。

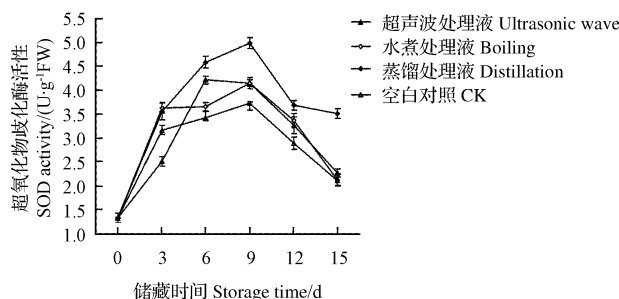


图2 丹皮液处理对青椒SOD活性的影响

Fig. 2 Effect of extract of cortex peony treatment on the activity of SOD

### 2.3 丹皮液处理对青椒POD活性的影响

POD催化分解果肉组织中低浓度的 $H_2O_2$ ,在果实衰老和冷害发展中起重要作用。图3结果表明,处理和对照在研究期间内,POD活性趋势为先升高后降低趋势,表现趋势同SOD活性。对照POD活性高峰期出现在第6天,超声波处理果实POD活性高峰期分别为第12天和第15天,水煮处理果实POD活性高峰期分别为第9天和第15天,表明丹皮液处理明显推迟青椒果实POD活性高峰的出现。储藏9d后,处理POD活性均显著高于对照( $P<0.05$ ),说明丹皮液处理诱导了青椒果实POD活性。

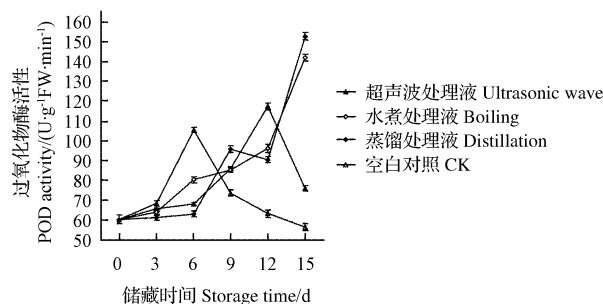


图3 丹皮液处理对青椒POD活性的影响

Fig. 3 Effect of extract of cortex peony treatment on the activity of POD

### 2.4 丹皮液处理对青椒CAT活性的影响

过氧化氢酶(CAT)可以清除 $H_2O_2$ ,是植物体内重要的酶促防御系统之一<sup>[16]</sup>。由图4可知,整个储藏期内,对照CAT活性明显低于处理。储藏期内,对照CAT活性先下降,9d出现小的活性峰,可能是因为储藏期内积累了一定的 $H_2O_2$ ,刺激了果实自身的CAT活性来清除 $H_2O_2$ ,消除活性氧的毒害。丹皮液处理青椒果实CAT活性表现为先上升后下降,在6d时,CAT活性达高峰,丹皮液处理青椒果实CAT活性极显著高于对照( $P<0.01$ )。结果表明,丹皮液处理提高了CAT活性,激发了保护酶系统活性,有效的延缓了果实衰老。

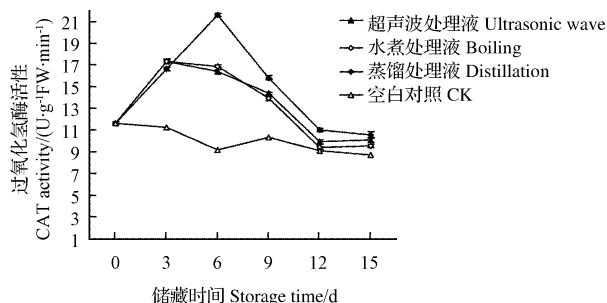


图4 丹皮液处理对青椒CAT活性的影响

Fig. 4 Effect of extract of cortex peony treatment on the activity of CAT

## 3 讨论

该试验结果表明,丹皮液处理降低了青椒果实MDA的含量,显著提高了SOD、POD、CAT等活性。说明丹皮液处理可以提高青椒果实保护酶对活性氧的清除能力,有效抑制MDA积累,减轻活性氧自由基对细胞膜的伤害,减缓细胞膜透性的增加,有利于维持膜的稳定性,从而延缓储存期青椒果实的衰老。比较3种丹皮液处理青椒果实的MDA和抗氧化酶活性指标,蒸馏丹皮液处理的青椒抗氧化保护酶系统表现最好,最有利于青椒的储藏。

该试验中,SOD活性表现为先上升后下降的变化趋

势,这是由于丹皮液处理先提高了 SOD、CAT 活性,由于果实清除活性氧的能力有限,超出了正常水平后, SOD、CAT 活性降低,这与王慧等<sup>[17]</sup>、Ariel 等<sup>[18]</sup>的研究结果相似。该试验中,水煮处理和蒸馏处理青椒 POD 活性逐步增高,在 15 d 时达峰值,这与王慧等<sup>[17]</sup>、张少颖等<sup>[19]</sup>研究中 POD 活性下降-上升-下降的趋势有所不同,分析原因可能因为 2 个试验所用材料品种不同、材料所处的生理阶段不同。另一可能原因或许是该研究为 15 d,处理时间相对较短,后期的酶活变化总趋势尚未表现出来。

该试验中,丹皮液处理液激发了 SOD、POD、CAT 的活性。SOD 活性高峰出现在 6 d 和 9 d,POD 活性高峰迟后,出现在 12 d 和 15 d,可能原因是 SOD 清除冷藏过程中的  $O_2^-$ ,生成  $O_2$  和  $H_2O_2$ ,进而激发了清除  $H_2O_2$  的 POD 活性。Pletjushkina 等<sup>[20]</sup>研究表明, $H_2O_2$  作为一种逆境反应的信号分子,会传导影响到抗氧化酶系统和其它生理生化反应,并且酶活的表达离不开基因作用的内因,因此下一步需要结合  $H_2O_2$  含量和酶活、胁迫相关基因的表达,进行丹皮液处理进而进行对调节青椒生理机理的研究。

#### 参考文献

- [1] 张瑞,史晓亚,张会丽,等. 不同储藏温度对青椒生理性状的影响[J]. 河南农业科学,2013,42(4):111-114.
- [2] 杜金华,傅茂润,李苗苗,等. 二氧化氯对青椒采后生理和储藏品质的影响[J]. 中国农业科学,2006,39(6):1215-1219.
- [3] 颜敏华,朱间美,颜建明. 影响青椒储藏性的因素[J]. 甘肃农业大学学报,2004(3):300-305.
- [4] 王淑琴,张庆芳,赵春艳,等. 不同保鲜袋对尖椒储藏效果的影响[J]. 储藏与加工,2001(3):18-19.
- [5] 陈发河,张维一,吴光斌. 甜椒果实冷藏方法的研究[J]. 北方园艺,2000(4):1-3.
- [6] 赵迎丽. 辣椒果实采后生理及冷害机理的研究[M]. 太原:山西大学,2002.
- [7] 吕建国. 保鲜剂和储藏温度对青椒果实采后生理和储藏品质的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [8] 吴晓慧,吴国荣,张卫明,等. 丹皮酚及其磺化物体外抗氧化作用[J]. 南京师大学报(自然科学版),2003,28(3):83-85.
- [9] 贾小丽,孙艳辉,吴义莲,等. 丹皮边角料提取物对草莓保鲜效果的研究[J]. 滁州学院学报,2012,14(5):60-61.
- [10] 崔霞,贾小丽,乔利香,等. 丹皮提取物对荷兰黄瓜保鲜的研究[J]. 粮食与食品加工,2013,20(4):75-77.
- [11] 赵世杰,许长成,邹琦,等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3):207-210.
- [12] 吕建国. 保鲜剂和储藏温度对青椒果实采后生理和储藏品质的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [13] 李玲玉. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009:97-98.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:168-169.
- [15] 李玲玉. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009:98.
- [16] 胡青霞,王吉庆,李静. 不同厚度薄膜包装、拮抗木霉菌处理对辣椒保鲜效果的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(11):218-221.
- [17] 王慧,张艳梅,王大鹏,等. 热激处理对青椒耐冷性及抗氧化体系的影响[J]. 食品科学,2013,34(2):312-316.
- [18] Ariel R V, Gustavo A M, Alicia R C, et al. Effect of heat treatment on straw berry fruit damage and oxidative metabolism during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 40(6):116-122.
- [19] 张少颖,任小林,饶景萍,等. 番茄果实采后一氧化氢处理对活性氧代谢的影响[J]. 园艺学报,2005,32(1):818-822.
- [20] Pletjushkina O Y, Fetisova E K, Lyamzaev K G, et al. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal[J]. Biochemistry, 2006, 71(1):60-67.

## Effect of Cortex Oil Peony Extracts on Malondialdehyde and Antioxidant Enzyme Systems in Green Pepper

ZHAO Qi, LI Yu-hua, YANG Yu-zhen, WANG Guo-xia

(School of Life Science, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044)

**Abstract:** Taking green pepper as test material, the malondialdehyde(MDA) content, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) of stored pepper were studied by three extraction methods including ultrasonic wave, boiling and distillation to extract active materials from paeonol. The results showed that extract of cortex peony treatment, compared to control treatment, enhanced the activities of SOD, POD, CAT, and decreased content of MDA. Extract of cortex peony treatment may regulate the activities of antioxidant enzyme systems and reactive oxygen and reduce the membrane lipid peroxidation damage of pepper, thereby favor storage of pepper.

**Keywords:** oil peony; extract of cortex peony; pepper; antioxidant enzyme system