

## 12个楸树无性系叶片多酚含量与抗氧化活性

徐洪宇<sup>1</sup>, 王军辉<sup>2</sup>, 黄晓华<sup>1</sup>, 雷鸣<sup>3</sup>, 董娟娥<sup>3\*</sup>, 尉芹<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

关键词: 楸树; 无性系; 总酚; 抗氧化活性

中图分类号: S759.3

文献标识码: A

### Study on Polyphenol Content and Antioxidant Activity from Twelve Clones of *Catalpa bungei* Leaves

XU Hong-yu<sup>1</sup>, WANG Jun-hui<sup>2</sup>, HUANG Xiao-hua<sup>1</sup>, LEI Ming<sup>3</sup>, DONG Juan-e<sup>3</sup>, WEI Qin<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** In this study, the antioxidant activity of 12 *Catalpa bungei* clones extracted from He'nan and Gansu was evaluated in order to find the most effective ones with higher antioxidant activity as well as total phenol content. The results showed that CA6 from Gansu Province was the most effective one in reducing ability (41.61%), DPPH radical scavenging activity (the reciprocal of  $IC_{50}$ ), hydroxyl radical scavenging activity (the reciprocal of  $IC_{50}$ ) and the highest total phenol content ( $31.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) among the 12 clones. The reducing ability and total phenol content determined in 6 clones in Gansu were significantly higher than that in He'nan Province. In addition to CA3, the hydroxyl radical scavenging activity and DPPH radical scavenging activity of the other 5 clones in Gansu were significantly higher than in that He'nan Province. Moreover, the antioxidant activity of ethyl acetate fraction in CA6 leaves was the highest, followed by n-butanol, petroleum ether, and the water fractions was the lowest.

**Key words:** *Catalpa bungei*; clones; total phenol content; antioxidant activity

自由基具有强氧化性, 机体衰老及多种疾病如肿瘤、炎症、神经退行性疾病、动脉粥样硬化等的诱发促进机制都与自由基有关<sup>[1]</sup>。自由基的减少, 不仅要靠自身的清除系统, 还需要外部抗氧化剂的协助。近年来, 关于合成抗氧化剂的副作用受到人们更多的关注, 因此, 寻找安全、高效的植物源类抗氧化剂, 已成为食品领域研究的热点。楸树 (*Catalpa bungei* C. A. Mey.) 为紫葳科 (Bignoniaceae) 梓属植物, 落叶乔木, 《本草纲目》记载楸树树皮、叶具有药

用功效。梓树与楸树均为梓属植物, 国内外研究报道, 梓树具有抗肿瘤、抑菌、抗氧化、抗炎等作用。实验前期对楸树叶成分的预试验发现, 含有与梓树叶中相似的化学成分。目前, 对楸树的研究主要集中在栽培、育种等方面, 关于其抗氧化活性方面还鲜见报道。

本研究分别以河南、甘肃两产地各 6 个楸树无性系为对象, 采用铁氰化钾法测定不同无性系叶片粗提物的还原力, 并对 2,2-二苯基-1-苦基肼 (DP-

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201204603); 农业科技成果转化资金项目(2013GB24320611)

作者简介: 徐洪宇(1985—), 女, 博士研究生. 主要从事植物资源化学研究. E-mail: xiaoyu\_303919@126.com

\* 通讯作者: 博士, 博导, 主要从事植物次生代谢与调控、天然产物提取分离与开发利用研究.

PH) 自由基清除率和羟自由基的清除能力及总酚含量进行测定, 筛选出抗氧化活性最强的无性系, 进一步对其叶片乙醇粗提物不同极性组分群(石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相)的抗氧化活性进行测定, 确定抗氧化活性高的组分群, 为下一步繁育具强抗氧化活性的楸树植物资源和开发高效植物源类抗氧化剂奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

2012年10月中旬, 分别在甘肃省天水市小陇山林业科学研究所实验基地(105°53' E, 34°32' N, 海拔1494 m)和河南省洛阳林业科学研究所实验基地(112°30' E, 34°41' N, 海拔180 m)采集6个无性系(表1)的叶片。采集同一块试验地生长状况一致、无病虫害的植株, 采集树龄为8 a。每个无性系采集3棵植株, 每植株分别从东南西北4个方向采集树冠中部的成熟叶片各500 g, 等量混合。叶片采集后在90℃下杀青处理20 min, 在60℃干燥箱中烘干, 粉碎, 过20目筛备用。

表1 楸树不同无性系的产地及代码

无性系品种	产地	缩写	无性系品种	产地	缩写
楸树无性系 2-5	河南省	CA2-5	楸树无性系 1	甘肃省	CA1
楸树无性系 1-4	河南省	CA1-4	楸树无性系 2	甘肃省	CA2
楸树无性系 2-8	河南省	CA2-8	楸树无性系 3	甘肃省	CA3
楸树无性系 9-1	河南省	CA9-1	楸树无性系 4	甘肃省	CA4
楸树无性系 1-1	河南省	CA1-1	楸树无性系 5	甘肃省	CA5
楸树无性系 008-1	河南省	CA008-1	楸树无性系 6	甘肃省	CA6

### 1.2 主要试剂及仪器

2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)、Folin-Ciocalteu试剂购自美国Sigma公司;2-D-脱氧核糖购自上海阿拉丁试剂有限公司;没食子酸标准品(中国药品生物制品检定所批号110831-200904);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)购自国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、过氧化氢、硫代巴比妥酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯。

紫外-可见分光光度计(UV-1800, 上海美谱达仪器有限公司);分析天平(AG204, METTLER TOLEDO);旋转蒸发器(RE52AA, 上海亚荣生化仪器厂);离心机(TGL-16 高速台式冷冻离心机)。

## 2 研究方法

### 2.1 粗提物及萃取物的制备

称取叶粉约5 g, 加入50 mL 80%的乙醇-水溶

液(v/v)(料液比1:10, w/v), 在80℃下回流提取3次, 每次1 h, 合并提取滤液, 45℃旋转薄膜蒸发浓缩至干, 用蒸馏水定容至50 mL, 存储于4℃冰箱, 用于测定总酚含量及抗氧化活性。

取筛选出的抗氧化活性高的植物叶粉100 g, 按上述方法提取、浓缩, 得粗提物浸膏, 用500 mL 蒸馏水配制成混悬液, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取5~8次, 将各萃取(余)相分别浓缩、干燥, 得石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相和水(萃余)相, 分别将各相配置成1.0 mg·mL<sup>-1</sup>质量浓度的水溶液, 进行总酚含量和抗氧化活性检测。

### 2.2 还原力的测定

采用Oyazu<sup>[2]</sup>的方法。精确吸取0.5 mL粗提物(1.67 mg·mL<sup>-1</sup>)或各相(萃取相和萃余相)(0.20 mg·mL<sup>-1</sup>), 加0.5 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 6.6)和0.5 mL 1%铁氰化钾溶液, 50℃水浴20 min。迅速冷却, 加入0.5 mL 10%三氯乙酸(TCA), 混合均匀, 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 取上清液1.0 mL加1.0 mL蒸馏水和0.2 mL 0.1%氯化铁溶液反应10 min, 700 nm下测定吸光值。样品还原力表示为0.1 mg·mL<sup>-1</sup>抗坏血酸的还原力的百分比。

### 2.3 DPPH 自由基清除率的测定

采用Brandwilliams等<sup>[3]</sup>的方法, 略作修改。取浓度分别为1.25、1.67、2.00、3.34、5.01、6.67 mg·mL<sup>-1</sup>的粗提物各1 mL或各相(0.50 mg·mL<sup>-1</sup>), 加入3 mL 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>的DPPH自由基乙醇溶液, 混匀后加入4.0 mL乙醇溶液, 于室温下避光静置反应30 min后, 在517 nm下测定吸光值, 空白以蒸馏水代替提取液作为对照。楸树无性系叶粗提物在1.25~6.67 mg·mL<sup>-1</sup>浓度下清除DPPH自由基的清除率达50%时所需的样品浓度即IC<sub>50</sub>, 以IC<sub>50</sub>的倒数大小代表其清除能力的强弱。按以下公式计算样品对DPPH自由基的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

式中: A<sub>c</sub> 为空白样品的吸光值, A<sub>s</sub> 为不同浓度样品的吸光值。

### 2.4 羟自由基清除率的测定

按照Ren等<sup>[4]</sup>的方法, 取浓度分别为0.04、0.13、0.17、0.20、0.50、1.00 mg·mL<sup>-1</sup>的粗提物各0.2 mL或各相(0.05 mg·mL<sup>-1</sup>), 加入0.1 mL Fe-

$\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0.1 \text{ mL EDTA}$  ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0.5 \text{ mL } 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  2-D-脱氧核糖溶液,  $0.9 \text{ mL}$  磷酸盐缓冲溶液 ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 和  $0.2 \text{ mL H}_2\text{O}_2$  ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $60 \text{ min}$ 。加入  $1.0 \text{ mL } 2.8\%$  TCA 终止反应, 再加入  $1.0 \text{ mL } 1.0\%$  硫代巴比妥酸, 沸水浴加热  $15 \text{ min}$ 。冷却后于  $532 \text{ nm}$  下测吸光值。按下列公式计算样品对羟自由基的清除率, 结果以自由基清除率(%)表示。

$$\text{清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

式中:  $A_c$  为空白样品的吸光值,  $A_s$  为不同浓度样品的吸光值。

## 2.5 总酚含量测定

参考 Turkmen 等<sup>[5]</sup>的方法并略做改动。精确吸取  $40 \mu\text{L}$  粗提物或各相, 加入  $0.5 \text{ mL } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂混匀, 静置  $5 \text{ min}$  后加

入  $7.5\%$  (M/V) 碳酸钠溶液  $0.5 \text{ mL}$ , 室温下避光反应  $2 \text{ h}$ ,  $725 \text{ nm}$  下测吸光值。以没食子酸( $0.1 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作为标品, 绘制标准曲线( $y = 11.097x - 5.0493$ ,  $R^2 = 0.9986$ )。根据标准曲线计算总酚含量, 以每克样品干质量中含有的没食子酸毫克数计, 单位为  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

## 2.6 数据分析

试验数据使用 SPSS18.0 软件进行 ANOVA 统计分析, 采用 SNK 法进行显著性检验( $p < 0.05$ ), 其中酚类物质含量与抗氧化活性的关系运用 Pearson 相关性分析。每个样品重复 3 次, 结果以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 3 结果与分析

### 3.1 各无性系叶粗提物总酚含量及抗氧化活性

图 1A 显示: 12 个楸树无性系叶粗提物均具有一定的还原力, 但不同无性系间因产地及无性系的不同, 其还原力差异显著( $p < 0.05$ )。采自甘肃省

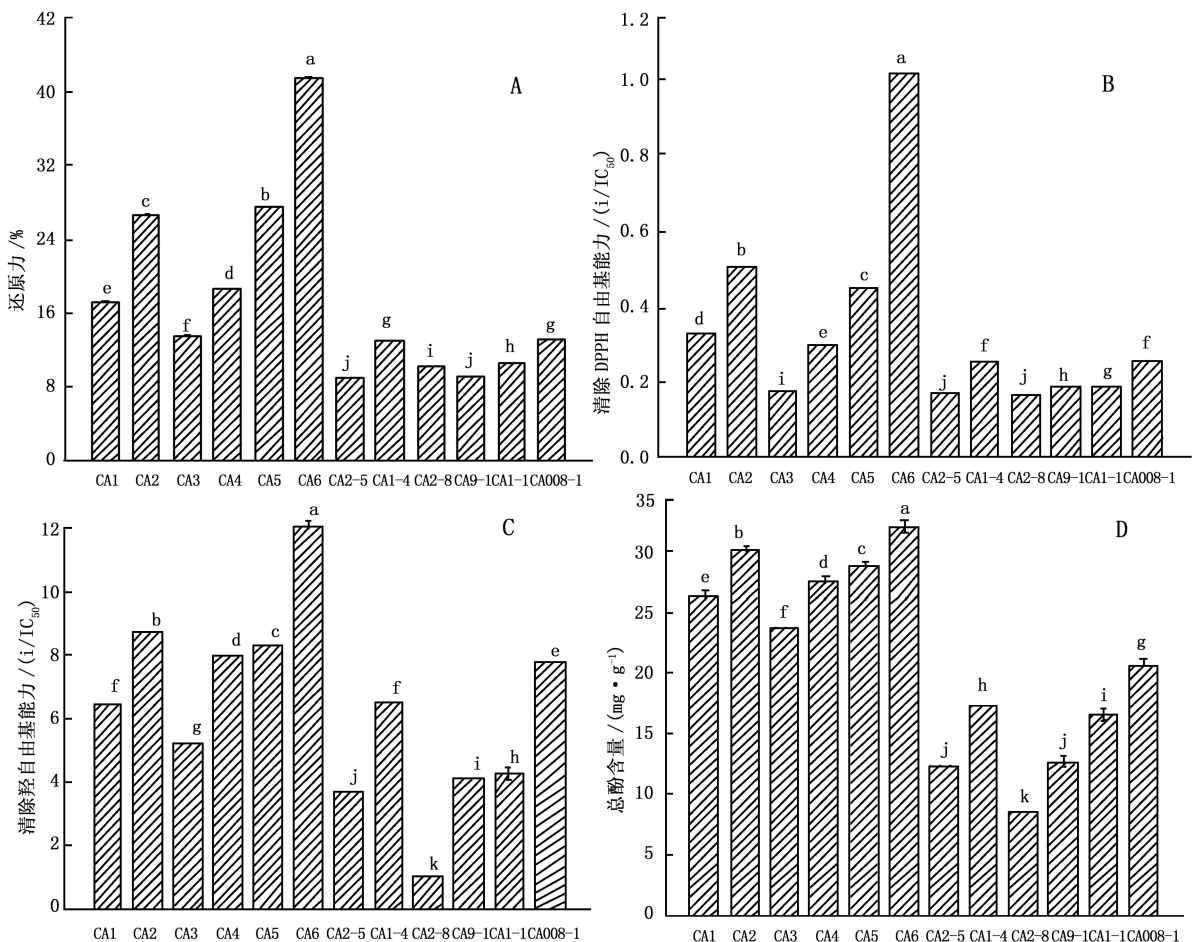


图 1 不同产地楸树无性系叶粗提物总酚含量及抗氧化活性(不同小写字母(a~h)表示差异显著( $p < 0.05$ ))

的6个楸树无性系叶粗提物的还原力均显著比河南省产地的高,2个产地的12个楸树无性系中,生长在甘肃省的CA6(41.61%)为还原力最高的无性系,比河南省产地中还原力最强的CA1-4(13.32%)和CA008-1(13.12%)大3倍;其次为CA5和CA2无性系。

DPPH 自由基是一种稳定的自由基,当反应体系中存在抗氧化物质时,它可以和 DPPH 自由基的单电子配对而使其吸光值变化,从而评价试验样品的抗氧化能力<sup>[6]</sup>。图 1B 显示:不同楸树无性系叶粗提物清除 DPPH 自由基的能力差异显著( $p < 0.05$ )。甘肃省产地的6个楸树无性系中除 CA3 外,其余5个楸树无性系叶粗提物清除 DPPH 自由基的能力均强于河南省产地,且甘肃省产地的不同楸树无性系对 DPPH 自由基的清除能力的差异较大,而河南省产地的6个楸树无性系清除 DPPH 自由基的能力相近;在12个楸树无性系中,甘肃省产地的 CA6 叶粗提物清除 DPPH 自由基的能力最强,其次为 CA2, CA3 最低。

12个楸树无性系叶粗提物对羟自由基的清除能力,以  $IC_{50}$  的倒数值大小代表对羟自由基的清除能力的强弱。图 1C 显示:各楸树无性系叶粗提物对羟自由基的清除能力差异显著( $p < 0.05$ ),其中,甘肃省的6个楸树无性系中,除 CA1、CA3 外,其余4个楸树无性系叶粗提物清除羟自由基的能力均强于河南省;在2个产地的12个楸树无性系中,清除羟自由基能力最强的无性系是甘肃省的 CA6。

2个产地12个楸树无性系叶粗提物中均含有一定量的酚类物质,且含量差异显著( $p < 0.05$ ) (图 1D)。甘肃省产地的6个楸树无性系叶粗提物中总酚含量均差异显著( $p < 0.05$ )且比河南省产地的高,其中,CA6 叶粗提物的总酚含量最高(31.73  $mg \cdot g^{-1}$ ),其次为 CA2(29.83  $mg \cdot g^{-1}$ ),CA2-8(8.57  $mg \cdot g^{-1}$ )的含量最低。

### 3.2 各无性系叶粗提物总酚含量与抗氧化活性的相关性分析

以12个楸树无性系的总酚含量为自变量,分别以还原力、清除 DPPH 自由基的能力( $IC_{50}$  值的倒数)、清除羟自由基的能力( $IC_{50}$  值的倒数)为因变量,分析总酚含量与抗氧化活性的相关关系。结果表明:总酚含量与还原力、DPPH 自由基清除率及羟自由基清除率均极显著正相关( $p < 0.01$ ),相关系数分别为 0.831、0.719、0.869,说明酚类物质是楸树叶具有抗氧化活性的物质基础之一。这与水果<sup>[7-9]</sup>、蘑菇<sup>[10]</sup>的多酚和抗氧化活性显著相关的结果一致。

### 3.3 楸树无性系 CA6 不同极性组分群的总酚含量及抗氧化活性

上述结果表明,CA6 叶片的乙醇粗提物具有较强的抗氧化活性。将 CA6 的粗提物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等溶剂萃取后得到不同极性的组分群,考察不同极性组分群的总酚含量和抗氧化能力。CA6 不同萃取相和萃余相的总酚含量及抗氧化活性的差异显著( $p < 0.05$ ) (表 2),酚类成分从非极性的石油醚萃取相到强极性的萃余相都有分布。可见 CA6 叶片提取物中酚类成分结构复杂,极性差异较大,其中,乙酸乙酯萃取相酚类成分含量(238.20  $mg \cdot g^{-1}$ )极显著高于正丁醇萃取相(40.30  $mg \cdot g^{-1}$ )和石油醚萃取相(17.37  $mg \cdot g^{-1}$ ),萃余相的酚类成分含量(9.90  $mg \cdot g^{-1}$ ),显著低于其它相。乙酸乙酯萃取相对 DPPH 自由基的清除率强于 BHT,而在还原力和羟自由基清除率略低于 BHT,即乙酸乙酯萃取相具有较强的抗氧化活性。3种抗氧化测定方法中均以乙酸乙酯萃取相 > 正丁醇萃取相 > 石油醚萃取相 > 萃余相,这一顺序与其酚类成分含量顺序一致,与相关性分析得到酚类成分与抗氧化活性呈正相关的结果一致,说明 CA6 的抗氧化能力与其中含有中等极性的酚类成分含量呈量效关系。

表 2 楸树无性系 CA6 不同极性组分群的总酚含量及抗氧化活性

组分	总酚含量/( $mg \cdot g^{-1}$ )	还原力/%	DPPH 自由基清除率/%	羟自由基清除率/%
石油醚相	17.37 $\pm$ 0.513 c	20.70 $\pm$ 0.738 d	25.65 $\pm$ 0.149 d	37.18 $\pm$ 0.131 d
乙酸乙酯相	238.20 $\pm$ 0.600 a	111.32 $\pm$ 0.943 b	80.70 $\pm$ 0.262 a	80.34 $\pm$ 0.098 b
正丁醇相	40.30 $\pm$ 1.281 b	39.18 $\pm$ 0.738 c	38.73 $\pm$ 0.127 c	44.12 $\pm$ 0.136 c
萃余相	9.90 $\pm$ 0.100 d	13.08 $\pm$ 0.896 e	16.40 $\pm$ 0.367 e	23.49 $\pm$ 0.031 e
BHT	-	173.29 $\pm$ 0.448 a	77.32 $\pm$ 0.184 b	83.75 $\pm$ 0.143 a

注: BHT 表示 2,6-二叔丁基-4-甲基茶酚; 同列字母不同表示差异显著( $p < 0.05$ )。

## 4 结论与讨论

不同的抗氧化测定方法因其检测的原理不同,故其测定的结果可能不同,所以单一一种测定方法不能准确的评价抗氧化活性<sup>[11]</sup>。本文采用还原力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率 3 种测定方法,对各楸树无性系的抗氧化活性进行测定。结果发现,因楸树无性系及产地不同,其抗氧化活性不同。酚类成分具有较好的抗氧化活性,本研究中酚类成分与还原力、DPPH 自由基清除率及羟自由基清除率呈极显著正相关,即酚类成分是其具有抗氧化能力的物质基础之一。不同产地楸树无性系的抗氧化活性及总酚含量存在较大的差异,主要是因各楸树无性系生长环境及无性系的不同,其含有的次生代谢产物的合成、积累量不同。本试验中,甘肃省产地的 6 个楸树无性系抗氧化活性和总酚含量整体强于河南省,这与甘肃省的 6 个楸树无性系的抗氧化活性成分含量高于生长在河南省的 6 个楸树无性系有关,也与两产地的地理、气候等差异有关。例如:在高海拔地区,植物会合成能在紫外区有较强吸收的酚类物质,以减少紫外线辐射对自身的伤害,使其叶表面中酚类物质含量随着紫外辐射的增强而增加<sup>[12]</sup>;所以处于高海拔地区的甘肃省,其紫外辐射强于河南省,也是导致抗氧化活性和总酚含量整体强于河南省的一个原因。因品种及产地引起的品质、抗氧化能力等的差异与榛果<sup>[13]</sup>、苹果<sup>[14-15]</sup>、石榴<sup>[16]</sup>等的研究结果类似。

产地为甘肃省的楸树无性系 CA6 是 12 个试验材料中抗氧化活性最强及总酚含量最高的无性系,同时 CA6 的不同萃取相和萃余相中,乙酸乙酯萃取相的总酚含量及抗氧化活性最强,乙酸乙酯萃取相中除含有具有抗氧化活性的中等极性的酚类成分外,还含有不具有抗氧化能力的其它成分,但其清除 DPPH 自由基能力强于 BHT,而在还原力和羟自由基清除率测定中略低于 BHT,可见,CA6 的乙酸乙酯萃取相具有开发潜力。

CA6 无性系因其具有种质资源的优势和较强的抗氧化活性,可以作为下一步开发植物源类抗氧化剂的重要资源。笔者将进一步对 CA6 叶片乙酸乙酯萃取相中活性成分进行分离、纯化,明确其具体结构,为更好利用植物资源开发新型天然抗氧化剂提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] Gao P, Zhang H F, Dinavahi R, *et al.* HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo[J]. *Cancer Cell*, 2007, 12: 230-238.
- [2] Oyaizu M. Studies on products of the browning reaction antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine [J]. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44(6): 307-315.
- [3] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30.
- [4] Ren J, Zhao M, Shi J, *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2008, 108(2): 727-736.
- [5] Turkmen N, Sari F, Velioglu Y S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(4): 713-718.
- [6] Jao C L, Ko W C. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(2): 430-435.
- [7] Leong L P, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in singapore markets[J]. *Food Chemistry*, 2002, 76(1): 69-75.
- [8] Vieira F G K, Borges G D, Copetti C, *et al.* Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 122(3): 421-425.
- [9] 丁秀玲,张京芳,韩明玉. 不同品种苹果化学成分及抗氧化活性比较[J]. *食品科学*, 2011, 32(21): 41-47.
- [10] Choi Y M, Ku J B, Chong H B, *et al.* Antioxidant activities and total phenolics of ethanol extracts from several edible mushrooms produced in korea[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2005, 14(5): 700-703.
- [11] Tabart J, Kevers C, Pincemail J, *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1226-1233.
- [12] 董娟娥,张康健,梁宗锁. 植物次生代谢与调控[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社, 2009: 74-75.
- [13] 罗青红,史彦江,宋锋惠,等. 不同产地杂交榛果实品质比较分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(3): 50-54.
- [14] Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, *et al.* Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21(5): 396-401.
- [15] Lata B, Trampeczynska A, Paczesna J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(2): 176-181.
- [16] Mousavinejad G, Emam - Djomeh Z, Rezaei K, *et al.* Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars [J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(4): 1274-1278.