

红果参提取物的抗氧化活性研究

陈莉华^{1,2*}, 贺诚志¹, 谭林艳¹, 廖微¹, 王晓静¹

¹吉首大学化学化工学院; ²吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南吉首 416000

摘要: 超声辅助提取红果参中的抗氧化活性物质并用 D-101 大孔树脂纯化, 以原花青素为指标测定抗氧化活性物质含量, 研究了提取物对羟基自由基、超氧阴离子自由基和亚硝酸盐体系的清除作用以及对油脂氧化体系的抑制作用。结果表明: 红果参实提取物表现出了对羟自由基、超氧阴离子自由基及亚硝酸盐的优异的清除能力, 对油脂氧化有极好的抑制作用, 对自由基的清除率及抗油脂氧化能力与提取物中原花青素质量浓度均呈剂量正相关效应。

关键词: 红果参; 原花青素; 提取物; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2; R285.2

文献标识码: A

Investigation of Antioxidant Activities of Extracts of Hong Guo Shen

CHEN Li-hua^{1,2*}, HE Cheng-zhi¹, TAN Lin-yan¹, LIAO Wei¹, WANG Xiao-jing¹

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University; ²Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Utilization, Jishou University, Hunan Jishou 416000, China

Abstract: The antioxidant components of Hong Guo Shen were ultrasonically extracted and purified using D-101 macroporous resin. The content of the extracts was determined using proanthocyanidins as index. The antioxidant activity of the purified extracts was investigated by testing scavenging effects of $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO_2 and against the peroxidation of oils. The results showed that the purified extracts exhibited excellent ability to remove $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO_2 and good inhibitory effect to peroxidation of oils. Furthermore, the antioxidant activity increased with the increasing of the concentration of extracts.

Key words: Hong Guo Shen; proanthocyanidins; extractions; antioxidant activity

红果参又称蜘蛛果、山萆薢, 具有润肺、止咳、滋补、理气、补虚、祛瘀止痛等功效^[1], 富含多糖及原花青素等活性成分。研究表明原花青素是当今人类发现的最有效的抗氧化剂^[2], 利用原花青素的抗氧化性开发系列功能性食品成为当前的研究热点^[3-5]。本研究提取并纯化红果参果实中抗氧化活性物质, 以原花青素为指标检测含量, 研究提取物的抗氧化性能, 旨在为进一步利用红果参资源提供实验依据。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

样品采于吉首大学“植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室”红果参基地。硫酸、苯酚、没食

子酸、抗坏血酸、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷、碘化钾、冰醋酸、三氯甲烷、淀粉、碘等均为分析纯。金健牌茶籽油(植物油)购于吉首阳光超市。

1.2 仪器与设备

723 可见分光光度计(上海荆和分析仪器有限公司); KQ250-E 型超声波发生器(郑州长城科工贸有限公司); GXZ-9070MBE 数显鼓风干燥箱(上海基玮试验仪器设备有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); K-201B-II 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 红果参的提取纯化及原花青素含量测定

精密称取红果参 100.0 g 于 1000 mL 烧杯中, 加入 60% 的乙醇溶液 800 mL, 调节 pH = 5, 浸泡 2 h 后放入超声波发生器中于 60 °C 超声提取 40 min, 抽滤, 共提取三次, 所得 3 次滤液旋转减压蒸发、浓缩至 200 mL, 得到粗提液。

准确称取 D-101 大孔吸附树脂 2.0 g, 加入 100

收稿日期: 2012-10-08 接受日期: 2013-11-21

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C2621430 2421, 11C26414305373); 湘西自治州科技计划项目; 吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室开放基金资助项目

* 通讯作者 Tel: 86-013574300264; E-mail: chenlihua99@163.com

mL 粗提液,调溶液 pH 值为 4,置于恒温水浴磁力搅拌器,20 ℃ 吸附 6 h,过滤,用 100 mL 60% 的乙醇溶液分五次洗涤树脂,得到纯化后的提取液,简称纯化液,后续实验所用均为该纯化液。

采用硫酸-香草醛法^[6]绘制原花青素测定的标准曲线,在最大吸收波长 495 nm 处测定吸光值,以原花青素浓度 c (mg/mL) 对吸光值 A 进行线性回归得回归方程为 $A = 1.874C - 0.0037$, $R^2 = 0.9996$ 。

准确吸取 1.0 mL 纯化液加入 5 mL 新鲜配制的显色剂(1% 香草醛溶液:8% 盐酸 = 1:1),在 30 ℃ 条件下避光反应 30 min,在紫外分光光度计上以溶剂为空白测 495 nm 处吸光值,计算纯化液中原花青素含量及红果参中原花青素得率。

1.3.2 纯化液抗氧化性分析

1.3.2.1 纯化液对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除

建立 Fenton 反应体系模型^[7],以空白液为参比在波长 510 nm 下测其吸光值 A_0 、 A_x 及 A_{x_0} ,重复三次测定,按下式计算提取物对羟基自由基的清除率:

$$\text{清除率}\% = 1 - \left(\frac{A_x - A_{x_0}}{A_0} \times 100\% \right)$$

式中, A_0 为空白对照液吸光值; A_x 为纯化液吸光值; A_{x_0} 为本底吸光值。

1.3.2.2 纯化液对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)自由基的清除

邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生稳定的超氧阴离子自由基并生成有色中间产物,可通过比色法检测^[8]。按照文献中的实验方法,在 325 nm 处测定体系的吸光值 A 、 A_j 、 A_0 ,纯化液对超氧阴离子自由基清除率计算公式为:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}\% = [1 - (A - A_j) / A_0] \times 100$$

式中, A 为样品加入缓冲溶液及邻苯三酚后的吸光值; A_j 为样品加入缓冲溶液后的吸光值; A_0 为缓冲溶液加入邻苯三酚后的吸光值。

1.3.2.3 纯化液对亚硝酸盐(NO_2^-)的清除

NO_2^- 在酸性条件下与对氨基苯磺酸发生反应,再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色络合物,该络合物在 538 nm 处有最大吸收,因此,可用分光光度法间接测定 NO_2^- 的量。

按照^[7]配制 NO_2^- 的标准系列,在波长 538 nm 下测定吸光值,得到 NO_2^- 浓度 c 与吸光值 A 的线性回归方程为: $A = 0.3969C + 0.0403$, $R^2 = 0.9969$,亚硝酸盐浓度在 0.0 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间有良好的线性关系。

吸取 1 mL 纯化液,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的亚硝酸钠

溶液 2.00 mL,测定 A 并由标准曲线方法计算 NO_2^- 的浓度及清除率:

$$\text{NO}_2^- \text{清除率}\% = [(\text{标准量} - \text{残留量}) / \text{标准量}] \times 100$$

1.3.2.4 纯化液抗油脂氧化能力测定

参照文献^[9,10]绘制标准曲线并求出碘量-吸光值之间的数学关系。碘量 M (μmol) 与吸光值 A 在 0.0 ~ 0.96 μmol 间有良好的线性关系,回归方程为 $M = 4.0153A + 0.0039$, $R^2 = 0.9986$ 。

纯化液对油脂的抗氧化性采用国际上通用的烘箱强化贮存法:称取 20 g 油脂,加入 2 mL 纯化液,搅拌均匀后,放入烘箱中强化保存,间隔 1 h 交换在烘箱中的位置并取 1 mL 待测样品,参照标准曲线方法分别测定 585 nm 处的吸光度。以同浓度抗坏血酸(Vc)和柠檬酸溶液作对比,比较其抗氧化能力。按下式计算油脂过氧化值(POV)及原花青素对油脂的保护率 η :

$$\text{POV}(\text{mmol}/\text{Kg}) = \frac{\text{碘生成量}(\text{mmol})}{W(\text{Kg})}$$

式中: W 表示油脂质量(kg)。

$$\text{保护率}\eta = \left(1 - \frac{\text{POV}_{\text{未1}} - \text{POV}_{\text{初}}}{\text{POV}_{\text{未2}} - \text{POV}_{\text{初}}} \right) \times 100\%$$

式中: η 为原花青素对油脂的保护率; $\text{POV}_{\text{初}}$ 为未对油脂进行强化氧化时的过氧化值(mmol/kg); $\text{POV}_{\text{未1}}$ 为添加原花青素的油脂强化氧化后的过氧化值(mmol/kg); $\text{POV}_{\text{未2}}$ 为未添加原花青素的油脂强化氧化后的过氧化值(mmol/kg)。

2 结果与讨论

2.1 红果参中原花青素含量测定

经测定,纯化液中原花青素浓度为 0.7127 mg/mL,红果参中原花青素得率为 0.14 g/100 g(干果)。

2.2 纯化液对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除

分别配制一系列不同质量浓度的原花青素纯化液,以相同浓度的柠檬酸及 Vc(以抗坏血酸配制)溶

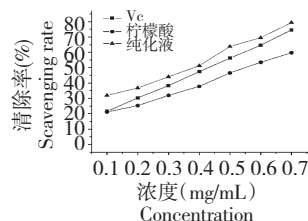


图 1 不同抗氧化剂对羟基自由基的清除

Fig. 1 Hydroxyl radical scavenging capacity of different antioxidants

液为对照,考察其对羟基自由基的清除作用,结果如图1所示。

从图1结果可以看出,纯化液清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用很明显,在相同的0.1~0.7 mg/mL浓度范围内,随着原花青素质量浓度的增大,清除率逐渐升高,呈现出良好的量效关系,纯化液对羟基自由基清除的效果优于Vc和柠檬酸,其大小排序为:纯化液>Vc>柠檬酸。

2.3 纯化液对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除

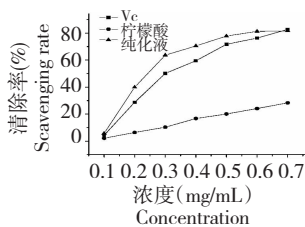


图2 不同抗氧化剂对超氧阴离子自由基的清除

Fig. 2 Superoxide anion free radical scavenging capacity of different antioxidants

如图2所示,在实验所选取浓度范围内,纯化液、Vc对超氧阴离子自由基的清除率具有相同趋势,都是随着原花青素质量浓度的增大而升高,Vc对超氧阴离子自由基的清除能力与纯化液有微小差距,柠檬酸的清除能力则远落后于纯化液。

2.4 纯化液对 NO_2 的清除

考察了不同原花青素质量浓度的纯化液、柠檬酸及Vc溶液对 NO_2 清除效果的影响,结果如图3所示。

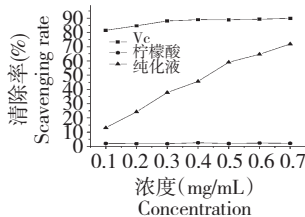


图3 不同抗氧化剂清除 NO_2 的能力

Fig. 3 NO_2 scavenging capacity of different antioxidants

由图3可以看出,随着浓度的增大,纯化液对 NO_2 的清除率呈良好的量效关系,而柠檬酸在实验浓度范围内清除率很低且无明显变化,Vc在低浓度时已有较好的清除效果。

2.5 相同原花青素质量浓度的纯化液抗氧化活性比较

以纯化液对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2 的清除能力(%)为指标,对红果参提取物的抗氧化活性进行了比较,结果见表1。

表1 红果参原花青素对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2 清除能力比较
Table 1 Comparison of antioxidant activity of Hong Guo Shen procyanidins

原花青素浓度 $C_{\text{procyanidins}}$ (mg/mL)	清除能力 Scavenging capacity (%)		
	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	NO_2
0.1	32	5	12
0.2	35	40	25
0.3	45	65	37
0.4	50	70	45
0.5	62	75	60
0.6	68	80	65
0.7	76	80	70

由表1的比较结果可知,纯化液对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2 均有较好的清除作用,相同原花青素浓度时纯化液对超氧阴离子自由基的清除效果最好,其次为羟基自由基,呈现的清除效果大小顺序为: $\text{O}_2^{\cdot-}$ > $\cdot\text{OH}$ > NO_2 。该研究结果与原花青素为消除自由基的最强抗氧化剂的已有报道^[5-7]相符。

2.6 不同生源途径的原花青素抗氧化能力比较

本研究组研究了不同生源途径的原花青素的抗氧化能力,发现当其生源途径不同时,同样质量浓度的原花青素的抗氧化能力是不同的,见表2。

表2 不同生源途径的原花青素抗氧化能力比较

Table 2 Comparison of antioxidant activity of procyanidins from different sources

原花青素浓度 $C_{\text{procyanidins}}$ (mg/mL)	清除能力 Scavenging capacity (%)								
	葡萄皮 Grape skin			金樱子 <i>Rosa laevigata Michx.</i>			红果参 Hong Guo Shen		
	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	NO_2	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	NO_2	$\cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	NO_2
0.1	29	3.5	12.5	36.2	87.2	96	32	5	12
0.2	31.2	1.2	16.4	68.8	94.2	95.7	35	40	25
0.3	35	3.5	28.0	80.8	98.3	95.2	45	65	37

0.4	37.9	1.6	31.8	96.2	94.2	96.8	50	70	45
0.5	42.2	244	38.5	98.3	95.3	96.4	62	75	60
0.6	40.5	36.1	40.2	98.8	97.7	90.9	68	80	65
0.7	47.9	48.3	46.7	99.8	98.8	96.2	76	80	70

由表2数据比较可知,从葡萄皮(黑玫瑰)、金樱子、红果参三种来源的天然植物中提取得到的原花青素所表现出来的抗氧化能力是不同的,三种不同来源的原花青素抗氧化能力大小顺序为:金樱子 > 红果参 > 葡萄皮,而将同种来源的原花青素对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO_2^{\cdot} 清除能力比较的话,葡萄皮原花青素的顺序为 $\cdot\text{OH} > \text{NO}_2^{\cdot} > \text{O}_2^{\cdot-}$,金樱子原花青素的顺序为 $\text{NO}_2^{\cdot} > \text{O}_2^{\cdot-} > \cdot\text{OH}$,红果参原花青素的顺序为 $\text{O}_2^{\cdot-} > \cdot\text{OH} > \text{NO}_2^{\cdot}$,本研究组正对不同生源途径的原花青素具有不同抗氧化能力以及同种生源途径的原花青素对不同的氧化体系具有不同清除能力等问题进行深入研究。

2.7 纯化液对油脂氧化的抑制作用

考察了30℃下原花青素质量浓度为0.1、0.3、0.5、0.7 mg/mL的红果参纯化液在不同时间内对植物油的抗氧化能力。结果见图4。

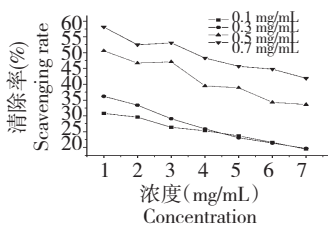


图4 红果参纯化液对植物油氧化抑制的影响

Fig. 4 Antioxidant ability of Hong Guo Shen purified extracts on vegetable oil

由图4可以看出,在相同的烘箱放置时间段内,纯化液中原花青素浓度对植物油的抗氧化能力影响较大。同样是烘箱强化放置时间1 h,原花青素浓度为0.1 mg/mL时,对植物油的保护率达到30%以上;而当浓度为0.71 mg/mL时,对植物油的保护率就可达到近60%。纯化液中原花青素质量浓度越大,对植物油的保护率显著上升,说明植物油的抗氧化作用增强,表明纯化物原花青素浓度与植物油的抗氧化能力有剂量效应关系。随着在烘箱放置时间的延长,含不同原花青素浓度的纯化液对油脂保护率均有所降低,这是因为原花青素是由不同数量的儿茶素(catechin)或表儿茶素(epicatechin)或儿茶

素与表儿茶素形成的二聚体、三聚体、四聚体等直至十聚体构成,随着在烘箱强制放置时间延长,这些儿茶素、表儿茶素以及多聚体转化为无定形鞣质而降低抗氧化效果。

3 结论

红果参纯化液在一定质量浓度范围内对 $\cdot\text{OH}$ 、 NO_2^{\cdot} 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均有一定的清除作用,对植物油具有较强的抗氧化效果,且清除作用及抗氧化效果均与浓度有剂量效应关系,表明红果参提取物具有良好的抗氧化能力,作为一种新的天然、保健的绿色食品抗氧化剂具有良好的开发前景。

参考文献

- China pharmacopoeia committee (中国药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010. 42-43.
- Yu HJ (禹华娟), Sun ZD (孙智达), Xie BJ (谢笔钧). Enzyme extraction auxiliary LianFang procyanidins process and its antioxidant activity research. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 154-158.
- Li CY (李长运), Wei SS (魏莎莎), Shi Y (施雅). Cinnamon high together of procyanidins hydrogenated degradation process research. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 660-663.
- Gao HN (高海宁), Zhang Y (张勇), Wang L (王丽). "Black beauty" potatoes pigment in vitro oxidation resistance research. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 224-228.
- Wei L (魏蕾), Lv JF (吕佳飞), Li ZZ (李志洲). Anthocyanin of extraction and purification, oxidation resistance and the advances in the research of the function. *Amino Acids Biol Res* (氨基酸和生物资源), 2009, 31(4): 83-86.
- Zhao P (赵平), Liu JY (刘俊英), Zhang YP (张月萍). Vanillin method to determine the procyanidins amount of substance concentration. *China Food Add* (中国食品添加剂), 2011, 3: 219-224.
- Yan J (颜军), Gou XJ (苟小军), Zou QF (邹全付). Spectrophotometry Fenton reaction that produces the hydroxyl radicals. *J Chengdu Univ, Nat Sci Ed* (成都大学学报, 自科版), 2009, 28(2): 91-94.