

龙眼核多酚物质的液质联用分析及其抗氧化活性

王淑霞, 李爱梅, 张俊杰, 欧仕益, 黄雪松, 张广文*

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 为研究龙眼核抗氧化能力与成分的关系, 采用不同极性溶剂萃取分离法、HPLC-ESI-MS 分析法和 DPPH 抗氧化能力测定法等对 60% 乙醇提取的龙眼核多酚粗提物进行分析研究, 鉴定出 11 种物质, 其中 6 种为多酚, 确定乙酸乙酯相抗氧化活性最强; 进一步对经大孔树脂 AB-8 柱分离后的乙酸乙酯相各流份进行体外 DPPH 自由基清除能力和还原能力测定, 得知与抗坏血酸相比, 流份 Fr1~Fr16 都具有良好的抗氧化活性, 其中流份 Fr7、Fr8 抗氧化活性最强。结合化学分离结果分析, 流份 Fr7 经反复重结晶, 得到较纯的没食子酸, 其抗氧化能力较强, 与抗氧化分析实验结果相一致。低极性萃取相抗氧化能力最强也表明龙眼核中含有丰富的小分子多酚类物质。

关键词: 龙眼核; HPLC-ESI-MS; 抗氧化活性; DPPH 自由基; 还原能力

HPLC-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Different Solvent Fractions of Ethanol Extract of Longan Seeds and Their Antioxidant Activities

WANG Shu-xia, LI Ai-mei, ZHANG Jun-jie, OU Shi-yi, HUANG Xue-song, ZHANG Guang-wen*

(Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This study was designed to analyze phenolic compounds in different solvent (aqueous, ethyl acetate and 1-butanol) fractions of the ethanol extract of longan seeds by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) and to evaluate their antioxidant activity. A total of 11 compounds were identified in aqueous, ethyl acetate and 1-butanol fractions, including 6 phenolic compounds. Ethyl acetate fraction had the strongest antioxidant activity among the three fractions. Further separation of ethyl acetate fraction by macroporous resin AB-8 column chromatography resulted in 16 eluates. The measurement of DPPH free radical scavenging activity and reducing potential using ascorbic acid as a reference substance demonstrated that all the eluates had excellent antioxidant activity and eluates No. 7 and 8 had the strongest antioxidant activity. Highly pure gallic acid was obtained after repeatedly recrystallizing eluate No. 7, thus supporting the excellent antioxidant activity of the eluate. Meanwhile, the strongest antioxidant activity of ethyl acetate fraction as a low-polarity fraction indicated that longan seeds contained abundant amounts of phenolic compounds having small molecular weight.

Key words: longan seed; high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS); antioxidant activity; DPPH radical; reducing power

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0196-08

龙眼核系龙眼的种仁, 具有降血糖、抗氧化等作用^[1-3], 含有丰富的抗氧化活性物质, 其中主要抗氧化物质为多酚和黄酮类物质^[3]。但由于没有进行综合利用, 每年废弃的龙眼核高达几十万吨, 造成环境的污染, 同时也造成资源的浪费。为了对龙眼核做进一步研究, 本研究通过对广州本地石硖龙眼核乙酸乙酯相、正丁醇相和水相, 以及萃取部分乙酸乙酯过大孔树脂后各流份进行了体外抗氧化活性研究, 并结合 HPLC-ESI-

MS 分析揭示抗氧化物质主要成分, 为有效地寻找和追踪龙眼核中抗氧化活性物质提供实验依据, 以期为广州本地石硖龙眼核的利用提供参考, 实现废物再利用, 保护环境的同时增加果农的经济收入。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

广州本地出产的石硖龙眼核; 乙醇(食品级) 广州

收稿日期: 2010-07-24

基金项目: 暨南大学引进优秀人才科研启动基金项目(51208045); 广东省科技计划项目(2007B020712005)

作者简介: 王淑霞(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品添加剂。E-mail: prettyxuxia2008@163.com

* 通信作者: 张广文(1975—), 男, 副教授, 博士后, 研究方向为食品添加剂。E-mail: zgwzsu@163.com

东巨公司; 乙酸乙酯、正丁醇(均为分析纯)天津化学试剂一厂; 焦性没食子酸(分析纯) 天津市科密欧化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

4000 QTRAP 型高效液相色谱-质谱联用仪 美国 AB 公司; Spectrum Lab 53 紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; EL-104 电子分析天平 梅特勒-托利多上海仪器有限公司; EK-600H 电子天平 日本 AND 公司; ZF-I 型三用紫外分析仪 上海顾村光电仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 龙眼核测试样品制备

将新鲜龙眼核置于 50℃ 以下的烘箱中烘干, 用 40 目的粉碎机粉碎备用。准确称取干燥至质量恒定的龙眼核粉末 1077.83g, 加入 5L 的 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 24h, 合并提取液, 60℃ 真空浓缩得浸膏 196.78g。用适量水溶解, 经醇沉、石油醚脱脂后依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取, 萃取液经减压浓缩后分别得到乙酸乙酯相 49.58g、正丁醇相 58.70g, 剩余水相为 73.09g。乙酸乙酯相经大孔树脂 AB-8 柱层析, 用乙醇梯度洗脱, 硅胶薄板 TLC 检测合并相同流份, 编号为 Fr1~Fr16。对乙酸乙酯相、正丁醇相、水相进行 HPLC-ESI-MS 分离分析。再将乙酸乙酯相、正丁醇相、水相及乙酸乙酯过大孔树脂 AB-8 柱后各流份取适量配成合适浓度的溶液, 用蒸馏水配成合适浓度的溶液, 测定多酚含量, 再稀释配成相同多酚含量的溶液, 对各流份进行抗氧化活性及还原能力测定。

1.3.2 龙眼核各测试样品多酚含量测定

1.3.2.1 测定波长的选择

取对照品溶液 5mL 及空白溶液 5mL, 各加酒石酸铁液 3.0mL, 用磷酸缓冲液定容至 25mL 并摇匀, 10min 后在 200~800nm 波长范围内作光谱扫描; 取与对照品浓度相当的样品液, 如上同样在 200~800nm 波长范围内作光谱扫描, 结合二者光谱扫描图, 选择合适的测定波长。

1.3.2.2 标准曲线的建立

精密吸取标准溶液 0、0.7、1.4、2.1、2.8、3.5mL 分别置于编号 0、1、2、3、4、5 的 10mL 容量瓶中, 再各加酒石酸铁液 3.0mL, 磷酸缓冲液 2.0mL, 蒸馏水定容后摇匀。10min 后, 在选定的测定波长处测定吸光度(A)。以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得方程为 $y=10.402x-0.0156$, $R^2=0.9993$ 。

1.3.2.3 龙眼核各部分多酚含量测定

分别精密量取蒸馏水、样品溶液各 1.0mL 于编号 0、1、2、3 的 10mL 容量瓶, 再各加 3mL 酒石酸铁液, 后用 pH7.5 的磷酸缓冲溶液 2.0mL, 蒸馏水定容后摇匀。10min 后在测定波长下测定吸光度 A。并依据线性方程

求得多酚含量, 并对萃取操作后各相进行 HPLC-ESI-MS 分析检测。再把各样品按一定浓度配成一系列梯度浓度溶液, 分别对其按下列方法进行抗氧化活性测定。

1.3.3 龙眼核萃取物 LC-MS 分析条件

运用型液质联用仪对龙眼核萃取物乙酸乙酯相、正丁醇相和水相成分进行检测。流动相为甲醇(A)和 0.4% 乙酸(B), 梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 HPLC-MS 洗脱条件

Table 1 Gradient elution program used in HPLC-MS analysis

时间/min	0	5	15	35	45	53	60
流动相体 A	0	10	20	30	97	3	100
积分数/% B	100	90	80	70	3	97	0

1.3.4 龙眼核抗氧化能力的测定

1.3.4.1 龙眼核各部分清除 DPPH 自由基能力测定

二苯代苦味酰基自由基(DPPH 自由基)是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 若受试物能清除它, 则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基等自由基的有效浓度, 打断脂质过氧化链反应的作用^[4-6]。DPPH 自由基有个单电子, 在 517nm 波长处有强吸收, 其乙醇水溶液呈深紫色, 加入受试物后, 在 517nm 不同时间测定其清除 DPPH 自由基而引起吸光度减少的情况。DPPH 自由基分析法被广泛用于清除自由基物质性质的研究, 通过测定吸收减弱的程度, 可评价自由基清除剂的活性。

取不同浓度测定液 2mL 分别加入具塞试管中, 加入 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液 2mL, 摇匀, 30min 后用 2mL 无水乙醇和 2mL 蒸馏水的混合溶液作参比测定其吸光度 A_i ; 同时测定 2mL 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液与 2mL 蒸馏水混合液的吸光度 A_0 , 以及 2mL 不同浓度的测定液与 2mL 无水乙醇混合液的吸光度 A_j , 平行实验 3 次, 取其平均值。根据下列公式计算不同浓度测定液对 DPPH 自由基的清除率 I/%。然后根据清除率与样品浓度的量效关系, 若为线性关系, 则求出回归方程和相关系数 r, 根据方程求出清除率达 50% 时所需的样品量 IC_{50} 。

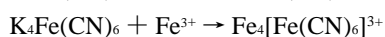
$$\text{清除率}/\% = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为蒸馏水与 DPPH 溶液在测定波长下的吸光度; A_j 为测定液和无水乙醇在测定波长吸光度; A_i 为测定液与 DPPH 溶液在测定波长的吸光度。

1.3.4.2 龙眼核各部分还原能力测定

还原力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标, 抗氧化物质通过提供电子可使自由基变为稳定的分子, 从而失去活性。许多研究已经证实抗氧化活性同还原力是密切相关的^[7-9]。采用铁氰化钾法进行龙眼核提取

物还原能力的测定。各取不同浓度的抗坏血酸、龙眼核提取物 0.5mL, 加入 pH6.6 0.2mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液 2.5mL 及 1g/100mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5mL, 于 50℃ 下避光反应 20min, 之后加入 10g/100mL 三氯乙酸 2.5mL, 4000r/min 离心 10min, 取上清液 2.5mL, 添加蒸馏水 2.5mL, 0.1g/100mL FeCl_3 0.5mL, 于 700nm 处测定吸光度, 空白采用蒸馏水代替样品。吸光度越大, 抗氧化能力越强, 还原能力越强。然后根据吸光度(A)与样品浓度的量效关系, 若为线性关系, 则求出回归方程和相关系数 r , 根据方程求出 A 值为 0.5 时所需的样品质量浓度 $A C_{0.5}$ 。



2 结果与分析

2.1 测定波长的选择

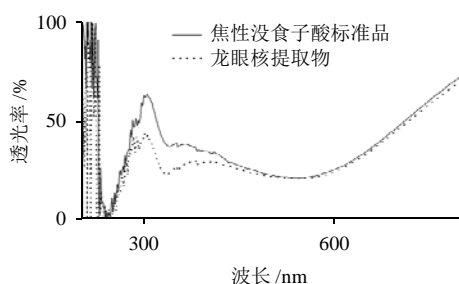


图1 焦性没食子酸溶液和龙眼核提取物 200~800nm 光谱扫描结果

Fig.1 Scanning spectra of pyrogallate standard and ethanol extract of longan seed from 200 through 800 nm

由图1可知, 焦性没食子酸标准溶液和龙眼核提取物在 220~260nm(240nm)处有最大吸收, 但其附近尖峰密集, 吸光度(A)可能会受杂质干扰; 在 540nm 波长附近吸收峰平滑, 不会有杂质干扰, 故选 540nm 作为测定波长。

2.2 多酚含量的测定

表2 龙眼核萃取分离后各部分多酚含量

Table 2 Polyphenol contents of ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and aqueous fractions

类别	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相
多酚含量/(mg/mL)	0.7168	0.5091	0.2651

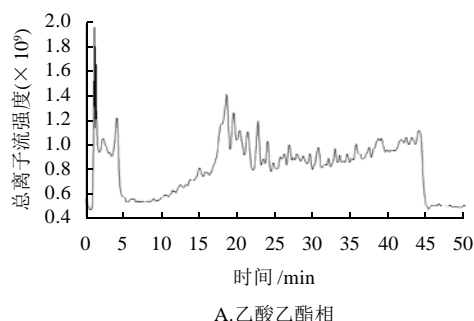
由表2可知, 经乙酸乙酯和正丁醇萃取后, 大部分多酚都集中于乙酸乙酯相中, 占总多酚的 48.08%, 正

丁醇部分也含有较多的多酚类物质, 水相中所剩多酚物质已不多, 只占总多酚的 17.78%。又由表3可知, 多酚物质主要分布于 Fr4、Fr5、Fr6、Fr7 及 Fr10 等流份中, 进一步研究它们的抗氧化活性。

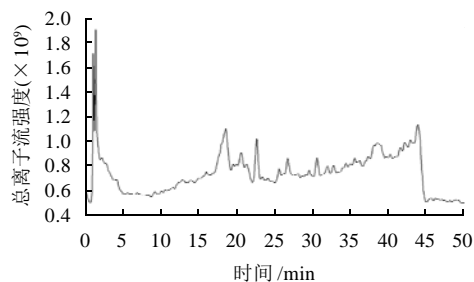
2.3 龙眼核萃取物 HPLC-MS 分析

2.3.1 龙眼核萃取物总离子流图

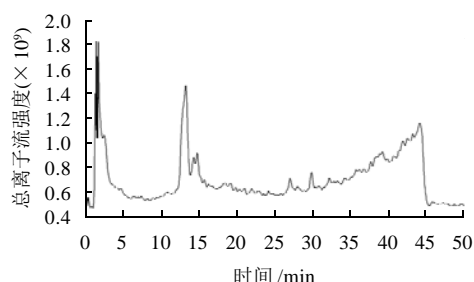
萃取分离后各相经 0.45nm 微孔滤膜过滤后进入 HPLC-ESI-MS 系统进行分离检测, 总离子流图如图2所示。由图2可以看出, 但由于一些化合物的极性较强, 在柱上的保留时间短, 对检测结果不利, 但随着时间延长物质出的峰基本能分得开, 因此所采用的分离条件能达到较好的分离效果。



A. 乙酸乙酯相



B. 正丁醇相



C. 水相

图2 不同萃取相 HPLC-ESI-MS 总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatograms of ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and aqueous fractions

表3 龙眼核乙酸乙酯流份多酚含量

Table 3 Polyphenol contents of 16 eluates from ethyl acetate fraction

流份	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10	Fr11	Fr12	Fr13	Fr14	Fr15	Fr16
多酚含量/(mg/mL)	0.0323	0.1059	0.1181	0.5191	1.2650	0.9125	1.3341	0.2787	0.1946	0.9484	0.2797	0.1342	0.1467	0.0253	0.0467	0.1164

2.3.2 龙眼核萃取物定性分析结果

结合参考文献^[10-12], 图2主要色谱峰的保留时间、主要质谱碎片峰、相对分子质量以及推测化合物如表4~6所示。龙眼核中含有大量物质, 多为小分子化合物, 乙酸乙酯相中所含成分最多, 各相中鉴定出11种物质, 另24种无法辨别。在这11种物质中, 没食子酸、鞣花酸、联苯三酚、鞣花酸戊糖共轭体、槲皮黄素-3-*O*-鼠李糖苷、没食子酰六羟基联苯二酰基-*O*-吡喃葡萄糖6种物质属于多酚类物质。酚类物质具有较活泼的羟基氢, 能提供氢与自由基反应, 生成惰性产物或较稳定的自由基, 从而中断或减慢自由基参与的连锁反

应, 因此具有清除自由基的作用, 是优良的活性氧清除剂和脂质抗氧化剂, 在人体内发挥很好的生理作用, 具有抗脂质氧化、延缓机体衰老、预防心血管系统疾病、防癌、抗辐射等生物活性^[13-15], 因此总酚含量与抗氧化活性直接相关, 总酚含量越高, 则其抗氧化活性越好^[16]。

2.4 龙眼核各部分抗氧化活性测定

2.4.1 龙眼核各部分清除DPPH自由基的能力

龙眼核萃取分离及乙酸乙酯部位分离后各流份清除DPPH自由基的能力如图3~4所示, 图中曲线为各流份

表4 乙酸乙酯相HPLC-ESI-MS定性分析结果
Table 4 Qualitative analysis of ethyl acetate fraction by HPLC-ESI-MS

序号	时间/min	相对含量/%	分子离子峰(m/z)	相对分子质量	推测化合物
1	1.2535	7.1254	133.1($M - H^+$) 172.9($M + HCOO^-$)	134.1	1,2,3,5-四甲基苯
2	2.3344	7.3137	171.2($M + H^+$) 169.2($M - H^+$)	170.2	没食子酸
3	15.0939	1.0838	485.5($M + H^+$) 483.1($M - H^+$) 385.2($M + H^+$) 383.4($M - H^+$)	484.1 384.2	未知 未知
4	18.6587	21.3714	652.6($M + NH_4^+$) 633.4($M - H^+$) 657.4($M + Na^+$) 293.3($M + H^+$) 291.1($M - H^+$)	634 292	没食子酰-六羟基联苯-吡喃葡萄糖 未知
5	19.5823	8.7746	471.3($M + H^+$) 469.4($M - H^+$) 199.1($M + H^+$) 197.2($M - H^+$)	470 198.1	未知 2-乙烷基-1,3,4-三甲基萘
6	20.3968	7.8464	413.2($M + H^+$) 411.1($M - H^+$)	412	未知
7	21.4504	5.8306	249.2($M + H^+$) 247.2($M - H^+$)	248.2	未知
8	22.7988	5.1701	435.5($M + H^+$) 433.4($M - H^+$)	434	鞣花酸-戊糖共轭体
9	26.9305	2.1827	449.3($M + H^+$) 447.2($M - H^+$)	448	槲皮黄素-3- <i>O</i> -鼠李糖苷
10	26.9305	1.6216	303.3($M + H^+$) 301.2($M - H^+$)	302	鞣花酸
11	29.646	1.0062	142.1($M + NH_4^+$) 168.7($M + HCOO^-$)	124.1	3-吡啶羧酸
12	30.765	2.9797	559.7($M + H^+$) 557.4($M - H^+$) 445.4($M + H^+$) 443.3($M - H^+$)	558.4 444.3	未知 未知
13	35.7683	1.9709	148.7($M + H^+$) 146.9($M - H^+$)	147.7	未知
14	39.0944	4.5154	149.0($M + Na^+$) 170.7($M + HCOO^-$)	126	1,2,3-苯三酚
15	44.064	6.9777	132.9($M + H^+$) 130.8($M - H^+$)	131.8	未知

表 5 正丁醇相 HPLC-ESI-MS 定性分析结果
Table 5 Qualitative analysis of *n*-butyl alcohol fraction by HPLC-ESI-MS

序号	时间/min	相对含量/%	分子离子峰(<i>m/z</i>)	相对分子质量	推测化合物
1	1.2574	36.0872	662.8(M + H ⁺)	661.7	未知
			660.7(M - H ⁺)		
			522.7(M + NH ₄ ⁺)		
			539.6(M + Cl ⁻)	504.7	未知
			503.4(M - H ⁺)		
2	18.6305	24.6959	304.4(M + NH ₄ ⁺)	286.4	未知
			331.3(M + HCOO ⁻)		
			652.6(M + NH ₄ ⁺)	634.5	没食子酰-六羟基联苯-吡喃葡萄糖
			633.5(M - H ⁺)		
			387.6(M - H ⁺)	388.6	未知
3	20.6661	5.8088	411.3(M + Na ⁺)		
			461.6(M + HCOO ⁻)	416.5	未知
4	22.7219	10.4841	439.5(M + Na ⁺)		
			431.7(M + H ⁺)	430.5	未知
			429.4(M - H ⁺)		
			531.6(M + H ⁺)	530.4	未知
			529.3(M - H ⁺)		
5	25.6913	3.1110	434.3(M + H ⁺)	434.3	鞣花酸-戊糖共轭体
			433.3(M - H ⁺)		
6	26.8295	4.0594	303.3(M + H ⁺)	302.2	鞣花酸
			301.1(M - H ⁺)		
7	29.6731	0.8244	151.7(M + NH ₄ ⁺)	133.7	甲硅烷基甲基-硅烷
			168.9(M + Cl ⁻)		
			174.8(M + NH ₄ ⁺)	156.8	2,3-二甲基喹啉
			191.1(M + Cl ⁻)		
			349.4(M + H ⁺)	348.3	未知
9	32.8991	1.6395	347.3(M - H ⁺)		
			471.6(M + Na ⁺)	448.4	槲皮黄素-3- <i>O</i> -鼠李糖苷
			493.4(M + HCOO ⁻)		
			144.2(M + Na ⁺)	126.2	1,2,3-苯三酚
			171.0(M + HCOO ⁻)		
10	38.7081	4.6175	392.5(M + NH ₄ ⁺)	374.5	未知
			397.5(M + Na ⁺)		

不同浓度的水溶液对 DPPH 自由基的清除率。从图 3 可以看出, 乙酸乙酯相、正丁醇相和水相各部分抗氧化性都比抗坏血酸强, 且萃取分离后各部分清除 DPPH 自由基的能力明显增加, 其中乙酸乙酯相清除能力最强, 正丁醇相次之, 剩余水相则慢一些, 因此选乙酸乙酯部分进一步过大孔树脂 AB-8 柱进行分析; 从图 4 可知, 乙酸乙酯相各流份均具有一定的 DPPH 自由基清除能力, 而且随着样品浓度的增加, 清除率也逐渐提高, 另外龙眼核乙酸乙酯相各流份的 DPPH 自由基清除能力都比抗坏血酸强; 测试样品浓度与清除率呈一定的量效关系; 当样品中多酚含量达到 0.0030mg/mL 时, Fr7 和 Fr15 的清除率达到 78.56% 和 77.65%, 且各流份只需要在较小量浓度范围内就能发挥很好的 DPPH 自由基清除作用。

表 6 水相 HPLC-ESI-MS 定性分析结果
Table 6 Qualitative analysis of aqueous fraction by HPLC-ESI-MS

编号	时间/min	相对含量/%	分子离子峰(<i>m/z</i>)	相对分子质量	推测化合物
1	1.2557	35.2668	320.2(M + Cl ⁻)	302.2	鞣花酸
			325.3(M + Na ⁺)		
2	13.0404	42.3501	382.6(M + H ⁺)	381.3	未知
			380.3(M - H ⁺)		
3	14.0908	6.7057	385.1(M + H ⁺)	384	未知
			383.3(M - H ⁺)		
4	14.5597	6.6215	385.4(M + H ⁺)	384.5	未知
			383.5(M - H ⁺)		
5	26.8475	2.3690	303.2(M + H ⁺)	302.1	鞣花酸
			301.3(M - H ⁺)		
6	29.6983	3.1099	227.4(M + H ⁺)	226.3	未知
			225.3(M - H ⁺)		
7	37.5492	1.2049	413.5(M + H ⁺)	412.4	未知
			414.4(M + H ⁺)		

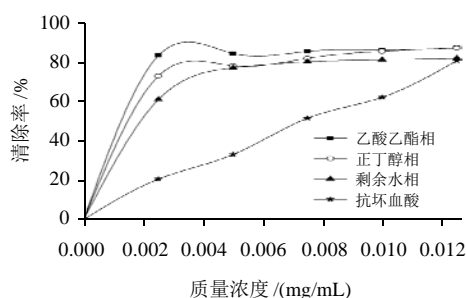
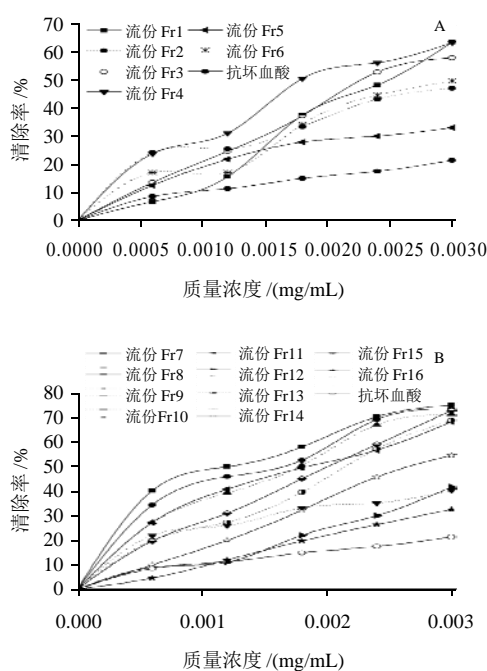


图3 萃取分离后各部分多酚清除DPPH自由基能力

Fig.3 DPPH radical scavenging rates of ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and aqueous fractions at different concentrations

A.Fr1~Fr6; B.Fr7~Fr16。

图4 乙酸乙酯不同流份清除DPPH自由基的能力

Fig.4 DPPH radical scavenging rates of eluates No. 1 through 16 at different concentrations

表7 乙酸乙酯各流份对DPPH自由基清除能力

Table 7 IC_{50} of eluates No. 1 through 16 for scavenging DPPH free radicals

流份 (mg/mL)	$IC_{50}/$ $r(c < 0.0030\text{mg/mL})$	流份 (mg/mL)	$IC_{50}/$ $r(c < 0.0030\text{mg/mL})$
Fr1 0.0025	0.9881	Fr10 0.0035	0.9243
Fr2 0.0031	0.9513	Fr11 0.0020	0.9683
Fr3 0.0024	0.9949	Fr12 0.0038	0.9872
Fr4 0.0021	0.9749	Fr13 0.0022	0.9943
Fr5 0.0043	0.9533	Fr14 0.0027	0.9983
Fr6 0.0030	0.9801	Fr15 0.0019	0.9972
Fr7 0.0014	0.9215	Fr16 0.0046	0.9980
Fr8 0.0015	0.9320	VC 0.0073	0.9778
Fr9 0.0018	0.9782		

注: r 为样品溶液浓度与清除率回归方程中的相关系数, 提示量效关系的线性相关性。

从表7可知, 当多酚含量小于0.0030mg/mL时, 各流份的清除率与多酚浓度线性关系良好, 其中流份Fr3、Fr13、Fr14、Fr15、Fr16的相关系数分别为0.9949、0.9943、0.9983、0.9972、0.9980; 从各流份的DPPH自由基清除的 IC_{50} 看, 各流份的DPPH自由基清除能力的大小顺序为: Fr7 > Fr8 > Fr9 > Fr15 > Fr11 > Fr4 > Fr13 > Fr3 > Fr1 > Fr14 > Fr6 > Fr2 > Fr10 > Fr12 > Fr5 > Fr16 > VC, 这个排序说明各流份清除DPPH自由基的能力不随极性增大而增大, 而只与流份的成分有关。其中流份Fr7(已被鉴定为没食子酸)和Fr8具有最小的 IC_{50} , 说明两个流份的清除率是最强的, 从图7可见, 二者的曲线线性基本相似, 只是流份Fr8的曲线稍低一点, 原因可能是二者都含有相同的物质, 但流份Fr8中另外还含有其他成分, 可能对清除率提高有阻碍作用。

2.4.2 龙眼核各部分还原能力测定

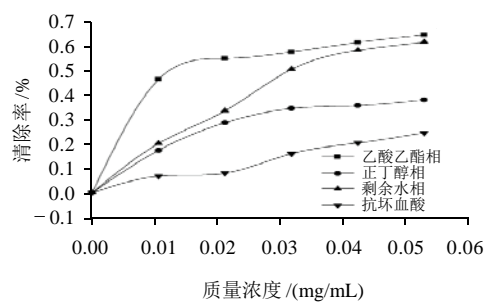
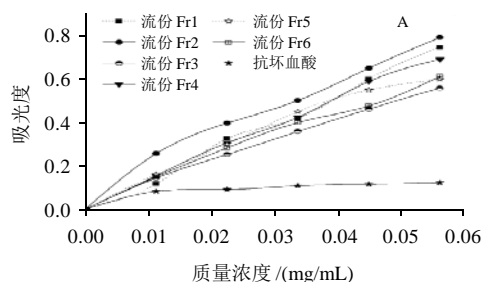


图5 萃取分离后各部分的多酚还原能力

Fig.5 Reducing power of ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and aqueous fractions

A.Fr1~Fr6; B.Fr7~Fr16。

图6 乙酸乙酯不同流份还原能力测定

Fig.6 Reducing power of eluates No. 1 through 16

龙眼核萃取分离及乙酸乙酯部位分离后所得到的各流份的还原能力如图 5、6 所示, 图中曲线为各流份不同浓度的水溶液的还原能力。由图 5 可以看出, 萃取分离后各部分多酚还原能力和抗坏血酸一样随着浓度的增加逐渐增强, 但萃取分离后各部分多酚的还原能力要比同浓度的抗坏血酸的强, 其中乙酸乙酯相的还原能力上升的最快, 在很低浓度时几乎就达到最高值, 这也与清除 DPPH 自由基的能力相一致; 由图 6 可知与抗坏血酸相比, 龙眼核提取物乙酸乙酯部分各流份都具有相当强的还原能力, 是良好的电子供应者, 其提供的电子可以使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ; 各流份的还原能力(即吸光度 A)随着各流份多酚浓度增加而增加, 其中流份 Fr7 具有最好的还原力, 这也与上述此流份具有较好的清除 DPPH 自由基能力相符合。

表 8 龙眼核乙酸乙酯各流份还原能力 $\text{AC}_{0.5}$ Table 8 $\text{AC}_{0.5}$ (the concentration required for achieving an absorbance of 0.5) of eluates No. 1 through 16

流份	$\text{AC}_{0.5}/$ (mg/mL)	$r(c < 0.0560\text{mg/mL})$	流份	$\text{AC}_{0.5}/$ (mg/mL)	$r(c < 0.0560\text{mg/mL})$
Fr1	0.0380	0.9971	Fr10	0.0406	0.9957
Fr2	0.0333	0.9904	Fr11	0.0452	0.9981
Fr3	0.0491	0.9977	Fr12	0.0399	0.9989
Fr4	0.0394	0.9984	Fr13	0.0335	0.9835
Fr5	0.0426	0.9874	Fr14	0.0369	0.9976
Fr6	0.0453	0.9959	Fr15	0.0318	0.9974
Fr7	0.0292	0.9922	Fr16	0.0627	0.9932
Fr8	0.0418	0.9995	VC	0.2513	0.8653
Fr9	0.0531	0.9994			

从表 8 可知, 当多酚含量小于 0.0560mg/mL 时, 各流份的吸光度与多酚浓度线性关系良好, 其中流份 Fr8 和 Fr9 的相关系数分别达到 0.9994 和 0.9995; 从各流份吸光度的 $\text{AC}_{0.5}$ 值看, 各流份的还原能力的大小顺序为: Fr7 > Fr15 > Fr2 > Fr13 > Fr14 > Fr1 > Fr4 > Fr12 > Fr10 > Fr8 > Fr5 > Fr6 > Fr11 > Fr3 > Fr9 > Fr16 > VC, 这个排序说明各流份还原能力不随极性增大而增大, 而只与流份的成分有关。其中流份 Fr7(已被鉴定为没食子酸)具有最小的 $\text{AC}_{0.5}$, 说明此流份的还原能力是最强的, 但原来 DPPH 自由基清除能力很强的流份 Fr8 的还原能力却不是太强, 处于中等水平, 可能是流份 Fr8 还原 Fe^{3+} 的能力不是很强。

3 讨 论

本实验通过对 60% 乙醇提取的龙眼核进行萃取分离

和 HPLC-ESI-MS 分离分析, 鉴定出 11 种物质, 另有 24 种物质无法辨别。同时又进一步对萃取后各相进行体外清除 DPPH 自由基能力和还原能力测定, 得知乙酸乙酯相抗氧化活性最强, 而正丁醇相和水相抗氧化活性相对较弱, 但三相中多酚类物质的抗氧化活性都比相同浓度的 VC 抗氧化活性强。说明龙眼核中的多酚类抗氧化物质主要为小分子化合物, 极性较小, 易溶于乙酸乙酯等极性较小的有机溶剂, 导致乙酸乙酯部分多酚含量最高。而总酚含量与抗氧化活性直接相关, 总酚含量越高, 则其抗氧化活性越好, 因此乙酸乙酯相的抗氧化活性最强, 正丁醇相的抗氧化活性次之, 而水相的抗氧化活性则更弱。

为了追踪龙眼核中抗氧化活性物质分布, 继续对乙酸乙酯相过大孔树脂 AB-8 柱后各流份进行体外清除 DPPH 自由基能力和还原能力测定。流份 Fr1~Fr16 水溶性较好, 抗氧化活性量效线性关系趋势明显, 与抗坏血酸相比, 具有良好的抗氧化活性。乙酸乙酯过柱后, 流份 Fr7、Fr8 抗氧化活性最强, 可对其进行进一步分离研究, 确定其多酚物质组成。结合化学分离结果分析, 流份 Fr7 经反复重结晶, 得到较纯的没食子酸, 这也更进一步说明龙眼核中多酚类物质和抗氧化活性之间关联: 多酚类物质是龙眼核中抗氧化活性的主要物质基础。

龙眼核中的多酚类抗氧化物质是一种理想的抗氧化剂, 也符合人们越来越追求天然安全的要求, 只是龙眼核中抗氧化物质的主要成分还未完全确定, 需要对其进行更进一步的分离研究, 为龙眼核的开发利用提供更充足的理论支持。

参考文献:

- [1] 黄儒强, 邹宇晓, 刘学铭. 龙眼核提取液的降血糖作用[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 991-992.
- [2] 黄儒强, 刘学铭, 曾庆孝. 龙眼核提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 现代食品科技, 2005, 84(2): 62-63.
- [3] 文良娟, 王巍. 龙眼活性物质的提取及其抗氧化能力的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 37-41.
- [4] 莫正昌, 邓靖, 汲广全, 等. 鹿蹄草提取物体外抗氧化活性评价[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 19-21.
- [5] 金杰. 桑椹醋提取物对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)清除作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2006(3): 23-28.
- [6] 许申鸿, 杭瑚, 郝晓丽. 葡萄籽化学成分分析及其抗氧化性质研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(2): 18-20.
- [7] OYAIZU M. Ant-oxidative activity of browning products of glucosamine fractioned by organic solvent and thin-layer chromatography[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1986, 35(11): 771-775.
- [8] DORMAN H J D, PELTOKETO A, HILTUNEN R, et al. Characterization of the antioxidant properties of deodorised aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs[J]. Food Chemistry,

- 2003, 83(2): 255-262.
- [9] DUH P D, DU P C, TEN G C. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage[J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(11): 1055~1061.
- [10] 黄儒强, 刘学铭. 龙眼核乙酸乙酯萃取物的 GC-MS 分析[J]. 食品工业科技, 2005, 26(3): 178-179.
- [11] 孙慧, 朱超, 章弘扬, 等. 大黄及其炮制品的液质联用分析及物质基础比较[J]. 中成药, 2009, 31(3): 420-424.
- [12] SOONG Y Y, BARLOW P J. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from Longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1085(2): 270-277.
- [13] SACHINDRA N M, AIRANTHI M K W A, HOSOKAWA M, et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds[J]. J Food Sci Technol, 2010, 47(1): 94-99.
- [14] ALVAREZ-SUAREZ J M, TULIPANIS, DIAZ D, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenols content and other chemical compounds[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8/9): 2490-2499.
- [15] PAN Yingming, WANG Kai, HUANG Siqin, et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of Longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1264-1270.
- [16] 陈湘宁, 王武装, 吴学瑞, 等. 柿子中不同成分与抗氧化活性关系的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 110-113.