

亚麻籽双液相萃取中醇相组分体外 抗氧化活性研究

李高阳^{1,2}, 丁霄霖²

(1. 湖南省农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用体外实验方法对亚麻籽双液相萃取中乙醇相的氯仿、正丁醇和水三种提取物进行抗氧化活性研究。结果表明: 乙醇相三个萃取组分中, 以正丁醇提取物抗亚油酸氧化能力最强, 比 BHT 略弱。氯仿提取物次之, 强于 VC, 水提取物最弱。在对 [DPPH·] 自由基的清除能力上, 正丁醇提取物最强, IC_{50} 为 $3.1 \mu\text{g/ml}$, 比芦丁 ($IC_{50}=3.38 \mu\text{g/ml}$) 强。水提取物略弱于 BHT, 氯仿提取物最弱; 正丁醇提取物对 [$\cdot\text{OH}$] 自由基的清除能力最强, IC_{50} 为 $18.15 \mu\text{g/ml}$, 比芦丁 ($IC_{50}=7.96 \mu\text{g/ml}$) 弱。氯仿提取物次之, 水提取物最弱; 正丁醇提取物螯合 Fe^{2+} 的能力最强, 氯仿提取物次之, 而水提取物最弱。

关键词: 亚麻籽; 双液相; 醇相; 抗氧化

In vitro Antioxidant Activity of Ethanol Phase Fraction from Two-liquid-phase Extraction of Flaxseed

LI Gao-yang^{1,2}, DING Xiao-lin¹

(1. Institute of Hunan Agricultural Product Processing, Changsha 410125, China;
2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The antioxidant activity of ethanol phase fraction extracted by chloroform, n-butyl alcohol and water from two-liquid-phase extraction of flaxseed was evaluated respectively. The results showed that n-butyl alcohol extracts is the strongest in inhibiting linoleic acid peroxidation, less than BHT, then chloroform extraction, and then water extraction. The capacities of scavenging [DPPH·] and [$\cdot\text{OH}$] of n-butyl alcohol extracts were stronger than chloroform extracts and water extracts, extracts IC_{50} are $3.1 \mu\text{g/ml}$ and $18.15 \mu\text{g/ml}$, rutin ($IC_{50}=3.58 \mu\text{g/ml}$ and $7.96 \mu\text{g/ml}$), respectively. Capacity of scavenging [DPPH·] of chloroform extracts is weaker than water extracts, but it is stronger in scavenging [$\cdot\text{OH}$] than water extracts; Fe^{2+} chelate activity of n-butyl alcohol extracts is strongest, then chloroform extracts, and then water extracts.

Key words: flaxseed; two-liquid-phase; ethanol phase; antioxidant

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0143-04

亚麻籽中富含木脂素类型的植物雌激素^[1], 且木脂素含量是植物中最高的^[2], 其主要成分是开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷 (SDG)^[1], 木脂素可以干扰荷尔蒙代谢, 减缓更年期综合症, 预防荷尔蒙敏感性乳腺癌、子宫癌和前列腺癌^[3,4]。SDG 是一种极性物质, 通常用极性溶剂进行浸提, 如脂肪族醇 (甲醇、乙醇和丙醇) 溶剂^[5]、二氧杂环乙烷和乙醇混合溶剂^[1]、70% 的甲醇^[3]。本人利用正己烷-乙醇-水双液相技术进行亚麻籽的同时萃油脱氰苷研究中, 酚类和木脂素等极性生理活性化合物进入了乙醇相^[5]。本文利用氯仿、正丁醇和水依次对乙醇相进行萃取, 得到相应的提取物, 然后开展乙醇

相各提取组分的抗氧化活性研究, 为下一步乙醇相的开发提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 原料和试剂

亚麻籽 (亚宁 11 号) 宁夏银川福德生物食品工程有限公司; 亚油酸、硫酸亚铁、硫氰酸铵、硫酸铜、硫代巴比妥酸 (TBA)、鲁米诺、邻菲罗啉、邻苯三酚、碳酸钠、碳酸氢钠等试剂均为分析纯; 双蒸水 实验

收稿日期: 2006-06-08

作者简介: 李高阳 (1971-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事食品科学技术研究。

室自制。

1.1.2 仪器

AB104-N 电子天平 托利多 - 梅特勒(上海)有限公司; CS501 型超级恒温水浴 上海浦东跃升科学仪器厂生产; SXJQ-1 型数显直流无级调速搅拌器 郑州长城科工贸有限公司; UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; SHB- 型循环水式多用途真空泵 郑州长城科工贸有限公司; 灵巧型中草药粉碎机 上海医用设备制造有限公司; SHG-C 型生物化学发光测定仪 上海上立检测仪器厂; FA-1 型旋转蒸发仪 上海玻璃仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 乙醇相不同组分的萃取

亚麻籽经中草药粉碎机粉碎后, 用正己烷 - 乙醇 - 水三元双液相体系进行浸提, 提取液过滤分层, 收集乙醇相滤液进行减压浓缩成浸膏。膏状物分别依次用氯仿、正丁醇和水进行多次萃取, 萃取液分别减压浓缩成膏状物, 得到氯仿提取物、正丁醇提取物和水提取物三个组分。

1.2.2 抗亚油酸氧化能力

乙醇相各组分抗亚油酸氧化采用 Gow-Chin Yen 等报道^[6]的硫氰酸铁法(ferric thiocyanate method, FTC法)并略加修改进行测定。分别配制反应液(2.5% 亚油酸 3.0ml、40mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液 9.0ml、无水乙醇 1.5ml、蒸馏水 1.5ml、100 μ g/ml 乙醇相样液 0.5ml)于 25ml 具塞试管中, 混匀器混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中避光保温, 每隔 12h 取反应液 0.1ml, 依次加入 75% 乙醇 9.7ml 和 30% 硫氰酸铵 0.1ml, 最后加入 20mmol/L 硫酸亚铁溶液 0.1ml, 准确反应 3min 后, 以蒸馏水为空白在 500nm 处比色测定吸光度 A_{500nm} 。所有测定值均设两次重复。

1.2.3 [DPPH \cdot] 自由基清除能力

乙醇相各组分对 [DPPH \cdot] 自由基清除能力采用 Sanchez-Moreno 和 Concepcion 等报道^[7]的方法并略加改动进行测定。分别取不同浓度的乙醇相样液 0.3ml, 先加入 0.1ml Tris-HCl 缓冲液(1mmol/L, pH7.9), 再加入 0.6ml DPPH 甲醇溶液(100 μ mol/L), 混匀后室温避光静置 30min, 以蒸馏水为空白在 517nm 处比色测定吸光度 $A_{517sample}$, 并以同体积的蒸馏水代替样品作为空白吸光度 $A_{517blank}$ 。所有测定值均设两次重复, 取平均值。[DPPH \cdot] 自由基清除率按公式“清除率% = $(A_{517blank} - A_{517sample}) / A_{517blank} \times 100$ ”进行计算, 并根据样品浓度对 [DPPH \cdot] 自由基清除率(%)的线性拟合平方和求出清除率为 50% 时所需的样品半抑制浓度 IC_{50} , 该实验以芦丁作为阳性对照。

1.2.4 [\cdot OH] 清除活性测定 - 化学发光法

选用 VC-Cu²⁺-H₂O₂- 酵母多糖体系^[8]产生 [\cdot OH], 以不同浓度的样品进行抑制, 用化学发光法测定。硬质玻璃管中依次加入待测样品 100 μ l、2mmol/L 的新鲜 VC 200 μ l、2mmol/L 的 Cu₂SO₄ 400 μ l、75mg/ml 的调理酵母多糖 100 μ l、0.1mmol/L 的鲁米诺 50 μ l 和 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.8)550 μ l, 30 $^{\circ}$ C 预恒温, 最后用 68mmol/L 的 H₂O₂ 600 μ l 瞬时加样, 启动发光反应, 立即用 R 程序连续测定每 6s 的发光积分强度, 并以第 6 个 6s 的发光强度 A 为标准进行计算。以甲醇作为空白对照(测量条件为: 甄别电压 0.2V, 温度 30 $^{\circ}$ C)。抑制率的计算如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

以半抑制率(IC_{50})表示清除活性。

1.2.5 对 Fe²⁺ 的螯合能力

Gow-Chin Yen 等报道^[6]在 1ml 不同浓度的样品液中加入 50 μ l FeCl₂(1mmol/L), 混匀后加入 0.2ml Ferrozine (5mmol/L) 和 1.75ml 水, 混匀后静置 10min。在 562nm 下测定样品吸光度值 A。以甲醇作空白对照。

$$\text{螯合率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 乙醇相各组分抗亚油酸氧化能力

硫氰酸铁法是利用亚油酸自动氧化, 使体系中的 Fe²⁺ 转化为 Fe³⁺, 用硫氰酸铵做显色剂, 反应体系在 500nm 处有最大吸收, 通过检测吸收值, 可以考察抗氧化剂的抗氧化效果。FTC 法测定的是氧化初期过氧化物的量, 随着反应的进行, 过氧化物逐步分解为小分子的物质, 因此, 当过氧化物的量达到最高值后, 测定值会初步下降。

乙醇相中 100 μ g/ml 的氯仿、正丁醇和水提取物与相同浓度的 VC 和 BHT 进行抗氧化能力实验的结果见图 1, 从图 1 中可以看出正丁醇提取物具有很强的抗亚油酸氧化能力, 远大于同浓度 VC 的抗氧化能力, 但比 BHT 的效果略弱。氯仿提取物抗亚油酸氧化能力小于正丁醇提取物, 比 VC 强。水提取物抗亚油酸氧化能力最弱, 不仅远弱于 BHT, 而且小于 VC。

2.2 乙醇相各组分清除 [DPPH \cdot] 自由基能力

N, N- 二苯基三硝基苯肼自由基 [DPPH \cdot], 是一种稳定的以氮为中心的自由基, 其不同浓度的甲醇溶液呈现不同程度的紫色, 在 517nm 处表现出不同的吸收强度。所以当向 [DPPH \cdot] 自由基的甲醇溶液中加入受试物后, 若受试物能清除, 表现为在 517nm 处的吸收强度不断减弱, 直至稳定。因此, 加入受试物后, 在 517nm

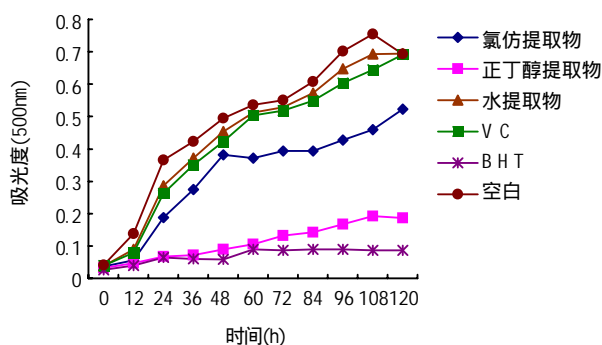


图1 不同受试物抗亚油酸氧化能力的比较(500nm)

Fig.1 Effects of antioxidant on linoleic acid oxidation measured as absorption of ferric thiocyanate at 500nm

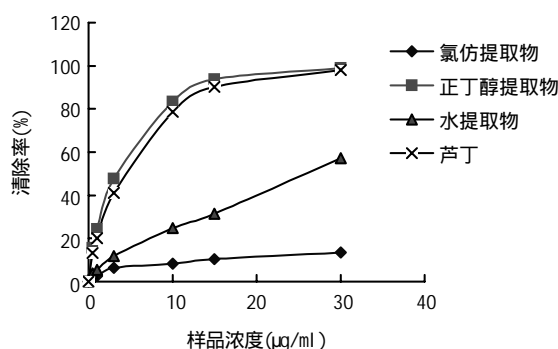


图2 各组分清除[DPPH·]自由基能力的比较

Fig.2 Effects of different fractions on the elimination of [DPPH·]

表1 受试物清除[DPPH·]自由基的半抑制率 IC₅₀Table 1 IC₅₀ of different fractions on the elimination of [DPPH·]

样品	氯仿提取物	正丁醇提取物	水提取物	芦丁
IC ₅₀ (μg/ml)	63.9	3.10	26.28	3.38

处可以动态检测其对[DPPH·]自由基的清除效果。

从不同浓度的受试物对[DPPH·]自由基的清除动力学曲线(图2)和对[DPPH·]自由基的半抑制率 IC₅₀(表1)可以看出,对[DPPH·]自由基的清除能力随受试物浓度的增大而增强,在乙醇相三个组分中以正丁醇提取物对[DPPH·]自由基的清除能力最强,IC₅₀为3.10μg/ml,比芦丁(IC₅₀=3.38μg/ml)强。水提取物对[DPPH·]自由基清除能力弱于正丁醇提取物,氯仿提取物最弱。

2.3 乙醇相各组分清除[·OH]自由基能力

羟基自由基是氧三电子还原产物,是氧化能力很强的自由基,在活性氧中其化学性质最活泼,反应性极强,寿命很短,是自由基中已知的最强的氧化剂,对生物机体的危害性极大。几乎可以与任何大分子物质(如蛋白质、核酸、脂质)等发生作用,导致机体受损和基因突变,引起机体衰老和癌变^[9]。

从不同浓度的受试物对[·OH]自由基的清除动力学曲线(图3)和对[·OH]自由基的半抑制率 IC₅₀(表2)可以看

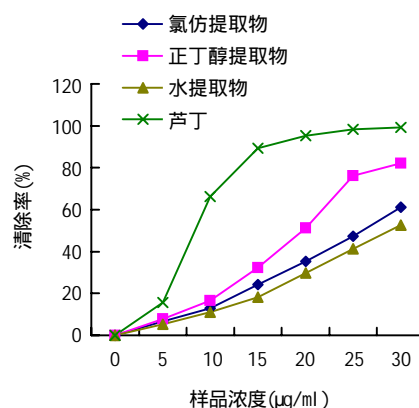


图3 不同受试物对羟基自由基[·OH]的清除效果

Fig.3 Effects of different fraction concentrations on the ratio of [·OH] free radical

表2 不同受试物清除[·OH]自由基的半抑制率 IC₅₀Table 2 IC₅₀ of different fractions on the elimination of [·OH] free radical

种类	氯仿提取物	正丁醇提取物	水提取物	芦丁
IC ₅₀ (μg/ml)	25.62	18.15	28.2	7.96

出,对[·OH]自由基的清除能力随受试物浓度的增大而增强,在乙醇相三个提取组分中以正丁醇提取物对[·OH]自由基的清除能力最强,IC₅₀为18.15μg/ml,比芦丁(IC₅₀=7.96μg/ml)弱。氯仿提取物对[·OH]自由基的清除能力弱于正丁醇提取物,水提取物最弱。

2.4 乙醇相各组分与 Fe²⁺ 螯合能力

过渡金属离子可通过Fenton反应促进脂类的氧化反应(H₂O₂+Fe²⁺→·OH),还可以使脂类氧化后的氢过氧化物降解产生各种自由基来传递氧化反应链^[10]。过渡金属离子螯合剂可以降低其氧化能力,而起到抗氧化剂的作用。亚麻籽双液相技术中乙醇相不同组分对 Fe²⁺ 的螯合作用见图4。

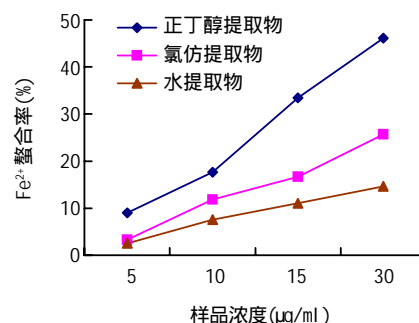
图4 不同乙醇相组分对 Fe²⁺ 螯合能力的比较

Fig.4 Effects of Fe²⁺ chelate activity

从不同浓度的受试物对 Fe²⁺ 的螯合动力学曲线(图4)可知,各受试物都具有螯合 Fe²⁺ 的能力,乙醇相的三个组分中以正丁醇提取物螯合 Fe²⁺ 的能力最强,氯仿提取

黑果枸杞色素性质研究

李 进¹, 赵红艳¹, 原 惠¹, 祝长青¹, 时德红²

(1. 新疆师范大学生命与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 新疆昌吉州第二中学, 新疆 昌吉 831100)

摘 要: 本文对黑果枸杞色素的理化性质和稳定性进行了研究, 结果表明黑果枸杞色素易溶于水, 属于花色苷类色素; 在酸性条件下, 对热有一定的耐受性, 耐可见光和紫外光的性能也较好, 蔗糖和防腐剂苯甲酸钠对该色素稳定性无影响, 而氧化剂 H_2O_2 对色素的稳定性有不良影响, 还原剂 Na_2SO_3 对色素的影响不显著, 而金属离子 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Sn^{2+} 离子对色素的稳定性具不良影响。

关键词: 黑果枸杞色素; 理化性质; 稳定性

Study on the Pigment of *Lycium ruthenicum* Murr.

LI Jin¹, ZHAO Hong-yan¹, YUAN Hui¹, ZHU Chang-qi ng¹, SHI De-hong²

(1. Life and Environment Science Institute, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China;

2. The Second Middle School of Changji County in Xinjiang, Changji 831100, China)

Abstract: This paper systematically studies the physical, chemical property and stability of the pigment of *Lycium ruthenicum* Murr., the results show that it is a type of anthocyanin and easy to solve in water, having resistance against heat in acid condition

收稿日期: 2006-08-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(200321110)

作者简介: 李进(1969-), 男, 讲师, 博士, 主要从事资源植物化学研究。

物次之, 而水提取物最弱。在 $30 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下, 氯仿提取物、正丁醇提取物和水提取物对 Fe^{2+} 螯合率分别为 25.7%、46.14% 和 14.65%。

3 结 论

3.1 乙醇相的三个不同萃取组分中, 以正丁醇提取物抗亚油酸氧化能力最强, 远大于同浓度的 VC, 但比 BHT 弱; 氯仿提取物抗亚油酸氧化能力小于正丁醇提取物, 而比 VC 强; 水提取物抗亚油酸氧化能力最弱, 不仅弱于 BHT, 而且也小于 VC。

3.2 对 $[DPPH \cdot]$ 自由基的清除能力上, 正丁醇提取物最强, IC_{50} 为 $3.1 \mu\text{g/ml}$, 比芦丁($IC_{50}=3.38 \mu\text{g/ml}$)强。水提取物略弱于 BHT, 氯仿提取物最弱;

3.3 正丁醇提取物对 $[\cdot OH]$ 自由基的清除能力最强, IC_{50} 为 $18.15 \mu\text{g/ml}$, 比芦丁($IC_{50}=7.96 \mu\text{g/ml}$)弱。氯仿提取物弱于正丁醇提取物清除 $[\cdot OH]$ 自由基的能力, 水提取物最弱; 同时, 正丁醇提取物螯合 Fe^{2+} 的能力最强, 氯仿提取物次之, 而水提取物最弱。

参考文献:

- [1] Sheng X Q, Lu Z Z, Lumonadio L, et al. Isolation and characterization of flaxseed constituents[J]. Pharmaceutical Biology, 1999, 37(1): 1-7.
- [2] Bemiller J N. Quince seed, psyllium seed, flaxseed and okra gums[J]. In Industrial Gums, 1993, (3): 339-367.
- [3] Andreas D, Saskia H, Peter W. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 943: 299-302.
- [4] Rose D P. Diet, hormones and cancer[J]. Annual Review of Public Health, 1993, 14: 1-17.
- [5] 刘大川, 庞美霞, 吴波. 亚麻籽木脂素-开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷提取工艺的研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(5): 83-86.
- [6] Gow Chin Yen, Pin Der Duh, Da Yon Chuang. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone[J]. Food Chemistry, 2000, 70: 437-441.
- [7] Sanchez M, Concepcion A, Larrauri, et al. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents[J]. Food Research International, 1999, 32: 407-412.
- [8] 张英, 吴晓琴, 俞卓裕. 竹叶和银杏叶总黄酮含量及其抗自由基活性的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2002, (4): 21-25.
- [9] 郑晶泉. 抗氧化剂氧化研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(1): 37-40.
- [10] Halliwell B. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. Free radicals and food additives[M]. London: Taylor & Francis Ltd, 1991. 37-57.