

灵香草浸膏及其净油的 抗氧化活性研究

刘贤贤¹, 张 业¹, 覃 雯¹, 邹碧群^{1,2}, 义祥辉^{1,*}

(1. 桂林师范高等专科学校化学与工程技术系, 广西桂林 541001;

2. 广西师范大学化学化工学院, 广西桂林 541004)

摘 要:以二苯代苦味酰自由基(DPPH·)法分别测试了灵香草浸膏及其净油的清除自由基活性,然后利用荧光猝灭法分别研究了浸膏、净油与Cu²⁺、Fe²⁺的螯合作用。结果表明,灵香草浸膏及其净油均对自由基DPPH·有良好的清除作用,不同溶液的半清除浓度IC₅₀为0.16~0.37mg·mL⁻¹;浸膏、净油对Cu²⁺、Fe²⁺表现出良好的螯合作用,净油对Fe²⁺的螯合作用最强,螯合常数为3.74×10²mL·mg⁻¹,浸膏对Fe²⁺的螯合作用次之,螯合常数为1.56×10²mL·mg⁻¹,净油对Cu²⁺的螯合作用最小,螯合常数为1.20×10²mL·mg⁻¹。研究说明灵香草浸膏、净油具有开发成为新型功能性抗氧化剂的潜力。

关键词:灵香草, 抗氧化, 自由基清除活性, 螯合作用

Study on the antioxidation of the concrete and essential oil of *Lysimachia foenum-graecum* Hance

LIU Xian-xian¹, ZHANG Ye¹, QIN Wen¹, ZOU Bi-qun^{1,2}, YI Xiang-hui^{1,*}

(1. Department of Chemistry and Engineering Technology, Guilin Normal College, Guilin 541001, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The free radical scavenging activities and the binding properties of the concrete and essential oil of *Lysimachia foenum-graecum* Hance were measured with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) method and fluorescence-quenching spectroscopy, respectively. The results showed that both of the concrete and essential oil displayed good free radical activities against DPPH· with IC₅₀ 0.16~0.37mg·mL⁻¹. And the copper and ferrous ion led to obvious statistic quenching of the concrete and essential oil fluorescence. The essential oil exhibited the best binding property with ferrous ion, and the concrete presented good binding property with ferrous ion, while the essential oil displayed the least binding property with copper ion. Their dissociation constants were 3.74×10², 1.56×10² and 1.20×10²mL·mg⁻¹, respectively. It was suggested that the concrete and essential oil of *Lysimachia foenum-graecum* Hance should be developed as an efficient new antioxidant.

Key words: *Lysimachia foenum-graecum* Hance; antioxidant; free radical scavenging activity; binding property

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)12-0137-04

灵香草(*Lysimachia foenum-graecum* Hance)又名零陵香、薰香、排草等,为报春花科排草属植物的全草,系广西大瑶山珍贵的天然香料植物。灵香草提取物具有极其特殊的芳香气息,且香气持久、稳定,属名贵香料,被用于高档烟的加香^[1]。此外,医药上其可用于治疗头疼、感冒、驱蛔虫,具有清热、行气、

止痛、驱虫等功效^[2]。然而,尽管灵香草天然资源丰富,经济价值高,人们对其研究仍主要集中在灵香草化学成分表征方面^[3-4],十八碳二烯酸、十七酸、叶绿醇等是其化学成分^[3-4],而抗氧化性能的研究则甚少涉及。为了考察灵香草开发成为抗氧化剂的潜力,本文对灵香草的提取物灵香草浸膏、净油的抗氧化能力进行测试,为功能型灵香草抗氧化剂产品的开发提供指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

灵香草浸膏 棕黑色油状物;净油 棕褐色油状物,二者都易溶于水,均由广西金秀香料香精有限公司提供,冷藏备用;其余试剂(除蒸馏水制备外)

收稿日期:2009-12-14 * 通讯联系人

作者简介:刘贤贤(1962-),女,教授,主要从事有机合成、天然产物化学与应用、杯芳烃的合成及应用的研究等领域的研究。

基金项目:广西区教育厅科研项目(200807MS076、200807MS075、200507067、No.200911MS281、200911MS282);来宾市科技项目。

表1 浸膏、净油的紫外、荧光光谱参数

物质	λ_{\max} (nm)	A_{\max} (nm)	ϵ ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes 位移 (nm)
浸膏	243	4.259	76	361	454	93
净油	235	4.136	43	352	440	88

均为分析纯。

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, RF-5301 荧光分光光度计, 恒温水浴锅, 冷冻设备。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外、荧光吸收光谱测试 把灵香草浸膏、净油分别配成 1mg/mL 的水溶液, 扫描它们的紫外、荧光吸收光谱。

1.2.2 DPPH 法测定抗氧化活性 对 DPPH· 的清除作用的测定参考文献[5]。将待测灵香草浸膏、净油提取液配制系列溶液, 分别移取各不同浓度的灵香草浸膏、净油提取液的溶液 0.1mL 加入到 3.9mL 的 DPPH· 溶液中, 混合均匀, 30min 后测其吸光度。灵香草浸膏、净油的清除自由基能力采用半抑制浓度 IC_{50} 值表示。测定待测灵香草浸膏、净油提取液浓度与自由基清除率, 并绘制自由基清除率对灵香草浸膏、净油提取液浓度曲线, 按式(1)计算 IC_{50} 值。

$$DPPH \cdot \text{清除率} (\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

A_0 与 A_1 分别代表自由基在波长为 517nm 时空白与样品对其作用后的吸光度, 然后作图求出线性方程, 再通过线性方程把它们对 DPPH· 自由基清除的半抑制浓度 IC_{50} 计算出来。

1.2.3 螯合作用测定 分别将灵香草浸膏、净油配成 $1mg \cdot mL^{-1}$ 的水溶液。然后, 把过渡金属离子 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 分别配制成不同浓度的水溶液。分别移取各离子不同浓度的溶液 0.1mL 加入到 3.9mL 提取物水溶液中, 混合均匀后在 37℃ 反应, 30min 后扫描荧光光谱, 由荧光光谱的变化来探讨灵香草浸膏、净油与各金属离子的螯合情况。

2 结果与讨论

2.1 灵香草浸膏及其净油的紫外、荧光吸收光谱

由灵香草浸膏及其净油的紫外吸收光谱(图 1A)可知, 浸膏的最大吸收波长和最大吸收值分别为 $\lambda_{\max} = 243nm$, $A_{\max} = 4.259$; 净油的最大吸收波长和吸收值分别为 $\lambda_{\max} = 235nm$, $A_{\max} = 4.136$ 。浸膏、净油的最大吸收峰的位置与酚类化合物的吸收基本一致, 说明了浸膏、净油含有大量的酚类化合物[4]。

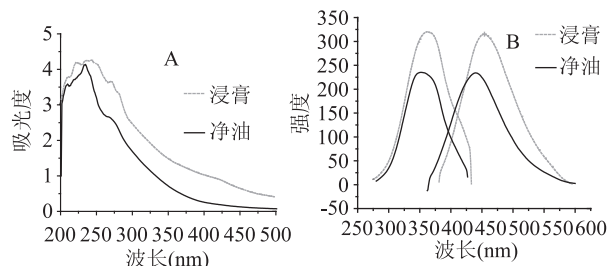


图1 灵香草浸膏、净油水溶液的紫外(A)、荧光(B)吸收光谱

由灵香草浸膏、净油的荧光吸收光谱(图 1B)可以看出, 浸膏的荧光吸收强度较净油的大; 浸膏的激发波长 $\lambda_{ex} = 361nm$, 发射波长 $\lambda_{em} = 454nm$, 净油的 λ_{ex}

$= 352nm$, 发射波长 $\lambda_{em} = 440nm$, 见表 1。

2.2 灵香草浸膏、净油清除自由基的作用

随着自由基生物学与自由基医学的迅速发展, 现已证明多种疾病的发生和发展与自由基对组织细胞的损伤关系密切[6]。自由基(free radical)通常指独立存在的带有未成对电子的原子或原子基团, 分子或离子, 如 $HO \cdot$ 、 $O_2^- \cdot$ 、 $ArO \cdot$ 等。在人体生命活动进程中, 自由基发挥着重要的作用。正常情况下, 人体内自由基的产生和清除是平衡的, 一旦自由基产生过多或抗氧化体系出现故障, 体内自由基代谢就会出现失衡, 可引起蛋白质、核酸(DNA)变性, 导致细胞和组织器官损伤, 诱发各种疾病, 加速机体衰老, 抗氧化剂的加入则能防止或改善这些损害[7]。

二苯代苦味酰自由基(DPPH·)在有机醇溶剂中是一种很稳定的自由基, 其孤电子在 517nm 附近有强吸收, 溶液呈深紫色[8], 当自由基清除剂存在时, 孤电子被配对, 吸收消失或减弱, 因此通过测定吸收减弱的程度, 可评价该自由基清除剂的活性。由于 DPPH· 自由基对受试物活性成分灵敏度较高, 而且操作简单易行, 这种方法得到了比较广泛的应用。 IC_{50} 通常被用来评价化合物对自由基的清除能力的大小, 即清除自由基一半浓度时所需自由基清除剂浓度, 其是评估化合物抗氧化活性的参数之一。 IC_{50} 值越低, 说明自由基清除剂对自由基的清除能力越强, 灵香草浸膏、净油不同溶液的 IC_{50} 分别为 0.16、0.17、0.36、0.37 $mg \cdot mL^{-1}$ (表 2), 说明了浸膏、净油对 DPPH· 有良好的清除作用, 这对开发新型功能性灵香草自由基清除剂、抗氧化剂具有重要的指导意义。

表2 灵香草浸膏、净油对自由基 DPPH· 的清除作用

物质	浸膏 DMF 溶液	浸膏 水溶液	净油 DMF 溶液	净油 水溶液
IC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)	0.16	0.17	0.36	0.37

2.3 灵香草浸膏及其净油与金属离子的螯合作用

Fenton 反应是评估螯合型抗氧化剂的活性与机理的重要方法[9-10], 具体做法是通过对抗氧化剂与 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 等金属离子的螯合作用进行表征。目前的表征手段主要有紫外光谱法、荧光光谱法、核磁共振等, 由表征结果可以了解抗氧化剂与金属离子的螯合情况。螯合常数可以反映该抗氧化剂的活性, 其与抗氧化剂的活性呈现良好的线性关系。本文中, 我们采用荧光光谱猝灭法研究提取物与金属离子的螯合作用。

当荧光体与猝灭体由于热运动等发生碰撞时, 可引起荧光体的荧光猝灭, 设想为动态猝灭, 则这种动态猝灭服从 Stern-Volmer 方程[11-13]。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad \text{式(2)}$$

其中: F_0 为猝灭体不存在时荧光体的荧光强度;

F 为加入猝灭体后的荧光强度; K_q 为双分子猝灭常数; $[Q]$ 为猝灭体浓度; τ_0 为猝灭体不存在时荧光体的荧光寿命; K_D 为 Stern-Volmer 常数。

$$K_D = K_q \tau_0 \quad (3)$$

当荧光体与猝灭体之间形成不发荧光的复合物时, 或者出现无辐射能量转移时, 根据化学平衡关系可得静态猝灭服从的关系为:

$$F_0/F = 1 + K_s [Q] \quad (4)$$

K_s 为荧光体与猝灭体之间的整合常数。对于静态猝灭通常采用 Lineweaver-Burk 双倒数函数关系^[11-13], 即由式(4)变形可得

$$F_0/(F_0-F) = 1 + K_d (1/[Q]) \quad (5)$$

其中: K_d 为离解常数。

$$K_d = 1/K_s \quad (6)$$

然后分别利用式(4)和式(6)作图, 判断其线性从而确定整合常数的计算方法。

灵香草浸膏及其净油水溶液与不同浓度 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 离子整合结果见图 2、图 3。

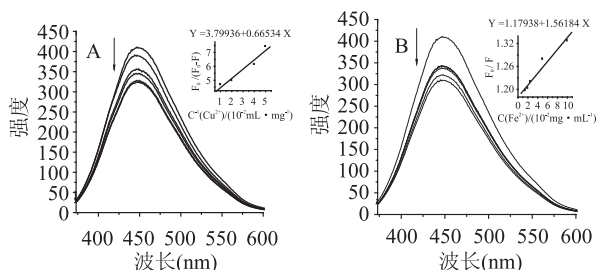


图2 Cu^{2+} (A) 和 Fe^{2+} (B) 分别对浸膏的荧光猝灭图

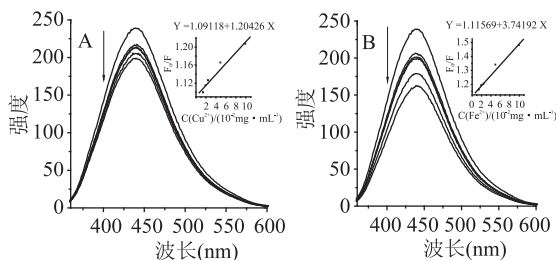


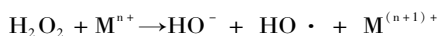
图3 Cu^{2+} (A) 和 Fe^{2+} (B) 分别对净油的荧光猝灭图

由图 2 和图 3 可见, 随着 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度的增加, 浸膏、净油的的荧光发射峰发生了猝灭现象。参考文献^[11-13]并结合公式(2)、式(4)作图并代入数据, 可计算浸膏、净油分别与 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 的整合常数(表 3)。

表 3 灵香草浸膏及其净油与 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 的整合常数

物质	对 Cu^{2+} 的整合常数 ($mL \cdot mg^{-1}$)	对 Fe^{2+} 的整合常数 ($mL \cdot mg^{-1}$)
浸膏	1.50×10^2	1.56×10^2
净油	1.20×10^2	3.74×10^2

由表 3 可见, 灵香草浸膏及其净油对 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 具有良好的整合作用。其中, 净油与 Fe^{2+} 的整合作用最强, 整合常数为 $3.74 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$; 浸膏对 Fe^{2+} 的整合作用次之, 整合常数为 $1.56 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$; 灵香草净油与 Cu^{2+} 的整合作用最小, 整合常数为 $1.20 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$ 。由此推测, 灵香草浸膏、净油是良好的整合型抗氧化剂, 其可防止 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 参与人体内的 Fenton 反应^[14], 间接阻碍或降低了羟自由基和氧自由基的产生^[15]:



总之, 以上研究充分说明了灵香草浸膏及其净油具有良好的清除自由基的能力, 具备开发为能够通过整合过渡金属阳离子来阻止人体 Fenton 反应发生的抗氧化剂的潜力。

3 结论

对灵香草浸膏及其净油清除自由基 DPPH· 的性能进行研究发现, 灵香草浸膏的 DMF、水溶液清除自由基 DPPH· 的 IC_{50} 分别为 0.16 、 $0.17 mg \cdot mL^{-1}$, 灵香草净油的 DMF、水溶液清除自由基 DPPH· 的 IC_{50} 分别为 0.36 、 $0.37 mg \cdot mL^{-1}$, 说明其浸膏、净油均具有良好的清除自由基活性, 其中浸膏的清除活性比净油大; 对灵香草浸膏及其净油与 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 的整合作用研究表明, 净油对 Fe^{2+} 的整合作用最强, 整合常数为 $3.74 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$, 浸膏对 Fe^{2+} 的整合作用次之, 整合常数为 $1.56 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$, 净油对 Cu^{2+} 的整合作用最小, 整合常数为 $1.20 \times 10^2 mL \cdot mg^{-1}$ 。由此可见, 灵香草浸膏、净油不仅具有良好的清除自由基活性, 还具有与过渡金属阳离子整合的性能, 故灵香草浸膏、净油具有开发为新型功能性自由基清除剂、整合性抗氧化剂的潜力。

参考文献

- [1] 朱凯, 王庆六, 马吉玲. 灵香草浸膏系列产品的研究[J]. 林产化学与工业, 1995, 15(2): 67-71.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2470-2472.
- [3] 莫彬彬, 余德顺, 李典鹏, 等. 广西灵香草提取物的化学成分研究及香气评价[J]. 香料香精化妆品, 2003(1): 5-7.
- [4] Shen Y H, Weng Z Y, Zhao Q S, et al. Five new triterpene glycosides from *Lysimachia foenum-graecum* and evaluation of their effect on the arachidonic acid metabolizing enzyme [J]. *Planta Med*, 2005, 71(8): 770-775.
- [5] Pan Y M, Zhu J C, Wang H S, et al. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Cortex fraxini* and use in peanut oil [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103: 913-918.
- [6] AMES BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging [J]. *Toxicology Letters*, 1998, 102(3): 5-18.
- [7] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 53-382.
- [8] Cotellet N, Bemier JL, Catteau J P, et al. Antioxidant properties of hydroxy-flavones [J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20(1): 35-43.
- [9] Brown J E, Khodr H, Hider RC, et al. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties [J]. *Biochem J*, 1998, 330: 1173-1178.
- [10] Van Acker SA, Van den Berg DJ, Tromp MN, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids [J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 331-342.
- [11] 陈晓波, 李崧. 铜、钠和钡离子与牛血清白蛋白作用的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(2): 309-312.
- [12] 宋峰, 梁宏. 荧光猝灭法研究 $Cu(II)$ 和 $Zn(II)$ 离子与 (下转第 141 页)

性的乳清蛋白膨润而使得保水率上升^[4-5]。因此,实验证明,在温度相同情况下,冷藏时间越长,粘度越高;在相同的时间内,冷藏温度越低,粘度越高。通过本次实验确定低温酸奶产品粘度指标为:4℃可以检测整个保质期,15℃可以检测 21d,25℃和 35℃可以检测 7d,观察到产品状态异常后应停止对粘度的监测。

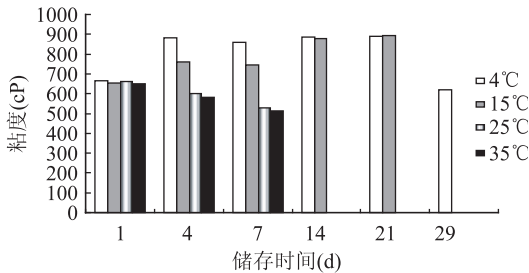


图1 储存温度对酸奶粘度的影响

2.2 储存温度对酸奶 pH 的影响

由图2可见,酸奶在4℃储存条件下,在储存29d内 pH 一直维持在 4.0~4.25 之间,酸度适宜、口感较好;同样,在 15℃ 储存 7d 酸奶 pH 也在 4.0 以上,仍然可以维持较好的酸度口感,但是在 15℃ 储存 14~29d,酸奶的 pH 迅速下降,酸度过高,口感下降;在 25℃ 和 35℃ 温度条件下存放,随着储存时间的延长,pH 会迅速下降,在保质期内下降到 3.5~3.75,这样一个酸度的酸奶已不适于食用。因此,酸奶在 4℃ 储藏 29d,在 15℃ 下储存 7d,均可以维持较好的 pH;其他储存温度对于酸奶的 pH 变化不利。

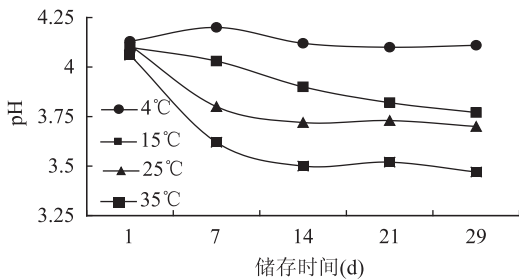


图2 储存温度对酸奶 pH 的影响

2.3 储存温度对酸奶乳酸菌活菌数的影响

酸奶是以乳酸菌(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)作为发酵剂发酵而成,因此在酸奶类产品中会存在大量的活乳酸菌,正是由于这些乳酸菌的存在会对人体肠道菌群产生一定的调节作用,从而有益于人体的健康,因此乳酸菌数量的多少直接影响到酸奶肠道保健功能的强弱。由图3可以看出,储藏温度的差异对于酸奶中的乳酸菌活菌数存在显著影响。实验结果表明,在4℃条件下存放29d内,乳酸菌活菌数可以一直维持在 10⁸ 以上。根据国家标准 GB/T 2746-1999 规定,酸牛奶中的乳酸菌活菌数需

大于 10⁶ 数量级,因此酸奶在 4℃ 储存条件下其中的乳酸菌活菌数在整个保质期内均处于较高水平。酸奶在 15℃ 条件下存放 21d 内,乳酸菌活菌数维持在 10⁶ 以上,然而从 21d 后乳酸菌数急剧下降,到保质期结束时几乎已经检测不到乳酸菌活菌;在 25℃ 条件下存放 7d,乳酸菌数在 10⁶ 以上,在 14d 以后就检测不到乳酸菌活菌;35℃ 条件下存放 4d 乳酸菌数还在 10⁶ 以上,第 7d 以后就无法检测到乳酸菌活菌。

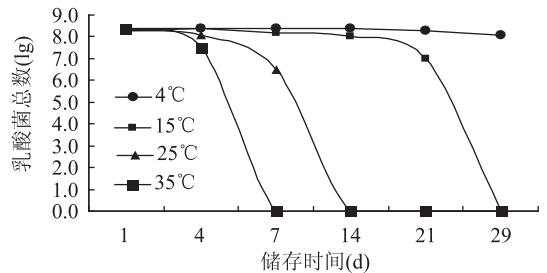


图3 储存温度对酸奶乳酸菌数的影响

3 结论

通过本研究证实,酸奶的储存温度对其品质存在着显著的影响。当酸奶处于相同的温度条件下,冷藏时间越长,粘度越高;在相同的时间内,冷藏温度越低,粘度越高。因此,酸奶在 4℃ 储存整个保质期,15℃ 储存 21d,25℃ 和 35℃ 储存 7d 可以保证较好的粘度口感。此外,在酸奶的 pH 方面,4℃ 储藏 29d,15℃ 储存 7d,均可以维持较好的 pH,适合饮用;另外,储存温度对于酸奶中的乳酸菌影响较大,在 4℃ 储存整个保质期、15℃ 存放 21d、25℃ 条件下存放 7d 及 35℃ 条件下存放 4d,其中的乳酸菌活菌数能够维持在 10⁶ 数量级以上,符合国家对于酸奶中乳酸菌含量的要求。综合分析上述因素,酸奶在 4℃ 储存整个保质期以及 15℃ 储存 7d 可以保证酸奶具有较好的粘度口感及 pH,同时还能保证乳酸菌活菌数维持在 10⁶ 数量级以上,而其他储存温度不利于保证酸奶品质。

参考文献

[1] 张和平,张佳程.乳品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1997:171-175.
 [2] 中华人民共和国卫生部.GB/T 4789.18-2003 食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验[S].北京:中国标准出版社,2003.
 [3] 沈辉.酸乳发酵过程中的理化性质和生物活性[J].无锡轻工大学学报,2000,19(9):5-7.
 [4] 杨爱君,方培生,余保宁,等.影响发酵酸奶粘度的因素及控制[J].现代食品科技,2008,21(4):45-47.
 [5] 郭清泉,张兰威,林淑英.酸奶制品在贮存过程中的变化[J].食品工业,2002(1):27-29.
 [14] 陈瑗,周玫.自由基医学[M].北京:人民军医出版社,1991:5-7.
 [15] Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique [J]. Hazard Mater,2003,98:33-50,611-617.

(上接第 139 页)

牛血清蛋白结合竞争[J].光谱学与光谱分析,2003,23(5):892-894.

[13] Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, et al. 2006. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin [J]. J Agric Food Chem, 54:6343-6351.