

萎叶抗氧化活性成分的提取 及活性测定体系的优化

纪明慧,郭飞燕*,王呈文,白小月,高倩,徐志江,凌昭星

(海南师范大学“省部共建-热带药用植物化学”教育部重点实验室,海南海口 571158)

摘要:目的:研究萎叶乙醇提取物的抗氧化活性。方法:采用微波辅助乙醇提取法提取萎叶抗氧化活性成分,以鲁米诺化学发光体系测定萎叶乙醇提取物清除羟自由基的效果,并对测定体系进行优化。结果:当料液比为 13:25(mg/mL),乙醇浓度为 50%,提取温度为 55℃,提取时间为 25min,微波提取功率为 600W 时,萎叶乙醇提取物对羟基自由基的清除效果最佳,清除率可达 98.2%,清除率测定体系中,当 pH10.18,Luminol 浓度为 0.8×10^{-4} mol/L, H_2O_2 浓度为 0.3% 时,体系测量精密高、稳定性和重复性好。结论:萎叶乙醇提取物对·OH 有很好的清除作用。

关键词:萎叶,抗氧化,鲁米诺,流动注射化学发光法

Extraction of antioxidant active components from *piper betle* and optimization of activity determination system

JI Ming-hui, GUO Fei-yan*, WANG Cheng-wen, BAI Xiao-yue, GAO Qian, XU Zhi-jiang, LING Zhao-xing

(Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education,
Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: Objective: To study the antioxidant activity of ethanol extracts from *Piper betle* L. Method: The ultrasonic-assisted ethanol extraction method was adopted to extract the antioxidant active components from *Piper betle* L, chemiluminescence analysis in H_2O_2 -Luminol system was used to determine efficiency of scavenging hydroxyl free radical and optimize the measurement system. Result: Under the conditions that solid-to-liquid ratio was 13:25 (mg/mL), ethanol concentration was 50%, extraction time was 25min and temperature was 55℃, microwave power 600W, the effect of removing hydroxyl radical was best and the clearance rate was 98.2%. H_2O_2 concentration 0.30% and Luminol concentration 0.8×10^{-4} mol/L and pH10.18 was suitable condition. Conclusion: The ethanol extract of *Piper betle* L had very good scavenging effect of hydroxyl radical.

Key words: *Piper betle* L; antioxidation; Luminol; flow-injection chemiluminescence

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)21-0246-04

萎叶(*Piper betle* L.)为胡椒科胡椒属植物,又名蒟蒻、青蒟、槟榔蒟、槟榔萎等^[1],是普遍生长在亚洲的一种植物,在我国主要分布于云南、广西、海南、台湾等地。萎叶是我国南方常见的药用植物,在《本草纲目》、《中药大辞典》和《本草纲目拾遗》中均有记载,萎叶根、子、叶皆可入药,具有祛风散寒、行气化痰、消肿止痒之功效。民间用于治疗风寒咳嗽、支气管哮喘、风湿骨痛、胃寒痛、妊娠水肿、牙痛等,外用治皮肤湿疹、脚癣^[1-2]。在海南的南部,咀嚼萎叶和槟榔是一种习俗,具有抑菌护齿的作用。有关萎叶挥发油成分、化学成分和营养成分已有一些文献报导^[1-4],但有关萎叶在抗氧化活性方面的研究报导并不多见,梁辉等人^[5]以 DPPH 法及联苯三酚红褪色法对云南保山产的萎叶进行抗氧化研究。为此,笔者采用微波辅助乙醇提取法对海南产萎叶进行提取,考察最佳的提取工艺条件,并用 H_2O_2 -鲁米诺化学

发光体系测定萎叶乙醇提取物对·OH 的抑制作用,以期为更好地开发和利用海南萎叶提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

萎叶 海南万宁,经海南师范大学生命科学学院钟琼芯老师鉴定为胡椒科胡椒属植物;鲁米诺(Luminol)分析纯,苏州工业园区亚科化学试剂有限公司;氢氧化钠、30% H_2O_2 、无水乙醇 分析纯,广州化学试剂厂;硫酸铜 分析纯,北京化工厂;维生素 C 分析纯,天津市四通化工厂;0.1mol/L 的 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲溶液。

MAS-I 型微波萃取仪 上海新仪微波化学科技有限公司;pHS-3C 型 pH 计 上海康仪仪器有限公司;BS124S 型电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司;IFFM-E 型流动注射化学发光仪 西安瑞迈电子科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 流动注射化学发光体系的建立 如图 1 所示,在实验过程中,鲁米诺溶液和待测液由主蠕动泵泵入管路, H_2O_2 、硫酸铜、维生素 C 溶液则由副蠕动泵泵入

收稿日期:2012-05-17 *通讯联系人

作者简介:纪明慧(1968-),女,副研究员,研究方向:有机化学。

基金项目:海南省教育厅科研基金项目(Hj2010-19)。

表 1 流动注射化学发光仪运行参数程序

Table 1 Operating parameters of flow injection chemiluminescence instrument

步号	泵运行时间(s)	主泵速度(r/min)	副泵速度(r/min)	重复次数	阀位	数据读取	主泵方向	副泵方向	跳转
1	10	30	0	1	L	N	F	F	1
2	10	25	25	1	L	Y	F	F	1
3	10	30	30	1	R	Y	F	F	1
4	20	20	20	1	L	Y	F	F	1
5	26	30	30	1	L	Y	F	F	1

注:蠕动泵用橡皮乳胶管内径为 1mm。

管路,按运行程序(表 1)进行流动注射化学发光分析,各溶液分别在混合器中混合并发生反应产生蓝光,测定 10s 内发光强度,由光检测器记录发光信号。在副蠕动泵中部分 Cu^{2+} 被维生素 C 还原成 Cu^+ , 然后迅速与 H_2O_2 反应产生羟基自由基^[6]。当主蠕动泵中进的是鲁米诺溶液和空白溶液时,发光强度为空白值 I_0 , 当进的是待测液时,发光强度记为 I , 根据发光信号强度的降低值 $(I_0 - I)$, 可以定量分析待测液中的成分清除羟基自由基的能力。其计算公式为^[7-8]:

$$\text{羟基自由基抑制率}(\%) = [(I_0 - I) / I_0] \times 100$$

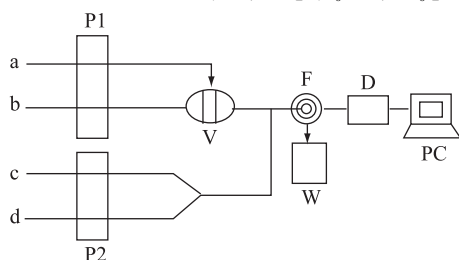


图 1 流动注射化学发光分析法的原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of

flow-injection chemiluminescence analysis

注:a:鲁米诺溶液;b:萎叶乙醇提取物溶液;c: H_2O_2 溶液;d:硫酸铜和维生素 C 溶液;P1:主蠕动泵;P2:副蠕动泵;V:八通阀;F:流通池;W:废液池;D:发光检测器;PC:计算机。

1.2.2 萎叶抗氧化活性成分提取 萎叶烘干,粉碎过 80 目筛,准确称取一定量的萎叶粉末于 50mL 烧杯中,加入 25mL 乙醇溶液,在不同温度、时间、微波功率下提取,然后抽滤,滤渣再用相同浓度乙醇溶液洗涤三次,合并滤液定容至 50mL,待测^[9-10]。

1.2.3 萎叶抗氧化活性测定 以 1.2.1 流动注射化学发光体系测定萎叶抗氧化活性。鲁米诺溶液、 H_2O_2 溶液和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 硫酸铜以及 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 维生素 C 溶液都根据需以 0.1 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液配制以达到所需的 pH。硫酸铜溶液和维生素 C 溶液加入量比为 7:4 (mL/mL),按运行程序(表 1)进行流动注射化学发光分析,进而分析 pH、 H_2O_2 浓度和鲁米诺浓度对测量体系的影响。

2 结果与分析

2.1 提取工艺的优化

2.1.1 料液比对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果影响 在其它条件不变的情况下,料液比对提取效果的影响见图 2。提取条件:80% 乙醇、提取温度 50°C 、提取时间 25min、微波功率 600W。由图 2 可以看出,当料液比为 10:25~13:25 时,提取物对羟基自由基的清除率随料液比的增加逐渐增加,增加料液比,提取物对羟基

自由基的清除率出现下降的趋势,说明当料液比增大,提取液中有效的活性成分含量增加,同时其他成分含量也会增加,其中某些成分对清除羟基自由基的活动产生拮抗,从而导致清除效果变差。因此,本实验选择提取液的最佳料液比为 13:25 (mg/mL)。

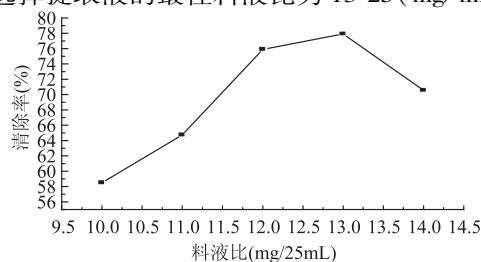


图 2 不同料液比提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果

Fig.2 The scavenging effect of extracts with different solid to liquid ratio on $\cdot\text{OH}$

2.1.2 乙醇浓度对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果影响 在其它条件不变的情况下,考察不同乙醇浓度对提取效果的影响,结果见图 3。提取条件:料液比 13:25、提取温度 50°C 、提取时间 25min、微波功率 600W。由图 3 可以看出,当乙醇浓度为 30%~50%,提取液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随乙醇浓度的增加逐渐增加,当乙醇浓度为 50% 时,清除率最高。当乙醇浓度为 50%~90% 时,提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随乙醇浓度的增加逐渐下降,说明提取液中对 $\cdot\text{OH}$ 产生抑制作用的活性组分具有较大的极性。

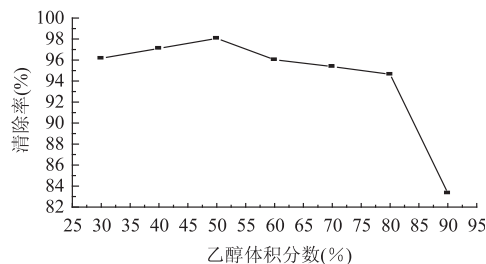


图 3 不同乙醇浓度提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果

Fig.3 The scavenging effect of extracts with different volume fraction of ethanol on $\cdot\text{OH}$

2.1.3 温度对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果影响 在其它条件不变的情况下,考察温度对提取效果的影响,结果见图 4。提取条件:50% 乙醇、料液比 13:25、提取时间 25min、微波功率 600W。由图 4 可知, 35°C 时提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率很低,随着提取温度的升高,提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率增加, 55°C 时清除率最高可达 98.2%; 温度低于 55°C , 萎叶中有效的抗氧化活性成分溶解度小,提取效果受到影响,因此活性不高; 温度高于 55°C 时,随着温度的提高,有效成分溶解达到

饱和,提取物对羟基自由基的清除率变化不大。

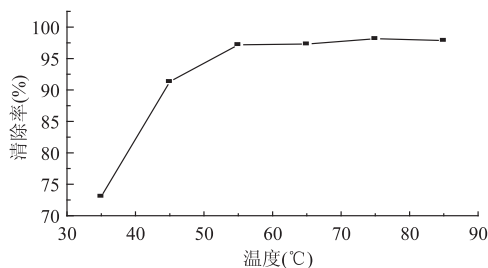


图4 不同温度提取物对·OH清除效果

Fig.4 The scavenging effect

of extracts with different temperature on ·OH

2.1.4 时间对·OH的清除效果影响 在其它条件不变的情况下,考察时间对提取效果的影响,结果见图5。提取条件:50%乙醇、料液比13:25、提取温度55℃、微波功率600W。由图5可知,随着提取时间的延长,提取物对羟基自由基的清除率逐渐增加,25min时清除率最高;时间小于25min,萎叶中有效的抗氧化活性成分提取不够充分,因此提取物活性受到影响;提取到25min时,提取基本完成,再延长提取时间,提取物对羟基自由基的清除率没有明显的变化,而体系溶液颜色变深,影响了测量效果。

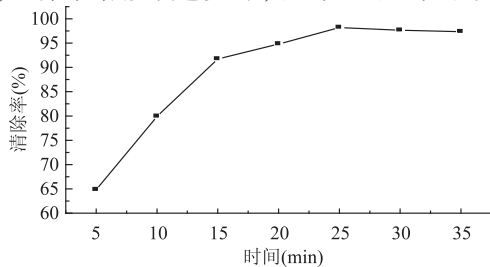


图5 不同时间提取物对·OH清除效果

Fig.5 The scavenging effect

of extracts with different time on ·OH

2.1.5 微波功率对·OH的清除效果影响 在其它条件不变的情况下,考察微波功率对提取效果的影响,结果见图6。提取条件:50%乙醇、料液比13:25、提取温度55℃、提取时间25min。由图6可知,当微波提取功率为300~600W时,提取物对·OH的清除率随着微波功率的提高逐渐增加,最高可达98.2%,当微波提取功率为600~800W时,提取物的清除率随着微波功率的提高呈现出下降趋势,表明增大微波提取功率会导致萎叶提取液中有效成分氧化分解,影响了清除效果。

2.2 抗氧化活性测定体系的优化

2.2.1 pH的选择 在其它条件不变的情况下,考察体系溶液的pH对测量效果的影响见图7。测定体系中 H_2O_2 浓度为0.3%、鲁米诺浓度为 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 、 $CuSO_4$ 和维生素C浓度均为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $CuSO_4$ 和维生素C比例为7:4(mL/mL)。由图7可知当体系溶液的pH为8.64~12.17时,随着pH增加,体系发光强度变化不明显,羟基自由基清除率变化不大。但是过高的pH会使体系的发光处于不稳定状态,从而影响实验的稳定性和重复性,三次平行实验,结果表明,当pH为10.18时提取物对羟基自由基清除率最好。

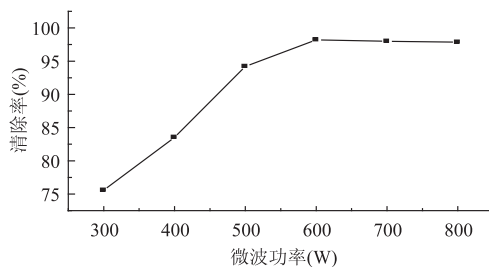


图6 不同微波功率提取物对·OH清除效果

Fig.6 The scavenging effect of extracts with different microwave power on ·OH

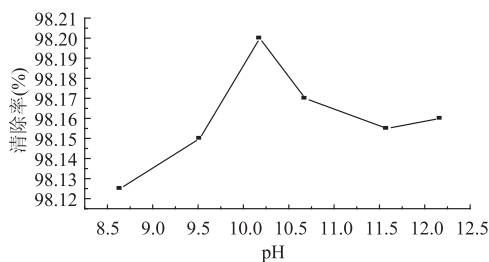


图7 pH对测定结果的影响

Fig.7 The effect of pH on the measured results

2.2.2 H_2O_2 浓度的选择 在其它条件不变的情况下,考察体系中 H_2O_2 浓度的变化对发光强度的影响,结果见图8。测定体系中鲁米诺溶液浓度为 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,pH为10.18, $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ $CuSO_4$ 和维生素C加入比例7:4。由图8可以看出,当 H_2O_2 的浓度为0.06%时,提取物对羟基自由基的清除率很低,光强度很小,这表明体系中若无过氧化氢的存在就没有羟基自由基的生成,无法产生化学发光。当 H_2O_2 的浓度为0.06%~0.3%时,体系的化学发光值随着 H_2O_2 浓度的增大而剧增,提取物对羟基自由基的清除率迅速提高,清除效果非常明显,而后随着 H_2O_2 浓度的继续增大,发光强度逐渐减少,清除率开始下降。这是因为 H_2O_2 本身对羟基自由基也有一定的抑制作用^[9], H_2O_2 浓度过大,不仅会抑制发光,也会使体系的发光处于一种不稳定的状态。三次平行实验,结果表明, H_2O_2 的最合适浓度为0.3%。

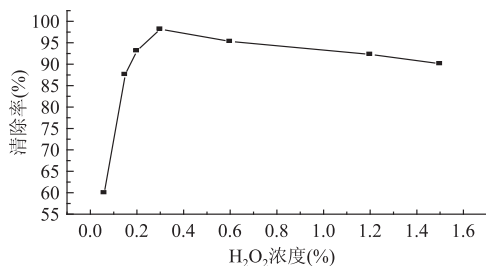


图8 H_2O_2 浓度对测定结果的影响

Fig.8 Impact of H_2O_2 concentration on test results

2.2.3 鲁米诺浓度的选择 在其它条件不变的情况下,考察体系中鲁米诺溶液浓度对发光强度的影响,结果见图9。测定体系中 H_2O_2 的浓度为0.3%、pH为10.18, $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ $CuSO_4$ 和 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 维生素C加入量为7:4。由图9可以看出,体系的化学发光依赖于鲁米诺的存在,当鲁米诺浓度为 0.4×10^{-4}

(下转第145页)

$$\Delta S^{\circ} = (\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ}) / T \quad \text{式(9)}$$

式中: C_{Be} 和 C_{Ac} 分别是次甲基蓝在吸附剂中的平衡浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和在溶液中的平衡浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); K_c 为平衡常数; ΔS° 为标准吸附熵变; ΔH° 为标准吸附焓; ΔG° 为标准吸附自由能; $T(\text{K})$ 为温度; R 为气体常数 ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)。

表3 微孔淀粉吸附次甲基蓝的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters for the adsorption of MB in micro-porous starch

热力学参数	303K	318K	333K
K_c	15.2391	4.8268	2.3390
$\Delta G^{\circ} (\text{kJ mol}^{-1})$	-6.8652	-4.1620	-2.3524
$\Delta H^{\circ} (\text{kJ mol}^{-1})$		-44.4026	
$\Delta S^{\circ} (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	-0.1239	-0.1265	-0.1263

由吸附热力学函数计算值分析:微孔淀粉对次甲基蓝的吸附是自发自过程 ($\Delta G^{\circ} < 0$), 且 ΔG° 的绝对值随着温度的升高而增加, 这与等温吸附线表现出的温度升高、吸附量减少的实验结果一致。此吸附反应为放热过程。

3 结论

3.1 在 30°C 、 pH 为 5.0 时, 吸附 60min 后, 微孔淀粉对次甲基蓝吸附效果最好。

3.2 微孔淀粉对次甲基蓝的吸附符合准二级动力学方程。随着反应温度的升高, 反应速率减小。由此推断, 微孔淀粉对次甲基蓝的吸附是放热反应。

3.3 微孔淀粉对次甲基蓝的吸附符合 Freundlich 吸

(上接第 248 页)

$\sim 1.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 随着鲁米诺浓度的增加, 体系的化学发光值呈逐渐增大的趋势, 羟基自由基的清除率也逐渐增大; 而当鲁米诺浓度达到 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 发光值达到最大值, 发光强度趋于稳定, 测量体系相对稳定, 提取液对羟基自由基的清除率达到最大, 可达 98.2%, 继续增大鲁米诺浓度, 体系的发光强度降低, 且实验的重现性较差。提取液对羟基自由基的清除率下降, 三次平行实验, 结果表明, 最合适的鲁米诺浓度为 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

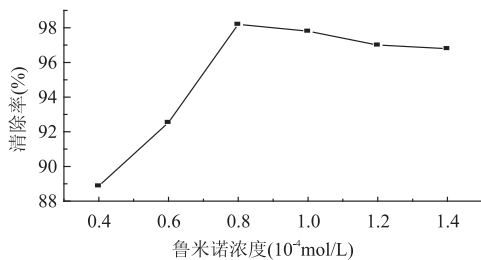


图9 鲁米诺浓度对测定结果的影响

Fig.9 Impact of Luminol concentration on test results

3 结论

实验结果表明, 以微波辅助提取, 当料液比为 13:25, 乙醇浓度为 50%, 温度为 55°C , 时间为 25min, 微波功率为 600W 时, 葵叶乙醇提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率效果最佳, 清除率可达 98.2%, 具有很强的抗氧化活性; 当 pH 为 10.18, H_2O_2 浓度为 0.3% 时, 鲁米诺浓度为 $0.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 体系测量精密高、稳定性和

重复性好。葵叶乙醇提取物为一混合体系, 清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用机理较复杂, 有待进一步研究。

3.4 吸附热力学参数为: $\Delta G^{\circ} < 0$, $\Delta H^{\circ} < 0$, $\Delta S^{\circ} < 0$, 吸附是自发的过程。

参考文献

- [1] 黄涛, 陈喜斌, 姜琳琳, 等. 变性淀粉的制备工艺及其对饲料品质的改良作用[J]. 饲料研究, 2005(4): 58-60.
- [2] 姚卫蓉, 姚惠源. 多孔淀粉的研究 I: 酶和原料粒度对形成多孔淀粉的影响[J]. 中国粮油学报, 2001(1): 36-38.
- [3] 朱仁宏, 姚卫蓉, 郑书铭, 等. 多孔淀粉在内墙涂料中的应用[J]. 涂料业, 2005, 35(1): 53-55.
- [4] 侯汉学, 张锦丽, 董海洲, 等. 食用变性淀粉的营养价值及安全性评价[J]. 粮食与饲料工业, 2002(11): 37-38.
- [5] Linke L. Porous materials made from starch [J]. Chemical Engineering & Technology, 1998(7): 580-584.
- [6] Hofmann T, Linke L. Starch-based porous materials [J]. Chemic-Ingredient Technical, 1998(6): 722-727.
- [7] 袁俊红, 陈英文, 唐玉娣, 等. 改性淀粉在环境和生物工程中的应用[J]. 化工进展, 2004, 23(12): 1312-1315.
- [8] 马娜. 微孔淀粉制造技术及其性质的研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003: 5-11.
- [9] 周琼, 王浩东, 张博, 等. 响应面法优化微孔淀粉制备工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 216-220.
- [10] 傅献彩, 沈文霞, 姚天扬, 等. 物理化学[M]. 第五版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 63-66.
- [11] 黄婷. 纳米材料固相萃取分离环境样品中的铈[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2008.

重复性好。葵叶乙醇提取物为一混合体系, 清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用机理较复杂, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院华南植物研究所等. 海南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1964: 331.
- [2] 郭声波. 蒺藜的历史与开发[J]. 中国农史, 2007(1): 8-17.
- [3] 尹燕, 黄相中, 王炯, 等. 葵叶茎化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(6): 887-888.
- [4] 黄相中, 尹燕, 黄文全, 等. 葵叶茎中生物碱和木脂素类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2285-2288.
- [5] 梁辉, 尹燕, 杨青昧, 等. 葵叶提取物的抗氧化与抑菌活性研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(5): 57-59.
- [6] 陈季武, 胡天喜. 测定 $\cdot\text{OH}$ 产生与清除的化学发光体系[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 136-139.
- [7] 吴拥军, 石杰, 屈凌波, 等. 流动注射化学发光法及光度法用于巴戟天提取液抗氧化活性的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(9): 1688-1691.
- [8] 孙涛, 周冬香, 毛芳, 等. 流动注射化学发光法对超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^- \cdot$ 和羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的检测[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 182-184.
- [9] 陈红梅, 朱本美, 张智勇. 微波法提取新疆罗布麻叶总黄酮及其抗氧化能力的研究[J]. 中国酿造, 2010(1): 105-108.
- [10] 刘彩琴, 赵丹, 朱敏. 姜黄素微波提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 302-305.