

热处理对何首乌抗氧化能力的影响

杨文建, 李大鹏, 李金奎, 李铭花, 陈义伦, 张培正

(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安, 271018)

摘要 通过总抗氧化能力、羟自由基清除能力、超氧阴离子自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力实验, 研究了热处理对何首乌 4 种溶剂提取物(甲醇、乙醇、乙醚和正己烷)抗氧化能力的影响, 并与传统煎制工艺的水提取物进行对比。结果表明: 热处理对乙醇提取物的 4 种抗氧化能力都有显著的增强效应, 且抗氧化能力均高于水提取物。对热处理前后各样品中总酚和总黄酮含量的测定及其与抗氧化活性的相关性分析发现, 热处理导致各溶剂提取物中总酚含量降低, 显著提高了乙醇提取物总黄酮含量; 总酚含量与提取物的抗氧化活性具有较好的正向线性相关性, 表明热处理对多酚物质的影响可能是抗氧化活性改变的主要因素。

关键词 何首乌, 热处理, 抗氧化, 多酚, 黄酮

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb)为蓼科多年生草本植物何首乌的块根。自古以来, 何首乌被人们认为具有益寿延年、延缓衰老的功效, 是著名药食同源性的滋补草药^[1]。《本草纲目》记载“久服长筋骨, 益精髓, 延年不老”。现代医学表明, 何首乌具有增强免疫, 抗氧化, 延缓大脑衰老, 提高 DNA 修复, 延长寿命, 降低胆固醇和改善脂肪代谢等多种功能^[2], 已被卫生部批准可用于生产保健食品。在我国, 传统药膳在加工时常采用加热处理, 中药功能成分的提取也常使用加热煎煮的方法, 但热处理对中药抗氧化能力影响的研究却较少。因此, 本论文研究了热处理对何首乌不同溶剂提取物抗氧化能力的影响, 并对热处理前后总酚和总黄酮含量的变化进行了分析, 以期药膳和功能食品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

何首乌, 购于石家庄制药集团; DPPH, Sigma-Aldrich 公司; 芦丁, 上海融禾医药科技有限公司; 没食子酸($\geq 98\%$), 天津塘沽区德华试剂厂; Folin-酚, 上海尚谊化工科技有限公司; V_c 、总抗氧化能力测定试剂盒、羟自由基测定试剂盒和抗超氧阴离子自由基测定试剂盒, 均购于南京建成生物工程研究所。

高速万能粉碎机(FW100), 天津泰斯特仪器有限公司; 旋转蒸发器(NE-1001), 日本东京理化器械株式会社; 紫外-可见分光光度计(S-3100), 韩国新科有限公司; 恒温水浴锅(HH-S4), 江苏省金坛市正

基仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备

何首乌经粉碎过筛(40 目)后精密称取 10 g 干粉, 用滤纸包裹置于索氏提取器中, 采用 150 mL 的不同溶剂(甲醇、乙醇、乙醚、正己烷)分别提取 2 h, 连续提取 3 次。分别合并 3 次提取液, 减压浓缩至粘稠状, 用蒸馏水回溶后离心取上清并定容至 100 mL, 4℃ 保存备用。为了比较溶剂提取与传统煎制工艺之间的差异, 本研究取 10 g 何首乌粉在 100 mL 水中煮沸煎制 20 min, 冷却后离心取上清定容至 100 mL, 4℃ 保存备用。取上述 4 种溶剂提取样和水煎制提取样分别于 100℃ 沸水浴中处理 20 min, 冷却后作为热处理后样品, 4℃ 保存备用。

1.2.2 总抗氧化能力测定

一些抗氧化物质能把 Fe^{3+} 还原生成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 能与菲啉类物质形成稳定的粉红色络合物, 在 520 nm 测定其吸光度值变化。以此原理测定各样品的总抗氧化能力, 并以 0.15 mg/mL V_c 为样品对照, 以蒸馏水为空白对照, 具体操作按照试剂盒说明进行。定义: 在 37℃ 水浴时, 每分钟每毫升样品使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 为一个总抗氧化能力单位(U/mL)。

1.2.3 羟自由基($OH\cdot$)清除能力测定

利用 Fenton 反应产生羟基, H_2O_2 的量与 Fenton 反应产生的羟基的量成正比, 当加入样品(给与电子受体)后用 gress 氏试剂显色, 其呈色与羟基的多少成正比关系, 在 550 nm 测定其吸光度值。以 0.15 mg/mL V_c 为样品对照, 以蒸馏水为空白对照,

第一作者: 硕士研究生(李大鹏博士为通讯作者)。

收稿日期: 2008-09-16, 改回日期: 2008-10-07

具体操作按照试剂盒说明进行。定义:每毫升样品在 37℃ 水浴下反应 1 min 使反应体系中 H_2O_2 的浓度降低 1 mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位(U/mL)。

1.2.4 超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)清除能力测定

利用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,当加入电子传递物质及 gress 氏显色剂后,溶液呈现紫红色,在 550 nm 下测定其吸光度。以 0.15 mg/mL V_c 为样品对照,以蒸馏水做空白对照,具体操作过程按照试剂盒说明进行。按照下面公式计算其清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$

式中: A_b ,空白对照管的吸光度值; A_s ,样品测定管的吸光度值。

1.2.5 DPPH 自由基清除能力测定^[3]

DPPH 自由基广泛用于研究抗氧化物质的自由基清除活性的测定,用 100 μL 一定浓度梯度的样品加入到试管中,然后向每管中加入 3.9 mL 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液,混匀避光 37℃ 水浴 1 h 后在 517 nm 下测定吸光度值,以蒸馏水做空白对照。定义:DPPH 自由基清除率为 50% 时所需样品的浓度为 IC_{50} 。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$

式中: A_b ——空白对照管的吸光度值; A_s ——样品测定管的吸光度值。

1.2.6 总酚含量测定^[4]

分别取 0.1 mL 各样品于具塞试管中,加 1.0 mL Folin-酚(稀释 10 倍)混匀后室温保持 5 min,然后再加入 1.0 mL 质量分数 10% Na_2CO_3 溶液,混匀后室温下放置 90 min(期间摇动几次),在 765 nm 处测定吸光度值。以蒸馏水做空白对照。总酚含量以没食子酸等价物表示,根据标准曲线线性方程 $A = 5.0849C + 0.0299$, $R^2 = 0.9969$ 来计算总酚含量。其中: A 为吸光度, C 为样品浓度(mg/mL)。

1.2.7 总黄酮含量测定^[5]

分别取 0.1 mL 各样品于具塞试管中,加入 0.3 mL 质量分数 5% 的 NaNO_2 摇匀后静置 5 min;再加入 0.3 mL 质量分数 10% AlCl_3 溶液,混匀后放置 6 min,然后再加入 2 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,混匀后立刻在 510 nm 处测定其吸光度值。以蒸馏水为空白,总黄酮含量以芦丁等价物表示,根据芦丁标

准曲线线性方程 $A = 0.2920C + 0.0240$, $R^2 = 0.9978$ 来计算总黄酮含量,其中 A 为吸光度, C 为芦丁等价物(mg/mL)。

2 结果与分析

2.1 总抗氧化能力测定

对各样品热处理前后总抗氧化能力的测定结果见图 1。

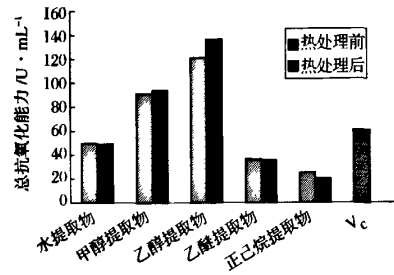


图 1 各样品总抗氧化能力测定

由图 1 可看出,乙醇提取物在热处理之后总抗氧化能力有了显著的提高,而正己烷提取物的总抗氧化能力却有所下降,其他各样品均变化不明显。其中,甲醇和乙醇提取物在热处理前后的总抗氧化能力均显著高于水提取物和 0.15 mg/mL V_c 。

2.2 羟基自由基清除能力测定

对各样品热处理前后羟自由基清除能力的测定结果见图 2。

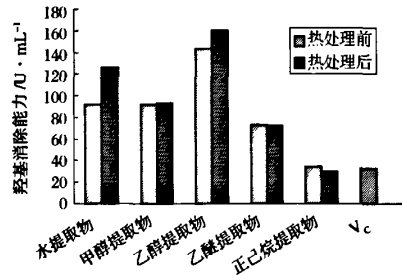


图 2 各样品羟基自由基清除能力测定

由图 2 可看出,水提取物和乙醇提取物在热处理后羟自由基清除能力均显著提高,甲醇提取物和乙醚提取物均无明显变化,而正己烷提取物的清除能力却有所下降。其中,对羟自由基的清除能力依次为乙醇提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物 > 乙醚提取物 > 0.15 mg/mL V_c 。

2.3 超氧阴离子清除能力测定

对各样品热处理前后超氧自由基的清除能力测定结果见图 3。

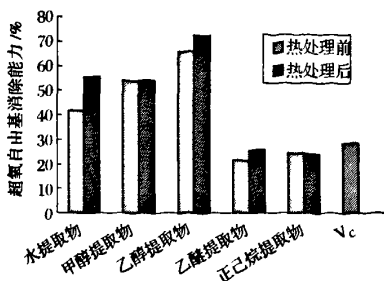


图3 各样品超氧阴离子清除能力测定

由图3可以看出,水提取物、乙醇提取物和乙醚提取物在热处理后超氧自由基清除能力显著提高,而甲醇提取物和正己烷提取物无显著变化。其中,甲醇提取物和乙醇提取物均高于水提取物,且三者都高于0.15 mg/mL Vc 的清除能力。

2.4 DPPH 自由基清除能力测定

对各样品热处理前后 DPPH 自由基的清除能力测定结果见图4。

因 IC₅₀ 值是 DPPH 自由基清除率为 50% 时所需各样品的浓度,所以值越小清除能力越强。由图4可看出,乙醇提取物和水提取物在热处理之后 DPPH 自由基清除能力均有了明显的提高,且乙醇提取物的

清除能力高于水提取物;甲醇提取物、乙醚提取物和正己烷提取物在热处理前后没有显著的变化。

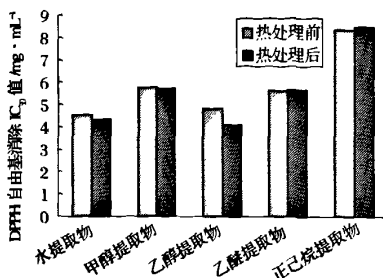


图4 各样品 DPPH 自由基清除能力测定

2.5 总酚和总黄酮含量测定

以上4种抗氧化能力测定结果显示,热处理对各提取样品的抗氧化活性都有不同程度的影响。而多酚是许多食品资源与传统中药中非常重要的抗氧化物质和营养成分,已被研究证实具有较好的清除自由基、抗氧化、抗衰老等多方面的功效并应用于功能食品、医药和化妆品等行业^[6]。黄酮作为人类饮食中最丰富的多酚类化合物同样具有重要的生理功能。因此,为了确定热处理对其总酚和总黄酮含量的影响,本文进一步对热处理前后各提取样品中总酚和总黄酮含量进行了测定,结果见表1。

表1 各样品热处理前后的总酚/总黄酮含量[平均值±标准差(n=3)]

	总酚含量/mg·mL ⁻¹ (样品)		总黄酮含量/mg·mL ⁻¹ (样品)	
	热处理前	热处理后	热处理前	热处理后
水提取物	3.065±0.086	2.975±0.078	0.796±0.062	0.792±0.068
甲醇提取物	3.216±0.112	3.204±0.089	0.612±0.041	0.608±0.052
乙醇提取物	3.528±0.119	3.409±0.126	0.949±0.059	1.115±0.078
乙醚提取物	2.643±0.098	2.448±0.079	0.785±0.071	0.791±0.069
正己烷提取物	2.102±0.121	2.113±0.074	0.448±0.034	0.442±0.047

由表1可以看出,水提取物中在热处理后总酚含量明显减少而总黄酮含量变化不显著;乙醇提取物在热处理后总酚含量呈现显著的降低而总黄酮含量却明显升高;乙醚提取物在热处理之后总酚含量显著减少但总黄酮含量变化不明显;而热处理对甲醇提取物和正己烷提取物中总酚和总黄酮含量的影响均不明显。

2.6 热处理前后总酚和总黄酮含量与样品抗氧化活性之间的相关性

从2.1~2.5结果可以看出,热处理不仅影响了各提取样品的抗氧化活性,而且引起了各样品中总酚和总黄酮含量的变化,为了确定抗氧化活性的改变是否由于热处理后多酚黄酮类含量的变化引起,本文对

热处理前后各样品抗氧化活性与总酚和总黄酮含量之间分别进行了相关性分析,结果见图5、图6。

从图5、图6可以看出总黄酮含量与样品的4种抗氧化活性均无很好的相关性,而热处理前后,样品的总酚含量与总抗氧化能力、羟自由基和超氧自由基清除能力均具有显著的正相关性,热处理前(后)的相关系数分别为0.814 5(0.299 0)、0.919 7(0.813 5)和0.820 6(0.923 0),Changwei^[7]在研究榕树提取物时也发现,其总酚含量与抗氧化能力具有良好相关性。由此可见,热处理对各样品中总酚的影响是引起其抗氧化性改变的主要因素。

从以上研究结果可知,乙醇提取物在热处理后抗氧化能力增强,总酚含量有所下降,总黄酮类含量却

有所升高。由于提取物在热处理过程中可能会发生分子的分解、基团异构化,化学键断裂,以及新物质的合成等反应,从而使各溶剂提取物的抗氧化能力有所变化。Lucrecia^[8]在研究多酚活性时发现,多酚抗氧化活性不仅和酚羟基数目有关,而且和酚羟基的位置

有很大的关系。因此,某些多酚物质在热处理过程中因发生上述反应生成抗氧化能力更强的黄酮类可能是乙醇提取物抗氧化能力增强的主要原因,这种增强效应的机理还有待进一步研究。

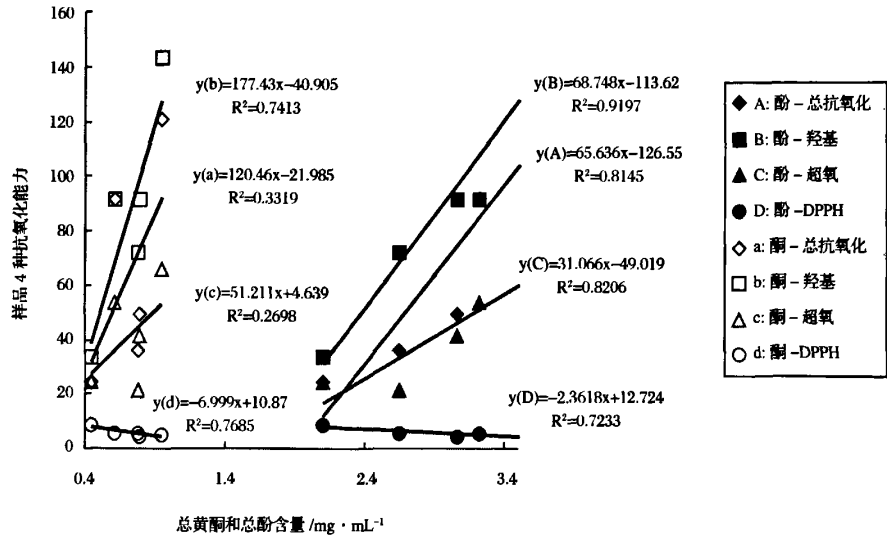


图 5 热处理前总黄酮、总酚含量与抗氧化活性的相关性

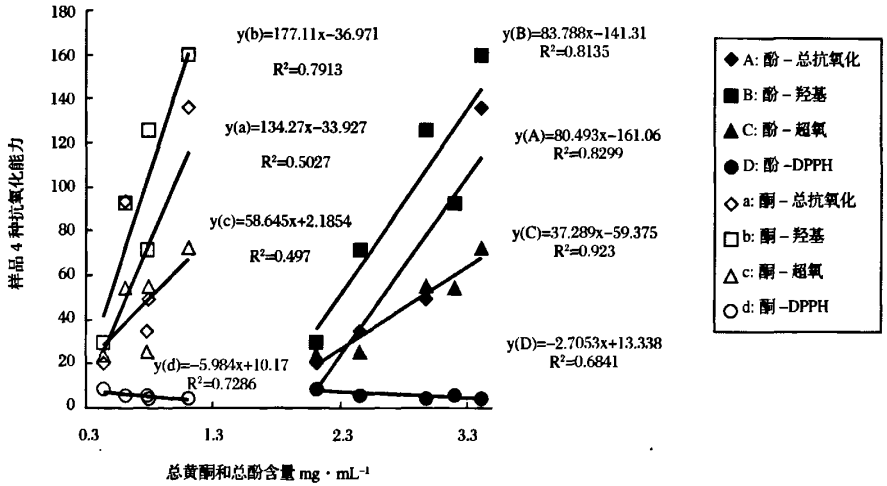


图 6 热处理后总黄酮、总酚含量与抗氧化活性的相关性

注:“A: 酚-总抗氧化”表示总酚含量与总抗氧化能力之间的相关性,其对应的线性方程为 $y(A)$;其他表示内容类似。

3 结 论

本文研究热处理对何首乌不同溶剂提取物抗氧化能力的影响发现,热处理对甲醇、乙醇、乙醚和正己烷 4 种溶剂提取物的抗氧化能力均有不同程度的影响,其中对乙醇提取物的总抗氧化能力和清除羟基、

超氧阴离子和 DPPH 自由基能力都有显著的增强效应,且抗氧化能力均高于传统煎制工艺的水提取物。这表明,从抗氧化功能考虑,应根据中药的特性选择适当的提取和热处理工艺。在对热处理前后各样品中总酚和总黄酮含量的测定及其与抗氧化活性的相关性分析发现,总酚含量与样品抗氧化活性具有

较好的正向线性相关性,因而热处理引起的多酚类,特别是总黄酮含量的变化可能是导致其抗氧化能力改变的主要原因。这将为开发中药相关食品提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 欧阳军. 药食同源话首乌[J]. 养生保健中药, 2006(9):40~43
- 2 李秀琼. 中药何首乌的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2008,24(3):65~65
- 3 Jitesh S Rathee, Birija S Patro, Soumyaditya Mula, et al. Antioxidant activity of piper betel leaf e xtract and its constituents[J]. J Agric Food Chem, 2006 54(24): 9 046~9 054
- 4 Kurt A Reynertson, Hui Yang, Bei Jiang, et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits[J]. Food Chemistry, 2008 (109):883~890
- 5 Li Yunfeng, Guo Changjiang, Yang Jijun, et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract [J]. Food Chemistry, 2006(96):254~260
- 6 刘运荣, 胡健华. 植物多酚的研究进展[J]. 武汉工业学院学报, 2005,24(4):53~65
- 7 Ao Changwei, Li Anping, Abdelnaser A Elzaawely, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil extract[J]. Food Control, 2008,19: 940~948
- 8 Lucrecia L Chaillou, Monica A Nazareno. New method to determine antioxidant activity of polyphenols [J]. Food Chemistry, 2006(54):8 397~8 402

Effect of Heat Treatment on Antioxidant Capability of *Polygonum multiflorum* Thunb

Yang Wenjian, Li Dapeng, Li Jinkui, Li Minghua, Chen Yilun, Zhang Peizheng

(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT The effect of heat treatment on the antioxidant capability of different solvent extracts (methanol, ethanol, aether and n-hexane) of *Polygonum multiflorum* Thunb, as compared to water extracts obtained through the traditional decocted method, were investigated. The antioxidant capability was evaluated by the methods of the total antioxidant capability, the scavenging capability of hydroxyl, superoxide anion and DPPH assay. Results showed that heat treatment can significantly enhance the antioxidant capability of ethanol extract which were higher than that of water extract. Meanwhile, the effect of heat treatment on the contents of total phenols and total flavonoids were investigated, and the correlations between total phenols, total flavonoids and antioxidant capabilities were also analyzed. Statistical analysis showed heat treatment can decrease content of total phenols in all extracts, but increased the content of total flavonoids. The positive linear relationship between total phenols and the antioxidant capability suggested that the effect of heat treatment on total phenols may be the main factor of antioxidant capability change.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb, heat treatment, antioxidant, total phenols, total flavonoids

信 息 窗

帝斯曼集团(DSM)与 LibraGen 医药公司合作研发催化酶

全球知名化工集团 DSM 与 法国医药公司 LibraGen 近期签署合作协议,将共同研发并生产以手性胺为原料合成的新型 Ω -转氨酶,用以催化旋光纯胺类化合物的合成。

此次合作,结合了 DSM 高度专业化的化工生产经验和独有的表达平台—PluGbug,以及 LibraGen 在细菌多样性条件下进行工业生产的经验。该项目计划研发可催化酮类物质反应生成高纯度 R-和 S-胺类物质的酶,这两种胺类物质现在越来越广泛地被用来合成活性医药原料(API)和精细化工原料。生产酶的过程将采用 DSM 的大规模发酵方式,鉴于酶的荧光活性,为方便生物催化,LibraGen 将采用简易包装对医药生产企业进行销售。据报道,双方的合作将拓宽 LibraGen 的客户群,范围延伸至化妆品、医药中间体以及精细化工领域。但财务等方面的细节还未透露。