

天然抗氧化剂木犀草素抗氧化活性的研究

阎高峰¹ 叶小利² 袁吕江³ 李学刚³

1(西南大学食品科学学院,重庆,400716) 2(西南大学生命科学院,重庆,400715)

3(西南大学药用资源化学研究所,重庆,400716)

摘要 研究了木犀草素的抗氧化活性及其影响因素。采用 TBA 快速测定法和烘箱贮存法进行测试,结果表明:木犀草素的添加量以 0.02% 为宜,其效果与同剂量的 BHT 相当,比同剂量的茶多酚抗氧化效果好。还原能力和清除羟自由基能力均比茶多酚和 BHT 强。在酸性介质下, pH 3~4 时,抗氧化活性最大;同时木犀草素也是一种耐热性很好的抗氧化剂,在 180℃ 下处理 2 h,基本上不影响其抗氧化性能。表明木犀草素作为天然抗氧化剂具有开发潜力。

关键词 木犀草素,抗氧化活性,影响因素

目前用于食品抗氧化作用的大多是一些化学合成物质,如 BHA(2,3-丁基羟基茴香醚)、BHT(二丁基羟基甲苯),由于它们的安全性原因(BHA 会引起肝损伤,甚至致癌)^[1],有些国家已禁止使用,因此研究开发天然抗氧化剂的工作一直是食品和生物领域的重要课题。

我国盛产花生,每年都有大量的花生壳产生,花生壳中除了含有较多的碳水化合物及粗纤维外,还含有少量的黄酮类化合物,主要为木犀草素。它是一种抗氧化物质,具有能抑制体内脂质氧化、延缓衰老及提高免疫能力的生理功能^[2]。木犀草素(毛地黄黄酮, Luteolin)是一种存在于许多植物体中的黄酮类物质,在抑制棕榈油形成丙二醛的作用中,表现出比 BHT 有更大的抗氧化活性^[3]。

本文针对花生壳中提取并纯化的木犀草素从添加量、pH、耐热性三方面对其抗氧化活性的影响作了研究。并对木犀草素作为油脂抗氧化剂的可能性、可行性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

山东临沂产新鲜成熟的花生壳,猪油为新鲜猪板油熬制,现榨芝麻油,茶多酚和 BHT 均为食用级(广州食品添加剂公司),其他试剂(分析纯)。

旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂), UV-265 型紫外-可见分光光度计(岛津),电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 抗氧化剂木犀草素的制备

将新鲜成熟的花生壳清洗,晾干,粉碎过 400 目筛,准确称取 1 000g,用体积分数 95% 甲醇,70℃ 提取 3 次,每次水浴加热回流 3 h。过滤残渣,合并滤液,真空浓缩干燥。石油醚脱脂,再用碱溶解酸析出去杂,经硅胶柱层析分离纯化,用体积分数 95% 乙醇重结晶获得纯度为 98% 的木犀草素。

1.2.2 抗油脂氧化能力的测定

1.2.2.1 硫代巴比妥酸(TBA)快速测定法^[4]

将木犀草素和 BHT 分别以设计的添加量(均为质量比)加入芝麻油中置于 60℃ 烘箱中恒温,24 h 后进行测定。具体为:取需要测定的油样 1 mL 分别加入 2 mL 20% 的三氯乙酸,与 2 mL 0.28% 硫代巴比妥酸溶液,混匀后沸水浴 15 min,冷却加 5 mL 氯仿,取上清液 532 nm 下比色。试验重复 2~3 次,用 A_{532} 平均值比较其抗氧化性强弱。

1.2.2.2 烘箱贮存法的测定 POV 值

将需要测定的各种抗氧化剂按设计添加并用少量溶剂溶解后,加入 30 g 猪油,放入 50 mL 容量瓶中,摇匀,置于 65℃ 烘箱内,每隔一定时间测定过氧化值(POV 值)。POV 值的测定方法按照国标(GB/T 5009.37—1996)^[5] 猪油卫生标准(GB 10146—1988),当 $POV \geq 16$ mmol/kg 时终止实验。

1.2.2.3 清除·OH 能力的测定方法^[7]

用 $FeSO_4$ 和 H_2O_2 产生·OH,以·OH 氧化水杨酸钠所得产物的吸光值表示·OH 多少,吸光值越小,则·OH 越少,清除效果越好。

不同的抗氧化剂溶解后放于离心管中,定容至 1 mL,加入 12 mmol/L 水杨酸钠 0.5 mL,0.9 mol/L $FeSO_4$ 0.5 mL,最后加 18 mmol/L H_2O_2 1 mL 启动反应,37℃ 恒温水浴反应 1 h 后 5 000 r/min 离心 10 min

第一作者:博士研究生,讲师。

收稿日期:2005-04-27,改回日期:2005-06-22

取上清液并稀释至 10 mL,在 510 nm 分光光度计上测吸光值 A ,根据以下公式计算·OH 的清除率。清除率/% = $\{[A - (A_1 - A_2)]/A\} \times 100$, A 为不加抗氧化剂时体系吸光值, A_1 为加入提取液后体系吸光值, A_2 为提取液的本底吸光值。

1.2.2.4 还原能力的测定方法^[6]

取不同抗氧化剂溶解并稀释至 2.5 mL,加入 0.2 mol/L 且 pH 6.6 的磷酸钠缓冲溶液 2.5 mL 及 1% 赤血盐 2.5 mL,于 50℃ 水浴反应 20 min 后急速冷却,加入体积分数 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,于 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 5 mL,加入蒸馏水 4 mL 及体积分数 0.1% 三氯化铁溶液 1 mL,混合均匀,10 min 后于 700 nm 测定其吸光值,吸光值越大表示还原力越强。

2 结果与分析

2.1 抗氧化剂的添加量与抗氧化效果

表 1 TBA 比色法测定的 A_{532} 平均值

种 类	抗氧化剂添加量/%			
	0	0.2	0.02	0.002
木犀草素	1.0	0.30	0.33	0.48
BHT	1.0	0.31	0.32	0.49

由表 1 列出了木犀草素和 BHT 以 3 个添加水平加入猪油中采用快速测定法的试验结果。由此可见,木犀草素具有良好的抗脂质氧化能力,其最适添加量 0.02% 左右。

采用烘箱法测试不同的抗氧化剂在猪油体系中的 POV 值变化如图 1 所示。试验结果表明,空白对照在 5 d 时,POV 值已达 16.1 mmol/kg,失去了食用价值。而此时添加量为 0.02% 木犀草素的试验组的 POV 值仅为 0.9 mmol/kg,表现出良好的抗油脂氧化能力。

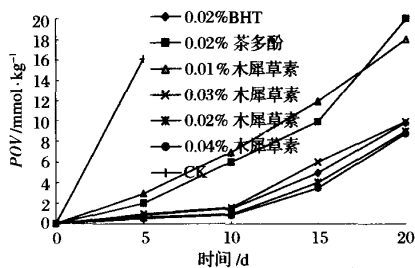


图 1 不同抗氧化剂对猪油 POV 值的影响

图 1 可看出,木犀草素随添加量增加抗脂质氧化能力增强,综合考虑应选 0.02% 的剂量。0.02% 的木犀草素与 0.02% BHT 作用基本相同,比茶多酚的抗脂质氧化能力强。

在油脂体系中,抗氧化剂的强弱取决于其自身提

供氢原子给脂质过氧化自由基的快慢、数量及提供氢原子后自身所形成的自由基的稳定性,还和抗氧化剂在油脂中的溶解度有关。从分子结构分析,木犀草素比 BHT 提供氢原子多,比茶多酚在油脂中溶解度好。

2.2 pH 值对木犀草素的抗氧化性能的影响

酸碱度是影响物质抗氧化活性正常发挥作用的重要因素之一,特别对多酚羟基类抗氧化剂而言,直接影响抗氧化剂质子释放速度的快慢及能力的大小。本实验中添加木犀草素的浓度均为 0.02%,分别用缓冲液调节样品溶液 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8。

表 2 不同 pH 值下木犀草素抗氧化性

pH 值	2	3	4	5	6	7	8
A_{532}	0.40	0.28	0.30	0.34	0.45	0.66	0.79

由表 2 可看出,木犀草素在不同的 pH 值下抗氧化能力不同,在 pH 值 3~4 的范围内,用快速测定法测定的芝麻油样的吸光值较小。说明在这个 pH 范围内,芝麻油的自动氧化速度较慢,表明木犀草素抗氧化作用的最适 pH 值范围为 3~4。

2.3 抗氧化剂木犀草素的耐热性能

抗氧化剂的耐热性能决定它的使用范围和功效,在试验中,称取一定量的木犀草素,放于碘量瓶中,在 180℃ 下烘箱处理,分别处理时间为 0、30、60、90、120、150 min,样品用无水乙醇溶解添加到芝麻油中,添加量为 0.02%,抗氧化活性按 TBA 快速测定法测定。

表 3 加热对木犀草素抗氧化活性的影响

处理时间/min	0	30	60	90	120	150
A_{532}	0.331	0.331	0.333	0.340	0.345	0.354

由表 3 可看出,木犀草素在 180℃ 下处理时间在 1 h 以内,其吸光值与对照没有什么变化,即抗氧化活性不会被影响,加热 2 h 后吸光值会稍变大,即抗氧化活性略有下降,但下降不明显。因此,木犀草素耐热性很好。能够广泛应用于高温处理的生产中。

2.4 木犀草素的还原能力和清除·OH 能力

木犀草素清除·OH 能力测定结果如图 2 所示,木犀草素还原能力测定结果如图 3 所示。

木犀草素具有供氢能力, H^+ 与自由基结合,使之还原为惰性化合物或是稳定的自由基,从而可以清除机体内过多的有害自由基。羟自由基是毒性最大的活性氧,对细胞内 DNA 的破坏作用最大^[7]。它可以加成至碱基双键中造成碱基破坏,而产生突变。活性氧所导致的 DNA 损伤在细胞里的积累被认为是

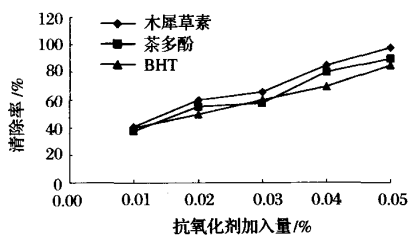


图2 不同抗氧化剂清除·OH能力的比较

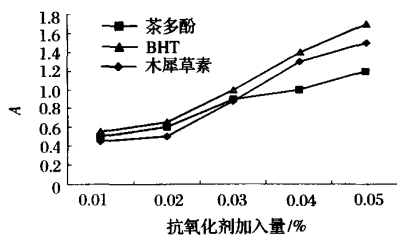


图3 不同抗氧化剂还原能力的比较

机体老化的主要原因^[8]。黄酮 β 环邻二酚羟基(3', 4'-邻二羟基)的存在极大的增加其抗氧化活性,可以认为这是高效黄酮类抗氧化剂的结构基础^[9]。而木犀草素的结构为3', 4', 5, 7-四羟基黄酮,因此其 β 环邻二酚羟基是清除羟自由基的关键功能团。从图2、图3可以看出,随着添加量的增加,清除率和还原能力都在增强。当木犀草素的加入量为0.05%时,对羟自由基的清除率达到96.02%,明显高于BHT,比茶多酚略好。

3 结论

TBA快速测定法结果表明,木犀草素在芝麻油中显示了良好的抗氧化性,有效添加量为0.02%。

在此浓度下,木犀草素在芝麻油和猪油中的抗氧化效果与BHT相近,在猪油中的抗氧化能力比茶多酚强。木犀草素的还原能力和清除羟自由基能力均比茶多酚和BHT强,在酸性介质下,pH 3~4时,抗氧化活性最大;同时木犀草素也是一种耐热性很好的抗氧化剂,在180℃下处理2 h,基本上不影响其抗氧化性能。表明木犀草素作为天然抗氧化剂具有很好的开发潜力,在食品、医药领域有广泛的应用前景。

参考文献

- 1 Bran A L. Toxicology and biochemistry of BHA and BHT [J]. JAOCS, 1975, 52(2): 372~375
- 2 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976. 123~126
- 3 Das Pereira. The relation between the maturity of peanut hull and its antioxidative activity [J]. Agric Food Chem, 1993, 14 (1): 67~70
- 4 沈建福, 张英. 竹叶黄酮糖苷的水解及其苷元的抗氧化性能研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(4): 14~16
- 5 国家技术监督局. 油脂过氧化值测定[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996. 1~3
- 6 翁瑞光. 葡萄婴萃取物于模式系统之抗氧化性[J]. 食品科学(台湾), 1998, 25(3): 268
- 7 吴文林, 胡天喜. 几种黄酮类化合物对羟自由基引起的DNA损伤的保护作用[J]. 自由基生命科学进展, 1997(5) 101~104
- 8 Bernstein C. Sex and DNA Repair[M]. New York: Academic Press, 1991. 166~168
- 9 牛金雯, 邹晓庭. 新型饲料抗氧化剂——天然黄酮类化合物的研究进展[J]. 饲料研究, 2001(9): 11

Studies on the Antioxidative Activity of Nature Luteolin

Yan Gaofeng¹ Ye Xiaoli² Yuan Lvjiang³ Li Xuegang³

1(College of Food Science, Southwest University, Chongqing, 400716, China)

2(College of Life Science, Southwest University, Chongqing, 400715, China)

3(The Chemistry Institute of Drug Resource, Southwest University, Chongqing, 400716, China)

ABSTRACT This paper studied the antioxidative effect factors of nature antioxidant luteolin. TBA rapid test and oven-storage test were applied to the experiments. It was found that the optimum quantity of luteolin added to the reaction mixture was 0.02%, its antioxidative activity was equivalent to BHT and stronger than that of GTP at the same dosage. The reducing activity and ·OH scavenging ability were better than that in BHT and GTP. The antioxidative activity of luteolin reached the maximum in acid conditions at pH 3~4. When heated at 180℃ for 2 hours, the antioxidative activity of luteolin did not decrease apparently. All of these results confirmed that luteolin is of potential value and exploitation in food industry.

Key words luteolin, antioxidative activity, influence factor