

橄榄果实单宁的抗氧化能力研究*

张亮亮¹, 林 鹏^{1, 2}, 林益明^{1, 2}

1(厦门大学生命科学学院生物系, 福建 厦门, 361005)

2(厦门大学湿地与生态工程研究中心, 福建 厦门, 361005)

摘 要 对橄榄果实中的总酚含量与可溶缩合单宁含量进行了测定, 并利用二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)和铁离子还原/抗氧化能力测定(FRAP)法, 研究了橄榄果实中单宁的自由基清除能力及抗氧化活性。结果表明: 橄榄果实中总酚含量较高[(572.35±39.72) mg/g(干重)], 用正丁醇-HCl法测得缩合单宁的含量为(1.47±0.02) mg/g(干重), 用DPPH法和FRAP法研究其自由基清除能力及抗氧化活性表明, 橄榄果实单宁具有较高的自由基清除能力(IC₅₀为48.45 μg/mL), 及较强的抗氧化能力(2.955 mmol AAE/g)。

关键词 橄榄果实, 单宁, 多酚, DPPH, FRAP

橄榄(*Canarium album* Lour. Rauesch.)为橄榄科橄榄属常绿乔木, 生于低海拔的杂木林中或山坡上以及沿海低丘陵地区, 主要分布在福建、广东、广西、台湾等南方省份^[1]。橄榄果实又名青果, 为我国传统中药材, 具有清热、利咽、祛痰、生津、健脾、解毒等功效, 用于咽喉肿痛、咳嗽、烦渴、鱼蟹中毒等^[2]。近年来橄榄叶提取物在美洲和欧洲用作膳食补充剂以增强免疫功能, 并作为天然抗氧化剂和自由基清除剂应用于食品、医药行业和化妆品中, 需求量逐年上升。橄榄中的没食子酸类多酚为其主要的药效成分, 但目前对橄榄中多酚类化合物的研究尚未见报道。

为更好的开发利用橄榄资源, 文中对橄榄果实中多酚类提取物抗氧化活性进行了探讨, 选用DPPH和FRAP两种方法测定其抗氧化能力; 二苯基苦基苯肼自由基(DPPH)(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)是一种稳定的自由基, 其甲醇溶液呈紫色, 在可见光区最大吸收峰为517 nm。当自由基清除剂加到DPPH溶液中时, 吸光值减少。因此, 可通过吸光值减弱的程度来评价自由基被消除的情况。抗氧化剂消除自由基能力越强, 其抗氧化活性越高。Fe³⁺-三吡啶三吡嗪(tripyridyl-triazine, TPTZ)可被样品中还原物质还原为Fe²⁺, 呈现出明显的蓝色, 并于593 nm处具有最大吸收峰, 由吸光值可计算样品总的抗氧化能力。本文从清除自由基能力和总抗氧化能力2方面来综合评价橄榄果实中单宁物质的抗氧化活性, 较为全面地评估了橄榄果实的抗氧化活性。

第一作者: 博士研究生(林益明教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金资助项目(40376026, 30671646)

收稿日期: 2007-09-20, 改回稿日期: 2007-11-30

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜橄榄果实由福州大世界橄榄有限公司提供, 于-20℃保存。

实验所用有机溶剂均为分析纯; 多酚含量及正丁醇-HCl法对缩合单宁的测定以纯化的橄榄果实单宁为标准物; 样品纯化所用色谱填料是Sephadex LH-20(Amersham公司); DPPH, TPTZ, 丁基羟基茴香醚(BHA), 抗坏血酸均为Sigma公司产品; 实验用水为二次去离子水。

SHZ-III B循环水真空泵(上海); SENCO旋转蒸发仪(上海); DK-526电热恒温水浴锅(上海); UV-2100紫外可见分光光度计; FD-1冷冻干燥机(北京)。

1.2 实验方法

1.2.1 单宁的提取与纯化

取橄榄果实200 g, 加入500 mL体积分数70%的丙酮溶液后用组织捣碎机捣碎, 浸提30 min, 重复提取3次。收集提取液在30℃旋转减压蒸发除去丙酮, 含有缩合单宁的水相用正己烷萃取3次后将水相冷冻干燥以得到单宁粗提物, 粗提物用少量体积分数50%甲醇溶液溶解后上Sephadex LH-20色谱柱, 用体积分数50%甲醇溶液作洗脱液去杂, 用体积分数70%丙酮溶液洗脱并收集纯化的单宁组分。30℃旋转减压蒸发除去丙酮, 水相冷冻干燥, 样品置于-20℃下保存备用。纯化得到的橄榄果实单宁为浅白色粉末。

1.2.2 样品溶液的制备

取0.1 g新鲜橄榄果实样品, 与2 mL左右体积

分数 70% 丙酮溶液混合后研磨成浆。转移到 25 mL 容量瓶中,蒸馏水定容,室温下避光保存备用。

1.2.3 总酚的测定^[3]

取 0.3 mL 样品溶液,加入 2.7 mL 蒸馏水后充分混匀。加入 1 mL 铁氰化钾溶液,并立即加入 1 mL 含 1 mol/L HCl 的 FeCl_3 溶液,混合完全后,置于 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下反应 15 min。然后加入 3 mL 6.02 mol/L 的磷酸溶液,充分混合后放置 2 min,加入 2 mL 质量分数为 1% 阿拉伯胶溶液,充分混合,3~5 min 后在 700 nm 下用分光光度计测定吸光值,蒸馏水作参比。

标准曲线的绘制:将纯化得到橄榄果实单宁样品配成浓度梯度为 0、40、80、120、160、200 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液,各浓度取 0.3 mL,加入 2.7 mL 蒸馏水后充分混匀。按以上步骤依次加入铁氰化钾溶液、 FeCl_3 溶液等试剂,最后测定吸光值并绘制成相应的标准曲线。

1.2.4 可溶缩合单宁的测定^[4]

取 1 mL 样品溶液,加入 6 mL 正丁醇-HCl(体积比 95:5)溶液,沸水浴 75 min。冰水冷却后在 550 nm 下用分光光度计测定,空白液用蒸馏水。

标准曲线的绘制:将纯化得到橄榄单宁样品配成浓度梯度为 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的水溶液,各浓度取 1 mL,加入 6 mL 正丁醇-HCl(体积比 95:5)溶液,按以上方法处理后,测定吸光值并绘制成相应的标准曲线。

1.2.5 DPPH 法测定自由基清除能力^[5]

配制质量分数为 0.004% DPPH 甲醇溶液,避光保存。加不同浓度的样品溶液 0.1 mL 和 3 mL 的质量分数为 0.004% DPPH 甲醇溶液于 10 mL 试管中,设 3 个重复。摇匀后室温放置 30 min,以甲醇溶剂做空白对照,测定其在 517 nm 处的吸光度值 $A_{\text{样品}}$ 。另测 3 mL DPPH 溶液与 0.1 mL 甲醇溶剂混合后在 517 nm 处的吸光度值 $A_{\text{空白}}$ 。橄榄果实单宁对 DPPH 自由基的清除率用抑制率 $K(\%)$ 来表示。

$$K/\% = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$,3 mL DPPH 溶液 + 0.1 mL 单宁溶液的吸光度; $A_{\text{空白}}$,3 mL DPPH 溶液 + 0.1 mL 甲醇溶剂的吸光度。

1.2.6 FRAP 分析法测定抗氧化能力

参照 Benzie 与 Strain 的方法^[6]。该方法原理为 TPTZ 可被样品中的还原物质还原为二价铁形式,呈现出明显的蓝色,并于 593 nm 处具有最大光吸收,

根据吸光度的大小计算样品抗氧化活性的强弱。步骤如下:取 0.1 mL 样品溶液(必要时稀释),加入 3 mL TPTZ 工作液(由 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液 25 mL,10 mmol/L TPTZ 溶液 2.5 mL,20 mmol/L FeCl_3 溶液 2.5 mL 组成),混匀后 25°C 反应 5 min,593 nm 测定吸光度。实验结果以达到相同抗氧化能力的抗坏血酸的量来表示。

标准曲线的绘制:取 0.01 mol/L 的抗坏血酸溶液 1、2、3、4、5 mL 分别置于 1~5# 50 mL 容量瓶中,用体积分数 50% 甲醇溶液定容到刻度,即得到 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的抗坏血酸标准液,参比样为去离子水。各标准液分别与 TPTZ 工作液反应,593 nm 处测得吸光度值,绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 橄榄果实中总酚及可溶缩合单宁含量

橄榄果实中总酚含量高达 (572.35 ± 39.72) mg/g(干重),可见橄榄果实中具有较高的总酚含量,植物单宁的多元酚结构赋予其一系列独特的化学性质;单宁与蛋白质的结合是其最重要的特征,单宁与蛋白质结合的能力称之为收敛性或涩性,收敛性是单宁多种生理活性的基础。橄榄果实中可溶性缩合单宁含量较低,为 (1.47 ± 0.02) mg/g(干重)。

2.2 橄榄果实单宁的自由基清除作用

DPPH 分光测定法,在国内外广泛用于清除自由基物质性质的研究与天然抗氧化剂的筛选。DPPH 是一种性质较为稳定的自由基,其甲醇溶液显紫色,在 517 nm 处有最大吸收,当有自由基清除剂存在时,DPPH 的单电子由于被配对,DPPH 浓度减小而使其颜色变浅,在 517 nm 处的吸光度值变小,这种颜色变浅的程度与配对电子数成化学计量关系,因此可用比色法进行定量分析。清除剂直接作用于 DPPH 自由基,反应时间短,用一般的分光光度计即可测定,故该方法操作简单、直接、灵敏、快速。按前述自由基清除率测试方法,对橄榄果实单宁的自由基清除率进行测定,并以常用的抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)和抗坏血酸作为对照,结果见表 1。

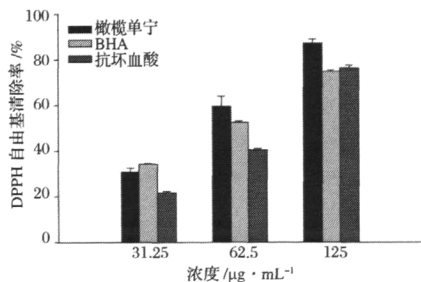
较低的 IC_{50} 值表示较高的自由基清除能力,从表 1 中可以看出,橄榄果实单宁的自由基清除能力(IC_{50} , 48.45 $\mu\text{g/mL}$)高于人工合成抗氧化剂 BHA(IC_{50} , 57.46 $\mu\text{g/mL}$)和抗坏血酸(IC_{50} , 78.25 $\mu\text{g/mL}$)。表明橄榄果实单宁具有较高的自由基清除能力。实验还发现,随着单宁样品浓度的增加,自由基

清除能力也逐渐增强(见图1)。植物多酚的抗氧化性是一种综合效应,其抗氧化性是通过几种途径综合体现出来的:缩合单宁以大量的酚羟基作为氢供体,对多种活性氧具有清除作用,可将单线态氧¹O₂还原成活性较低的三线态氧³O₂,减少氧自由基产生的可能性,同时也是各种自由基有效的清除剂,生成活性较低的多酚自由基,打断自由基氧化的链式反应;其次,植物多酚可以邻位二酚羟基与金属离子螯合,减少金属离子对氧化反应的催化;再者,对于有氧化酶存在的体系,如体内主要的氧自由基生成的源头XOD,多酚对其有显著的抑制能力;植物多酚还能与V_C和V_E等抗氧化剂之间产生协同效应,具有增效剂的作用。因此可以推论:植物单宁的抗氧化性来源于多酚分子中大量的酚羟基,来源于多酚独特的分子结构^[7]。进一步设想,多酚分子中的酚羟基含量越大,其抗氧化性可能越强。

表1 橄榄果实单宁的抗氧化能力

样 品	抗氧化能力	
	DPPH 自由基清除能力 ¹⁾	FRAP ²⁾
	IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	/mmol(AAE)·g ⁻¹
橄榄果实单宁	48.45 ± 0.23	2.955 ± 0.064
BHA ³⁾	57.46 ± 0.97	7.425 ± 0.137
抗坏血酸	78.25 ± 1.41	—

注:1) DPPH 自由基清除能力以达到 50% DPPH 自由基抑制率的抗氧化剂浓度来表示;2) FRAP 抗氧化性值以达到相同抗氧化能力的抗坏血酸的量来表示 (mmol AAE/g);3) BHA,丁基羟基茴香醚;数据为平均值±SD(n=3)。



(BHA,实验结果表示为3组数据的平均值±标准差)

图1 橄榄果实单宁及2种抗氧化剂的DPPH
自由基清除能力随浓度变化规律

2.3 橄榄果实单宁的FRAP抗氧化能力测定

由表1可以看出,橄榄果实中单宁的FRAP抗氧化性值虽然低于人工合成的常用抗氧化剂BHA的FRAP抗氧化性值,但仍然表现出较高的抗氧化能力。实验发现,橄榄果实中总酚含量较高,其DPPH自由基清除率和FRAP值也较高,说明橄榄果实中酚类物质的含量与其抗氧化性密切相关。

由 Benzie 和 Strain 建立的 FRAP 分析法原理明确,操作简便,不需特殊仪器,易于标准化,已用于测定不同抗氧化物质、食物与生物样品的抗氧化活性,但是它所测结果反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性,而是样品总的还原能力,一些学者因此认为该法测定结果可用来反映样品的总抗氧化活性^[6]。

3 小 结

根据对橄榄果实中的总酚含量与可溶缩合单宁含量进行了测定,发现橄榄果实中总酚含量极高。同时实验采用了2种体外抗氧化实验模型,研究了橄榄果实中单宁的DPPH自由基清除能力及FRAP抗氧化能力。结果表明,橄榄果实单宁具有较强的自由基清除能力及FRAP抗氧化活性。而且在各体系中,橄榄果实单宁的抗氧化活性与其浓度之间均有良好的量效关系。因此,橄榄果实单宁具有良好的抗氧化活性,可进一步研究开发为抗氧化功能性食品。

参 考 文 献

- 苑景春. 橄榄辨析[J]. 北京中医杂志, 2002, 21(1):42~43
- 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995. 168
- Graham H D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 801~805
- Terrill T H, Rowan A M, Douglas G B, et al. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992, 58 (3): 321~329
- Braca A, Tommasi N D, Bari L D, et al. Antioxidant principles from Bauhinia terapotensis[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64: 892~895
- Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Journal of Aanlysis Biochem, 1996, 239: 70~76
- Yoshida T, Mori K, Hatano T, et al. Effect of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 1989, 37: 2 016~2 025

Study on the Antioxidant Activity of Tannins from *Canarium album* Fruits

Zhang Liangliang¹, Lin Peng^{1,2}, Lin Yiming^{1,2}

1 (Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

2 (Research Centre for Wetlands and Ecology Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT Total phenolics and extractable condensed tannins contents of *Canarium album* Lour. Rauesch. fruits were determined. In addition, the effects of tannins from *C. album* fruits on free radical-scavenging and antioxidant activity were determined by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) model systems. The results showed as follows: total phenolics and extractable condensed tannins were 572.35 ± 39.72 mg/g and 1.47 ± 0.02 mg/g respectively; tannins extracted from *C. album* fruits showed a very good DPPH radical scavenging activity (IC_{50} of $48.45 \mu\text{g/mL}$) and ferric reducing/antioxidant power (2.955 mmol/L AAE/g). The DPPH radical scavenging activities were well proved with the ferric reducing/antioxidant capacity of the studied tannins.

Key words *Canarium album* fruits, tannins, polyphenol, DPPH, FRAP

会
讯

中国国际生物科技产业博览会 Bio-China 将在北京举行

经中华人民共和国科技部的批准,“2008 中国国际生物科技产业博览会 Bio-China”将于 2008 年 11 月 25~27 日在北京中国国际展览中心举行。本次活动将邀请中国光大对外贸易总公司、中国医药生物技术协会、中国医药质量管理协会、中国生物化学与分子生物学会、中国生物材料委员会等相关权威机构参与和支持。本次展会以“促进科技发展、引领经济潮流、树立行业品牌”为主题,充分发挥“展览、推介、交易、交流”四大功能。在成功举办的基础上,不断向“专业化、市场化、国际化”的方向发展,随时整合行业资源,不断提高参展展品的科技含量,吸引更多的国内外商家亲临现场,达成合作意向,带动产业经济发展,为广大参展商和参观商提供交易、交流、展示的绝佳平台。

同期举办:(1)生物技术发展论坛;(2)生命科学与生物技术的新契机;(3)生物制药新品发布会;(4)诊断试剂学术研讨会;(5)未来检验诊断新趋势;

参展范围:(1)医药生物技术:医学检验试剂、医学检验仪器、诊断试剂、生物芯片、血液制品、生化药物、纳米生物技术、疫苗、生命科学产品、抗生素等;(2)基因工程、细胞工程、遗传工程、生化工程、酶工程、发酵工程生物信息功能基因组学方面的高新技术等;(3)医药原料、各类中间体、生化药物试剂和疫苗、中草药种植、医药中间体、食品添加剂、保健品生产、特种浓缩植物营养油、OEM 加工等;(4)海洋生物产品:保健食品软、胶囊加工、海洋生物技术、海洋食品、多烯鱼油等;(5)生物产业相关的科学仪器设备、分析仪器 and 试剂、实验室仪器设备和解决方案、食品分析仪器和各种化学试剂技术等。

联系方式:地址:北京市京源路乙 8 号 621/616 室;电话:010-51713386;传真:010-51713296;网站:www.hyzb.net.cn;邮箱:zhangxu555@126.com;联系人:张旭 13581580885。

政
策
法
规
标
准

出口食品企业应慎用辐照技术

日本厚生劳动省进一步加强了对进口辐照食品的检查力度,将“香辣调味料、干燥蔬菜和茶叶(包括代用茶)”检查范围的抽检样本数由此前的 310 个增加到 517 个(包括香辣调味料 337 个、干燥蔬菜 151 个和茶叶 29 个)。这一技术性贸易措施的出台,将进一步提高出口辐照食品的门槛,对我国输日辐照食品企业产生较大影响。

辐照作为一种有效的杀虫、灭菌和抑制发芽的技术手段,在各国食品加工行业中广泛应用。为了确保辐照食品的安全,近年来,美国、加拿大、欧盟等国家和地区对食品的辐照技术要求和检测标识均作了明确规定,我国也有相关法规和技术标准出台。

此次日本加大了对辐照食品的检查范围,检验检疫部门提醒广大企业应给予高度重视,并建议采取以下举措:认真研究进口国家和地区对辐照工艺的相关规定和要求,结合自身实际情况加以对照,有则改之,无则加勉;做好自查自纠工作,加强自我监管力度,对不宜采用辐照技术的产品或辐照残留超标的,坚决停用停售;加强对原料、辅料的管理,做好有效监控,防止经辐照的原料、辅料混入食品生产环节;随时关注相关风险预警,进一步加大与检验检疫部门的交流,以便及时应对各项疑难问题。