

毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分及其体外抗自由基活性

程霜¹, 崔庆新², 陈玮³

(1. 聊城大学食品科学与工程系, 山东 聊城 252059; 2. 聊城大学化学系, 山东 聊城 252059;
3. 中国科学院研究生院生物系, 北京 100085)

摘要: 提取了毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分, 通过考察稳定 DPPH 自由基 (DPPH·) 在 517nm 处吸光强度的变化测定毛樱桃籽脂溶性抗氧化物的清除自由基活性, 并同 Trolox 进行了对比, 研究结果表明, 毛樱桃籽脂溶性抗氧化物具有较强的抗 DPPH· 能力。利用气相色谱结合质谱联用技术对该混合物组分进行了分离、分析, 结果表明, 该混合物主要由 γ -谷甾醇、角鲨烯、 γ -生育酚、愈创醇、古巴烯醇、视黄酸甲酯组成, 这些成分的协同作用贡献于毛樱桃籽脂溶性抗氧化物的强抗 DPPH· 活性。毛樱桃籽脂溶性抗氧化物对于毛樱桃籽脂质及其副产物的深加工和开发应用具有重要的意义。

关键词: 毛樱桃籽; 脂溶性抗氧化物; 抗自由基活性; 气相色谱—质谱联用

Constituents and Anti-oxidizing Properties of Lipid Fractions

from *Prunus tomentosa* Thumb Seed *in vitro*

CHENG Shuang¹, CUI Qing-xin², CHEN Wei³

(1. Department of Food Science and Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China
2. Department of Chemistry, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China
3. Department of Biology, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The radical scavenging potential of lipidic fractions from *Prunus tomentosa* Thumb seed was evaluated for their capacity to scavenge the relatively stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) by assaying the change of absorbance of the free radical solution at 517nm, with data obtained compared with Trolox. Results showed that there is potent anti-oxidizing activity in the test system. Anti-oxidizing constituents are characterized by capillary gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) detection to be composed of gamma-sitosterol, squalene, retinoic acid methyl ester, gamma-tocopherol, champacol and cis-alpha-copaene-8-ol. They are the most important natural anti-oxidizing contained in *Prunus tomentosa* Thumb seed oil, with attribution to the DPPH radical-scavenging and the anti-oxidizing potential as a result of the combination of such specific components. Data obtained also suggest that the oil possesses biological properties that could partially be beneficial to health as synergic effects of diet, the information is of importance in processing and utilizing the crude oils and their byproducts.

Key words *Prunus tomentosa* Thumb seed; lipid fractions; anti-oxidizing activities; GC/MS

中图分类号: TQ646.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0083-05

毛樱桃 (*Prunus tomentosa* Thumb), 俗称山樱桃、野樱桃, 属蔷薇科野生或半野生植物, 广泛分布于我国的华北、西北及东北各地, 毛樱桃为落叶灌木, 根系发达, 枝叶繁茂, 抗逆性强, 易于繁殖, 能有效地抵御各种

逆境所致的水土侵蚀和流失^[1], 毛樱桃挂果早、果实营养丰富, 是果汁、果酒等果品加工的良好原料^[2]。毛樱桃主要作为果树育种的砧木原材料, 为综合开发和充分利用这一野生植物资源, 本文对毛樱桃种子脂溶性抗氧

收稿日期: 2005-02-28

作者简介: 程霜 (1970-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为膳食黄酮与健康。

化成分进行了提取和抗氧化活性评价分析了相关成分。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

HP6890GC/5973MSD 气-质联用分析仪 安捷伦科技有限公司, 附 G1701BA-B.01.00 ChemStation 软件, G1033A, D.01.00 NIST98 标准质谱检索库; HP8453 型紫外-可见分光光度计 美国惠普公司。

1.1.2 试剂

毛樱桃采自内蒙古, 水溶性 VE 类似物—2, 5, 7, 8-四甲基-6-羟基-萘喃-2-羧酸(6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox), 1, 1-二苯基苦基苯肼(1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH) Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分的提取

毛樱桃籽油脂的提取: 毛樱桃种子干燥后, 剥壳去皮, 研钵研碎, 加入 10 倍体积乙醚于冰浴中超声提取 10min, 离心收集液相, 残渣重复萃取两次, 离心收集液相, 合并提取液, 30℃真空浓缩, 得毛樱桃籽油脂, 称重。称取一定量油样, 溶于重蒸丙酮, 漩涡震荡, 10000r/min 离心以除去磷脂等丙酮不溶物, 上清液 30℃真空浓缩除去丙酮, 所得油脂溶于石油醚, 冷藏, 备用。

脂溶性抗氧化成分的提取: 采用固相萃取(Solid phase extract, SPE)方法, Accu Bond C₁₈固相(3ml, 500mg ODS-C₁₈, Agilent 公司)用 20ml MeOH 湿润吸附剂表面、渗透键合烷基相, 除去固相萃取管上的只溶于强洗脱溶剂杂质, 避免其对分析物的干扰; 上样前用 3ml 1% 的 HAc 平衡, 然后加入去磷脂的毛樱桃籽油-石油醚溶液, 真空抽滤, 调节真空度, 使流出液的流速为 1.0ml/min, 滤干后用石油醚充分洗涤以除去非极性脂质; 用 20% MeOH-1% HAc 洗脱不确定成分, 然后, 用氮气吹干, 再用 10ml MeOH 洗脱所有残留于萃取柱上的抗氧化成分, 重复三次, 合并洗脱液, 真空浓缩即为毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分。

1.2.2 DPPH·清除活力研究

参考文献[3], DPPH-MeOH 溶液, 加入 20μl 不同浓度抗氧化物-MeOH 溶液, 漩涡混合, 使最终溶液 DPPH·浓度为 200μmol/L, 溶液于 37℃保温反应 30min, 517nm 测定吸光值 A, MeOH 溶液作空白对照。DPPH·抑制率 %=[1-A/A₀]×100。

DPPH·与抗氧化物化学当量数的确定: 另取 20μl 不同浓度抗氧化物-MeOH 溶液加入 1980μl 200μmol/L DPPH-MeOH 溶液, 漩涡混合, 溶液于 37℃保温 12h 使其达到平衡, 517nm 测定反应平衡时和反应前吸光值

A, 参考文献[4] 可以确定抗氧化物与 DPPH·反应的化学当量数 n(mol DPPH/g 抗氧化物), $n = \Delta A / \epsilon l C$ 式中, ΔA 为反应前和反应平衡时吸光值 A 的差值; ϵ 为 DPPH-MeOH 溶液的摩尔消光系数($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), 通过 DPPH-MeOH 标准溶液浓度对 517nm 吸光值 A 曲线斜率求取; l 为光程(cm); C 为抗氧化物浓度(g/L)。从而计算出每 1g 抗氧化物中的活性 H 供体数目: $n \times 6.02 \times 10^{23}$ (阿佛加德罗常数) 个分子。

抗氧化物清除 DPPH·速率常数的确定: 取不同浓度抗氧化物-MeOH 溶液加入溶液中(确保抗氧化物浓度 >> DPPH·浓度), 漩涡混合, 溶液于 37℃保温, 517nm 测定反应动力学曲线, 参考文献[5], 根据公式(2)、(3)、(4)、(5)

$$-d[DPPH] / dt = k_1[DPPH] = k_2[DPPH][AH] \quad (2)$$

$$[DPPH] = [DPPH]_0 e^{-k_1 t} \quad (3)$$



$$k_1[DPPH] = k_2[DPPH][AH] \quad (5)$$

$$k_2[DPPH][AH] = k_1[DPPH] \quad (6)$$

式中, [DPPH]₀、[DPPH]_t 分别代表反应起始时、反应到时间 t 时 DPPH·的浓度, [AH]: 抗氧化物的浓度、n: 反应化学当量数, 由于 Trolox 与抗氧化物清除自由基能力不同, 为了便于比较二者的清除效率, 根据公式(5)回归一级反应动力学常数 k₁ 与浓度曲线, 根据斜率求取二级反映动力学常数 k₂, 二级速率常数 $k_2 = dk_1/dt [(g/L)^{-1} \cdot s^{-1}]$, 根据化学当量数 n、二级速率常数 k₂, 确定每个抗氧化物分子与 DPPH·结合的动力学常数 k₂, $k_2 = k_2/n [(mol/L)^{-1} \cdot s^{-1}]$, k₂ 值越大表明该分子越易与 DPPH·结合, 清除 DPPH·, k₂ 可以评价抗氧化物清除 DPPH·速率的效率和快慢。

1.2.3 抗氧化成分鉴定

毛樱桃籽脂溶性抗氧化物甲醇溶液利用气-质联用分析技术进行分离分析。

气相色谱条件 色谱柱: HP-5MS, 5% 苯甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱(30m×0.25mm×0.25μm), 进样口温度: 250℃, 柱室温度: 初始温度 100℃, 以 10℃/min 升温速率升至 250℃(保持 10min), 高纯氮气作载气, 柱前压 65kPa, 流速 1ml/min, Gas saver: 20.0ml/min, 溶剂迟延时间: 5min。

质谱条件 接口温度: 280℃, 电离方式: EI, 电子能量: 70eV, 离子源温度 230℃, 四极杆温度 150℃, 调谐方式: 标准调谐, 质量扫描方式: 10~500amu 全部范围扫描, 电子倍增器电压: 1368V。

在上述 GC-MS 仪器实验条件下, 取抗氧化物甲醇溶液 0.2μl 进样、分离, 得总离子流图。

2 结果与分析

2.1 脂溶性抗氧化物清除 DPPH·活力

DPPH 一种稳定的有机自由基, 通过检测化学、生物试剂对 DPPH 自由基的清除能力可以评价其抗氧化性的强弱。利用 DPPH 溶液的紫红色吸光度变化作为清除自由基能力的分光光度测定, 是一种灵敏、简单易行的有效方法, 广泛应用于各种体外抗氧化研究^[6], DPPH 能与多种结合体发生反应, 用于表征各种 H 供体的清除自由基能力, 评价其抗氧化活性大小。由图 1 可以看出, 毛樱桃籽脂溶性抗氧化物具有较强的清除 DPPH·能力, 呈浓度依耐效性, 随着浓度的增加, 其清除能力显著加强, 其半数抑制浓度 IC_{50} 为 $23.58 \mu\text{g/ml}$, 略高于强自由基清除剂 Trolox 的抑制浓度 IC_{50} ($18.23 \mu\text{g/ml}$), 结果表明毛樱桃籽脂溶性抗氧化物是一类相当强的自由基淬灭剂, 能以较低的浓度抑制 DPPH·引起的各种氧化损伤。

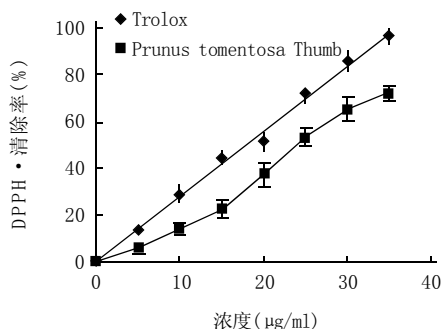


图1 DPPH·清除率—清除剂浓度相关曲线

Fig.1 Related effect of antioxidants on DPPH· scavenging

毛樱桃籽脂溶性抗氧化物能快速清除 DPPH·, 结合 DPPH-MeOH 标准曲线 DPPH-MeOH 溶液的摩尔消光系数 ϵ 为 $11500 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图 2), 结果表明抗氧化物与 DPPH·反应的化学当量数 n 为 $1.03 \times 10^{-2} (\text{mol/g})$, 即每 1g 抗氧化物中的活性 H 供体数目为 6.201×10^{21} 个分子 (Trolox 与 DPPH·反应的化学当量数 $n=0.83 \times 10^{-2}$, 与文献[5]相一致)。

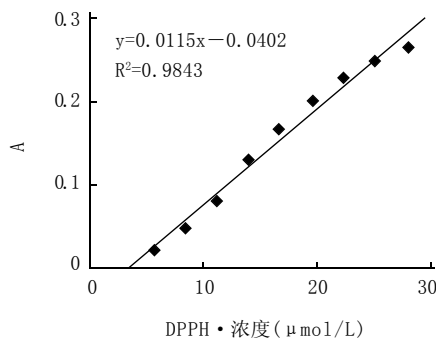


图2 DPPH-MeOH 溶液标准曲线

Fig.2 Standard curve of DPPH radical

同时实验显示, 抗氧化物和 Trolox 对 DPPH·的清除符合准一级动力学 (图 3、图 4) 模式, 各抗氧化物浓度的自由基清除曲线相关很好 (相关系数 $R^2=0.9065 \sim 0.9983$), 根据公式 (5), 通过回归一级反应动力学速率常数 k_1 得毛樱桃籽脂溶性抗氧化物二级反应动力学速率常数 $k_2=0.6711 \pm 0.0326 [(\text{g/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$, 高于 BHA ($k_2=0.42 \pm 0.02$) 和 BHT ($k_2=0.05 \pm 0.003$)^[7] (Trolox 与 DPPH·反应的二级反应动力学速率常数 $k_2=1.1681 [(\text{g/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$ (图 5),

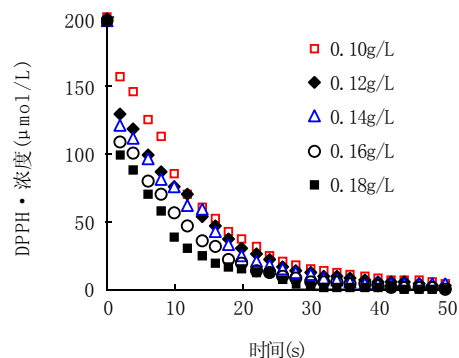


图3 毛樱桃籽脂溶性抗氧化物清除 DPPH·动力学曲线

Fig.3 Kinetic curve of LFP on decay of DPPH·

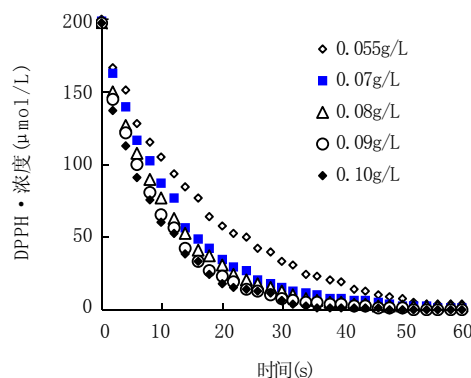


图4 Trolox 清除 DPPH·动力学曲线

Fig.4 Kinetic curve of Trolox on decay of DPPH·

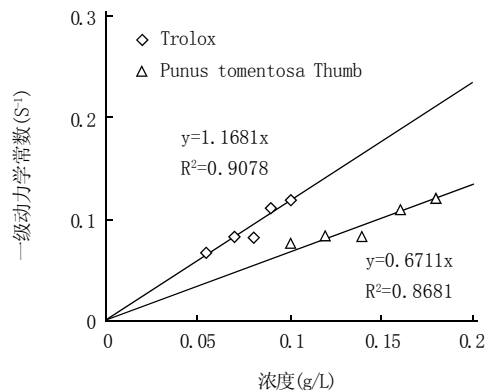


图5 DPPH·清除一级动力学常数—抗氧化物浓度相关曲线

Fig.5 Correlation between the pseudo-first-order rate constants (k_1) and the concentration of antioxidants from LFP

结果表明,单位质量的毛樱桃籽脂溶性抗氧化物含有丰富的清除DPPH·的活性基团,毛樱桃籽脂溶性抗氧化物是一种高效的抗氧化原料,对于毛樱桃籽脂质的深加工和开发具有重要的保质意义。

结合抗氧化物与DPPH·反应的化学当量数 n ,根据公式(6),计算二级反应动力学速率常数 k_2 为 $65.16(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Trolox与DPPH·反应的二级反应动力学速率常数 $k_2=140.73[(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$),表明毛樱桃籽脂溶性抗氧化物的质子供体或活性H原子空间结构非常有利于H供体与DPPH·自由基结合,从而快速淬灭自由基。

2.2 脂溶性抗氧化物成分

取抗氧化物甲醇溶液在GC-MS仪器实验条件下 $0.2\mu\text{l}$ 进样、分离,得总离子流图(图6)。共分离出8个组分,从总离子流图中提取各组分质谱图(图7),经

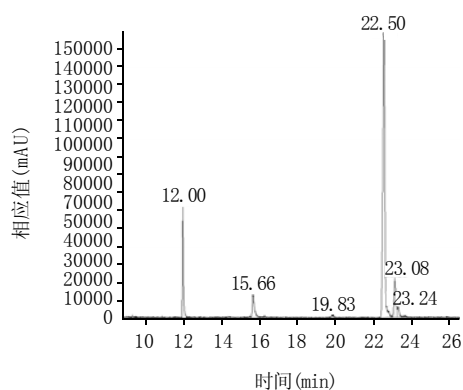


图6 毛樱桃籽脂溶性抗氧化物总离子流图

Fig.6 Total ion chromatography of antioxidants from LFP

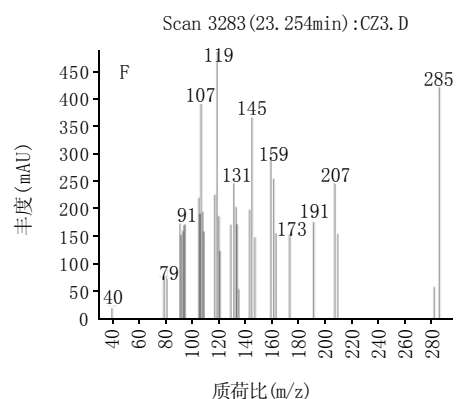
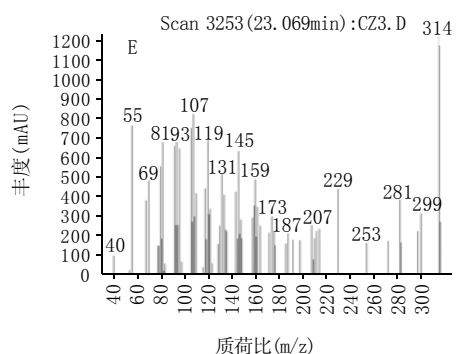
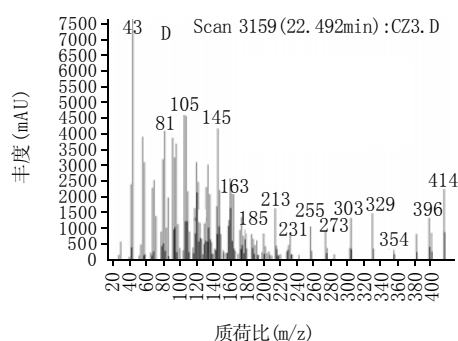
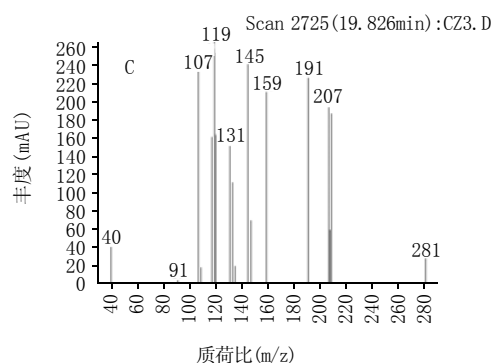
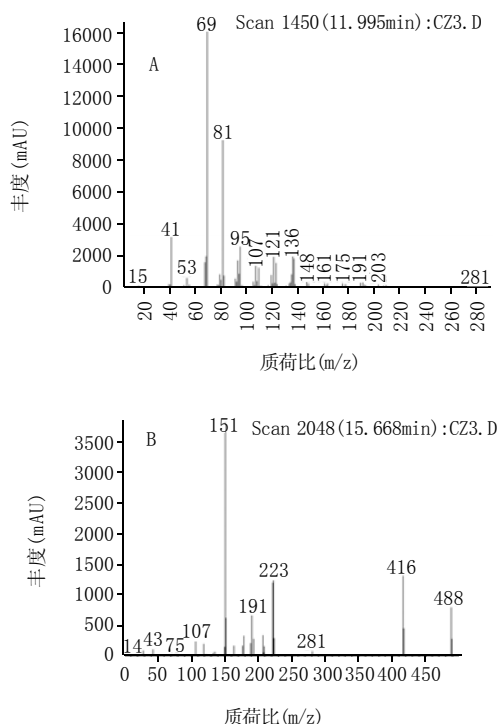


图7 毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分质谱图

Fig.7 Mass spectrum of antioxidants from LFP

用NIST98标准谱库检索并与8峰索引和EPA/NIH质谱图集标准谱图^[8,9]核对,结合人工谱图解析及GC保留指数法数据,确认了毛樱桃籽脂溶性抗氧化物的6种成分,

并用面积归一化法确定了各种成分的相对质量分数, 结果见表 1。

表 1 毛樱桃籽脂溶性抗氧化成分及其含量
Table 1 Composition and content of antioxidants from LFP

保留时间 (min)	化合物名称	相对百分含量 (%)
12.00	角鲨烯(squalene 图7-A)	12.53
15.66	γ -生育酚(γ -tocopherol图7-B)	5.73
19.83	顺- α -古巴烯-8-醇(cis- α -Copaene-8-ol图7-C)	0.88
22.50	γ -谷甾醇(γ -sitosterol 图7-D)	66.12
23.08	视黄酸甲酯(Retinoic acid methyl ester图7-E)	8.91
23.24	愈创醇(champacol 图7-F)	2.00
总和		96.17

角鲨烯(squalene)为长链三萜类化合物, 别名为鲨烯、三十碳六烯、角鲨油素或鱼肝油萜, 化学命名为 2, 6, 10, 15, 19, 23-六甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22-二十四碳六烯。属多不饱和烯烃类, 不饱和双键具有空轨道, 易于接受电子, 很容易结合自由基, 与 DPPH $\cdot$ 结合从而淬灭 DPPH $\cdot$, 显示出极强的抗氧化能力。VE 能通过提供 H 原子生成含大 π 键的稳定的生育醌, 从而将自由基 DPPH $\cdot$ 转变成化学性质不活泼的 DPPHH, 中断连锁反应, 有效抑制 DPPH $\cdot$ 的过氧化作用, 保护不饱和脂肪酸免受氧化损伤, 表现出强烈的抗氧化活性。

有文献报道植物甾醇是一种新型的天然抗氧化剂, 具有抗氧化能力^[10], 通过清除自由基抑制脂质过氧化。毛樱桃籽脂溶性抗氧化物抑制 DPPH $\cdot$ 活性可能也与其所含的 γ -谷甾醇密切相关。

视黄酸甲酯可能是来源于 β -胡萝卜素的衍生物, β -胡萝卜素通过中心裂解生成视黄酸, 1mol β -胡萝卜素可以裂解生成 1.5~2mol 视黄醛, 视黄醛是体外环境 β -胡萝卜素中心裂解的主要产物, 生成视黄醛, 视黄醛又可被还原为视黄醇, 或者被氧化为视黄酸。 β -胡萝卜素也能够直接产生视黄酸, 通过偏心裂解途径产生一系列羰基代谢产物, 即链长变短的 β -脱辅基-胡萝卜醛。 β -脱辅基-胡萝卜醛随后被氧化为相应的 β -脱辅

基-胡萝卜酸, 通过一个类似脂肪酸 β -氧化的过程, β -脱辅基-胡萝卜酸被一步步地转化为视黄酸, β -脱辅基-胡萝卜酸的 β -氧化过程形成视黄酸作为最终的氧化产物^[11]。视黄酸同 β -胡萝卜素一样具有强烈的还原性, 作为链式反应阻断剂, 能有效的清除包括 DPPH $\cdot$ 在内的各种自由基。愈创醇和顺- α -古巴烯-8-醇也含不饱和双键, 具有空轨道, 也易于结合自由基, 与 DPPH $\cdot$ 结合从而淬灭 DPPH $\cdot$, 显示抗氧化能力。

毛樱桃籽脂溶性抗氧化物中的多种成分的协同作用而不是某一种成份的独立作用, 可能是该类物质强烈清除自由基活性的主要原因, 毛樱桃籽脂溶性抗氧化物的清除 DPPH $\cdot$ 活性有助于毛樱桃籽脂质及其副产品的深加工和开发应用。

参考文献:

- [1] 郎兰计, 张志杰, 张清平, 等. 山西水土保持科技[J]. 1995, (2): 25-26.
- [2] 郭明军, 游泳, 高海生, 等. 毛樱桃系列产品开发研制[J]. 中国林副特产, 1994, (2): 27-29.
- [3] Mimica DN, Bozin B, Sokovic M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(9): 2485-2489.
- [4] Bondet V, Brand WW, Berset C. Kinetics and mechanisms of antiradical activity using the DPPH $\cdot$ free radical method[J]. Lebensm-Wiss-Technol, 1997, 30: 609-615.
- [5] Leong LP, Shui G. An investigation of antiradical capacity of fruits in Singapore markets[J]. Food Chemistry, 2002, 76: 69-75.
- [6] Abe N, Hirota A. Chemical studies of the radical scavenging mechanism of bisorbicillinol using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Chem Commun, 2002, (6): 662-663.
- [7] Espin JC, Soler RC, Wlcher HJ, et al. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 1588-1592.
- [8] Fred WM. The Wiley/NBS registry of mass spectral data[M]. A Wiley-Interscience Publication, 1989.
- [9] 丛浦珠, 苏克曼. 分析化学手册(第二版), 第九分册, 质谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [10] Lampi AM, Dimberg LH, Eldin AK. A Study on the influence of fucosterol on thermal polymerisation of purified high oleic sunflower triacylglycerols[J]. J Sci Food Agric, 1999, 79: 572-579.
- [11] 汪之项, 荫士安. β -胡萝卜素转化为维生素A的机制、调节和生物学意义[J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(5): 387-387.