

五种常用香料的抗氧化活性研究

郭德建¹, 仲小青¹, 汪程远¹, 陈舜宏², 余海虎^{2,*}

(1. 香港理工大学深圳研究院, 广东 深圳

518057; 2. 香港理工大学应用生物与化学系, 香港)

摘 要: 用四种不同极性溶剂提取五种常用植物香料, 并用福林-酚法检测提取物总酚含量, 用二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)法检测提取物自由基清除活性, 铁离子还原法检测提取物总还原力, 硫代巴比妥酸(TBA)法检测提取物抑制 Fe^{2+} -半胱氨酸引发的大鼠肝微粒体脂质过氧化作用。结果表明: 丁香石油醚提取物、甲醇提取物、水提取物和肉桂甲醇提取物的总酚含量较高, 其抗氧化活性与常用抗氧化剂——2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)作用相当。总体而言, 高极性溶剂提取物的总酚含量比低极性溶剂提取物的总酚含量高, 抗氧化活性也比低极性溶剂提取物的强。

关键词: 植物香料; 总酚含量; 抗氧化活性

Study on Antioxidant Activities of Five Common Vegetable Spices

GUO De-jian¹, ZHONG Xiao-qing¹, WANG Cheng-yuan¹, CHEN Shun-hong², YU Hai-hu^{2,*}

(1. Shenzhen Research Institute, The Hong Kong Polytechnic University, Shenzhen 518057, China

2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hongkong, China)

Abstract: The total phenolic contents of the extracts from five vegetable spices with 4 different polar solvents were determined by Folin-Ciocalteu's phenol method. The free radical scavenging activities of the extracts were assayed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The total reducing powers of the extracts were tested with ferric reducing antioxidant power (FRAP). The inhibition effects of the extracts on lipid peroxidation of rat liver microsomes induced by Fe^{2+} -cysteine were detected with thiobarbituric acid (TBA). The results showed that methanol extract of *Eugenia caryophyllata* showed the highest total phenolic content and the strongest antioxidant activity among all extracts. The total phenolic content, concentration of 50% DPPH· scavenging, total reducing power, and concentration of 50% inhibition of rat liver microsomes lipid peroxidation induced by Fe^{2+} -cysteine were $724.58 \pm 9.58 \text{ mg/g}$, $1.476 \mu\text{g/ml}$, $6079.64 \pm 105.4 \mu\text{mol/g}$ and $20.48 \mu\text{g/ml}$ respectively. Generally, the total phenolic contents of the extracts with high polar solvents are higher than those of extracts with low polar solvents, and the antioxidant activities are stronger than those of extracts with low polar solvents.

Key words vegetable spices; total phenolic content; antioxidant activity

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0454-04

某些植物香料具有很强的抗氧化活性, 能有效防止食品的氧化酸败^[1-2]。植物香料抗氧化成分一般为挥发性的油类、酚类、黄酮类、萜类、醛类、酮类、酸类、醇类、酯类、生物碱类和不饱和烃类等^[3-4]。这些成分能与氧化性物质作用、或螯合金属离子、或淬灭自由基, 从而阻止其它物质被氧化^[5-6]。在体内, 某些抗氧化物质还能提高机体抗氧化酶的活性, 降低炎症因子的表达, 防止机体因过度氧化反应受损^[7-8]。本研究旨在探讨五种常见植物香料的抗氧化活性及其有效作用部位, 为进一步开发抗氧化植物香料资源提供

科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

五种植物香料购于深圳市医药公司, 由本实验室鉴定(见表1)。

二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)、福林-酚试剂(Folin-Ciocalteu's phenol reagent) Sigma-Aldrich公司; 三吡啶三吡嗪(2,4,6-tripyridyl-s-triazine, TPTZ) Fluka公司; 其余试剂均为分析纯。

收稿日期: 2006-09-07

*通讯作者

基金项目: 深圳市科信局虚拟大学园事业单位切块项目

作者简介: 郭德建(1975-), 男, 助理研究员, 研究方向为中药抗氧化与抗衰老。

表1 五种常见植物香料
Table 1 Five common vegetable spices

香料	英文名	拉丁文名	使用部位
丁香	Clove	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	花蕾
肉桂	Cassia Bark	<i>Cortex Cinnamomi</i> Cassiae	树皮
茴香	Fennelfruit	<i>Fructus Foeniculi</i>	果实
八角	Star Anise Fruit	<i>Fructus Anisi Stellati</i>	果实
花椒	Bunge Pricklyash Peel	<i>Pericarpium Zanthoxyli</i>	果皮

Cobas Fara 离心分析仪 Roche 公司; 紫外-可见分光光度计(PerllinElmer instruments-Lambda 35 UV/VIS spectrometer); LABOROTA 4001 减压旋转蒸发仪 Heidolph 公司。

1.2 方法

1.2.1 香料提取

将香料粉碎, 过10目筛, 取10g粉末装于250ml具塞三角瓶中, 依次用100ml石油醚、乙酸乙酯-氯仿(1:1)、甲醇和水, 室温振荡提取。每种溶剂提取三次, 每次振荡提取24h, 合并三次的提取液, 减压浓缩干燥, 分别得到石油醚提取物(PEF)、氯仿-乙酸乙酯(1:1)提取物(CEF)、甲醇提取物(MEF)和水提取物(WEF)。溶剂回收。

1.2.2 总酚含量测定

采用福林-酚法检测提取物的总酚含量。福林-酚试剂是一种显色剂, 在碱性溶液中, 酚类化合物可以将钨钼酸还原成蓝绿色化合物, 颜色的深浅与酚含量呈正相关, 蓝色化合物在760nm处有最大吸收。以没食子酸作为参照标准, 提取物中总酚含量以等同于没食子酸(gallic acid equivalent)的量表示。将Singleton等人的方法稍加改进^[9]: 150μl适当浓度的提取物溶液与750μl福林-酚试剂反应7~8min, 加入600μl浓度为75.0g/L的Na₂CO₃, 室温反应2h, 检测760nm波长下吸光度。以蒸馏水加相应比例提取物溶液及Na₂CO₃溶液作空白对照。吸光度代入标准曲线的线性回归方程, 计算出样品的总酚含量。每个提取物做六次平行对照, 取平均值。

1.2.3 DPPH·清除活性测定^[10]

DPPH·是一种稳定的自由基, 其甲醇溶液呈紫红色, 在515nm处有最大的吸光度。该方法是基于抗氧化剂清除DPPH·而引起紫红色消褪来定量检测。24mg DPPH·溶于1L甲醇, 0.10ml适当浓度的样品溶液加入装有3.90ml DPPH·溶液的具塞试管中, 摇匀, 反应30min, 以0.10ml样品与3.90ml甲醇混合物为空白对照, 检测在515nm处吸光度(A_s); 同时检测0.10ml样品溶解溶剂与3.90ml的DPPH·混合物的吸光度(A_c)。根据公式计算清除率SR(%):

$$SR(\%) = \frac{1-A_s}{A_c} \times 100$$

适当浓度的样品经梯度稀释, 每个稀释度做六个重复, 以清除率对样品浓度作曲线, 求出DPPH·清除率为50%时对应的样品浓度(SC₅₀), 结果见表3。

1.2.4 总还原力测定

在低pH值下, Fe³⁺与三吡啶三吡嗪复合物(ferric tripyridyltriazine, Fe³⁺-TPTZ)可被还原物质还原为二价铁形式, 呈现出明显的蓝色, 在593nm处具有最大吸收值。根据吸光度的大小计算样品的总还原力^[11]。25.0ml醋酸盐缓冲液(300mmol/L, pH3.6)、2.5ml TPTZ(10mmol/L, 用40mmol/L的盐酸配制)、2.5ml的FeCl₃溶液(20mmol/L)混合, 配成FRAP试剂。所有反应溶液都预热到37℃, 100μl适当浓度的样品和300μl FRAP试剂混合, 37℃反应, 由离心分析仪器检测并计算0~4min内, 反应体系在593nm吸光度的变化值(ΔA_{593nm})。300μl的FRAP溶液和100μl的蒸馏水混合, 作空白对照。结果与Fe²⁺-TPTZ标准溶液比较, 计算生成的Fe²⁺量。

1.2.5 抑制Fe²⁺-半胱氨酸引发的大鼠肝微粒体脂质过氧化物的产生

利用差速离心法制备大鼠肝微粒体^[12]。SD雌性大鼠, 250±20g, 禁食过夜, 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉放血处死, 肝门静脉灌注4℃生理盐水至肝脏呈土黄色。取出肝脏, 用4℃含1.15% KCl的磷酸钾缓冲液(pH7.4)漂洗三次, 吸干, 称重, 剪碎。按1:4(V/W)加入上述缓冲液匀浆, 匀浆液10000×g离心20min, 取上清液, 105000×g离心60min, 收集沉淀, 重新溶于上述缓冲液。以上操作均在低温下进行。Lowry法测蛋白含量, -80℃保存^[13]。

检测提取物对Fe²⁺-半胱氨酸引发的小鼠肝微粒体脂质过氧化反应的抑制作用。将Martinez等人的方法稍做改进^[14]: 肝微粒体用前匀浆, 肝微粒体蛋白终浓度为2.0mg/ml, 硫酸亚铁终浓度为50.0μmol/L, 半胱氨酸终浓度为20.0μmol/L, 样品浓度适中(DMSO终浓度不大于0.1%), 37℃水浴保温60min, 然后立即冰浴, 加17.0%三氯乙酸1ml, 3000r/min离心10min, 取上清液, 加入0.67%硫代巴比妥酸1.0ml, 100℃水浴40min, 流水冷却, 检测535nm处吸光度A_s。等体积的溶剂代替样品, 与上述操作相同, 作为对照组吸光度A_c。反应体系直接冰浴, 加入显色试剂作为空白校正。样品抑制率由下面公式计算:

$$IR(\%) = (1 - \frac{A_s}{A_c}) \times 100$$

样品梯度稀释, 每个稀释度做六个重复, 以清除率对样品浓度作曲线, 计算出抑制率为50%时对应的样品浓度(IC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 总酚含量

五种植物香料提取物的总酚含量测定结果如表 2 所示。

表 2 五种植物香料提取物的总酚含量(均值±标准差, n=6) Table 2 Total phenolic contents of five vegetable spices extracts (Means ± SD, n=6)				
香料	总酚含量(mg/g)			
	石油醚 提取物	氯仿-乙酸乙酯 (1:1)提取物	甲醇提取物	水提取物
八角	N D	56.98±0.96	51.20±2.38	16.84±0.18
丁香	552.77±9.73	117.96±1.09	724.58±9.58	343.09±6.39
花椒	15.64±0.69	70.27±0.53	184.92±2.11	127.23±4.22
茴香	19.98±0.64	22.92±0.48	41.69±0.67	55.29±0.38
肉桂	4.15±0.16	10.67±0.25	527.20±16.62	280.09±3.72

注: ND 表示未检测到终点。

没食子酸水溶液和 DMSO 溶液在 2~10 μg/ml 浓度范围内, 与福林-酚试剂作用后, 吸光度与浓度呈线性关系, 线性回归方程分别为 $y=0.0532x-0.0638$, $R^2=0.9978$; $y=0.0514x+0.0007$, $R^2=0.9999$ 。

如表 2 所示, 有三种提取物的总酚含量大于 500mg/g, 其中丁香 MEF 的总酚含量最高, 为 724.58 ± 9.58mg/g, 肉桂 PEF 的总酚含量最低, 只有 4.15 ± 0.16mg/g。总体上, MEF 和 WEF 的总酚含量高于 CEF 和 PEF 的总酚含量。

2.2 DPPH·清除活性

五种植物香料提取物清除 DPPH·活性的测定结果如表 3 所示。

DPPH·是一种较稳定的自由基。如表 3 所示, 丁香 PEF、MEF、WEF 和肉桂 MEF 清除 DPPH·的活性强于常用抗氧化剂 BHT 的活性; 肉桂 WEF 清除 DPPH·活性比 BHT 活性略低; 丁香 MEF 活性最强, SC₅₀ 为 1.48 μg/ml。总体上, MEF 和 WEF 清除 DPPH·活性明显比 PEF 和 CEF 高。

2.3 总还原力

五种香料提取物总还原力的测定结果如表 4 所示。

表 4 五种植物香料提取物的 FRAP 值(Means ± SD, n=6) Table 4 FRAP values of five vegetable spices extracts(Means ± SD, n=6)				
香料	FRAP(μmol/g)			
	石油醚提取物	氯仿-乙酸乙酯(1:1)提取物	甲醇提取物	水提取物
八角	105.81±3.64	275.79±3.39	376.34±22.81	120.12±6.72
丁香	3636.18±120.73	2341.53±118.68	6079.64±105.4	3448.73±45.08
花椒	102.79±2.96	422.18±9.91	1071.88±12.43	623.75±3.11
茴香	44.29±5.93	102.29±4.36	188.85±12.67	305.18±5.14
肉桂	23.39±0.65	N D	4091.44±115.44	2661.80±21.78
BHT	781.42±7.01			

注: ND 表示活性太低, 未检测到终点。

表 3 五种植物香料提取物清除 DPPH·活性
Table 3 DPPH·scavenging activities of five vegetable spices extracts

香料	SC ₅₀ (μg/ml)			
	石油醚提取物	氯仿-乙酸乙酯 (1:1)提取物	甲醇提取物	水提取物
八角	N D	71.65	54.70	754.81
丁香	3.63	29.28	1.476	2.78
花椒	380.5	83.24	58.84	17.32
茴香	N D	113.4	231.4	162
肉桂	471.02	403.49	1.83	4.98
BHT	4.75			

注: ND 表示活性太低, 未检测到终点。

如表 4 所示, 丁香 PEF、CEF、MEF 和 WEF, 花椒 MEF, 肉桂 MEF, WEF 总还原力均大于 BHT 的还原力。丁香 MEF 的总还原力最强, 为 6079.64 ± 105.4 μmol/g; 肉桂 PEF 的总还原力最弱, 为 23.39 ± 0.65 μmol/g。总体上, MEF 和 WEF 的总还原力比 CEF 和 PEF 的总还原力强。

2.4 抑制 Fe²⁺-Cys 诱导大鼠肝微粒体脂质过氧化作用

表 5 五种植物香料提取物抑制 Fe²⁺-Cys 诱导的大鼠肝微粒体脂质过氧化作用
Table 5 Inhibition effects of five vegetable spices extracts on rat liver microsomes lipid peroxidation induced by Fe²⁺-Cys

香料	IC ₅₀ (μg/ml)			
	石油醚提取物	氯仿-乙酸乙酯 (1:1)提取物	甲醇提取物	水提取物
丁香	21.08	898.14	20.48	52.37
茴香	N D	987.30	963.69	435.483
肉桂	N D	572.45	78.56	339.67
花椒	N D	298.7	254.06	627.4
八角	521.6	326.76	1204.51	460.2
BHT	116.38			

注: ND 表示活性太低, 未检测到终点。

如表 5 所示, 丁香 PEF、MEF、WEF 和肉桂 MEF 抑制 Fe²⁺-Cys 诱导的大鼠肝微粒体脂质过氧化活性均比 BHT 的活性强。所有提取物中, 丁香 MEF 显示了最强的抑制活性, IC₅₀ 为 20.48 μg/ml。

3 结 论

丁香四种不同极性溶剂的提取物都显示了较强的抗氧化活性(CEF抑制 Fe^{2+} /Cys诱导的大鼠肝微粒体脂质过氧化活性除外),这表明丁香具有多种不同极性的抗氧化物质。肉桂的抗氧化物质主要集中在甲醇提取部位,说明肉桂主要含极性的抗氧化物质。

丁香的PEF、MEF、WEF和肉桂MEF总酚含量较高,抗氧化活性也强,而八角、花椒和茴香的抗氧化活性则较低。多酚类化合物是多数植物抗氧化活性的主要成分,其含量与提取物的抗氧化活性呈显著的相关性^[15-16]。多酚类化合物的酚羟基是这些化合物抗氧化的活性基团^[17]。多酚类化合物通常极性较高,因此,一般植物的抗氧化物质主要集中在极性较强的提取部位。食品工业往往只选用低极性的挥发油部位作调味或其它用途,而主要的抗氧化部位则废弃,造成了资源浪费。可以考虑植物香料在提取挥发油后,继续用较高极性溶剂,如乙醇-水等提取抗氧化物质,从而更好的利用资源。

化学合成的抗氧化剂对人体健康有潜在危害,应用越来越受到限制^[18]。天然植物香料安全、无毒,不但具有特殊的香味,而且还有强的抗氧化活性,可广泛应用于食品、药品和化妆品^[19]。它们既能赋予食品特殊的香味,又能防止食品氧化变质。有研究表明:摄入适当的植物抗氧化剂,有助于改善人体的抗氧化状况,预防因氧化引起的相关疾病^[20]。肉桂、丁香等植物香料含有丰富的抗氧化物质,在膳食中适当添加这些香料或提取物,不但能增加食物的风味,还有助于预防因氧化引起心血管等疾病,增进健康。

参考文献:

- [1] MARTINEZ-TOME M, JIMENEZ A M, RUGGIERI S, et al. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives[J]. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(9): 1412-1419.
- [2] LOPEZ-BOTE C J, GRAY J I, GOMAA E A, et al. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat[J]. *British Poultry Science*, 1998, 39(2): 235-240.
- [3] SHAN B, CAI Y Z, SUN M, et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(20): 7749-7759.
- [4] NAKATANI N. Antioxidants from spices and herbs[J]. *Furi Rajikaru no Rinsho*, 1996(10): 41-47.
- [5] SRINIVASAN K. Role of spices beyond food flavoring: utraceuticals with multiple health effects[J]. *Food Reviews International*, 2005, 21: 167-188.
- [6] 王爱云, 李春华. 食用香料植物的开发利用研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 300-302.
- [7] WU A, YING Z, GOMEZ-PINILLA F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition[J]. *Experimental Neurology*, 2006, 197(2): 309-17.
- [8] BISWAS S K, MCCLURE D, JIMENEZ L A, et al. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(1/2): 32-41.
- [9] SINGLETON V L, OORTHOFFER R, LAMUELA R, et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. *Methods in Enzymology (Oxidants and Antioxidants) Part A*, 1999, 299: 152-178.
- [10] NAIK G H, PRIYADARSINI K I, SATAV J G, et al. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(1): 97-104.
- [11] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [12] SLATER T F, SAWYER B C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fractions *in vitro*[J]. *Biochemical Journal*, 1971, 123: 805-814.
- [13] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [14] MARTINEZ L A, RIOS J L, PAYA M, et al. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1992, 12(4): 287-292.
- [15] NAKATANI N. Phenolic antioxidants from herbs and spices[J]. *BioFactors*, 2000, 13(1~4): 141-146.
- [16] SONG Y Y, PHILIP J B. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88: 411-417.
- [17] ZHANG H Y. Theoretical elucidation of structure-activity relationships of flavonoid antioxidants[J]. *Science in China series B*, 1999, 42: 106-112.
- [18] 郑裕国, 王远山, 薛亚平. 抗氧化剂的生产及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 411.
- [19] JESSIE S W, KRISHNAKANTHA T P. Inhibition of human platelet aggregation and membrane lipid peroxidation by food spice, saffron[J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 278(1~2): 59-63.
- [20] LAMPE J W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70: 475-490.