

自然存放条件下沙棘果浆中抗氧化物质的变化

顾 恒,张 浩*,陈 雏
(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

摘要: 目的 考察自然存放条件下沙棘果浆中主要抗氧化物质的变化。方法 将不同存放时间的沙棘果浆制成样品溶液,分别用分光光度法测定总黄酮含量,DPPH法测定清除自由基活性,HPLC法测定黄酮类成份、抗坏血酸的含量,测定样品溶液pH。结果 存放过程中,总黄酮与抗坏血酸的含量逐渐降低;清除 DPPH自由基活性降低;pH先降后增,30 d时有一最低值。结论 实验结果可作为沙棘的食品、药品工业生产的参考。

关键词: 沙棘;抗氧化物质;存放;高效液相色谱;DPPH试剂

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006 - 0103(2009)04 - 0337 - 03

The change of the antioxidants in Hippophae rhamnoides subsp. L. Sinensis Rousi slurry during natural storage

GU Heng, ZHANG Hao*, CHEN Chu

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the content change of antioxidants in sea buckthorn berry slurry that preserved at room temperature. **METHODS** Samples obtained at different storage time were prepared with appropriate methods. The total flavonoid concentration (TFC) was determined by ultraviolet spectrophotometry (UV). Content of flavonoid constituents and ascorbic acid (AA) was analyzed by HPLC. The antioxidative capacity was determined by DPPH free radical - scavenging assay. pH value of the sample solution was recorded by pH meter. **RESULTS** AA concentration and TFC were gradually decreased during the storage. Antioxidative activity that expressed as AA equivalents per 100 g of homogenate (AEAC) was decreased during the preservation. The pH value of the extract solution decreased at first, reached its lowest value at the end of 30th day, and then increased. **CONCLUSION** The results of the experiment will provide reference for the production of sea buckthorn.

Key words: Hippophae rhamnoides; Antioxidants; Preservation; HPLC; DPPH reagent

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2009)04 - 0337 - 03

沙棘属植物是胡颓子科的落叶灌木或乔木,其果实含有大量的酚酸类、抗坏血酸(AA)、类胡萝卜素、生育酚等成分,具有较强的抗氧化性;有清除超氧阴离子自由基、羟基自由基、减少脂质过氧化自由基、抑制脂质过氧化等作用。文献^[1]发现,沙棘果汁中酚酸类化合物对总抗氧化活性的贡献率不到5%,而AA对总抗氧化活性的贡献率约75%。AA是沙棘果汁中主要的抗氧化物质。自然存放条件下,存放时间对沙棘抗氧化活性的影响还未见报道。因此,作者对自然存放过程中,沙棘果浆所含抗氧化物质的变化进行了研究。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

抗坏血酸(AA)、槲皮素、山奈素和异鼠李素对照品(中国药品生物制品检定所);其余对照品(自

制,纯度>97%,表2;乙腈(Tedia公司);DPPH试剂(Sigma公司);甲醇为色谱纯;去离子水为双蒸水;其余试剂为分析纯;沙棘果实于2007年9月采自四川省宝兴县夹金山,经张浩教授鉴定为中国沙棘 *Hippophae rhamnoides* subsp. L. *Sinensis* Rousi,果实清洗晾干后密封于塑料瓶中,储藏于-20℃下,凭证标本储藏于四川大学华西药学院标本馆。LC-10ATyp高效液相色谱仪(日本岛津);色谱柱为Shim-Pack VP-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),保护柱(7.5 mm×4.6 mm,5 μm);TU1810紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);FD-1型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);KQ2200超声波清洗器(昆山市禾创超声仪器有限公司)。

1.2 方法与结果

1.2.1 样品的制备 称量80 g沙棘果实,用搅拌

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:30472153);四川省科技富民强县专项行动计划:道孚县沙棘科技示范基地建设

作者简介:顾恒(1983-),女,正攻读生药学专业的硕士学位。

*通讯作者(Correspondent author), Email: zhanghxx@vip.sina.com

机匀浆,均分成 12 份密封于灭菌安瓿中,常温下避光存放。存放时间为 2008 年 5 月 7 日至 8 月 5 日,成都日平均温度为 15 ~ 30 。12 个样品于 0、10、20、30、60、90 d 取出,每个时间点取出两瓶,保存于 - 20 下。将 12 个样品加入冻干后,得到的粉末分别过 24 目筛。精确称量约 120 mg 沙棘果粉于 50 ml 磨口锥形瓶,加入 20 ml 80% 甲醇,密塞并称定重量,浸泡过夜;超声提取 30 min,80% 甲醇补失重量,用滤纸过滤。续滤液用于 UV 测定 TFC, DPPH 法定清除自由基的活性;另取 2 ml 续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,用 HPLC 法测定黄酮类成分的含量。精确称量约 50 mg 果粉于 50 ml 磨口锥形瓶中,加入 10 ml 去离子水,密塞并称定重量,超声提取 15 min,去离子水补失重量,滤纸过滤,取 2 ml 续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,用 HPLC 法测定 AA 含量,剩余续滤液用于 pH 测定。

1.2.2 UV 测定 TFC 参照 2005 年版《中国药典》中沙棘总黄酮的测定方法采用亚硝酸钠 - 硝酸铝比色法测定。配制 0.328 mg·ml⁻¹ 芦丁对照溶液。分别用移液管量取 0.05、1.5、2.5、3.0、3.5、4.0 ml 于 25 ml 量瓶中,按照《中国药典》方法,在 500 nm 处测定吸光度。标准曲线为: $Y = 0.0823X - 0.0041$ ($r^2 = 0.9998$),线性范围为 3.12 ~ 8.27 mg。其精密密度为 1.96% ($n = 6$),重复性为 2.20% ($n = 6$),回收率为 96.77% ($n = 6$);取常温下避光放置 0 d 的样品,于 0、2、4、8、24 h 测定,其 $RSD = 2.94\%$,样品在 24 h 内稳定。精密量取 2 ml 沙棘果粉 80% 甲醇提取液于 25 ml 量瓶中,按照《中国药典》方法,对样品吸光度分别进行测定。每个样品重复测定 3 次(表 1)。

1.2.3 DPPH 法测定清除自由基的活性 精密称定 8.3 mg DPPH 于 25 ml 量瓶中,用色谱甲醇定容,放置。取 10 ml DPPH 溶液于 100 ml 量瓶中,用甲醇定容。取 20 μl 果粉提取液,加入 3.5 ml 配好的 DPPH 溶液,混合均匀,在 517 nm 处,分别在 0、1、5 min 时,测定吸光度值,然后每隔 10 min 测定 1 次,至吸光度不再变化。每个样品重复测定 3 次。 $AEAC[mg \cdot (100g)^{-1}] = \Delta A / \Delta A_{AA} \times C_{AA} \times V \times 100 / w$ 计算。 ΔA 为加入样品后吸光度的变化, C_{AA} 为 AA 标准溶液浓度 ($mg \cdot ml^{-1}$), ΔA_{AA} 为加入与样品溶液相同体积的 AA 标准溶液后, DPPH 溶液吸光度的变化, V 为提取液的体积, w 为提取的沙棘果实的质量^[2]。

1.2.4 HPLC 法测定黄酮类成份的含量 流动相 A 为 0.4% 磷酸, B 为乙腈;洗脱梯度 0 ~ 15 min, B 为 8% ~ 15%; 15 ~ 30 min, B 为 15% ~ 20%; 30 ~ 50 min, B 为 20% ~ 35%; 50 ~ 60 min, B 为 35% ~ 23%; 60 ~ 70 min, B 为 23% ~ 8%, 流速 1 ml·min⁻¹;柱温 30 ;检测波长 360 nm;进样量 10 μl^[3]。每样品平行进样 3 次。

1.2.5 HPLC 法测定 AA 的含量 流动相为乙酸 - 甲醇 (98 : 2, pH 3.5);流速 0.8 ml·min⁻¹;检测波长 246 nm;柱温 30 ;进样量 5 μl,测定时间 15 min^[4]。每个样品平行进样 3 次。精确称取 25.0 mg AA 于 50 ml 量瓶中,用去离子水定容得对照溶液,分别稀释至 100、50、25、12.5、6.3 μg·ml⁻¹,分别进样测定。计算得标准曲线为: $Y = 0.1X + 2.6 \times 10^3$ ($r^2 = 0.9998$),线性范围为 0.19 ~ 2.61 mg。本方法精密密度为 2.27% ($n = 6$),重复性为 3.58% ($n = 6$),回收率为 96.37%。稳定性的测定,取 0 d 于常温避光放置的样品,经过 2 h, AA 的含量减少 4.10%。样品在 2 h 内基本稳定,所有样品在制样后 2 h 内测定完毕。

1.2.6 样品 pH 的测定 配制 pH 4.0 (25) 的邻苯二甲酸氢钾缓冲溶液,校正 pH 计,测定果粉水提液的 pH。每样品平行测定 3 次。所有样品在制样后 2 h 内测定完毕。实验结果见表 1、2 及图 1、2。

表 1 存放过程沙棘果浆中 TFC、AA 含量、AEAC 活性及 pH 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Change of TFC, AA concentration, AEAC and pH value during preservation in Hippophae rhamnoides ($\bar{x} \pm s, n = 6$)				
T/d	TFC/mg·(100 g) ⁻¹	AEAC/mg·(100 g) ⁻¹	AA/mg·(100 g) ⁻¹	pH
0	1199.7 ± 10.1	1457.6 ± 9.4	922.1 ± 7.3	2.19 ± 0.02
10	985.6 ± 5.9	1371.5 ± 9.6	608.7 ± 8.3	2.20 ± 0.01
20	1072.1 ± 7.2	1448.9 ± 5.1	561.8 ± 3.3	2.00 ± 0.01
30	821.4 ± 4.2	1218.1 ± 7.3	243.2 ± 4.7	1.98 ± 0.01
60	710.4 ± 5.2	1080.5 ± 3.5	174.7 ± 0.4	2.57 ± 0.02
90	691.1 ± 5.7	924.4 ± 4.4	98.5 ± 1.3	2.85 ± 0.02

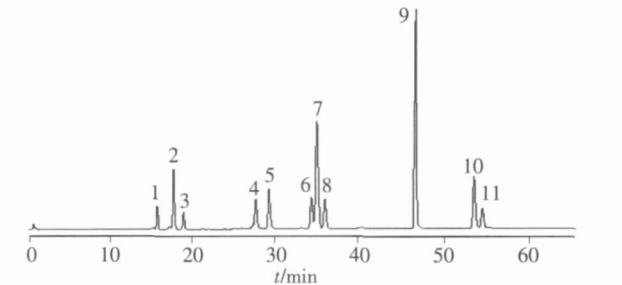


图 1 黄酮类成分对照品 HPLC 谱图
Fig 1 HPLC spectrum of reference substances of flavonoids

表 2 HPLC测定沙棘果浆中几种黄酮类化合物含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Table 2 Concentration of flavonoid constituents from Hippophae rhamnoides determined by HPLC at different preservation time ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Peak No.	Content/mg·(100 g) ⁻¹						Equation	r
	0 d	10 d	20 d	30 d	60 d	90 d		
1	31.900±0.160	31.330±0.440	32.320±0.250	27.710±0.170	24.300±0.370	20.960±0.590	Y=9.608×10 ³ X+3.421×10 ³	0.9993
2	19.720±0.330	18.100±0.100	20.440±0.050	18.180±0.290	15.860±0.490	15.780±0.050	Y=1.086×10 ⁴ X+9.890×10 ³	0.9998
3	12.010±0.470	11.350±0.670	14.880±0.220	21.450±0.360	22.890±0.120	18.290±0.050	Y=1.088×10 ⁴ X+2.113×10 ³	0.9999
4	44.050±0.470	37.540±0.360	34.700±0.270	15.560±0.390	5.440±0.050	—	Y=1.584×10 ⁴ X+1.785×10 ⁴	0.9998
5	19.790±0.160	—	—	—	—	—	Y=1.860×10 ⁴ X+1.350×10 ⁴	0.9995
6	9.640±0.620	1.730±0.060	—	—	—	—	Y=1.994×10 ⁴ X+5.631×10 ³	0.9997
7	50.350±0.700	11.310±0.120	4.790±0.090	—	—	—	Y=1.577×10 ⁴ X+3.435×10 ⁴	0.9994
8	16.000±0.270	5.450±0.010	4.300±0.050	—	—	—	Y=2.361×10 ⁴ X+1.936×10 ⁴	0.9999
9	—	0.287±0.007	0.314±0.001	0.337±0.001	0.355±0.009	0.417±0.007	Y=4.581×10 ⁶ X-1.036×10 ⁵	0.9998
10	—	0.049±0.001	0.054±0.001	0.054±0.001	0.068±0.002	0.144±0.012	Y=4.258×10 ⁶ X-6.658×10 ³	0.9993
11	—	0.257±0.006	0.319±0.001	0.336±0.019	0.452±0.004	0.622±0.013	Y=4.302×10 ⁶ X+6.487×10 ⁴	0.9993

“—” means under the detection limits; 1. quercetin - 3 - O - sophorose - 7 - O - rhamnose, 2. kaempfer - ol - 3 - O - sophorose - 7 - O - rhamnose, 3. isorhamnetin - 3 - O - sophorose - 7 - O - rhamnose, 4. isorhamnetin - 3 - O - gluc - oside - 7 - O - rhamnose, 5. quercetin - 3 - O - rutinoside, 6. quercetin - 3 - O - glucoside, 7. isorhamnetin - 3 - O - rutinoside, 8. isorhamnetin - 3 - O - glucoside, 9. quercetin, 10. kaempferol, 11. isorhamnetin

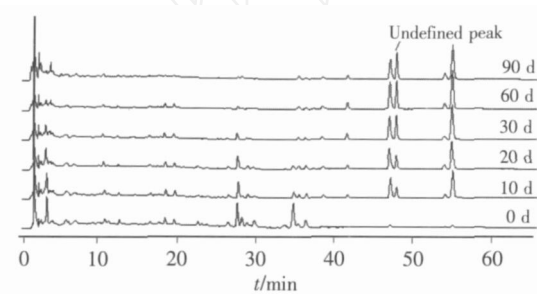


图 2 不同存放时间沙棘果浆中所含黄酮类成分的 HPLC 谱图

Fig 2 HPLC spectrum of flavonoids of Hippophae rhamnoides slurry at different preservation time

2 讨论

存放过程中,沙棘果浆的变化总趋势为:TFC和AA含量逐渐降低,AEAC逐渐降低,pH增高。存放中,黄酮糖苷类在酶的作用下水解成为黄酮苷元。由图 2可知,自然存放过程中槲皮素、山奈素、异鼠李素及一未知化合物($t_R = 47.62\text{ min}$)含量在不断增加,黄酮苷 4、5、6、7、8的含量在逐渐降低,到 90 d 时,几乎只剩下槲皮素、山奈素、异鼠李素、未知化合物以及微量的 1、2、3化合物。未知化合物有待进一步分离鉴定。AA 在自然存放过程中被氧化分解,含量逐渐减少。pH 先降低后增加,30 d 时有一最低值;沙棘果浆中 AA 的含量不断降低,造成 pH 先降低后升高,可能是沙棘果浆中其他酸性物质如有机酸等含量变化引起的,还需进一步的研究。90 d

时,AEAC减小为 0 d 的 63%,而 90 d 时 AA 含量减少为 0 d 的 11%,AEAC 和 AA 含量减小比例不一致。这可能因为黄酮糖苷水解成黄酮苷元后,位阻降低导致抗氧化能力升高;且黄酮糖苷水解成黄酮苷元后母核上 -OH 基团数增多,提供质子能力升高,抗氧化能力增强的缘故^[5]。黄酮糖苷水解成苷元导致的 AEAC 增强与 AA 含量降低导致的 AEAC 减小相耦合,造成 AEAC 变化总趋势降低,但是降低幅度比 AA 小。

参考文献:

[1] Daniel R,Meike B,Dietrich K, *et al* Structure - antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice[J]. Agric Food Chem, 2003, 51 (15): 4233 - 4239.

[2] Leong LP, Shui G An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets[J]. Food Chem, 2002, 76 (1): 69 - 75

[3] Chu C, Hao Z, Wei X, *et al* High - performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries[J]. Chromatogr A, 2007, 1154 (1): 250 - 259.

[4] 成志强,孙成均,黎源倩.反相高效液相色谱法同时测定食品和多维片中 8 种水溶性维生素[J].分析化学研究简报, 2001, 29 (9): 1068 - 1071.

[5] Catherine A, Rice Evans, Nicholas J, *et al* Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20 (7): 933 - 956.

收稿日期: 2008 - 11