

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.02.028

索氏提取与水蒸气蒸馏提取对丁香油抗氧化及抑制 LDL 氧化能力的影响

The effects of the antioxidant activity and inhibition on LDL oxidation of clove oil extracted by soxhelt and steam distillation methods

李学进¹ 熊一凡^{1,2} 郑昌鸿¹ 杨莉萍¹
 LI Xue-jin¹ XIONG Yi-fan^{1,2} ZHENG Chang-hong¹ YANG Li-ping¹
 陈慧¹ 刘常金^{1,2,3} 江慎华^{1,2,3}
 CHEN Hui¹ LIU Chang-jin^{1,2,3} JIANG Shen-hua^{1,2,3}

(1. 九江学院医学部, 江西 九江 332000; 2. 九江安德和生物科技有限公司, 江西 九江 332000;

3. 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

(1. School of medicine, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China;

2. Jiujiang Andeh Biotechnology Co., Ltd., Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China;

3. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

摘要:采用分光光度法和荧光分析法对这 2 种丁香油的抗氧化活性及抑制 LDL 氧化修饰能力进行了比较。结果表明,水蒸气蒸馏丁香油 (COESD) 的 DPPH 自由基清除率、总还原力、总抗氧化能力及 FRAP 法抗氧化能力均显著强于索式提取的 (COESM) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);通过对 LDL 氧化过程中 Trp 荧光淬灭、脂褐素及总荧光产生量、MDA 修饰 Lys 残基荧光变化和全波长扫描比较,COESD 的抑制能力也强于 COESM 的;有效成分含量分析表明 COESD 比 COESM 含有更高的抗氧化活性物质总多酚及总黄酮。

关键词:丁香油;索式提取;水蒸气蒸馏提取;抗氧化;低密度脂蛋白

Abstract: The comparison of antioxidant activity and inhibition efficiency on LDL oxidation of two kinds of clove oil were studied

by spectrophotometry and fluorescence analysis in this study. The results showed as follows. The scavenging ability on DPPH radicals, total reducing and antioxidant capacities, ferric reducing antioxidant power of COESD were significantly stronger than those of COESM ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). During LDL oxidation, the inhibition effect of COESD on tryptophan (Trp) fluorescence quenching, the formation of total fluorescence products and lipofuscins, lysine (Lys) modification detected by MDA and UV-Visible scanning spectra were also better than those of COESM. The results of active component content analyses showed that COESD contained more total polyphenols and flavonoids than COESM. This study provided the reference for further research and development of clove oil.

Keywords: clove oil; clove oils extracted by soxhelt methods; clove oils extracted by steam distillation; antioxidant activity; low density lipoprotein

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360371);江西省科技支撑计划(编号:20151BBF60026);江西省重点研发计划(编号:20171BBF60049,20181BBH80010);江西省教育厅科技项目(编号:GJJ161080,GJJ 161081);江西省天然产物与功能食品重点实验室开放基金资助项目;九江学院教学改革研究课题(编号:2015-04);九江学院人才引进基金(编号:2010-1)

作者简介:李学进,男,九江学院讲师,硕士。

通信作者:江慎华(1973—),男,九江学院教授,博士后。

E-mail:jiangshenhua66@163.com

收稿日期:2018-07-19

丁香是桃金娘科药用植物丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) 的干燥花蕾^[1-2],具有抗菌、抗病毒、抗氧化、消炎和抗癌等特性^[3]。丁香的主要化学成分分为两类:非挥发性成分和挥发性成分。非挥发性成分主要包括鞣质、多酚、黄酮类化合物等^[4]。挥发性成分以丁香油为主,其含量高达 21.3%^[5],具有很强的抗菌、抗氧化活性^[6]。

植物油脂的提取方式较多,如水蒸气蒸馏提取法、超

临界二氧化碳萃取法、压榨提取法、索式提取法等^[3,7]。其中,水蒸气蒸馏法和索式提取法是实验室最普遍使用的 2 种方法。Hadi^[5]使用正己烷和苯对丁香花蕾中的油进行索式提取;Guan 等^[8]优化了超临界二氧化碳萃取丁香精油的提取工艺,并与水蒸气蒸馏法、索式提取法等方法提取得到的丁香油组成成分进行了比较与分析。虽然国内外学者^[5,8-9]采用这 2 种方法对丁香油进行了提取,但是,在这 2 种常用的提取方法中,究竟哪种方法提取效果更好,哪种方法提取所得丁香油脂的抗氧化活性及抑制 LDL 氧化效果更好,目前尚不清楚。因此,本试验拟分别采用水蒸气蒸馏法和索式提取法提取丁香油,进而对这 2 种丁香油脂抗氧化能力、抑制 LDL 氧化能力及抗氧化物质含量进行了比较,确定丁香油更优的提取方法,以期为后续丁香油脂产业化开发提供思路。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂

丁香:产自中国广西,江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,粉碎过 60 目筛后冷藏备用;

LDL:采用刘仁绿等^[10]的方法自血浆中分离得到,以牛血清白蛋白为标准品,采用 Lowry 法^[11]测定蛋白浓度来定量 LDL 浓度;

肝素钠:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

其他化学试剂为分析纯或优级纯。

1.2 主要仪器设备

荧光磷光分光光度计:LS-55 型,美国 Perkin Elmer 公司;

pH 计:PB-10 型,赛多利斯科学仪器有限公司;

紫外可见分光光度计(双光束):TU-1901 型,北京谱析通用仪器有限责任公司;

可见分光光度计:UNIC 7200 型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

高速万能粉碎机:DFY-300 型,温岭市林大机械有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 丁香油提取

(1) 水蒸气蒸馏法:参考岳晓霞等^[12]的方法,略作修改。称取丁香粉末 50 g,加入到 1 000 mL 圆底烧瓶中,加 700 mL 蒸馏水,沸腾后开始计时,水蒸气蒸馏提取 6 h,采用石油醚从收集液中萃取出丁香油,用无水硫酸钠干燥后获得水蒸气蒸馏丁香油(clove oils extracted by steam distillation,COESD),称重,按式(1)计算得率。

$$c = \frac{v_1}{v_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——得率,%;

v_1 ——水蒸气蒸馏丁香油容积,mL;

v_2 ——提取液容积,mL。

(2) 索式提取法:在 Li 等^[13]的方法基础上,略作修改。称取丁香粉末 50 g,用滤纸包裹严实后置索氏提取器中,加 400 mL 石油醚于 1 000 mL 圆底烧瓶中,采用索式提取法提取 6 h,沸腾后开始计算时间,蒸干石油醚得到丁香油,无水硫酸钠干燥后获得索式提取丁香油(clove oils extracted by soxhelt methods,COESM),称重,按式(2)计算得率。

$$c = \frac{v_1}{v_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

c ——得率,%;

v_1 ——索式提取丁香油容积,mL;

v_2 ——提取液容积,mL。

1.3.2 COESD 及 COESM 抗氧化能力的比较 将 COESD 及 COESM 配制成相应浓度,空白对照组用甲醇代替丁香油,阳性对照以相同浓度 V_c 和 2,6-二叔丁基对甲酚(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol,BHT)代替丁香油样液,进行相同操作。分别对样品清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl,DPPH)自由基能力、总抗氧化能力、总还原力和铁离子还原/抗氧化能力(Ferric reducing ability of plasma,FRAP)进行测定,以比较和评价这 2 种方法对丁香油的提取得率及其抗氧化及抑制 LDL 氧化功能活性的影响。

(1) DPPH 自由基清除能力:采用江慎华等^[14]的方法,略作修改。取 0.5 mL 不同浓度样液(6.250 0,12.500 0,25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)同 0.100 mmol/L DPPH 溶液 1.0 mL (现用现配)混合均匀,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 60 min,在 517 nm 波长下测吸光值,以甲醇代替样液调零,操作中避光。空白对照组以同等体积甲醇代替样液执行相同操作。阳性对照组分别用相同浓度 V_c 和 BHT 代替样液执行相同操作,清除率越高、抗氧化能力越强。DPPH 自由基清除率按式(3)计算:

$$Y = \frac{A - B}{A} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

Y ——抑制率,%;

A ——空白对照样 517 nm 吸光值;

B ——不同浓度样品 517 nm 吸光值。

(2) 总还原力:采用江慎华等^[14]的方法,稍有修改。量取不同浓度样液(50.000,100.000,200.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)0.500 mL 加入试管中,依次加入 1.250 mL pH 6.6 磷酸缓冲液(0.200 mol/L)和 1.250 mL 铁氰化钾溶液(1%),50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后迅速冷却,再依次加入 10%三氯化铁溶液 1.250 mL、蒸馏水 4.25 mL、0.1%三氯化铁溶液

0.85 mL,振荡均匀后静置 10 min,在 700 nm 下比色测定,吸光值越高、抗氧化能力越强。

(3) 总抗氧化能力:采用江慎华等^[14]的方法,略作修改。取不同浓度样液(100,150,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入试管中,再加终浓度 0.600 mol/L 硫酸、28.000 mmol/L 磷酸钠和 4.000 mmol/L 钼酸铵混合液 4 mL,振荡均匀后于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 90 min,取出后冷却至室温,在 695 nm 处测吸光值。

(4) FRAP 法抗氧化能力:采用刘梦莹等^[15]的方法略作修改。取 100 μL 不同浓度(12.5,25.0,50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 样液与 FRAP 混合液振荡均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 min 后,在波长 593 nm 测吸光值。FRAP 混合液配制方法:将 pH 3.6 乙酸钠缓冲液(0.300 mol/L)、10.000 mmol/L TPTZ 溶液和 20.000 mmol/L 三氯化铁按体积比 10:1:1 混匀,现用现配。TPTZ 溶液采用 40.000 mmol/L 优级纯 HCl 为溶剂溶解、定容。

1.3.3 抑制 LDL 氧化修饰能力

(1) LDL 氧化修饰孵育:LDL 氧化修饰孵育体系参考文献^[16](LDL 及各种试剂浓度均为混合体系中的终浓度)。丁香油样品组:取 4.9 mL LDL 溶液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液(1.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 50 μL ,分别加 50 μL 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 48 h 后测定以下指标以比较 2 种油对 LDL 氧化修饰的抑制效果。

(2) 阻止 LDL 氧化修饰过程中色氨酸(Trp)荧光淬灭:采用 Chen 等^[17]方法,按 1.3.3(1)方法孵育,在激发波长(Ex)295 nm /发射波长(Em)330 nm 处测定荧光强度以比较抑制效果。

(3) 阻止 LDL 氧化修饰产生脂褐素能力:采用 Yang 等^[18]方法,按 1.3.3(1)方法孵育,在 Ex 350 nm / Em 460 nm 处测定荧光强度以比较抑制效果。

(4) 阻止 LDL 氧化修饰产生总荧光产物:采用 Cominacini 等^[19]的方法。按 1.3.3(1)方法孵育,在 Ex 360 nm/Em 430 nm 处测定荧光强度以比较抑制效果。

(5) LDL 脂质氧化产物修饰赖氨酸(Lys)残基荧光变化:采用 Picard 等^[20]的方法。按 1.3.3(1)方法孵育,在 Ex 390 nm/ Em (410~550) nm 内扫描,测定荧光光谱以比较抑制效果。

(6) 通过紫外、可见全波长扫描比较抑制效果:采用 Esterbauer 等^[21]的方法,略作修改。按 1.3.3(1)方法孵育反应体系,在波长 200~750 nm 内扫描以反映抑制效果差别。

1.3.4 COESD 及 COESM 抗氧化有效成分含量的比较

(1) 总多酚含量:采用江慎华等^[22]和熊一凡等^[16]的方法,略作修改。将 Folin 试剂原液用水稀释 10 倍,配制

标准品没食子酸浓度分别为 150.000,100.000,50.000,25.000,12.500,6.250,3.125,0.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 个样液。取稀释后的 Folin 试剂 2.250 mL,加入 0.5 mL 不同浓度没食子酸和 100.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 种丁香油,然后加入 6% Na_2CO_3 溶液 2.25 mL、振荡均匀,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 90 min 后于 765 nm 读数,根据浓度与吸光度值之间的相关性,确定标准曲线方程为: $Y=0.012 4X-0.015$ ($R^2=0.998 8$)。

以丁香油代替没食子酸执行相同操作测定其总多酚含量。

(2) 总黄酮含量:采用江慎华等^[22]的方法,略作修改。将标准芦丁配成质量浓度分别为 1 000.000,800.000,600.000,400.000,200.000,100.000,50.000,0.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 8 个样液。取去离子水 2.25 mL 加入 0.5 mL 不同质量浓度的标准品芦丁溶液和 4 000.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 种丁香油,然后加入 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.3 mL,振荡均匀、静置 5 min 后,加 1.000 mol/L NaOH 溶液 1.000 mL,振荡均匀后在 510 nm 读数,确定标准曲线方程为: $Y=0.001 1X-0.021$ ($R^2=0.999 3$)。

以丁香油代替芦丁执行相同操作测定总黄酮含量。

1.3.5 数据处理 采用 DPS 7.05 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 COESD 及 COESM 得率的比较

由图 1、2 可见,COESD 外观色泽清亮、透明,得率为 17.79%。而 COESM 外观色泽为棕褐色,得率为 20.30%。可能是石油醚在提取油脂的同时将原料中其它杂质及色素等成分也溶解出来^[8]。Guan 等^[8]在提取丁香油时也发现 COESD 的得率低于 COESM,且 COESM 色泽为棕褐色。

2.2 COESD 及 COESM 抗氧化能力的比较

2.2.1 DPPH 自由基清除能力的比较 由图 3 可见,COESD 和 COESM 清除率随着浓度增加而增强,呈现出良好的量效关系。其中,COESD 的清除率均高于 COESM



图 1 COESD、COESM 外观色泽

Figure 1 The colours of COESD and COESM

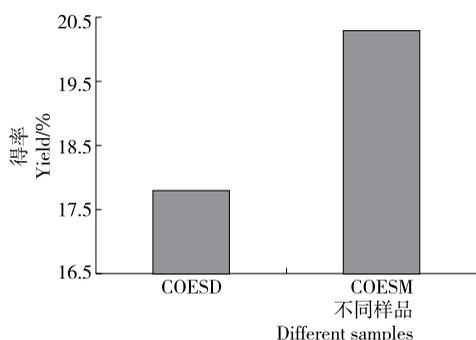


图 2 COESD、COESM 得率

Figure 2 The yields of COESD and COESM

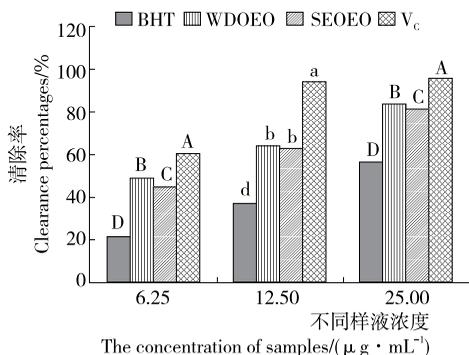
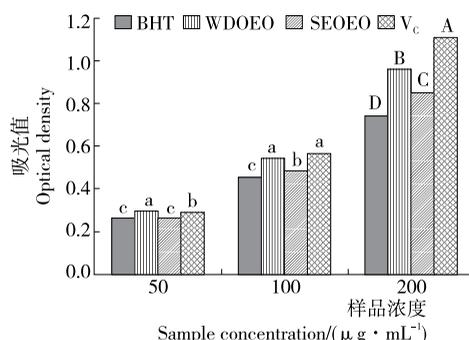


图 3 对 DPPH 自由基清除能力比较

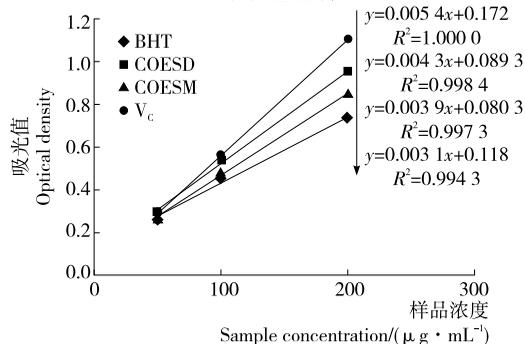
Figure 3 The comparison of scavenging ability on DPPH radicals

的($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。当浓度升高到 25.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,COESD 的清除率高达 $(83.520 \pm 0.100)\%$,显著高于 COESM $(81.278 \pm 0.057)\%$ ($P < 0.01$)。2 种丁香油清除率均显著高于阳性对照 BHT ($P < 0.01$),均呈现出很强的清除能力。庄军辉等^[23]发现丁香油主要成分丁香酚中含有酚羟基,容易释放 $\cdot\text{H}$,并与 DPPH \cdot 配对,所以丁香油对 DPPH 自由基呈现出很强的清除能力。

2.2.2 总还原力的比较 由图 4(a)可得出,在 50.000~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,COESD 与 COESM 呈现出很高的总抗氧化力,均强于阳性对照 BHT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);COESD 总抗氧化力显著高于 COESM ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显示出与 2.2.1 相同的比较结果。当浓度为 50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,COESD 在 700 nm 吸光值 (0.296 ± 0.003) 甚至显著高于 Vc 的 (0.289 ± 0.002) ($P < 0.05$)。当浓度为 200.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,COESD 吸光值 (0.952 ± 0.006) 比 COESM (0.848 ± 0.009) 高出 0.104,并产生显著性差异 ($P < 0.01$)。这可能是 COESD 所含还原酮高于 COESM 中还原酮的缘故^[24]。



(a) 总还原力



(b) 样品浓度与总还原力之间的相关性

不同大写字母表示浓度在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同样品之间的总还原能力具有极显著性差异 ($P < 0.01$);不同小写字母表示浓度分别在 50,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同样品之间的总还原能力具有显著性差异 ($P < 0.05$)

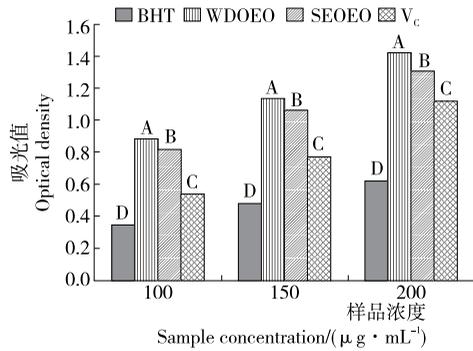
图 4 总还原力比较

Figure 4 The Comparison of total reducing powers

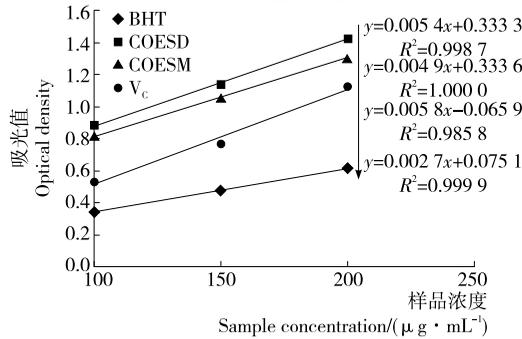
从图 4(b)可看出,4 种样品浓度与总还原力之间具有良好的线性关系, R^2 均高于 0.99 以上,Vc 样品的相关系数 R^2 高达 1.0,本试验测定结果的可靠性得到了验证。赵楠楠等^[25]在研究红松壳抗氧化能力时也发现其样品浓度与 OD_{700} 吸光度值显示出高度相关, R^2 达 0.989,与本研究结果相似。

2.2.3 总抗氧化能力的比较 由图 5(a)可知,COESD 和 COESM 吸光值均极显著高于阳性对照 BHT 和 Vc ($P < 0.01$),说明这 2 种丁香油均呈现出非常强的总抗氧化活性(OD_{695} 值越高总抗氧化能力越强)。COESD 各浓度吸光值均极显著高于 COESM ($P < 0.01$)。当浓度为 200.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,COESD 吸光值高达 (1.424 ± 0.009) ,比 COESM 吸光值 (1.304 ± 0.010) 高出 9.2%。

图 5(b)中显示出各样品浓度与总抗氧化力也呈现出良好的线性关系, R^2 均高于 0.98 以上,COESM 样品的相关系数 R^2 高达 1.0,也验证了本试验测定结果的可靠性。郭娟等^[26]在研究芦丁和丹参素的抗氧化能力时也发现其样品浓度在 OD_{695} 吸光度值呈现出良好的浓度依赖性,得出与本研究相似的结果。



(a) 总抗氧化力



(b) 样品浓度与总抗氧化力之间的相关性

不同大写字母表示浓度分别在 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同样品之间的总抗氧化能力具有极显著性差异 ($P < 0.01$)

图 5 总抗氧化能力比较

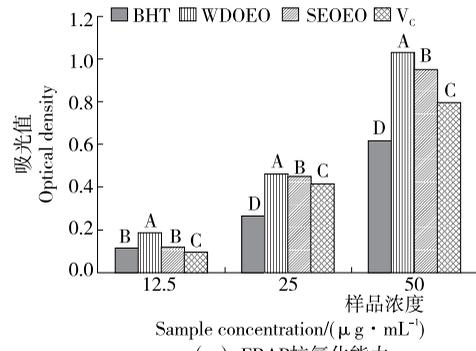
Figure 5 The Comparison of total antioxidant activity

2.2.4 FRAP 法抗氧化能力的比较 从图 6(a) 可得, 其结果与总抗氧化能力相似, 浓度在 12.5~50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, COESD 及 COESM 显示出非常强的抗氧化力, OD_{593} 吸光度值均显著高于两个阳性对照 V_c 和 BHT。2 种丁香油相比, COESD 的 OD_{593} 比 COESM 更高 ($P < 0.01$)。由图 6(b) 可知, 各样品浓度与 OD_{593} 吸光度值也显示出良好的线性关系, R^2 均 > 0.98 , 验证了试验结果的可靠性。Olszowy 等^[27] 在研究不同精油的 FRAP 抗氧化能力时也发现样品浓度与 OD_{593} 吸光度值显示出高度相关, R^2 均为 0.8~1.0。

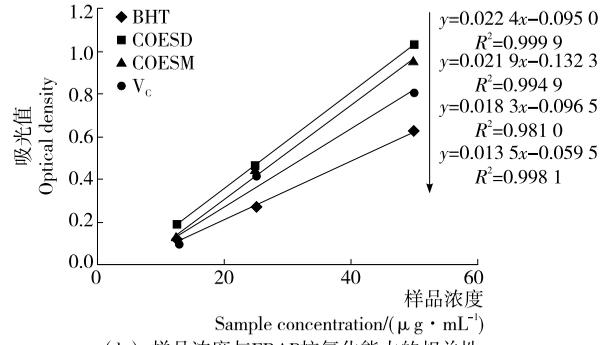
2.3 COESD 及 COESM 抑制 LDL 氧化能力的比较

LDL 氧化是引起 AS 的关键环节^[28]。天然抗氧化剂在抑制 LDL 氧化、预防 AS 和相关心血管疾病中具有重要意义^[29]。上述试验结果证明, 在 2 种提取方法所得丁香油中, COESD 的抗氧化能力比 COESM 更强。以 Trp 荧光淬灭、脂褐素荧光定量、总荧光产物、Lys 残基荧光变化和全波长扫描为评价指标, 进一步对 COESD 及 COESM 抑制 LDL 氧化能力进行比较和评价。

2.3.1 对 LDL 氧化过程中 Trp 残基荧光淬灭效果的比较 如图 7 所示, 添加丁香油及 BHT 后, Trp 残基荧光淬灭得到显著抑制 ($P < 0.05$)。COESD 的 Trp 残基荧光强度 (135.638) 高于 COESM 的 (133.155), 与 BHT 样液



(a) FRAP 抗氧化能力

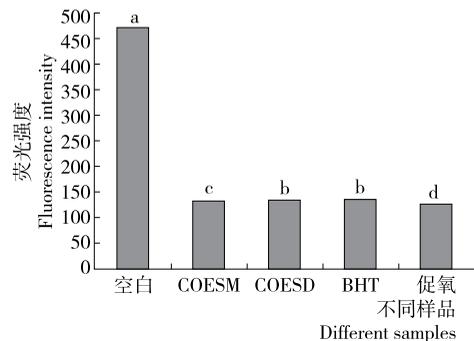


(b) 样品浓度与 FRAP 抗氧化能力的相关性

不同大写字母表示浓度分别在 12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同样品之间的 FRAP 抗氧化能力具有极显著性差异 ($P < 0.01$)

图 6 FRAP 法抗氧化能力的比较

Figure 6 The Comparison of FRAP antioxidant activity



不同小写字母表示不同样品之间 Trp 残基产生的荧光强度具有显著性差异 ($P < 0.05$)

图 7 对 LDL 氧化过程中 Trp 荧光淬灭的抑制比较

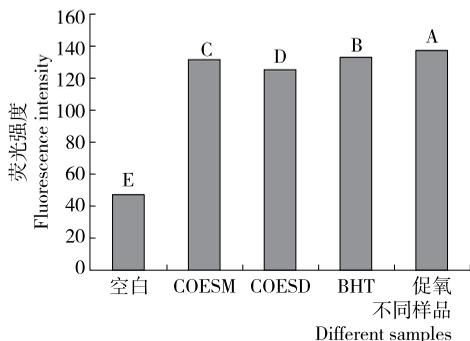
Figure 7 The comparison of inhibition efficiency on Trp fluorescence quenching

荧光强度 (136.105) 无显著差异。这可能是丁香油中抗氧化成分通过阻止 apoB-100 中 Trp 残基的氧化而实现对 LDL 氧化的抑制。熊一凡等^[16] 也发现丁香总多酚提取物对 LDL 氧化过程中 Trp 残基荧光淬灭具有很好的抑制效果。

2.3.2 对 LDL 氧化过程中脂褐素产生抑制效果的比较

从图 8 中可以看出, 空白组荧光强度最低, 促氧组的荧光强度最高, 说明 LDL 氧化修饰过程中产生较多量脂

褐素。在丁香油及阳性对照样中,BHT 组脂褐素产生量最多(荧光强度为 132.739),其次是 COESM(荧光强度为 130.787),COESD 产生量最少(荧光强度为 124.975)。说明添加丁香油或 BHT 能显著减少脂褐素产生,对 LDL 氧化修饰具有显著的抑制效果,显示 COESD 及 COESM 中抗氧化成分通过保护 LDL 中蛋白、阻碍脂质氧化产物与蛋白结合形成脂褐素,从而抑制 LDL 氧化^[2]。

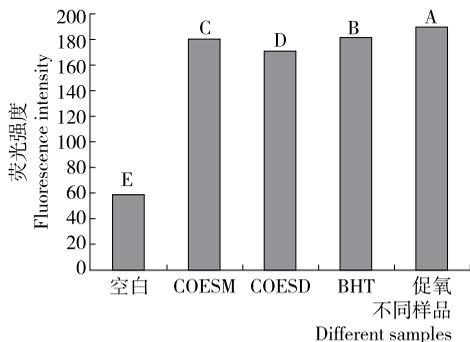


不同大写字母表示不同样品之间脂褐素产生量具有极显著性差异(P<0.01)

图 8 对 LDL 氧化修饰过程中脂褐素生成的抑制比较

Figure 8 The comparison of inhibition efficiency on lipofuscin generation during oxidation of LDL

2.3.3 对 LDL 氧化过程中总荧光产生的抑制比较 由图 9 可得,促氧组荧光强度最高,说明没有样液保护的 LDL 氧化最快,空白组荧光强度最低。添加丁香油及 BHT 样液后总荧光的产生得到有效抑制。COESD 及 COESM 的总荧光均显著低于阳性对照 BHT,显示出很强的抑制效果。其中,COESD 总荧光强度仅为 170.967,显著低于 COESM 样液的 (179.991) (P<0.01),均弱于阳性对照 BHT,可知丁香油能有效地抑制总荧光产物的



不同大写字母表示不同样品之间总荧光产物产生量具有极显著性差异(P<0.01)

图 9 对 LDL 氧化修饰过程中总荧光产物生成的抑制比较

Figure 9 The comparison of inhibition effects on fluorescent products generation during oxidation of LDL

产生。COESM (179.991) 荧光强度强于 COESD (170.967) (P<0.01),说明 COESD 抑制总荧光产物生成的能力更强。王丽丽等^[30]也发现,紫丁香叶提取物也能有效抑制脂褐素等荧光产物的产生。

2.3.4 对 LDL 脂质氧化产物修饰 Lys 残基荧光变化的抑制效果比较 由图 10 可知,在 410~550 nm 时,促氧组氧化修饰程度最严重,其荧光强度最强,明显高于空白组及各样品组。添加 COESD、COESM 及 BHT 样液后荧光强度均显著下降,表明这些样品能有效抑制 MDA 氧化修饰 Lys 残基。尽管 COESM 的抑制效果不及 COESD,但这 2 种丁香油的抑制效果均强于 BHT。原因可能是丁香油中抗氧化成分能竞争性抑制 MDA 与 Lys 残基交联形成 MDA-Lys,从而抑制 LDL 氧化^[18]。

2.3.5 通过紫外、可见光全波长范围内扫描对 COESD 及 COESM 抑制 LDL 氧化修饰效果的比较 从图 11 看出,促氧组在 249 nm 处有最高峰,与空白组相比,其吸光值上升迅速,且最大吸收峰明显发生红移。谢志勇等^[31]发现,LDL 氧化修饰过程中形成共轭二烯(CD),并产生新

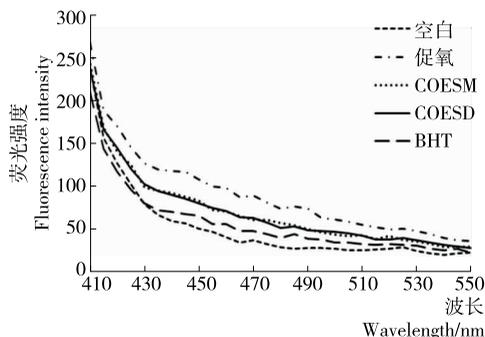


图 10 LDL 氧化修饰过程中 MDA 修饰 Lys 残基的抑制效果

Figure 10 The comparison of inhibition efficiency on Lys residue being modified by MDA during oxidation of LDL

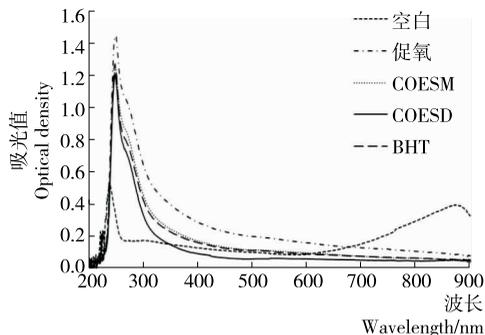


图 11 对 LDL 氧化过程中紫外可见光谱改变的抑制效果比较

Figure 11 The comparison of inhibition efficiency on UV-Visible spectroscopy during oxidation of LDL

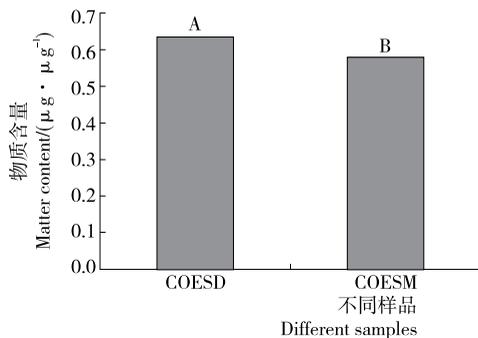
的发色团,使最大吸收峰明显发生红移,而添加 COESD 和 COESM 样液后,最大吸收峰均低于促氧组,且能有效抑制光谱红移。其中,COESD 抑制效果较 COESM 更胜一筹。Yang 等^[18]也发现丁香乙酸乙酯相能有效抑制 LDL 氧化过程中 CD 在 234 nm 形成的吸收峰红移。

上述结果表明,在 LDL 氧化过程中,各样品对 Trp 残基荧光淬灭、对脂褐素及总荧光产物产生的抑制效果、对 MDA 修饰 Lys 残基及对紫外可见光谱改变的抑制效果排列顺序依次为:COESD>COESM>BHT。

2.4 COESD 及 COESM 总多酚、总黄酮含量的比较

总多酚、总黄酮为植物油中主要的抗氧化物质^[32]。COESD 抗氧化活性及对 LDL 氧化修饰的抑制能力均强于 COESM。为进一步分析其中的原因,本试验进一步对这 2 种丁香油所含的抗氧化活性主要物质——总多酚及总黄酮含量进行了测定,测定结果如图 11、12 所示。

通过图 12、13 可知,COESD 中总多酚含量显著高于 COESM ($P<0.01$);而尽管 COESD 总黄酮含量也比 COESM 高,但却无显著性差异。据文献报道,丁香油中主要成分为丁香酚^[9]。总多酚、总黄酮测定结果表明,COESD 抗氧化能力及抑制 LDL 氧化能力均比 COESM 更强的原因很可能是其含有更高含量的总多酚、总黄酮。



不同大写字母表示不同样品之间总多酚含量具有极显著性差异 ($P<0.01$)

图 12 总多酚含量比较

Figure 12 The Comparison of total polyphenols

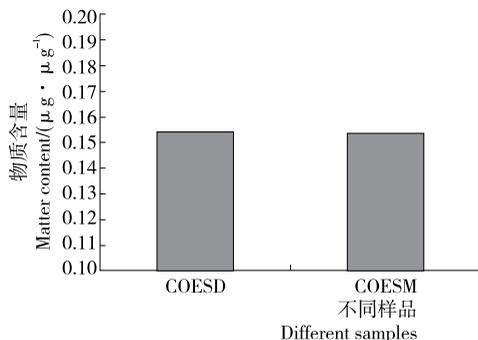


图 13 总黄酮含量比较

Figure 13 The Comparison of total flavonoids

3 结论

本试验采用水蒸气蒸馏和索式提取这 2 种最常用的方法提取得到水蒸气蒸馏丁香油(COESD)和索式提取丁香油(COESM),然后对 COESD 和 COESM 得率、外观、抗氧化及抑制 LDL 氧化能力进行了比较。结果发现,COESD 外观色泽清亮、透明,得率为 17.79%,COESM 外观色泽为棕褐色,得率为 20.30%;尽管 COESD 得率稍低于 COESM,但 COESD 抗氧化能力(DPPH 自由基清除率、总还原力、总抗氧化能力及 FRAP 法抗氧化能力)却高于 COESM($P<0.05$ 或 $P<0.01$);COESD 对 LDL 氧化的抑制能力(Trp 荧光淬灭、脂褐素及总荧光产生量、MDA 修饰 Lys 残基荧光变化和全波长扫描比较)也强于 COESM;通过进一步测定组成成分发现,COESD 抗氧化及抑制 LDL 氧化能力更强的主要原因是含有更多量的总多酚及总黄酮。由此可见,COESD 油的品质好于 COESM,但是其得率偏低是该技术的限制因素。后续应进一步提高 COESD 得率以及比较这两种技术的经济成本;采用其它提取技术所得丁香油抗氧化及抑制 LDL 氧化能力如何,COESD 与 COESM 所含抗氧化成分的差别及脂肪酸组成也有待继续探索。

参考文献

- [1] 刘龙秀,张小霞,曲文娟,等. 丁香不同极性部位抑制低密度脂蛋白脂质氧化修饰的研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(22): 71-75.
- [2] 万严,杨琼玉,曲文娟,等. 丁香乙酸乙酯相抑制 LDL 中赖氨酸、色氨酸氧化修饰的研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 10-16.
- [3] 刘晓丽,钟少枢,于泓鹏,等. 微波法和水蒸气蒸馏法提取丁香精油的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 110-112.
- [4] 沈勇根,蔡志鹏,江慎华,等. 丁香非挥发性成分抗氧化活性[J]. 农业机械学报, 2012, 43(10): 131-137.
- [5] HADI S. Pengambilan Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (Clove Oil) Menggunakan Pelarut N-Heksana Dan Benzena [J]. Jurnal Bahan Alam Terbarukan, 2013, 1(2): 25-30.
- [6] 梁蓉,钟芳,王浩,等. 丁香油微乳的制备及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(7): 127-131.
- [7] 刘宁,桂云云,刘佳丽. 植物中精油提取方法的研究进展及应用现状[J]. 安徽化工, 2013, 39(1): 26-28.
- [8] GUAN Wen-qiang, LI Shu-fen, YAN Rui-xiang, et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1 558-1 564.
- [9] KOLLMANNBERGER H, NITZ S, ERTAŞ M, et al. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove[J]. Bioresources, 2007, 2(2):111-120.
- [10] 刘仁绿,肖敏,江卫青,等. 诃子粗提物及不同极性部位抑

- 制低密度脂蛋白氧化修饰的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 100-104.
- [11] 董学艳, 姜铁民, 刘继超, 等. 高通量快速检测母乳总蛋白、乳清蛋白和酪蛋白含量方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 308-310.
- [12] 岳晓霞, 张根生, 李志, 等. 水蒸气蒸馏提取丁香精油及其抑菌性研究[J]. 中国调味品, 2008, 33(9): 49-52.
- [13] LI Jing, WU Hai-qiang, LIU Zhi-gang. Acaricidal activity of clove bud oil against *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae)[J]. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases, 2009, 27(6): 492-493, 497.
- [14] 江慎华, 蔡志鹏, 廖亮, 等. 丁香抗氧化活性物质提取及人工胃肠液对其活性的影响[J]. 农业机械学报, 2012, 43(7): 149-155.
- [15] 刘梦莹, 江慎华, 曲文娟, 等. 恒温超声辅助提取诃子 FRAP 类抗氧化活性物质的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 238-243.
- [16] 熊一凡, 李文, 曲文娟, 等. 恒温超声辅助提取丁香总多酚工艺优化及其对低密度脂蛋白氧化修饰过程中荧光的抑制[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 159-166.
- [17] CHEN C Y, MILBURY P E, CHUNG S K, et al. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(12): 785-794.
- [18] YANG Qiong-yu, WAN Yan, JIANG Shen-hua, et al. The antioxidant inhibition of clove effective fraction on lipid, protein and spectra variation of LDL[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(1): 312-320.
- [19] COMINACINI L, GARBIN U, DAVOLI A, et al. A simple test for predisposition to LDL oxidation based on the fluorescence development during copper-catalyzed oxidative modification[J]. Journal of Lipid Research, 1991, 32(2): 349-358.
- [20] PICARD S, PARTHASARATHY S, FRUEBIS J, et al. Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(15): 6 876-6 880.
- [21] ESTERBAUER H, ZOLLERN H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1989, 7(2): 197-203.
- [22] 江慎华, 王书源, 马海乐, 等. 丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究[J]. 农业机械学报, 2010, 41(1): 132-138.
- [23] 庄军辉. 丁香酚体内外抗氧化作用及其机制研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014: 20.
- [24] SUGANTHY N, NISHA S A, PANDIAN S K, et al. Evaluation of *gelidiella acerosa*, the red algae inhabiting South Indian coastal area for antioxidant and metal chelating potential[J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2013, 3(4): 399-406.
- [25] 赵楠楠, 朱晓冉, 李德海. 红松壳多酚、黄酮和多糖含量及抗氧化活性相关性的研究[J]. 现代食品科技, 2017(12): 44-49.
- [26] 郭娟. 芦丁、丹参素体外抗氧化作用的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009: 23-24.
- [27] OLSZOWY Małgorzata, DAWIDOWICZ Andrzej L. Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods[J]. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 2016, 147(12): 1-9.
- [28] LIU Ting-ting, ZENG Yi, TANG Kun, et al. Dihydromyricetin ameliorates atherosclerosis in LDL receptor deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2017, 262: 39-50.
- [29] CHANDRASEKARA A, SHAHIDI F. Antioxidant Phenolics of Millet Control Lipid Peroxidation in Human LDL Cholesterol and Food Systems[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2012, 89(2): 275-285.
- [30] 王丽丽, 赵新淮. 紫丁香叶提取物对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(5): 641-644.
- [31] 谢志勇, 谢丽琴, 江慎华, 等. 基于光谱学技术对丁香油与乙酸乙酯相抑制 LDL 非酶糖基化、氧化修饰能力的比较[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(2): 518-527.
- [32] ANTHONY K K, GEORGE D S, SINGH H K B, et al. Reactive Oxygen Species Activity and Antioxidant Properties of Fusarium Infected Bananas [J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(4): 213-222.
- (上接第 128 页)
- [24] CHEMAT F, ZILLE HUMA, KHAN M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(4): 813-835.
- [25] GALLEGO-JUAREZ J A, RIERA E, BLANCO S D F, et al. Application of high-power ultrasound for dehydration of vegetable: processes and devices[J]. Drying Technology, 2007, 25(11): 1 893-1 901.
- [26] ORTUÑO C, PÉREZ-MUNUERA I, PUIG A, et al. Influence of power ultrasound application on mass transport and microstructure of orange peel during hot air drying[J]. Physics Procedia, 2010, 3(1): 153-159.
- [27] SHARMA G P, VERMA R C, PATHARE P B. Thin-layer infrared radiation drying of onion slices[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67(3): 361-366.
- [28] 葛哲学. 神经网络理论与 MATLAB R2007 实现[M]. 北京: 电子工业出版社, 2007: 136-141.
- [29] 林喜娜, 王相友, 丁莹. 双孢蘑菇远红外干燥神经网络预测模型建立[J]. 农业机械学报, 2010, 41(5): 110-114.
- [30] 陆琼瑜, 童学锋. BP 算法改进的研究[J]. 计算机工程与设计, 2007, 28(3): 648-650.