

益智有效抗氧化成分的分离条件的研究

刘红^{1,2}, 郭祀远¹, 韩长日², 纪明慧², 李琳¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641; 2. 海南师范学院化学系, 海南海口 571158)

摘要: 探讨了干柱层析法分离益智渣及益智乙醇提取物的抗氧化成分。实验中采用乙酸乙酯/环己烷(3:7)、氯仿/甲醇(9:1)为展开剂依次二次干柱层析分离出抗氧化物质。结果表明,益智渣及益智乙醇提取物均有较强的抗氧化性,益智渣的 H₂O₂ 清除能力强于益智乙醇提取物。

关键词: 益智; 抗氧化剂; 自由基

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)05-0469-03

Separation of the antioxidative ingredient from *Alpinia oxyphylla* Miquel

LIU Hong^{1,2}, GUO Si-yuan¹, HAN Chang-ri², JI Ming-hui², LI Lin¹

(1. College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 2. Department of Chemistry, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: In this paper, we extracted the antioxidative substance from *Alpinia oxyphylla* Miquel by using column chromatography. In the process of experiment, we separated better efficient antioxidative fractions by silica gel column chromatography with different extensible reagent, ethyl acetate; hexane(3:7) and chloroform; methanol(9:1). The results show that the ethanol extracts from the seeds of *A. oxyphylla* Miquel and its residue after hydrodistilling have better antioxidant activities, particularly, the capacity of scavenging on H₂O₂ is higher in the residue of *A. oxyphylla* Miquel.

Key words: *Alpinia oxyphylla* Miquel; oxidation inhibitor; radical

益智(*Alpinia oxyphylla* Miquel)为多年生热带雨林半荫性草本药用植物,是姜科(Zingiberaceae)山姜属植物的干燥成熟果实。其果实性温和,味辛辣且香浓。主要用于治疗“温脾止泻摄唾,暖肾固精缩尿”(中国卫生部,1985)。

益智是海南四大南药之一,也是卫生部1998年公布的既是食品又是药品的一种天然植物,具有广泛的生物活性,如抗氧化性、抗衰老、抗肿瘤、抗菌等,其中最为重要的是抗氧化活性,它能抑制脂肪氧化和清除自由基。众所周知,羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 H₂O₂ 是致癌物(郑荣梁,1998)。本研究以清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 H₂O₂ 为指标分离从益智提取物

中分离具有极强抗氧化性的化合物。

1 材料与实验

1.1 试验材料与设备

1.1.1 试验材料 益智(万宁新中农场)。薄层层析硅胶 H(化学纯)、30%过氧化氢(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、环己烷(分析纯)、甲醇(分析纯)、乙醇(分析纯)、氯仿(分析纯)。

1.1.2 设备 KDW型调温电热套(山东省城永兴仪器厂);721型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);CS501型超级恒温器(重庆试验设备厂)。

收稿日期: 2004-07-13 修订日期: 2005-02-20

基金项目: 海南省自然科学基金资助(20301)(Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province, Grant No. 20301)。

作者简介: 刘红(1967-),女,山东诸城人,副教授,博士生,主要从事天然产物分离研究。E-mail: lhyd123@sohu.com

1.2 实验方法

1.2.1 有效抗氧化成分的工艺流程 (1)益智乙醇提取物的分离:将干燥的益智粉碎,取一定量的益智粉,用无水乙醇浸泡1 d,过滤,将乙醇提取液加热蒸馏,得到粘稠的深褐黄色的树脂油。然后用乙酸乙酯/环己烷(3:7)展开分得五层。测定每层的抗氧化性,接着将效果好的一层用氯仿/甲醇(9:1)展开,继续分离得到3层,并测定每层抗氧化性。

(2)益智渣的有效成分提取分离:将益智粉水蒸汽蒸馏,蒸馏后的余渣用无水乙醇浸泡1 d,得到乙醇提取液,减压浓缩。然后用乙酸乙酯/环己烷(3:7)展开分得4层。

1.2.2 抗氧化作用的测定 (1) H_2O_2 清除能力实验(宁正祥等,1995;王巨存等,1994)。样品溶液的制备:把各层色带分别用20 mL无水乙醇分3次提取,萃取液蒸发乙醇,得各层的益智挥发油,称0.300 0 g,用乙醇定溶到10 mL。 H_2O_2 清除能力测定: H_2O_2 清除量测定采取碘量法,在碘量瓶中加入1 mL样品溶液,0.1 mol/L柠檬酸缓冲液5 mL定溶到25 mL,加入0.1 mol/L H_2O_2 (用时配制)2 mL置37 °C恒温水浴中保持20 min取出,加入10% KI溶液2 mL,2 mol/L H_3PO_4 1 mL暗处反应120 min,从反应液中取2 mL溶液,用0.002 mol/L $Na_2S_2O_3$ 溶液滴定,同时做空白试验。

H_2O_2 清除量(mmol/mL样品) = $C(V_{空} - V_{样})/V$

式中: C - $Na_2S_2O_3$ 标准液的浓度(mol/L); $V_{空}$ -空白试验消耗标准液的体积(mL); $V_{样}$ -样品试验消耗标准液的体积(mL); V -所取样品体积(mL)。

(2)羟自由基的清除率的测定(王巨存等,1994):50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液2 mL,40 μ g/mL蕃红花红2 mL,样品溶液1 mL,3% H_2O_2 溶液2 mL(用时配制),0.001 mol/L EDTA-Fe(II)2 mL(用时配制),混匀,37 °C恒温水浴中保持30 min,在520 nm测吸光度。空白则以1 mL无水乙醇代替样品溶液,对照以1 mL无水乙醇和2 mL蒸馏水代替EDTA-Fe(II)和供试样品。

清除率 = $(A_{样品} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 益智渣提取物抗氧化性分析

2.1.1 益智渣提取物清除 H_2O_2 活性 以乙酸乙酯

/环己烷(3:7)为展开剂,柱色谱分为4层:1层为黄色,对 H_2O_2 清除量为-2.13 mmol/mL;2层、3层为浅黄色,对 H_2O_2 清除量分别为0.1 mmol/mL和-0.1 mmol/mL;4层为棕黄色,对 H_2O_2 清除量为1.8 mmol/mL。不同色带对 H_2O_2 的清除率各不相同。其中4层清除能力较强,而1和3层没有清除作用,而且有促进氧化作用。本实验结果表明只有4层(呈棕黄色)清除能力较强。

2.1.2 益智渣提取物清除羟自由基活性

上述各层羟自由基清除率见图1。

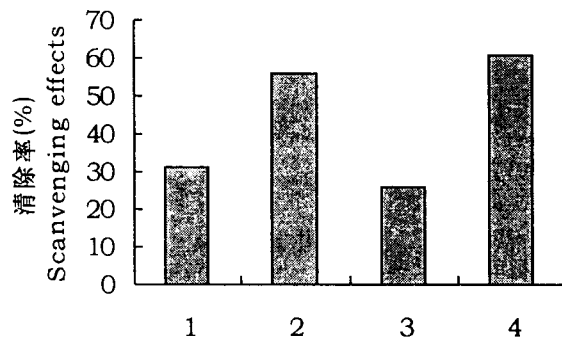


图1 不同色带对羟基自由基的清除率

Fig. 1 Scavenging effect of extracts of *Alpinia oxyphylla* Miquel without distilled oil from different chromatography layer on hydroxyl free radicals

由图1可以看出,不同色带对羟自由基的清除率各不相同。其中2层、4层较好,而1层、3层较差。从清除 H_2O_2 自由基和清除羟自由基活性看,利用柱层析分出第4层有抗氧化活性。

2.2 益智乙醇提取物抗氧化性分析

2.2.1 益智乙醇提取物清除 H_2O_2 活性 以乙酸乙酯/环己烷(3:7)为展开剂,柱层析共分5层色带: I层为棕黄色,对 H_2O_2 清除量为-2.84 mmol/mL; II层、III层为浅黄色,对 H_2O_2 清除量分别为-0.43 mmol/mL和0.1 mmol/mL; IV层为深黄色,对 H_2O_2 清除量为0.41 mmol/mL; V层为黑褐色,对 H_2O_2 清除量为0.48 mmol/mL。其中V层清除能力较强,而I层、II层没有清除能力。

2.2.2 益智乙醇提取物清除羟自由基活性 以乙酸乙酯/环己烷(3:7)为展开剂共分5层色带,各层羟自由基清除率见图2,其中V层(5层)最好,而I层(1层)、II层(2层)较差。

2.3 益智乙醇提取物进一步分析抗氧化作用

取第一次层析的抗氧化性最好的V层,以氯仿

/甲醇(9:1)为展开剂。共分为3层色带, V_1 为深黄色, V_2 黄色, V_3 为黑褐色。

2.3.1 H_2O_2 清除量 共分为3层色带: V_1 对 H_2O_2 清除量为 1.57 mmol/mL; V_2 对 H_2O_2 清除量为 0.93 mmol/mL; V_3 对 H_2O_2 清除量为 2.17 mmol/mL。其中 V_3 层最好, V_1 次之, V_2 较差。

2.3.2 羟自由基的清除率 各层羟自由基清除率见图 3, 其中 V_3 层最好, V_1 次之, V_2 较差。

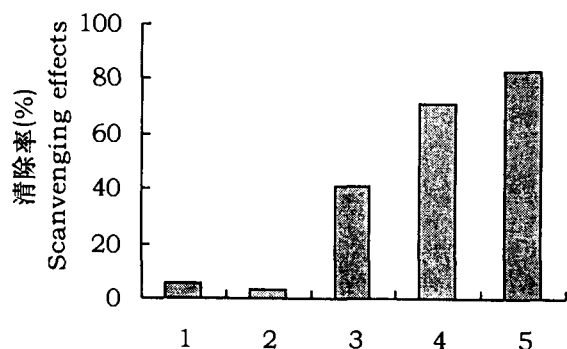


图 2 不同色带对羟基自由基的清除率

Fig. 2 Scavenging effect of extracts of *Alpinia oxyphylla* Miquel without distilled oil from different chromatography layer on hydroxyl free radicals

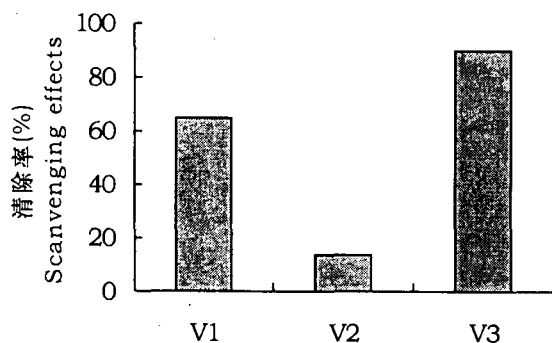


图 3 羟自由基的清除率

Fig. 3 Scavenging effect of extracts of *Alpinia oxyphylla* Miquel from the second chromatography on hydroxyl free radicals

3 结论

益智渣乙醇提取物在第一次的干柱层析中,以乙酸乙酯/环己烷(3:7)为展开剂展开的干柱层析为4层,测其各层抗氧化性中得出4层最好。由于各层受到的极性不同而分为4层,极性小的4层则在最底层,其颜色从1到4层分别为棕黄色、浅黄色、浅黄色、棕黄色;其味道都有甜药味,而4层的辛辣味浓。

益智乙醇提取物第一次展开分为5层, V层抗氧化性最好。其颜色从I到V层分别为棕黄色、浅黄色、浅黄色、深黄色、黑褐色;其味道都有甜药味,而V层的辛辣味浓。

为了分离的清除 H_2O_2 的物质,益智乙醇提取物第二次干柱层析选择展开剂改为氯仿/甲醇(9:1)。由于展开剂中的甲醇极性大能使V层提取物迅速分层。从柱中颜色看出分3层,从 V_1 到 V_3 层的颜色分别为深黄色、黄色、黑褐色,并测其抗氧化性中得出 V_3 层最好。可能的抗氧化性物质是益智酮A、益智酮B。

结果表明,益智乙醇提取物和益智渣具有较强能清除过氧化氢、羟自由基的性能,有抗氧化作用。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1987. 中华人民共和国药典 1985 年版一部[M]. 北京:人民卫生出版社,化学工业出版社,262.
- 郑荣梁. 1998. 自由基生命科学进展(第6集)[M]. 北京:原子能出版社,72-75.
- Ning ZX(宁正祥), Zhang SH(张水华), Gao JH(高建华), et al. 1995. Elimination of active free radicals and nitrite by some fresh fruits and vegetables(一些果蔬对活性自由基和亚硝酸盐的清除作用)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), (2): 32-35.
- Wang JC(王巨存), Xing GS(刑国胜), Hu D(胡 铎), et al. 1994. Effects of Ge-132 on oxygen free radicals and the lipid peroxidation induced by hydroxyl free radical *in vitro*(有机锗 Ge-132 对氧自由基和羟自由基诱导的脂质过氧化的影响)[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 29(1): 23-25.