

银杏中种皮提取物抗氧化活性的研究

莫晓燕,徐 静,张安宁

(西安交通大学 生命科学与技术学院,陕西 西安 710049)

[摘 要] 分别采用卵黄脂蛋白多不饱和脂肪酸过氧化体系、超氧阴离子自由基体系、羟自由基体系、二苯代苦味酰(DPPH)自由基体系以及总抗氧化能力等检测指标,对银杏中种皮采用不同提取方法(微波提取、超声提取、乙醇和水浸提)获得的黄酮类物质的抗氧化能力进行了对比研究。结果表明,不同提取方法获得的提取液均具有较强的抗氧化活性,而不同提取工艺可影响银杏中种皮提取液的抗氧化作用及其机理,其中乙醇浸提液对卵黄脂蛋白过氧化体系的抑制率为50.69%,微波水提液对超氧阴离子和羟自由基的清除能力分别达213.96和411.26 U/L,乙醇超声提取液对DPPH自由基的清除率及总抗氧化能力分别为89.8%和44.09 U/mL。

[关键词] 银杏中种皮;黄酮类物质;抗氧化活性;自由基;抑制率;清除率

[中图分类号] S792.95

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0083-06

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属多年落叶乔木,具有很高的开发应用价值。然而银杏中种皮在加工过程中大多作为废料被丢弃,造成资源浪费及环境污染。因此,有必要对银杏中种皮的有效成分进行研究,以便综合利用银杏资源,保护生态环境。

近年来的许多研究^[1,2]证实,黄酮类物质具有抑制脂质过氧化及清除多种自由基的能力,是一种较为理想的天然抗氧化剂。研究发现^[3],银杏中种皮提取液中含有黄酮类物质,且具有明显的抗氧化活性。本研究分别采用微波、超声、乙醇和水浸提等方法提取银杏中种皮中的黄酮类物质,测定了不同提取液在卵黄脂蛋白多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)过氧化体系中的抗氧化活性,及其清除超氧阴离子自由基、羟自由基和二苯代苦味酰(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基的能力,同时测定了不同提取液的总抗氧化能力,为银杏中种皮的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

银杏中种皮购于江苏江阴:芦丁(生化试剂,上海试剂厂)、硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA)(分析纯,西安化学试剂厂)、维生素C(分析纯,西安化学试剂厂)、DPPH(分析纯,美国Sigma

公司),其余试剂均为分析纯;抗超氧阴离子自由基、活性氧及总抗氧化能力测试盒,均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 主要仪器

WFZ800-D3B型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);5810R型高速冷冻台式离心机(德国Eppendorf公司);PJ21F-B型微波炉(广东美的企业集团);5200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);GB11240-89型电热恒温水浴锅(北京医疗设备厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 银杏中种皮提取液的制备 银杏中种皮洗净除杂→50℃烘干至恒重→粉碎过筛→提取(微波法、超声法、乙醇和水浸提法)→抽滤→离心→测定总黄酮含量。

1.3.2 卵黄脂蛋白PUFA过氧化体系中抗氧化活性的测定^[4~6] 建立以Fe²⁺诱发卵黄磷脂C-2位上的极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白PUFA的过氧化模型,按表1加样。其中对照管提前加入质量分数20%三氯乙酸0.5 mL,然后将对照管与测定管同时置于37℃水浴中温育30 min,取出后,于测定管中加入质量分数20%三氯乙酸0.5 mL,静置10 min后,将两管于3 500 r/min离心15 min,取2 mL上清液,加入质量分数0.8%TBA溶液1 mL,沸水浴15 min,冷却,测定532 nm处吸光度A₅₃₂。

[收稿日期] 2005-03-28

[作者简介] 莫晓燕(1954—),女,江苏江都人,高级工程师,硕士,主要从事天然产物有效成分研究。

表 1 卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系活性测定加样量

Table 1 Loading of system of peroxidation of polyunsaturated fatty acid from yolk lipoprotein mL						
处理 Treatment	卵黄悬液 Yolk	蒸馏水 H ₂ O	提取液 Extracts	25 mmol/L 硫酸亚铁 25 mmol/L FeSO ₄	磷酸缓冲液 PBS	20% 三氯乙酸 20% TCA
对照管 Control tube	0.2	0.1		0.2	1.5	0.5
测定管 Mensuration tube	0.2		0.1	0.2	1.5	0.5

试验分别测定了 P₁、P₂ 2 种提取液对卵黄脂蛋白过氧化物的抑制率,其中 P₁ 为称取银杏中种皮 4 g,以 10 倍体积的体积分数 40 % 乙醇溶液于 60 ℃ 浸提 4 h 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.186 9 mg/mL;P₂ 为称取银杏中种皮 4 g,以 40 倍体积的水微波提取 40 min 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.103 6 mg/mL。抑制率的计算公式为:

抑制率 % = $\frac{\text{对照管 } A_{550} - \text{测定管 } A_{550}}{\text{对照管 } A_{550}} \times 100\%$

1.3.3 超氧阴离子自由基清除能力的测定^[7-8] 采用抗超氧阴离子自由基测试盒,模拟人体中黄嘌呤氧化酶反应体系产生超氧阴离子自由基。当被测样品中含有 O₂⁻ 清除剂时,反应体系中 O₂⁻ 的量随之减少。按照测试盒说明(表 2)进行加样,充分混匀,置于 37 ℃ 恒温水浴 40 min,分别加入 2.0 mL 显色剂,混匀后静置 10 min,用蒸馏水调零,测定 550 nm 处的吸光度 A₅₅₀。

表 2 超氧阴离子自由基体系活性测定加样量

Table 2 Loading of system of superoxide anion free radical mL							
处理 Treatment	1 号试剂 Reagent 1	蒸馏水 H ₂ O	0.15 mg/mL V ₁ 标准液 0.15 mg/mL V ₁	提取液 Extracts	2 号试剂 Reagent 2	3 号试剂 Reagent 3	1 号试剂 Reagent 4
对照管 Control tube	1.0	0.2			0.1	0.1	0.1
标准管 Standard tube	1.0		0.2		0.1	0.1	0.1
测定管 Mensuration tube	1.0			0.2	0.1	0.1	0.1

试验中分别测定了 S₁、S₂、S₃ 3 种提取液对超氧阴离子自由基的清除能力。称取银杏中种皮 4 g,S₁ 为 40 倍体积的水微波提取 30 min 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.145 1 mg/mL;S₂ 为 40 倍体积水微波提取 40 min 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.160 4 mg/mL;S₃ 为 12 倍体积的体积分数 50%乙醇、80 ℃ 浸提 5 h 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.206 0 mg/mL。

银杏中种皮提取液对 O₂⁻ 的清除能力用抗超氧阴离子活力表示。规定在反应体系中,每升样品在 37 ℃、40 min 条件下所产生的相当于 1 mg 维生素 C 产生的超氧阴离子自由基的变化值为 1 个活力单

位。以维生素 C 溶液为标准,抗超氧阴离子活力的计算公式为

抗超氧阴离子活力/(U/L) = $\frac{\text{对照管 } A_{550} - \text{测定管 } A_{550}}{\text{对照管 } A_{550} - \text{标准管 } A_{550}} \times V_0$
标准液质量浓度 × 1 000 × 样品测试前的稀释倍数。

1.3.4 羟自由基清除能力的测定^[9,10] 采用活性氧测定试剂盒,以经典的 Fenton 反应体系产生羟自由基,若加入 ·OH 清除剂,则反应体系中的 ·OH 也相应减少^[11]。利用这一原理,可测出银杏中种皮提取液对 ·OH 的清除能力。按照试剂盒说明进行加样(表 3),所用提取液与 1.3.3 相同,混匀后于 37 ℃ 反应 1 min,再分别加入 2 mL 显色剂,室温放置 20 min,用蒸馏水调零,测定 550 nm 处吸光度 A₅₅₀。

表 3 羟自由基体系活性测定加样量

Table 3 Loading of system of hydroxyl radical mL					
处理 Treatment	蒸馏水 H ₂ O	1 号试剂 Reagent 1	2 号试剂 Reagent 2	提取液 Extracts	3 号试剂 Reagent 3
空白管 Blank tube	0.4				0.4
对照管 Control tube	0.2	0.2			0.4
标准管 Standard tube	0.2		0.2		0.4
测定管 Mensuration tube			0.2	0.2	0.4

以每升样品在 37℃ 下反应 1 min,使反应体系中 H₂O₂ 浓度降低 1 mmol/L 为 1 个抗活性氧单位,其计算公式为:

抗活性氧活力/(U/L)= $\frac{\text{对照管 } A_{550}-\text{测定管 } A_{550}}{\text{标准管 } A_{550}-\text{空白管 } A_{550}} \times \text{标准管浓度} \times \frac{1\,000}{\text{取液量}} \times \text{样品测试前的稀释倍数}.$

1.3.5 DPPH 自由基清除能力的测定^[12,13]

表 4 DPPH 自由基体系活性测定加样量
Table 4 Loading of system of DPPH free radical

处理 Treatment	提取液 Extracts	73.5 μmol/L DPPH 乙醇溶液 DPPH	乙醇 Ethanol
空白管 Blank tube	2		2
对照管 Control tube		2	2
测定管 Mensuration tube	2	2	

试验测定了 D₁,D₂,D₃ 3 种提取液对 DPPH 自由基的清除能力。称取银杏中种皮 4 g,D₁ 为 40 倍体积水超声提取 5 min 后再微波提取 30 min 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.145 5 mg/mL;D₂ 为 40 倍体积水超声提取 10 min 后再微波提取 30 min 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.146 0 mg/mL;D₃ 为 12 倍体积的体积分数 50%乙醇溶液超声提取 5 min 后再于 80℃ 浸提 6 h 获得的提取液,总黄酮质量浓度为 0.209 5 mg/mL;D₄ 为质量浓度 0.120 0 mg/mL 维生素 C 溶液;D₅ 是质量浓度为 0.181 8 mg/mL 芦丁溶液。各样品液对 DPPH

DPPH 自由基清除能力的测定原理是 DPPH 乙醇溶液呈深紫色,在 517 nm 处有一强吸收峰,随着 DPPH 与抗氧化剂给出的氢相结合,反应体系逐渐变为淡黄色,吸光值减少,反应结束时达到稳定,其褪色程度与接受的电子数成定量关系。按照表 4 进行加样,充分混匀后静置 30 min,测定 517 nm 处吸光度 A₅₁₇。

自由基的清除率用下式计算:
清除率/%=(1- $\frac{\text{测定管 } A_{517}-\text{空白管 } A_{517}}{\text{对照管 } A_{517}}$)×100%。

1.3.6 总抗氧化能力的测定^[14] 采用总抗氧化能力测试盒,其原理是抗氧化物质(包括抗氧化剂和抗氧化酶)能将 Fe³⁺ 还原成 Fe²⁺,后者与非酚类物质形成稳定的络合物。因此,通过比色即可测定银杏中种皮提取液的抗氧化活性。按照试剂盒说明加样(表 5),充分混匀后于 37℃ 水浴 30 min,然后分别加入 4 号试剂 0.1 mL,对照管中补加 0.5 mL 提取液,混匀并静置 10 min,用蒸馏水调零,测定 520 nm 处吸光度 A₅₂₀。试验中测定的提取液与 1.3.5 相同。

表 5 总抗氧化能力测定加样量
Table 5 Loading of total antioxidant capacity

处理 Treatment	1 号试剂 Reagent 1	提取液 Extracts	2 号试剂 Reagent 2	3 号试剂 Reagent 3
对照管 Control tube	1.0		2.0	0.5
测定管 Mensuration tube	1.0	0.5	2.0	0.5

以 37℃ 时,每分钟每毫升样品使反应体系的吸光度值增加 0.01 为 1 个总抗氧化能力单位。

总抗氧化能力/(U/mL)= $\frac{\text{测定管 } A_{520}-\text{对照管 } A_{520}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \text{样品测试前的稀释倍数}.$

2 结果与分析

2.1 对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系抗氧化活性的影响

2.1.1 温育时间 温育是诱发卵黄脂蛋白过氧化的重要步骤。本研究在文献[4,5]报道的基础上,首先以 0.120 0 mg/mL 芦丁溶液为抗氧化剂添加到

卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系中,观察了温育时间与抗氧化活性的关系。结果(图 1)显示,在起始阶段,芦丁对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系的抑制率呈上升趋势。当反应体系温育 30 min 时,芦丁对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系的抑制率最大,为 46.09%;随着温育时间的继续延长,抑制率迅速下降,至 4 h 趋于稳定。因此在后续试验中,以 37℃ 温育 30 min 作为评价银杏中种皮提取液抗氧化活性的反应条件。
2.1.2 不同提取液 对按体积比稀释成不同浓度的 P₁ 和 P₂ 2 种提取液,以及维生素 C 和芦丁溶液的抗氧化活性进行了比较,结果见图 2。

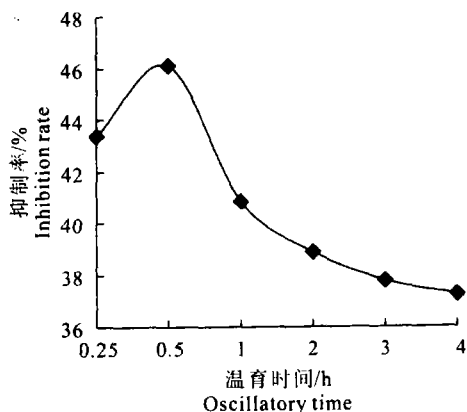


图 1 振荡时间对卵黄脂蛋白过氧化物抑制率的影响
Fig. 1 Effect of oscillatory time on inhibition rate of yolk lipoprotein peroxide

由图 2 可知,不同浓度的 4 种溶液都表现出明显的抗氧化活性,且其抗氧化活性随浓度的增大呈上升趋势(即呈现量效关系)。其中,以未稀释的乙醇浸提液(P_1)的抗氧化活性最高,对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系的抑制率达 50.69%,微波水提液(P_2)次之,抑制率为 34.12%。银杏中种皮提取液的抗氧化机制涉及两个方面:一是黄酮类物质能与具有促进过氧化作用的 Fe^{2+} 生成络合物,从而降低 Fe^{2+} 的催化活性^[15];二是黄酮类物质能将氢提供给中间自由基 $RO\cdot$ 和 $ROO\cdot$ 等,自身转变为稳定的酚基自由基,减缓游离自由基链式反应的速度,从而起到抑制卵黄脂蛋白进一步氧化的作用^[16]。而乙醇浸提液对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体系的抑制率(50.69%)远远高于近似浓度的标准芦丁溶液(23.42%),说明银杏中种皮提取液含有的多种黄酮类物质,与其他抗氧化剂之间具有协同效应。

2.2 对超氧阴离子自由基及羟自由基的清除能力

测定 3 种不同提取方法获得的银杏中种皮提取液清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力,结果(图 3)显示, S_1 , S_2 , S_3 3 种银杏中种皮提取液均具有较高的抗超氧阴离子和羟自由基活力,其中微波水提液(S_2)对超氧阴离子与羟自由基的清除能力分别达 213.96 和 411.26 U/L。提取液对这两种自由基的清除能力与其总黄酮质量浓度高低不呈正比关系, S_3 的总黄酮质量浓度虽然高于 S_1 和 S_2 ,但其清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力有所降低,这可能与提取工艺有关。由于乙醇浸提液(S_3)加工时间较长,可能使银杏中种皮中对自由基起清除作用的抗氧化成分受到破坏。

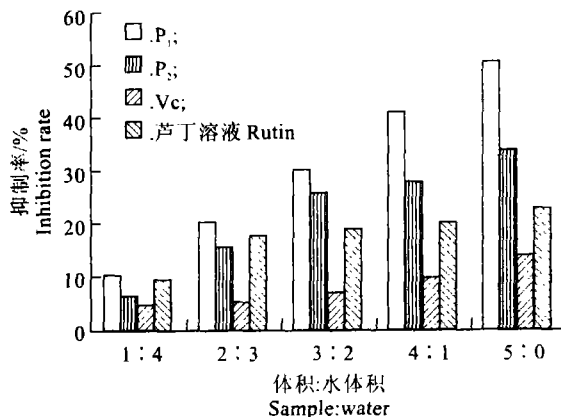


图 2 不同提取液对卵黄脂蛋白过氧化物的抑制率
Fig. 2 Inhibition rate of extracts on yolk lipoprotein peroxide

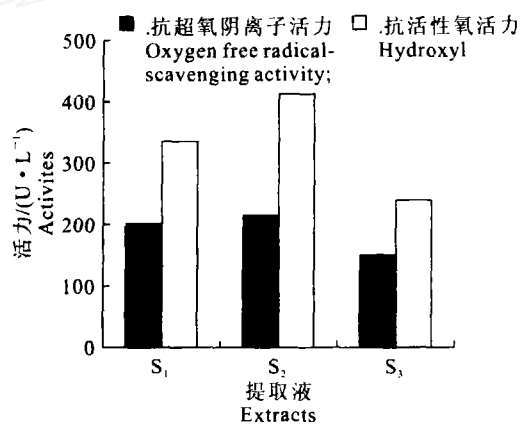


图 3 不同提取液清除超氧阴离子和羟自由基的能力

Fig. 3 Superoxide anion and hydroxyl radical-scavenging activities of extracts

2.3 对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 自由基化学性质十分稳定,因此常被用来评价黄酮类物质的抗氧化活性。本试验以标准芦丁溶液和维生素 C 溶液为对照,测定了 3 种提取液清除 DPPH 自由基的能力,结果见图 4。

由图 4 可知, D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , D_5 5 种样品溶液对 DPPH 均有很好的清除能力,并且 D_1 , D_2 , D_3 3 种不同加工方法得到的提取液与标准芦丁溶液和维生素 C 溶液的清除效果基本相当,其中乙醇超声提取液(D_3)清除率最高,达 89.80%,高于芦丁溶液清除率,略低于维生素 C 溶液清除率。

2.4 提取液的总抗氧化能力

D_1, D_2, D_3, D_4, D_5 5 种样品溶液总抗氧化能力的测定结果见图 5。由图 5 可知, D_1, D_2, D_3 3 种银杏中种皮提取液的总抗氧化能力与其总黄酮质量浓度呈正相关, 其中总黄酮质量浓度最高的乙醇超声提取液(D_3)的总抗氧化能力最高, 达 44.09 U/mL, 明

显高于维生素 C (29.23 U/mL) 和芦丁溶液 (8.45 U/mL)。提取液的抗氧化作用可能通过以下 3 条途径实现: ①清除游离自由基, 以免引发过氧化反应; ②分解过氧化物, 阻断过氧化链; ③络合对过氧化起催化作用的金属离子, 提高反应活化能, 阻碍过氧化反应的发生。

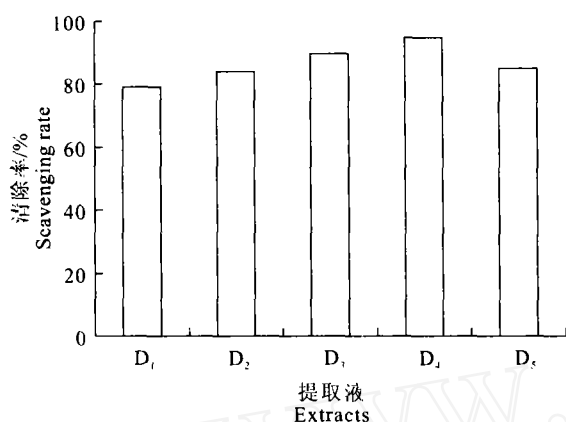


图 4 不同提取液对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 4 DPPH free radical-scavenging activities of extracts

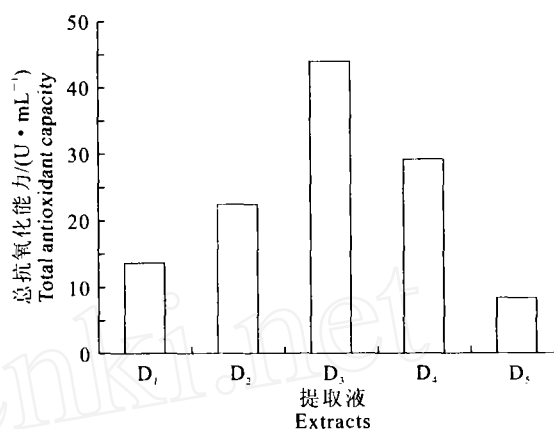


图 5 不同提取液的总抗氧化能力

Fig. 5 Total antioxidant capacity of extracts

3 讨论

本试验对银杏中种皮提取液的抗氧化活性进行了较为深入系统的研究, 通过 5 种检测指标分析了不同提取方法的生物学效应。结果表明, 无论是水或乙醇浸提, 还是微波或超声波提取, 银杏中种皮提取液均具有较高的抑制脂质过氧化和清除自由基的作用, 其中乙醇浸提液对卵黄脂蛋白 PUFA 过氧化体

系的抑制率为 50.69%, 微波水提液对超氧阴离子与羟自由基的清除能力分别达 213.96 和 411.26 U/L, 乙醇超声提取液对 DPPH 自由基的清除率及总抗氧化能力分别为 89.8% 和 44.09 U/mL, 说明银杏中种皮可作为新型天然抗氧化剂的来源, 具有良好的开发前景。但是, 不同的提取工艺对银杏中种皮的抗氧化作用及其机理有一定的影响, 有必要进一步优化提取工艺。

【参考文献】

- [1] 康西鹏, 张云. 银杏叶的研究进展及应用[J]. 山西食品工业, 2001, (1): 17-18.
- [2] 姚冬青, 王雪莲, 杨志. 银杏叶药理作用概述[J]. 牡丹江医学院学报, 2001, 22(2): 68-69.
- [3] 周坚, 叶甫云. 水提法提取银杏中种皮中黄酮类物质的研究[J]. 武汉工业学院学报, 1999, (3): 1-6.
- [4] 张尔贤, 俞丽君, 周意琳, 等. Fe^{2+} 诱发脂蛋白 PUFA 过氧化体系及对若干天然产物抗氧化作用的评价[J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(2): 218-222.
- [5] 曹炜, 宋纪蓉, 陈卫军. 蜂胶对脂质过氧化的抑制作用[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 34-36.
- [6] 李琳, 姜新发, 张志斌, 等. 枇杷皮和芒果皮粗提液抗氧化活性研究[J]. 电子科技大学学报, 2003, 32(6): 755-759.
- [7] Robak J, 于文胜, 孔爱英. 清除活性氧类药物的作用机制[J]. 国外医学·药学分册, 1995, 22(6): 346-350.
- [8] Lu Y, Foo L Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chem, 2000, 68: 81-85.
- [9] Berg R, Haenen G R M M, Berg H. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant (TEAC) capacity assay[J]. Food Chem, 2000, 70: 391-395.
- [10] 钱玉春, 董明盛, 江汉湖. 丹贝异黄酮的抗氧化作用[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(2): 104-108.
- [11] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

- [12] 张燕平,戴志远,陈肖毅.紫苏提取物体外清除自由基能力的研究[J].食品工业科技,2003,24(10):67-70.
- [13] 许申鸿,杭 珊.DPPH 分析法研究野生植物的抗氧化活性[J].青岛大学学报,1999,12(3):75-79.
- [14] 孙艳梅,徐雅琴,杨 林.天然物质类黄酮的抗氧化活性的研究[J].中国油脂,2003,28(3):54-57.
- [15] 郑裕国,王远山,薛亚平.抗氧化剂的生产及应用[M].北京:化学工业出版社现代生物技术与医药科技出版中心,2004.287-288.
- [16] 岳庆磊,郭效杰,罗宗铭,等.黄酮类化合物抗氧化机理及其在医药中的应用[J].广州化工,2003,31(2):10-12.

Studies on antioxidant activities of extracts from mesosperms of *Ginkgo biloba*

MO Xiao-yan, XU Jing, ZHANG An-ning

(School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

Abstract: The antioxidant activities of extracts from mesosperms of *Ginkgo biloba*, which was obtained by different extracting technologies such as microwave extraction, ultrasonic extraction, ethanol extraction and water extraction, were compared and analyzed through the model system of peroxidation of polyunsaturated fatty acid from yolk lipoprotein, the scavenging effects on superoxide anion free radical, hydroxyl radical, DPPH free radical as well as the total antioxidant capacity. The results showed that these extracts had higher antioxidant activities, and different extracting technologies may have some influence on the antioxidant activities and mechanism of extracts from mesosperms of *Ginkgo biloba*. The extract by ethanol extraction could inhibit yolk lipid peroxide with the rate of 50.69%. The extract by microwave extraction with water could scavenge O_2^- and $\cdot OH$, and the scavenging capacities were 213.96 and 111.26 U/L respectively. The extract by ultrasonic extraction with water could scavenge DPPH with the rate of 89.8% and its total antioxidant capacity was 44.09 U/mL.

Key words: mesosperm of *Ginkgo biloba*; flavonoid; antioxidant activity; free radical; inhibition rate; scavenging rate