

# 山苍子油的体外清除自由基作用

程超

(湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000)

**摘要:** 本文以新鲜的山苍子为原料, 通过超声波辅助水蒸气蒸馏法进行山苍子油的提取, 并通过 Fenton 体系和邻苯三酚自氧化法研究了山苍子油在体外对自由基的清除作用。实验结果表明, 超声波法可以提高山苍子油的得率, 山苍子粗油可以有效清除羟自由基、超氧自由基。

**关键词:** 山苍子油; 抗氧化; 自由基

## The Elimination of Free Radical in Vitro of *Litsea Cubeba* Oil

Cheng Chao

(The Bioscience and Technology College in Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

**Abstract:** In this article, using fresh *Litsea Cubeba* as raw material, the oil of its was extracted by water stream evaporation and ultrasonic wave. At the same time, the elimination effect in vitro of *Litsea Cubeba* oil was studied. The results showed that the extracting rate of *Litsea Cubeba* oil was enhanced by ultrasonic, and *Litsea Cubeba* Oil has a great effect on the elimination of free radical.

**Keywords:** *Litsea Cubeba* Oil; Antioxidation; Free radical

山苍子油为淡黄色到棕黄色油状液体, 柠檬醛是其主要成分占 60%—80%, 最高可达 90%, 是合成香料及制药工业重要的中间体<sup>[2]</sup>。除此之外, 还含有甲基庚烯酮, 香茅醛, 蒎烯、茨烯、柠烯及松油醇等, 是合成紫罗兰酮系列高级香料的主要原料, 也是食品工业良好的天然增香剂。

研究表明山苍子油具有较强的抗氧化活性, 本文利用 Fenton 反应法产生羟自由基, 其容易与甲基紫上的共轭双键结合, 从而使其褪色。通过加入山苍子油与甲基紫竞争结合羟自由基, 从而间接测定出山苍子油清除羟自由基的能力<sup>[3]</sup>。此外利用邻苯三酚自氧化法产生超氧阴离子自由基  $O_2^-$ , 其自氧化产物在 420nm 呈现最大吸收峰, 在反应体系中加入能清除自由基的物质, 使其吸光度低于对照组, 反应一段时间后, 加入抗坏血酸可终止反应, 使吸光度值稳定, 便于测定<sup>[4]</sup>。

## 1 材料、试剂与仪器

### 1.1 实验材料

山苍子: 购于湖北省恩施市。

### 1.2 试剂

1mol/L  $FeSO_4$  溶液: 称取 5.567g  $FeSO_4 \cdot 5H_2O$  固体, 用双蒸水定容至 20ml;

收稿日期: 2004-10-30

作者简介: 程超, 讲师, 研究生, 主要从事于食品化学与资源开发工作

1mmol/L 甲基紫溶液: 称取 0.0078g 甲基紫粉末定容至 20ml;

30%  $H_2O_2$  溶液: 市售 30%  $H_2O_2$  用高锰酸钾法标定, 浓度为 7.64mol/L。取 1ml  $H_2O_2$  稀释至 153ml, 从中取 1ml 加双蒸水定容至 20ml, 即为 2.5mmol/L  $H_2O_2$  溶液;

0.2mol/L KF 溶液: 称取 0.0376g KF 固体加双蒸水至 2ml;

Tris-HCL 配制: 称取 1.21g 三羟甲基氨基甲烷, 加双蒸水定容至 50ml; 从中取 25ml 与 10.95ml 0.2mol/L HCL 混合, 加双蒸水至 100 ml 即为 0.05mol/L Tris-HCL 缓冲溶液<sup>[5]</sup>;

45mmol/L 邻苯三酚溶液, 用 0.05mol/L Tris-HCL 溶解 (pH=8.2);

5% 抗坏血酸溶液;

蔗糖脂肪酸酯: HLB 值 13。

### 1.3 仪器

UV755B 紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; 水蒸汽蒸馏装置: JY92-II 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科器研究所。

## 2 实验方法

### 2.1 水蒸汽蒸馏法提取山苍子粗油工艺流程

鲜果 → 样品瓶 → 一次蒸馏提取 → 二次蒸馏提取 → 分离 → 装瓶、密封、冷藏

鲜果→研碎→超声波粉碎→一次蒸馏提取→二次蒸馏提取  
→分离→装瓶、密封、冷藏

## 2.2 实验操作

在水蒸汽蒸馏法提取山苍子油时,对原料进行粉碎。称取鲜果研碎,将碎末放入锥形瓶中,加水至刻度,锥形瓶放入装有冰块的大烧杯中,超声波粉碎,取出锥形瓶将料液倒入 500ml 磨口圆底烧瓶中,连接好水蒸汽蒸馏装置。在圆底烧瓶中加入少量沸珠,蒸馏至烧瓶中剩少许水时,加 100ml 蒸馏水进行二次蒸馏。提取的油水混合物用分液漏斗分离,将粗油装入 10ml 容量瓶中,密封、冷藏。

未经超声波处理的鲜果也采用上法提取。

## 2.3 山苍子粗油得率计算

山苍子粗油得率( $\%$ )= $(m_2-m_1)/m \times 100\%$

式中:  $m_1$ —100ml 容量瓶重(g)

$m_2$ —粗油与容量瓶质量(g)

$m$ —取样鲜果质量(g)

## 2.4 甲基紫溶液的制备

取 3 份 150ml 蒸馏水分别加入 1.5ml 甲基紫溶液,用 1mol/L  $H_2SO_4$  溶液调 pH 为 3.5 后,将其均分成 9 份装至 100ml 锥形瓶中。

## 2.5 羟自由基·OH 的产生

取二份甲基紫溶液,一份边搅拌边加入 1ml  $H_2O_2$  和 0.2ml  $FeSO_4$  溶液,反应 10min 后,加入 1 滴 KF 溶液以消除  $Fe^{3+}$  的干扰,以水为参比,于 580nm 处测吸光度值,记为  $A_1$ ; 另一份不加 Fenton 试剂,测吸光度值记为  $A_0$ ,  $\Delta A = A_0 - A_1$ 。用  $\Delta A$  间接表示·OH 的生成量,  $\Delta A$  越大,·OH 的生成量越多。

## 2.6 羟自由基·OH 清除率的测定

取 0.1ml 粗油加入到 10ml 含 0.1%蔗糖脂肪酸酯的乳化液中。取 5 份甲基紫溶液,分别加不同体积粗油乳化液,于 580nm 处测吸光度值,记为  $A_2$ 。

·OH 清除率= $(A_2 - A_1) / (A_0 - A_1) \times 100\%$

## 2.7 超氧自由基清除率的测定

在一系列试管中加 5ml 0.05 mol/L 的 Tris-HCL 缓冲液,对照组分别加不同体积的粗油乳化液,混均在 420nm 处测定吸光度,记为  $A_0$ , 实验组 I 分别加不同体积的乳化液并混匀,再加入 100 $\mu$ l 抗坏血酸溶液,待计时至 5min 时,立即注入反应体系中,混匀以终止反应在 420nm 处测定吸光度,记为  $A_1$ 。实验组 II 不加乳化液,按上述方法终止反应后,再加入对应的不同体积粗提液并混匀,在 420nm 处测定吸光度,记为  $A_2$ <sup>[5]</sup>。

抑制率(Y) =  $(A_2 - A_1) / (A_2 - A_0) \times 100\%$

## 3 结果与分析

### 3.1 山苍子粗油的提取

山苍子油是一种极易挥发的香精油,通过水蒸汽可使山苍子油从其鲜果中浸提出来。该法提取时间较长,粉碎后沸腾厉害,要注意控制加热温度。

表 1 超声波处理对山苍子得率的影响

Tab1 Influence of ultrasonic wave on the extraction rate of oil

超声波处理	未处理	5min	10min	15min	20min
得率(%)	1.180	1.355	1.405	1.407	1.408

由表 1 可知超声波处理鲜果后,山苍子油得率有所提高,粉碎 10min 后,粗油得率基本保持稳定。本实验所用山苍子鲜果较嫩,工艺复杂,提取粗油有部分损失。故得油率与有关资料提供的数据相比微偏低。

### 3.2 初始反应 pH 值的确定

pH 对 Fenton 体系的进行影响很大,因为过低的 pH 会导致  $Fe(OH)_3$  沉淀的生成,同时对甲基紫的吸光度值的稳定性也有很大的影响,所以在此对初始 pH 进行了确定。

实验研究发现,在 pH=3.5 时最利于 Fenton 反应的进行,甲基紫的颜色与 pH 关系如下: pH1.0→1.5: 绿→蓝; pH2.0→3.0: 蓝→紫; pH≥3.0 的酸性溶液中呈紫色,于 580nm 处有最大吸光度值,所以初始 pH 确定为 pH3.5。

### 3.3 甲基紫浓度的确定

甲基紫的浓度不同,在 580nm 处的吸光度值也不同,从而导致精确度下降,为了增加实验的准确性,在此对甲基紫的浓度进行了确定,具体见表 2。

表 2 不同浓度甲基紫溶液的吸光度

Tab 2 The absorbance with different concentration of Methyl Violet

浓度(mmol/L)	0.0067	0.01	0.0133	0.02
吸光度	0.399	0.585	0.827	0.983

从表 2 可以看出,甲基紫浓度在 0.01mmol/L 时,吸光度值近 0.7,此时测定精密度较高。

### 3.4 山苍子油对·OH 的清除作用

利用 Fenton 体系产生·OH,添加不同浓度的山苍子油测定其清除率,为了保证山苍子油能与反应体系充分融合,采用蔗糖脂肪酸酯做乳化剂配成一定浓度的山苍子油乳化液(具体配制方法见实验方法中的 2.5),结果见表 3 和图 1。

由图 1 可看出,山苍子油乳化液用量与清除·OH 自由基的能力存在一定的线性关系,当粗油乳化液用量高于 100 $\mu$ l 时,清除率在 50%以上,说明山苍子油有较强的清除·OH 自由基的能力,在作为添加剂使用

时,为达到最佳效果,应选择适当粗油乳化液用量。

表 3 粗油乳化液加入量与自由基抑制率的关系

Tab 3 The relation of quantity of oil emulsifier of hydroxyl radical

乳化液 (μl)	A0	A1	A2	抑制率 (%)
100	0.577	0.334	0.431	48.15
300	0.588	0.336	0.489	60.71
500	0.571	0.431	0.517	61.43
700	0.587	0.334	0.511	69.96
900	0.565	0.435	0.534	76.15

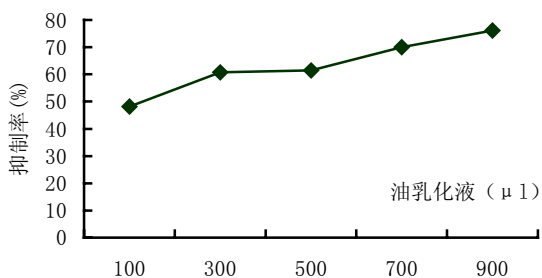


图 1 粗油乳化液用量对·OH 自由基清除率的影响

Fig1 The influence of quantity of oil emulsifier on the elimination of hydroxyl radical

### 3.5 山苍子油对超氧自由基的清除作用

采用邻苯三酚自氧化法测定山苍子油对超氧自由基的清除作用,利用上述配制的山苍子油乳化液,具体测定结果见表 4 和图 2。

表 4 粗油乳化液加入量与自由基抑制率的关系

Tab 4 The relation of quantity of emulsifier on the elimination of

#### Oxygen radical

乳化液 (μl)	A0	A1	A2	抑制率 (%)
100	0.111	0.376	0.483	28.76
300	0.187	0.363	0.570	54.05
500	0.210	0.327	0.470	55.68
700	0.285	0.338	0.410	57.60
900	0.347	0.365	0.384	51.35

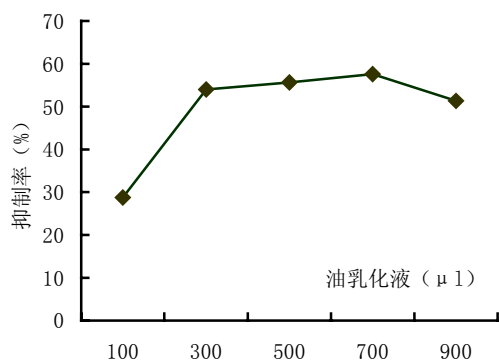


图 2 粗油乳化液用量对氧自由基清除力的影响

Fig2 The influence of quantity of Oil emulsifier on the elimination of Oxygen radical

由图 2 可以看出,山苍子油乳化液用量与清除氧自由基的能力存在密切的关系,当粗油乳化液用量在 200μl 以上时,清除率高于 50% 说明山苍子油有较强的清除氧自由基的能力。粗油乳化液用量为 400μl 时,清除率达到 57.60%。随着用量的增加,清除率有所降低,其具体原因还有待于研究。

## 4 结论与讨论

4.1 由实验发现山苍子油可以有效的清除·OH 和超氧阴离子自由基,清除率分别可以达到 76.15%和 57.60%。

4.2 利用 Fenton 体系产生·OH 自由基要控制好反应时间。

4.3 甲基紫溶液的吸光度值稳定后测定精确度高。

4.4 乳化剂用量不能太高,否则影响实验精确性。

### 参考文献

- [1] 成四喜.山苍子油综合利用前景.化学时刊[J],1991(6):16-17
- [2] 刘业程.山苍子化学.韶关师专学报[J],1989,(3):79-94
- [3] 庞战军,周政,陈瑗等.自由基医学研究方法[M].人民工业出版社:3,9
- [4] 李芳荣.山苍子油 β-环糊精包结物的制备工艺研究[J]:21-22
- [5] 王春雨.天然食物对自由基的作用.食品工业科技[J],2001,(6):21-22

(上接第 60 页)

3.4 温度也是影响贮藏茶叶含水量变化的一个十分重要的因素。低温能有效抑制贮藏茶叶含水量的增加,而且在低温贮藏下,不同初始含水量、不同包装的茶叶含水量变化的差别较常温下为小。所以,要控制贮藏茶叶含水量的变化,首先应低温贮藏;其次,是选用防潮性能好的包装。在保证这两条的前提下,初始含水量不一定很低,一般以 4~5%为宜。

### 参考文献

- [1] 陆锦时.红碎茶贮存包装试验报告 [J].茶叶科技, 1992 (4) :8~11
- [2] 华铁民主编.茶叶包装与储运 [M].北京:中国农业出版社, 1996:139
- [3] 杜长焯,闵未儒主编.四川茶叶 [M].成都:四川科学技术出版社, 1989:511~512
- [4] 周国兰.水分与茶 [J].贵州茶叶,1999 (2) :38