

仰玲玲,吴向阳,仰榴青.野葛藤地上部分挥发油成分分析和抗氧化活性研究[J].江苏农业科学,2014,42(2):268-271.

野葛藤地上部分挥发油成分分析和抗氧化活性研究

仰玲玲¹, 吴向阳², 仰榴青³

(1. 合肥职业技术学院生物应用技术系,安徽合肥 23800; 2. 江苏大学环境学院,江苏镇江 212013;

3. 江苏大学化学化工学院,江苏镇江 212013)

摘要:对茅山地区野葛藤的挥发成分进行了初步分析和抗氧化活性研究,采用水蒸气蒸馏-乙醚萃取法对野葛藤进行提取,用 GC/MS 对其挥发成分进行初步分析,并用 DPPH 法、邻二氮菲法和邻苯三酚自氧化法研究了葛藤挥发油清除自由基活性。得出结果:葛藤分离出的 153 个组分中可鉴定组分 64 个,其中主要以烷酸和烯酸类化合物为主;且挥发油都具有良好的清除自由基活性。

关键词:野葛藤;挥发油;水蒸气蒸馏-乙醚萃取法;GC/MS;抗氧化活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0268-04

野葛 [*Puerariae lobata* (Wild) Ohwi] 为豆科多年生落叶藤本植物,广泛分布在茅山地区。中国药典收载的葛根系野葛的干燥根,其药用最早记载于《神农本草经》。现代药理研究证实,葛根具有显著的扩张冠状动脉、增加冠脉血流量、降低血压及血管阻力、抗心律失常、抗氧化作用、提高学习记忆功能等多种药理作用^[1]。另外,近年来研究发现野葛的其他部位,如葛藤(葛藤茎和葛叶)、葛花,也具有类似的药理活性。目前我国野葛的研究和开发都集中在葛根与葛花^[2]部位,而对葛藤部位的分析主要为异黄酮类成分,对其他化学成分的分析以及生物活性的研究少。本研究分别利用水蒸气蒸馏-乙醚萃取法对野葛藤进行提取,并对所得成分进行初步分析和抗氧化活性研究,以期对葛藤的开发利用提供科学

依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

野葛藤样品,2007 年 10 月采集于江苏省茅山地区,60℃烘干,粉碎,过 60 目筛,贮存于干燥器中备用。5% 苯酚溶液的配制:取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,蒸馏,收集 182℃馏分,称取 10 g,加水溶解并稀释至 200.0 mL,摇匀,置棕色瓶内,放冰箱中备用。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·)(美国 Sigma 公司);邻二氮菲和苯丙三酚(国药集团化学试剂有限公司);95% 医用乙醇;其余试剂均为分析纯;所有用水均为双蒸水。

1.2 主要仪器与设备

气相色谱-质谱联用仪,配有 6890N 色谱仪、5975B VL MSD 和 HP7683 全自动进样器(美国 Agilent 公司);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);旋转蒸发仪 RE-52C(巩义市予华仪器有限责任公司)。

收稿日期:2013-07-07

作者简介:仰玲玲(1983—),女,安徽巢湖人,硕士,讲师,主要从事食品工艺与检测。E-mail:foodwhat605b@aliyun.com。

通信作者:吴向阳,博士,教授,主要从事生物资源高效利用研究。E-mail:wuxy@ujs.edu.cn。

在流通中运输设备最重要,权重为 63.64%。没有好的运输设备,冷链运输不能保证,牛奶微生物就会超标。

在销售中储藏技术最重要,权重高达 76.66%,说明销售商如何储存产品是乳品安全终端的关键环节。

3.2 增强质量安全意识

乳品从生产到销售,经历众多环节,一旦某个环节的从业人员安全意识淡薄,就极易出现问题。影响乳品安全的因素很多,有些因素具有不可预测、不可控制的特性,要求每个乳业从业人员都要具备风险意识,关注乳品的每个风险源,把产品质量问题消灭在萌芽状态。不断发生的乳品事件也在考验消费者对乳业的信心,只有保障产品的质量安全,才能提升乳企竞争力和重塑自身形象。另外,进行风险评估不是目的,不是将考评结果“写在纸上、挂在墙上”,评估结果能引起决策层重视才是关键。

3.3 严格乳业的全过程监管

为确保产品质量,需要在奶源、生产、流通和销售环节建立全过程监控体系,重视每一个环节,确保每个环节都不出现

问题,包括奶源、奶牛、原奶储藏、运输设备、储藏技术。这些关键点需要重点监督,但是我国食品问题监控是分段监督,双重标准、多头监管是目前食品问题的漏洞。进行食品监管体制改革是当前保证乳品安全的关键,可以按照生乳、各种乳制品的界限进行监管,防止出现游离于监管体系之外的主体。

本研究基于乳品生产过程进行分析,得出乳品安全评估指标体系,进而计算出各指标的权重,希望通过政府及企业的重视和改变,促进我国乳品业的可持续发展。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴:2011[M]. 北京:中国统计出版社,2012:13-21.
- [2] 乌尔里希·贝克. 风险社会[M]. 何博闻,译. 南京:译林出版社,2004:20.
- [3] Saaty T L. 层次分析法——在资源分配、管理和冲突分析中的应用[M]. 许树柏,译. 北京:煤炭工业出版社,1988:50-60.
- [4] 彭国甫,李树丞,盛明科. 应用层次分析法确定政府绩效评估指标权重研究[J]. 中国软科学,2004(6):136-139.

1.3 试验方法

1.3.1 葛藤挥发油的提取 准确称取葛藤茎叶 50 g, 置于 2 000 mL 圆底蒸馏烧瓶中, 加入 500 mL 蒸馏水, 用挥发油提取器进行提取, 时间为 12 h, 蒸出液用乙醚萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 乙醚自然挥发干, 得到金黄色挥发油 0.2011 g。

1.3.2 挥发油成分分析

1.3.2.1 供试样品的制备 取一定量的挥发油, 加入甲酯化试剂(10 mL 浓 H_2SO_4 缓慢倒入 90 mL CH_3OH 中, 搅匀, 待冷却加入 100 mL 苯)3.0 mL, 室温下反应 24 h; 加入 1.0 mL 苯和 0.5 mL 饱和 NaCl 溶液, 充分搅拌, 离心 5 min, 静置, 取上清液备用。

1.3.2.2 GC-MS 分析条件 气相色谱条件: DB-1 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 μm); 载气 He, 载气流量 1.50 mL/min; 柱温 75~220 $^{\circ}C$; 程序升温: 初始温度为 75 $^{\circ}C$, 保持 3 min 后以 8 $^{\circ}C/min$ 的速率升至 220 $^{\circ}C$, 保持 5 min; 气化室温度为 260 $^{\circ}C$; 分流比为 25:1。质谱条件: EI 离子源; 离子源温度 230 $^{\circ}C$; 电子能量 70 eV; 接口温度 250 $^{\circ}C$; 质量扫描范围 35~540 u。

1.3.3 抗氧化活性试验

1.3.3.1 清除 DPPH· 自由基试验^[3-4] 利用分光光度法测定 DPPH· 的清除率, 测定波长为 524 nm。分别取 2 mL 不同浓度的以 80% 乙醇为溶剂的样品液于试管中, 加入 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH· 溶液(以无水乙醇配制), 混合均匀, 暗处反应 30 min 后于 524 nm 处测定其吸光度 $D_{524\text{nm}}$, 以溶剂 80% 乙醇代替样品液测得空白吸光度 D_0 , 重复 3 次。清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S = (D_0 - D_{524\text{nm}}) / D_0 \times 100\%$$

1.3.3.2 清除羟自由基($\cdot OH$) 试验^[5] 取 1 mL 0.75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液于试管中, 依次加入 2 mL 0.2 mol/L pH 值 7.40 磷酸盐缓冲溶液和 1 L 蒸馏水, 充分混匀后, 加入 1 mL 0.75 mmol/L 硫酸亚铁溶液($FeSO_4$) 混匀, 再加入 1 mL 0.01% 双氧水(H_2O_2), 于 37 $^{\circ}C$ 水浴 60 min, 在 536 nm 处测其吸光度, 所测得的数据为损伤管的吸光度 $D_{\text{损}}$; 以 1 mL 样品液代替 1 mL 蒸馏水测得样品的吸光度 $D_{\text{样}}$; 用 1 mL 蒸馏水代替 1 mL 双氧水测得的吸光度为 $D_{\text{未}}$ 。重复 3 次。清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S = (D_{\text{样}} - D_{\text{损}}) / (D_{\text{未}} - D_{\text{损}}) \times 100\%$$

1.3.3.3 清除超氧自由基($O_2^{\cdot -}$) 试验^[6] 取 9 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 8.2)与 1 mL 样品液混合, 25 $^{\circ}C$ 恒温水浴 15 min。取 3 mL 混合液于比色皿中, 加入 0.1 mL 的 45 mmol/L 邻苯三酚, 摇匀, 在第 4 分钟加入 10 mol/L 盐酸 1 滴终止反应, 于 325 nm 处测定样品吸光度 D_1 , 同时分别测定不加邻苯三酚的样品液和磷酸盐混合液的吸光度 D_2 和以 1 mL 溶剂代替样品液的磷酸盐和邻苯三酚混合液的吸光度 D_3 , 重复 3 次。 $O_2^{\cdot -}$ 清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } S = [1 - (D_1 - D_2) / D_3] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 葛藤挥发油成分分析

用水蒸气蒸馏法提取葛藤挥发油 201.1 mg, 出油率为 0.402%。利用毛细管色谱对其挥发油成分进行了分析, 化学

工作站给出总离子流色谱图(图 1)。利用气-质联用技术对它进行总离子质谱检测, 采用计算机对各峰质谱图进行标准谱库的检索并结合质谱裂解规律, 从 153 个峰中鉴定出 64 个组分, 占挥发油总量的 91.17%。利用峰面积归一化计算各组分的相对含量。分析鉴定结果见表 1。

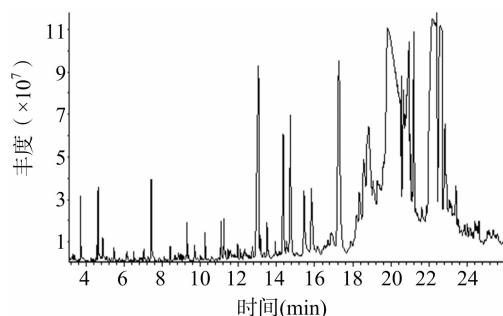


图1 葛藤挥发油总离子流

从表 1 可知, 成功鉴定出的 64 种化合物中: 醇类化合物(7 个, 见表 1 中序号 14、22、44、54、55、58、60) 占总量的 5.22%; 酮类化合物(2 个, 见表 1 中序号 25、38) 占 4.41%; 烯炔类化合物(3 个, 见表 1 中序号 22、34、57) 占 0.65%; 烷烃类化合物(3 个, 见表 1 中序号 7、10、21) 占 0.12%; 醛类化合物(6 个, 见表 1 中序号 2、8、11、13、15、59) 占 0.32%; 烷酸和烯酸类化合物(31 个, 烷酸见表 1 中序号 1、6、9、12、16、19、23、28~31、35、36~37、41~43、46~47、49、53、61, 烯酸见表 1 中序号 3、27、40、48、52~53、56、62~63) 占 69.72%; 芳烃类化合物(4 个, 见表 1 中序号 5、18、20、50) 占 0.65%; 酯类化合物(5 个, 见表 1 中序号 4、17、33、45、64) 占 3.55%; 其他化合物(1 个, 见表 1 中序号 39) 占 1.35%。

从分析结果可以看出, 葛藤挥发油中主要化学成分为: 2-甲基-Z, Z-3, 13-十八碳二烯醇, 植酮、壬二酸、十二烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、(Z)-9-十八烯酸、10, 13-十六二烯酸、11-十八碳烯酸、8-(2-呋喃)辛酸酯、2-戊酸十四酯、9-十八炔, 其中主要以烷酸和烯酸类化合物为主。

2.2 抗氧化活性试验

2.2.1 清除 DPPH· 自由基效果 图 2 和图 3 分别为挥发油和维生素 C 对 DPPH· 的清除效果。可以看出, 挥发油对 DPPH· 具有清除作用, 清除率随着提取物浓度的增加而增大。挥发油对 DPPH· 自由基的半清除率(IC_{50}) 值为 3.3011 mg/mL, 其清除 DPPH· 能力弱于维生素 C(0.009 1 mg/mL)。

2.2.2 清除羟基自由基($\cdot OH$) 效果 图 4 和图 5 分别为挥发油和维生素 C 对 $\cdot OH$ 的清除效果。可以看出, 挥发油对 $\cdot OH$ 有一定的清除作用, 且清除率随着浓度的增加而增大, 当浓度为 4 mg/mL 时, 挥发油的清除率为 72.48%。挥发油对 $\cdot OH$ 自由基的半清除率 IC_{50} 值为 3.075 5 mg/mL, 其清除 $\cdot OH$ 能力弱于维生素 C(0.347 7 mg/mL)。

2.2.3 清除超氧自由基($O_2^{\cdot -}$) 效果 图 6 和图 7 分别为挥发油和维生素 C 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除效果, 可见挥发油在 3 mg/mL 的清除率达到 64.39%。挥发油的 IC_{50} 值为 2.342 4 mg/mL, 其清除率低于维生素 C(0.229 9 mg/mL)。

表 1 葛藤挥发油化学成分及其相对含量

序号	保留时间 (min)	化合物名称	分子式	分子量	相似度 (%)	相对含量 (%)
1	3.693	己酸	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	87	0.36
2	4.242	(Z)-2-庚烯醛	C ₇ H ₁₂ O	112	94	0.02
3	4.377	2-己烯酸	C ₇ H ₁₂ O ₂	128	89	0.03
4	4.523	3,3-二甲氧基丙酸甲酯	C ₆ H ₁₂ O ₄	148	90	0.07
5	4.859	2-戊基呋喃	C ₉ H ₁₄ O	138	93	0.19
6	5.454	庚酸	C ₇ H ₁₄ O ₂	186	90	0.10
7	6.901	正十一烷	C ₁₁ H ₂₄	156	93	0.04
8	7.013	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	142	89	0.08
9	7.405	辛酸	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	83	0.61
10	8.830	正十二烷	C ₁₂ H ₂₆	170	95	0.05
11	8.953	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	156	93	0.04
12	9.290	壬酸	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	95	0.21
13	9.985	(Z)-2-癸烯醛	C ₁₀ H ₁₈ O	154	93	0.04
14	10.793	(E)-2-癸烯醇	C ₁₀ H ₂₀ O	156	84	0.01
15	10.972	反式-2,4-癸二烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	152	95	0.03
16	11.073	癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	95	0.22
17	11.230	甲基-8-氧辛酸甲酯	C ₉ H ₁₆ O ₃	172	83	0.25
18	11.679	1,2-乙酰基-1,1,6-三甲酯萘	C ₁₃ H ₁₆	172	84	0.04
19	11.948	正癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	96	0.09
20	12.094	2-乙烯基萘	C ₁₂ H ₁₀	154	92	0.06
21	12.509	十六基环氧乙烷	C ₁₈ H ₃₆ O	268	95	0.03
23	13.148	辛二酸	C ₈ H ₁₄ O ₄	174	95	0.15
25	13.821	β-紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	192	93	0.02
26	13.933	6,6-二甲氧基-辛酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₄	216	83	0.12
27	14.124	13-十四烯酸	C ₁₄ H ₂₆ O	210	86	0.04
28	14.348	十二烷酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	95	1.16
29	14.516	10-氧代癸酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	186	91	0.16
30	14.730	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	188	91	1.50
31	15.447	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	98	0.86
32	15.672	柏木脑	C ₁₅ H ₂₆ O	222	94	0.05
33	15.840	8-(2-呋喃)辛酸酯	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224	84	1.03
34	16.513	17-三十五碳烯	C ₃₅ H ₇ O	490	86	0.14
35	17.276	肉豆蔻酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	81	4.19
36	18.352	肉豆蔻酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	282	83	1.19
37	18.577	十五烷酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	97	2.13
38	18.835	植酮	C ₁₈ H ₃₆ O	268	93	4.39
39	19.295	9-十八炔	C ₁₈ H ₃₄	250	89	1.35
40	19.665	(Z)-9-十六碳烯酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96	2.02
41	19.855	十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96	17.19
42	20.349	十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96	3.45
43	20.517	十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96	0.95
44	20.562	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	296	93	0.61
45	20.663	2-戊酸十四酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	63	1.96
47	20.966	十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	91	3.05
48	21.022	15-甲基-11-棕榈油酸	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	84	0.59
49	21.235	十七烷酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	94	2.40
50	21.874	茺菝	C ₁₆ H ₁₀	202	83	0.36
51	22.222	10,13-十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	282	99	11.93
52	22.413	11-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	284	99	2.10
53	22.626	十八烷酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	98	6.33
54	22.861	2-甲基-Z,Z-3,13-十八碳二烯醇	C ₁₉ H ₃₇ O	281	86	2.55
55	23.086	1-二十二烷醇	C ₂₂ H ₄₆ O	326	93	0.72
56	23.187	十八烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	95	0.57
57	23.299	1-十九烯炔	C ₁₉ H ₃₈	266	83	0.48
58	23.433	(R)-()-14-甲基-8-十六炔-1-醇	C ₁₇ H ₃₂ O	252	97	0.81
59	23.658	顺式-9-十六烯醛	C ₁₆ H ₃₀ O	238	80	0.11
60	23.826	叔十六硫醇	C ₁₆ H ₃₄ S	258	83	0.15
61	24.028	十九烷酸	C ₁₉ H ₄₀ O	300	93	0.26
62	24.544	9,12,15-十八碳三烯酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	84	0.24
63	25.183	6,9,12-十八碳三烯酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	80	0.23
64	25.408	邻苯二甲酸二异辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	83	0.24

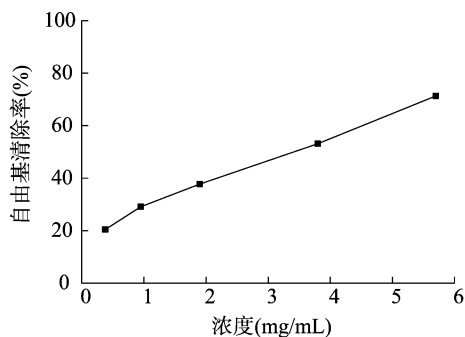


图2 挥发油对DPPH·的清除效果

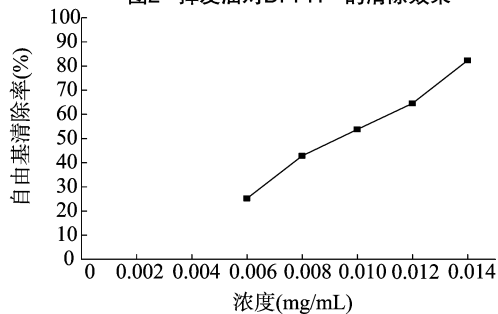


图3 维生素C对DPPH·的清除效果

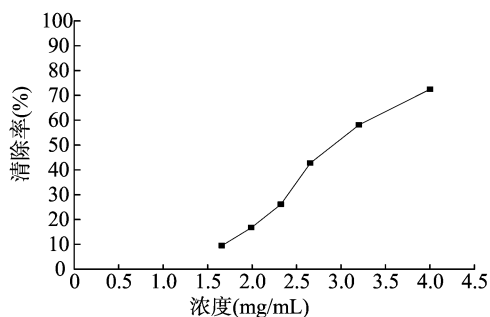


图4 挥发油对·OH的清除效果

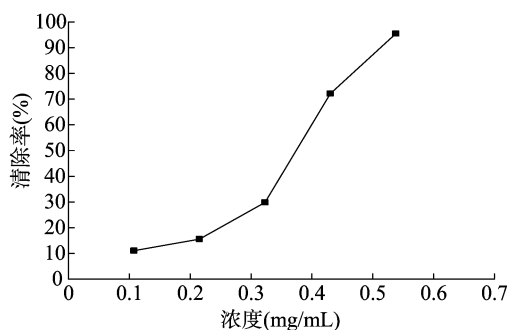
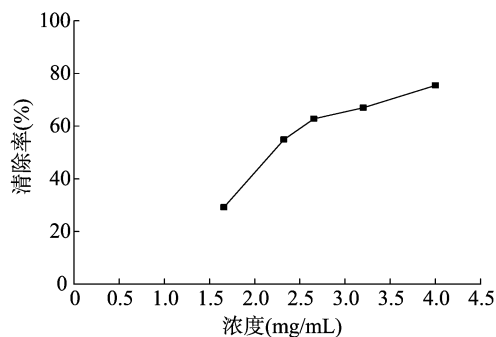
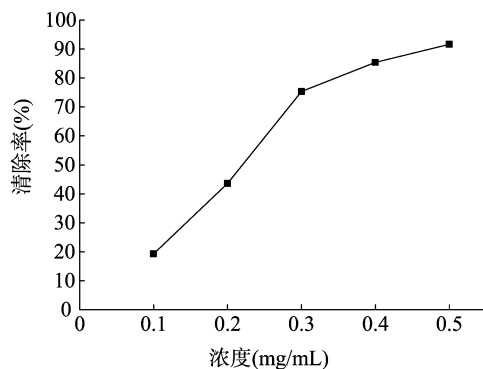


图5 维生素C对·OH的清除效果

图6 挥发油对O₂·⁻的清除效果图7 维生素C对O₂·⁻的清除效果

醛类化合物(6个)占0.32%;酸类化合物(31个)占69.72%;芳烃类化合物(4个)占0.65%;酯类化合物(4个)占3.55%;其他化合物(1个)占1.35%。

本研究通过清除DPPH·、自由基能力、清除羟自由基能力、清除超氧阴离子能力3个方面试验,并与维生素C进行比较,得出较为客观的结论:野葛藤挥发油对3种自由基(DPPH·、·OH、O₂·⁻)均有较好的清除作用,可开发为天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1]赵亮,潘显道,朱承根. 葛根黄酮的研究进展[J]. 医学研究通讯,2004,33(11):33-35.
- [2]周艳晖,岑颖洲,李药兰,等. 广东连南地区野葛花挥发油成分的GC-MS分析[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版,2004,25(3):381-385.
- [3]Liyan-Pathirana C M, Shahidi F. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions[J]. Food Chemistry,2007,101(3):1151-1157.
- [4]许申鸿,杭璐. 葡萄籽和葡萄片清除自由基作用的研究[J]. 食品科学,1999(12):28-30.
- [5]于立梅,赵谋明,崔春,等. 山竹壳中原花青素提取分级及抗氧化活性的研究[J]. 食品与机械,2007,23(4):60-64.
- [6]Ouetier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour[J]. Journal of Ethnopharmacology,2000,72(1/2):35-42.

3 讨论与结论

采用硫酸催化甲酯化衍生化方法,对野葛藤挥发油进行了GC-MS分析,鉴定出64种化合物,其中醇类化合物(7个)占总量的5.22%;酮类化合物(2个)占4.41%;烯炔类化合物(3个)占0.65%;烷烃类化合物(3个)占0.12%;