

丁香活性物质提取工艺优化与抗氧化活性研究^{*}

江慎华¹ 王书源¹ 马海乐¹ 王振斌¹ 吴士云¹ 王昌禄²

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 天津科技大学食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

【摘要】 对丁香抗氧化活性物质提取工艺及其抗氧化活性进行了研究。结果表明,最佳提取工艺条件为:60%乙醇、提取温度60℃、料液比1:20和提取时间40 min;在此工艺条件下抗氧化活性物质提取率为 $(10\,480.4 \pm 40.3) \mu\text{mol/g}$,获得的相应丁香粗提物具有较强的抗氧化活性,总还原力弱于相同质量浓度的阳性对照BHT和VC ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),FRAP法抗氧化能力和DPPH自由基清除能力弱于相同质量浓度的VC,强于相同质量浓度的BHT ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);通过生物活性追踪发现丁香抗氧化活性物质主要存在于其弱极性的乙酸乙酯部分,该部分100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度样液的总还原力达 0.634 ± 0.040 ,FRAP法抗氧化能力达 0.433 ± 0.005 ,DPPH自由基清除率达 $(85.294 \pm 0.499)\%$;相关关系表明丁香抗氧化活性的主要物质基础为总多酚和总黄酮。

关键词: 丁香 抗氧化活性 提取工艺 生物活性追踪法

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)01-0132-07

Extracting Technology and Antioxidant Activity of Bioactive Components from Clove

Jiang Shenhua¹ Wang Shuyuan¹ Ma Haile¹ Wang Zhenbin¹ Wu Shiyun¹ Wang Changlu²

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China 2. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract

The extracting technology and antioxidant activity of bioactive components from clove were studied. The results showed that the optimal parameters of the extracting technology were as follows, the concentration of ethanol was 60%, the extracting temperature was 60℃, the ratio of sample to extracting solution was 1:20, and the extracting time was 40 min. The recovery ratio of bioactive compounds from clove was $(10\,480.4 \pm 40.3) \mu\text{mol/g}$ in this extracting technology. The crude extracts obtained from this extracting technology were proved to have strong antioxidant activity. The reducibility of the crude extracts was weaker than those of two positive controls (BHT and VC) ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The FRAP values and the activity of scavenging DPPH radicals of the crude extracts were weaker than those of VC and stronger than those of BHT ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). It was found by using the bioassay guided method that the bioactive antioxidants of clove were mainly attributed to the ethyl acetate fraction. The reducibility (OD 700 nm) and FRAP values (OD 593 nm) of the sample of the ethyl acetate fraction with the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ were 0.634 ± 0.040 and 0.433 ± 0.005 , respectively. The percentage of scavenging DPPH radicals of the same sample was $(85.294 \pm 0.499)\%$. The result of correlation analysis showed that the strong antioxidant activity mainly resulted from the high

收稿日期: 2009-07-27 修回日期: 2009-09-11

^{*} “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD27B06)、江苏大学高级专业人才培养启动基金项目(09JDC023)、江苏大学学生科研项目(07A066,07A067)和江苏大学大学生实践创新训练计划项目(2009072)

作者简介: 江慎华, 讲师, 博士, 主要从事天然产物、食品营养学和功能性食品研究, E-mail: jiangshenhua@yahooh.com.cn

通讯作者: 王昌禄, 教授, 博士生导师, 主要从事天然产物与发酵工程研究, E-mail: changluwang@yahooh.com.cn

contents of the total phenols and total flavonoids.

Key words Clove, Antioxidant activity, Extracting technology, Bioassay guided method

引言

细胞内自由基产生的损伤可以导致癌症、心血管病和免疫系统衰退等多种退变性疾病^[1],摄入外源性的抗氧化剂能有效地预防或抑制这些疾病的发生。因此,天然抗氧化剂正在受到越来越多的关注^[2]。丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugenia caryophylla* Thunb.)的干燥花蕾,是药食两用植物^[3]。研究表明,丁香具有众多功能活性^[4-6]。丁香的抗氧化性研究方面,国内仅有陈文学和郭新竹进行了研究^[7-8];国外,对丁香抗氧化的研究主要集中在丁香精油方面^[9-11]。在丁香活性物质提取方面的研究,仅有采用超临界 CO₂ 萃取技术从丁香中提取丁香酚并确定其最佳提取工艺的相关报道^[12]。

尽管目前国内外具有较多有关丁香的研究报道,但对其抗氧化活性物质提取工艺及采用生物活性追踪法对其抗氧化活性进行研究却暂无相关的报道。本文通过采用单因素、正交试验及生物活性追

踪法对其最佳提取工艺和抗氧化活性进行研究,以期产业化开发丁香和阐明丁香抗氧化物质基础和作用机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

三吡啶三吡嗪(tripyridyl triazine,简称 TPTZ)、DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼)购自 Sigma 公司,其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 试验材料

丁香,产地广西,南京正草堂药业有限公司。药材买回后立即粉碎、过 40 目筛后置冰箱中备用。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素试验

称取 5 g 丁香粉,分别采用表 1 中因素、水平进行单因素试验,提取液合并定容成(料液比单因素试验除外)统一体积、稀释 380 倍后采用 FRAP 法进行抗氧化活性物质提取率的测定。其中,料液比是指丁香粉质量(g)与提取溶剂体积(mL)的比例。

表 1 丁香抗氧化活性物质提取单因素试验

Tab.1 Univariate experiments of extracting antioxidants from clove

因素	水平	抗氧化活性物质提取条件
乙醇体积分数/%	0,20,40,50,60,70,80,90	1:10 料液比,60℃,100 r/min 水浴振荡提取 30 min、提取 3 次
提取次数	1,2,3,4	1:10 料液比,60%乙醇,60℃,100 r/min 水浴振荡提取 30 min
提取时间/min	10,20,30,40,50,60	1:10 料液比,60%乙醇,60℃,100 r/min 水浴振荡提取 3 次
提取温度/℃	20,30,40,50,60,70,80,90	1:10 料液比,60%乙醇,100 r/min 水浴振荡提取 30 min、提取 3 次
料液比	1:5,1:10,1:15,1:20,1:30,1:50	60℃,60%乙醇,100 r/min 水浴振荡提取 30 min、提取 3 次

1.3.2 正交试验

以单因素试验结果为参考,设计四因素三水平(L₉(3⁴))的正交试验,其因素水平如表 2 所示,试验重复 3 次,以抗氧化活性物质提取率为考察指标。

表 2 丁香抗氧化活性物质提取正交试验因素水平

Tab.2 Parameters of orthogonal experiments of extracting antioxidants from clove

水平	因素			
	乙醇体积 分数 A/%	提取温度 B/℃	料液比 C	提取时间 D/min
1	50	50	1:10	30
2	60	60	1:15	40
3	70	70	1:20	50

1.3.3 丁香粗提物抗氧化活性的研究

称取 200 g 丁香粉末样品,采用正交试验获得的最佳提取工艺提取 3 次,提取液合并浓缩后冷冻

干燥获得丁香抗氧化活性物质粗提物,将该粗提物配制成质量浓度为 50、100、150 μg/mL 的样品,以相同质量浓度的 BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)和维生素 C(VC)作为阳性对照,分别进行总还原力、FRAP 法抗氧化能力和 DPPH 自由基清除能力的测定。

(1) 总还原力的测定

采用 Liang 等^[13]方法,略有修改。取 1 mL 样液于试管中,依次加入 2.5 mL、0.2 mol/L pH 值 6.6 磷酸缓冲溶液和 2.5 mL 1% 铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)溶液,于 50℃ 水浴中保温 20 min 后快速冷却,再加入 2.5 mL 10% 三氯醋酸溶液,以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,依次加入 2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液振荡摇匀,静置 10 min 后在 700 nm 下测其吸光度。

(2) FRAP 法抗氧化能力的测定

采用 Wijngaard 等^[14]方法,略有修改。取

100 μL 样液同 1.0 mL FRAP 工作液混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 于波长 593 nm 测定吸光度。以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为标准品做标准曲线, 样品的抗氧化能力以波长 593 nm 处的吸光度或 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量 ($\mu\text{mol/g}$) 表示。FRAP 工作液由 0.3 mol/L pH 值 3.6 乙酸钠缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液 (TPTZ 溶液采用 40 mmol/L HCl 溶解和定容) 和 20 mmol/L 三氯化铁以体积比 10:1:1 混合, 现用现配。

(3) DPPH 自由基清除能力的测定

采用 Lai 等^[15] 方法, 略有修改。0.5 mL 提取液同 1.0 mL、0.1 mmol/L DPPH 溶液 (需现用现配) 振荡摇匀, 对照样为 0.5 mL 95% 乙醇和 1.0 mL 0.1 mmol/L DPPH 混合, 常温避光反应 60 min 后于波长 517 nm 处比色, 以 95% 乙醇作参比调零。DPPH 自由基清除率计算式为

$$Y = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

式中 A_0 ——517 nm 下对照样品的吸光度

A ——517 nm 下不同质量浓度样品的吸光度

1.3.4 生物活性追踪法丁香抗氧化活性的研究

采用 Jiang 等^[1] 方法, 称取 200 g 丁香粉末样品, 以正交试验获得的最佳提取工艺提取 3 次, 提取液合并浓缩后采用正己烷脱除丁香精油, 之后加入一定体积的蒸馏水, 超声辅助溶解至悬浊液后分别采用极性逐渐增大的乙酸乙酯和正丁醇依次萃取, 最后剩余水相部分。3 个不同样品分别旋转浓缩、真空干燥后冷冻干燥获得乙酸乙酯相、正丁醇相和水相, 将获得的极性部分配制成质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的样品, 以相同质量浓度的 BHT 和 VC 作为阳性对照分别进行总还原力、FRAP 法抗氧化能力和 DPPH 自由基清除能力的测定, 以追踪丁香抗氧化活性物质的来源和初步物质基础。

1.3.5 丁香抗氧化活性物质基础的初步分析

为了初步分析丁香抗氧化活性的物质基础, 对丁香不同极性部分的总黄酮和总多酚含量进行测定, 并计算出各不同极性部分样品总还原力、FRAP 法抗氧化能力、DPPH 自由基清除能力与总黄酮、总多酚含量之间的相关关系。

(1) 总黄酮含量的测定

采用 Bakar 等^[16] 方法测定样品总黄酮含量。加 2.25 mL 蒸馏水于试管中, 取 0.5 mL 样液加入试管, 加入 0.15 mL 5% NaNO_2 , 静置 6 min, 加入 0.3 mL 10% 的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 静置 5 min, 加入 1.0 mL 1 mol/L NaOH, 振荡均匀后于波长 510 nm 处比色测定, 以芦丁为标样配成质量浓度为 25、50、100、200、

400、600、800、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 8 个样液做标准曲线。

(2) 总多酚含量的测定

采用 Bakar 等^[16] 方法测定样品总多酚含量, 略有修改。将 Folin 试剂取出适当体积稀释 10 倍, 取该稀释液 4 mL 加入到 1 mL 提取样液中, 然后加入 5 mL 7.5% 的碳酸钠溶液, 振荡均匀室温静置 2 h 后于 765 nm 处读数。以没食子酸为标样配成质量浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$ 8 个样液做标准曲线。本文所有试验均 3 次重复, 试验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

乙醇体积分数的单因素试验结果如图 1a 所示。由该图可以看出, 在 0~50% 范围内, 抗氧化活性物质提取率随着乙醇体积分数的增大而增加, 但在 50%~70% 范围内随着体积分数的增大提取率增加不明显, 到 80%~90% 时反而下降。其原因可能是 50%~70% 的乙醇对水溶性和脂溶性物质都具有较好的溶解性。选定 50%、60% 和 70% 乙醇体积分数做正交试验。

提取温度的单因素试验结果如图 1b 所示。由该图可见, 20~60 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内随着提取温度的增大提取率逐渐增加, 60 $^{\circ}\text{C}$ 效果最好, 60 $^{\circ}\text{C}$ 以后随着温度的增加提取率逐渐降低。其原因可能由于丁香所含的一些抗氧化活性物质对 60 $^{\circ}\text{C}$ 以上的高温较敏感的缘故。选定 50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 作为正交试验的提取温度。

提取次数的单因素试验结果如图 1c 所示。如该图所示, 随着提取次数的增加提取率逐渐增大, 但随着提取次数的增加所耗费的溶剂和成本也急剧增加, 综合各种因素考虑本试验选定提取 3 次。

提取料液比的单因素试验结果如图 1d 所示。如该图所示, 随着提取料液比从 1:5 到 1:50 的变化, 提取率逐渐增加。其中, 料液比从 1:5 到 1:10 时增加幅度比较大, 当料液比由 1:10 继续变化到 1:50 时, 增加幅度逐渐减少。本试验选定料液比 1:10、1:15 和 1:20 做正交试验。

提取时间的单因素试验结果如图 1e 所示。从该图可以发现, 在提取时间 10~40 min 范围内随着提取时间的增加提取率逐渐增大。提取时间 40 min 以后随着时间的增加提取率逐渐减少。这可能是随着时间的延长丁香所含的一些对温度较为敏感的抗氧化活性物质逐渐失去活性的缘故。本试验选定提取时间 30、40、50 min 做正交试验。

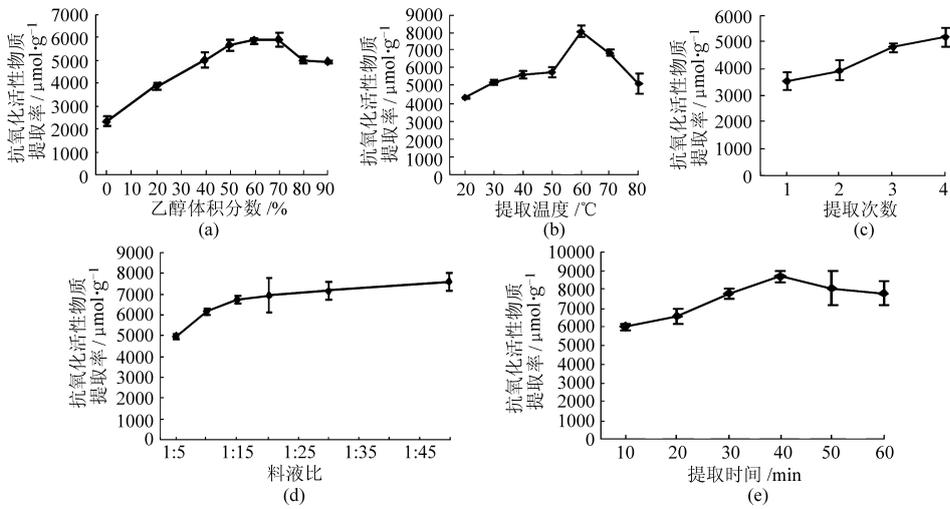


图 1 丁香抗氧化活性物质提取工艺单因素试验结果

Fig.1 Results of univariate experiments for extracting antioxidants from clove

2.2 丁香抗氧化活性物质提取正交试验结果

根据单因素试验确定的四因素三水平的正交试验结果如表 3 所示。由该表可以看出影响丁香抗氧化活性物质提取率的因素从大到小排序依次为乙醇

体积分数、料液比、提取时间和提取温度,最佳提取工艺为 A_2 、 B_2 、 C_3 和 D_2 , 即 60% 乙醇、提取温度 60℃、料液比 1:20 和提取时间 40 min。

表 3 丁香抗氧化活性物质提取的正交试验结果

Tab.3 Orthogonal experiments of extracting antioxidants from clove

试验序号	A	B	C	D	抗氧化活性物质提取率/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	7 943.9 ± 67.2
2	1	2	2	2	9 558.9 ± 40.3
3	1	3	3	3	9 910.4 ± 134.4
4	2	1	2	3	9 558.9 ± 40.3
5	2	2	3	1	10 423.4 ± 161.2
6	2	3	1	2	9 093.4 ± 214.9
7	3	1	3	2	8 048.4 ± 26.9
8	3	2	1	3	7 107.9 ± 67.2
9	3	3	2	1	6 281.4 ± 214.9
k_1	9 137.733	8 517.067	8 048.4	8 216.233	
k_2	9 691.9	9 030.067	8 466.4	8 900.233	
k_3	7 145.9	8 428.4	9 460.733	8 859.067	
R	2 546	601.6667	1 412.333	684	

正交试验方差分析结果如表 4 所示。由该表可以发现正交试验 4 个因素的显著性水平均低于 0.001。因此 4 个因素对试验的最终结果都具有极强的显著性。按照最佳提取工艺进行 3 次平行验证试验,最后测定的结果为 $(10 480.4 \pm 40.3) \mu\text{mol/g}$ 。由此证明该最优提取工艺较为可靠,可以考虑作为后续扩大提取工艺的提取条件。

2.3 丁香粗提物抗氧化活性的测定结果与分析

Jeong 等^[17]采用测定总还原力、FRAP 法抗氧化能力和 DPPH 自由基清除能力等方法测定桔梗的抗氧化活性并获得了良好的研究结果。本文采用以上 3 种方法测定了丁香粗提物的抗氧化能力。

表 4 丁香抗氧化物质提取正交试验方差分析

Tab.4 Analysis of variance of orthogonal experiments for extracting antioxidants from clove

来源	平方和	自由度	均方和	F 比	显著性水平
校正模型	0.085 (a)	8	0.011	232.304	0.000
截距	3.330	1	3.330	72 389.570	0.000
A	0.060	2	0.030	647.755	0.000
B	0.004	2	0.002	38.121	0.000
C	0.017	2	0.009	190.179	0.000
D	0.005	2	0.002	53.161	0.000
残差	0.000	9	4.60×10^{-5}		
总和	3.416	18			
校正总和	0.086	17			

在总还原力的测定结果中(表 5),50、100 和

150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内丁香粗提物在波长 700 nm 处的 OD 值分别高达 0.153 ± 0.009 、 0.299 ± 0.005 和 0.439 ± 0.0145 , 尽管在此质量浓度范围内其总还原力均不及相同质量浓度的阳性对照 BHT 和 VC ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$), 但丁香粗提物毕竟为混合物, 其中所含的杂质比较多, 而阳性对照均为分析纯的高纯度产品。如果进一步提高活性物质的纯度, 其抗氧化活性会得到极大加强。

FRAP 法抗氧化能力 (以 593 nm 处的 OD 值表示) 的测定结果表明 (表 5), 丁香粗提物也具有很强的抗氧化能力。在 50、100 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度范围内其 593 nm 处的 OD 值分别高达 0.208 ± 0.012 、 0.362 ± 0.012 和 0.429 ± 0.001 , 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$

的质量浓度时甚至和相同质量浓度的 VC 没有极显著性差异 ($P < 0.001$)。尽管质量浓度在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其吸光度值极显著性低于 VC ($P < 0.001$), 但均极显著性高于阳性对照 BHT ($P < 0.001$)。由此结果可见丁香粗提物的强抗氧化活性得到了进一步验证。

DPPH 自由基清除率的测定结果表明 (表 5), 质量浓度为 50、100 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香粗提物的清除率分别为 $(66.118 \pm 0.332)\%$ 、 $(79.647 \pm 0.832)\%$ 和 $(83.294 \pm 0.666)\%$, 尽管显著性低于 VC, 但仍然高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BHT ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$)。可见丁香粗提物具有很强的自由基清除能力。

表 5 丁香粗提物抗氧化能力的测定结果

Tab. 5 Antioxidant activities of the crude extracts from clove

质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	抗氧化活性	样品			显著性 水平
		BHT	丁香粗提物	VC	
50	总还原力	0.291 ± 0.004^B	0.153 ± 0.009^C	0.417 ± 0.005^A	$P < 0.001$
100		0.518 ± 0.006^B	0.299 ± 0.005^C	0.695 ± 0.043^A	$P < 0.001$
150		0.602 ± 0.034^B	0.439 ± 0.015^B	0.913 ± 0.080^A	$P < 0.001$
50	FRAP 法抗氧化能力	0.144 ± 0.014^C	0.208 ± 0.012^B	0.444 ± 0.011^A	$P < 0.001$
100		0.234 ± 0.008^C	0.362 ± 0.012^B	0.472 ± 0.023^A	$P < 0.001$
150		0.273 ± 0.006^B	0.429 ± 0.001^A	0.473 ± 0.024^A	$P < 0.001$
50	DPPH 自由基清除率/%	65.765 ± 1.165^B	66.118 ± 0.332^B	84.353 ± 0.166^A	$P < 0.05$
100		66.353 ± 0.499^C	79.647 ± 0.832^B	94.706 ± 1.165^A	$P < 0.01$
150		68.353 ± 0.665^C	83.294 ± 0.666^B	95.294 ± 0.333^A	$P < 0.001$

2.4 生物活性追踪法丁香抗氧化活性的研究

在发现丁香粗提物具有较强抗氧化活性的基础上, 采用生物活性追踪法对丁香抗氧化物质进行活性追踪, 以便了解丁香抗氧化活性物质来自于哪个极性部分。以相同质量浓度的 BHT 和 VC 为阳性对照, 对采用 1.3.4 节方法获得的丁香 3 个不同极性部分 (乙酸乙酯相、正丁醇相和水相) 分别进行抗氧化活性 (总还原力、FRAP 法抗氧化能力和 DPPH 自由基清除能力) 测试, 通过不同极性部分抗氧化能力的强弱得到活性追踪的结果。

不同极性部分总还原力测定结果表明 (表 6), 丁香抗氧化活性物质主要存在于弱极性的乙酸乙酯部分, 其 700 nm 的吸光度高达 0.634 ± 0.040 , 显著性高于其他两个极性更强的正丁醇相 (0.066 ± 0.009) 和水相部分 (0.142 ± 0.005) ($P < 0.001$)。同时, 乙酸乙酯相的总还原力也高于阳性对照 BHT ($P < 0.001$), 尽管稍低于 VC (0.695 ± 0.043), 但无显著性差异 ($P > 0.001$)。由此可见丁香乙酸乙酯相具有极强的抗氧化能力, 丁香的抗氧化物质主要来自于该相。丁香不同极性部分 FRAP 法抗氧化能

力结果表明 (表 6), 在丁香不同极性部分的样品中仍以乙酸乙酯相抗氧化活性最高, 其在 593 nm 处的 OD 值高达 0.433 ± 0.005 , 均极显著性高于正丁醇相 (0.117 ± 0.018) 和水相 (0.192 ± 0.011) ($P < 0.001$), 同时也显著性高于阳性对照 BHT ($P < 0.001$), 虽然稍低于 VC, 但无显著性差异 ($P > 0.001$)。由此可见, 丁香的强抗氧化活性物质主要来自于乙酸乙酯相得到了进一步验证。

丁香不同极性部分 DPPH 自由基清除率结果表明 (表 6)。在 3 个不同极性部分中仍以乙酸乙酯相清除率最高 ($85.294 \pm 0.499\%$), 极显著性高于正丁醇相 ($64.941 \pm 0.666\%$) 和水相 ($22.000 \pm 2.163\%$) ($P < 0.001$), 尽管乙酸乙酯相清除率低于 VC ($94.706 \pm 1.165\%$), 但仍显著性高于 BHT ($68.353 \pm 0.499\%$) ($P < 0.001$)。由此可见, 丁香极强的自由基清除能力的物质基础也主要是由弱极性的乙酸乙酯相所贡献。Jiang 等^[1] 和 Chen 等^[18] 在采用类似的生物活性追踪法研究香椿和紫萼花强抗氧化活性物质时也发现这两种植物的抗氧化活性物质主要来自于弱极性的乙酸乙酯相。

表 6 丁香不同极性部分抗氧化能力的测定结果

Tab. 6 Antioxidant activities of the different fractions from clove

抗氧化活性	样品(100 μg/mL)				
	正丁醇相	水相	乙酸乙酯相	BHT	VC
总还原力	0.066 ± 0.009 ^C	0.142 ± 0.005 ^C	0.634 ± 0.040 ^A	0.518 ± 0.006 ^B	0.695 ± 0.043 ^A
FRAP 法抗氧化能力	0.117 ± 0.018 ^C	0.192 ± 0.011 ^B	0.433 ± 0.005 ^A	0.234 ± 0.008 ^B	0.472 ± 0.023 ^A
DPPH 自由基清除率/%	64.941 ± 0.666 ^C	22.000 ± 2.163 ^D	85.294 ± 0.499 ^B	68.353 ± 0.499 ^C	94.706 ± 1.165 ^A

注:同一行不同字母表示各样品之间存在显著性差异($P < 0.001$)。

2.5 丁香抗氧化活性物质基础的初步分析

为了进一步分析丁香强抗氧化活性的物质基础,对丁香各不同极性部分的总黄酮和总多酚的含量进行了测定,其测定结果如表 7 所示。从该表可见,丁香乙酸乙酯部分的总多酚与总黄酮含量最高,分别达到(522.690 ± 9.415) mg/g 和(258.586 ± 30.168) mg/g,均显著性高于其他两个极性部分($P < 0.05$)。不同极性部分总多酚和总黄酮含量与总还原力、FRAP 法抗氧化能力极度相关,与 DPPH 自由基清除能力也高度相关,其 R^2 分别为 0.994 1、0.975 3、0.762 8 和 0.987 8、0.963 7、0.790 9。由此可见,丁香抗氧化活性的主要物质来源于乙酸乙酯部分,而乙酸乙酯部分强抗氧化活性的主要物质基

础由该部分高含量的总多酚和总黄酮所贡献。Jiang 等^[1]采用类似的方法对香椿抗氧化活性进行研究时也发现其主要的抗氧化活性物质也存在于乙酸乙酯部分,主要的物质基础也是由高含量的总黄酮和总多酚所贡献,其不同极性部分 FRAP 法抗氧化能力和总还原力与总多酚和总黄酮含量的相关系数分别为 0.979 6、0.980 0 和 0.976 8、0.982 4。由于绝大多数黄酮类化合物的天然存在形式为糖苷型,而黄酮苷元的抗氧化能力基本都比相应的糖苷类化合物强^[19-20]。因此,采用相应的酸或酶对丁香乙酸乙酯部分水解将黄酮苷转变成相应苷元的话会进一步提高其抗氧化活性。

表 7 丁香不同极性部分总多酚、总黄酮含量及抗氧化活性与其相关关系

Tab. 7 Contents of the total phenols and flavonoids and the correlation between the reducibility and the antioxidant activity of clove

成分	成分含量/mg·g ⁻¹			成分含量与抗氧化活性之间的相关关系		
	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相	总还原力	FRAP 法抗氧化能力	DPPH 自由基清除能力
总多酚	522.690 ± 9.415 ^A	5.870 ± 1.058 ^C	18.1 ± 0.230 ^B	$R^2 = 0.994 1$	$R^2 = 0.975 3$	$R^2 = 0.762 8$
总黄酮	258.586 ± 30.168 ^A	53.283 ± 13.080 ^B	50.168 ± 10.895 ^B	$R^2 = 0.987 8$	$R^2 = 0.963 7$	$R^2 = 0.790 9$

注:同一行不同字母表示各样品之间存在显著性差异($P < 0.05$)。

3 结论

(1) 通过单因素试验和正交试验确定了丁香抗氧化活性物质的最佳提取工艺,在此条件下获得的丁香粗提物具有较强的抗氧化活性。

(2) 通过生物活性追踪发现丁香抗氧化活性物

质主要存在于其弱极性的乙酸乙酯部分,该部分质量浓度为 100 μg/mL 样液的总还原力、FRAP 法抗氧化能力和 DPPH 自由基清除率均显著性高于阳性对照 BHT($P < 0.001$)。

(3) 相关关系表明丁香抗氧化活性的主要物质基础为其高含量的总多酚和总黄酮。

参 考 文 献

- Jiang S H, Wang C L, Chen Z Q, et al. Antioxidant properties of the extract and subfractions from old leaves of *toona sinensis* roem (meliaceae)[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2009, 33(3):425 ~ 441.
- Gioti E M, Fiamegos Y C, Skalkos D C, et al. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(3): 398 ~ 404.
- 刘洪宇,朱姝,小松かつ子,等. 丁香水溶性化学成分的研究[J]. *中药材*,2008,31(7):998 ~ 1 000.
Liu Hongyu, Zhu Shu, Komatsu Katsuko, et al. Study on aqueous chemical constituents from the flower buds of *eugenia caryophylla*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2008,31(7):998 ~ 1 000. (in Chinese)
- Singh A K, Dhamanigi S S, Asad M. Anti-stress activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove)[J]. *Indian Journal of Pharmacology*,2009,41(1): 28 ~ 31.

- 5 Rodrigues T G, Fernandes A, Sousa J P B, et al. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages[J]. Natural Product Research, 2009, 23(4): 319 ~ 326.
- 6 Mishra R K, Singh S K. Safety assessment of *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) extract with respect to testicular function in mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(10): 3 333 ~ 3 338.
- 7 陈文学, 豆海港, 仇厚援. 丁香提取物抗氧化研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 149 ~ 152.
Chen Wenxue, Dou Haigang, Qiu Houyuan. Research of clove extract on antioxidant properties[J]. Food Research and Development. 2006, 27(1): 149 ~ 152. (in Chinese)
- 8 郭新竹, 秦国华. 丁香、桂皮抗氧化作用的研究[J]. 食品科技, 1999(1): 49 ~ 50.
Guo Xinzhu, Qin Guohua. The antioxidant activities of clove and cassia[J]. Food Science and Technology, 1999 (1): 49 ~ 50. (in Chinese)
- 9 Samusenko A L. Investigation of antioxidant activity of essential oils from lemon, pink grapefruit, coriander, clove and its mixtures by capillary gas chromatography[J]. Oxidation Communications, 2008, 31(3): 519 ~ 526.
- 10 Misharina T A, Samusenko A L. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008, 44(4): 438 ~ 442.
- 11 Abdel-Wahhab M A, Aly S E. Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis[J]. Journal of Applied Toxicology, 2005, 25(3): 218 ~ 223.
- 12 Yanling G, Liu J H, Lü R M, et al. An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 57(2): 237 ~ 241.
- 13 Liang C H, Syu J L, Mau J L. Antioxidant properties of solid-state fermented adlay and rice by *Phellinus linteus*[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 841 ~ 845.
- 14 Wijngaard H H, Rößle C, Brunton N. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 202 ~ 207.
- 15 Lai P, Li K Y, Lu S, et al. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran[J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 538 ~ 544.
- 16 Bakar M F A, Mohamed M, Rahmat A, et al. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 479 ~ 483.
- 17 Jeong C H, Choi G N, Kim J H, et al. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*[J]. Food Chemistry, 2010, 118(2): 278 ~ 282[2009-09-11]. <http://www.elsevier.com/locate/foodchem>
- 18 Chen F A, Wu A B, Shieh P, et al. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*[J]. Food Chemistry, 2006, 94(1): 14 ~ 18.
- 19 殷涌光, 闫琳娜, 于庆宇. 酶解法提高松针黄酮抗氧化性能试验[J]. 农业机械学报, 2009, 40(6): 129 ~ 132, 178.
Yin Yongguang, Yan Linna, Yu Qingyu. Experiment on enzymatic hydrolysis to improve *in vitro* anti-oxidative activity of pine needle flavonoids[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(6): 129 ~ 132, 178. (in Chinese)
- 20 李晓磊, 李丹, 殷涌光. 酶法提高大豆糖蜜抗氧化活性及其机理[J]. 农业机械学报, 2009, 40(2): 135 ~ 138, 109.
Li Xiaolei, Li Dan, Yin Yongguang. Enhanced antioxidant activity of soybean molasses using cellulase[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(2): 135 ~ 138, 109. (in Chinese)