

液相及气相植物精油清除 DPPH 自由基的研究

柴向华, 刘智臻, 吴克刚

(广东工业大学轻工化工学院食品科学与工程系, 广东广州 510006)

摘要: 本文采用分光光度法研究了 14 种植物精油在液相和气相状态下清除 DPPH 自由基的能力。实验结果显示不同精油对 DPPH 自由基有不同的清除效果, 在液相和气相条件中, 肉桂精油、百里香油、丁香精油的清除效果最好; 进一步选取肉桂精油、百里香油、丁香精油进行复配, 丁香精油分别与肉桂精油、百里香油复配产生了协同增效效应, 特别是丁香精油和百里香油复配时在气相、液相中均具有很好清除 DPPH 自由基的效果; 丁香精油与百里香油复配时, 28 °C 的气相清除率明显高于 19 °C, 19 °C 时丁香精油占 60~80% 会出现气相复配增效效应, 而在 28 °C 时占 20~60% 则出现气相复配增效效应, 在液相时丁香精油占 40~80% 出现复配增效效应。在不同的复配比例中, 复配物中的不同抗自由基活性成分间会产生协同增效效应。

关键词: 植物精油; 自由基; DPPH

文章编号: 1673-9078(2014)11-218-222

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.038

Scavenging of DPPH Free Radicals by Plant Essential Oils in Gas and Liquid Phases

CHAI Xiang-hua, LIU Zhi-zhen, WU Ke-gang

(Department of Food Science and Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging capacities of 14 types of essential oils in the gas and liquid phases were studied via spectrophotometry. The essential oils exhibited different DPPH free radical scavenging capacities. Under liquid and gas phase conditions, cinnamon, thyme, and clove essential oils exhibited the best scavenging capacities. Furthermore, cinnamon, thyme, and clove essential oils were used to prepare compounded essential oils, and the clove essential oil produced synergistic effects with the cinnamon and thyme oils. In particular, the compounded essential oil prepared from thyme and clove essential oils had good DPPH scavenging capacities in both the liquid and gas phases. When clove essential oil was compounded with thyme oil, the rate of DPPH radical scavenging in the gas phase at 28 °C was obviously higher than that at 19 °C. Synergistic effects in the gas phase at 19 °C and 28 °C, as well as in the liquid phase were appeared when clove essential oil accounted for 60% to 80%, 20% to 60%, and 40% to 80%, respectively. With different compounding ratios, the different anti-free radical active ingredients of the compound could produce synergistic effects.

Key words: plant essential oil; free radical; 2,2-diphenylpicrylhydrazyl

自由基又称游离基, 系外层轨道含有未配对电子的原子、原子团或特殊状态的分子的总称。自由基作为一类含有未成对电子的物质被认为可以和生物分子反应而造成细胞损伤和凋亡^[1]。一定浓度的自由基是机体进行正常生命活动的必要条件之一, 但当其产生过量或出现在不适当的细胞部位将通过过氧化反应而导致分子结构及功能的破坏最终造成细胞、组织的病理改变。此外自由基对蛋白分子的攻击可造成蛋白质结构及功能的改变^[2]。空气中某些物质能吸收波长

在 290~700 nm 范围内光波, 被激发后发生光解反应, 产生自由基, 可能造成光化学烟雾等危害^[3]; 在塑料的注塑、挤压、缝焊和切割等工艺均可使空气中产生自由基^[4]。电离辐射环境空气中的物质会被电离形成稳定性自由基, 附着于飘尘上, 较长时间浮游在空气中, 对脐血淋巴细胞 DNA 具有损伤效应^[5]。散布在空气中的自由基会直接攻击人的皮肤, 从表皮细胞中抢夺电子, 使皮肤失去弹性, 粗糙老化产生皱纹, 破坏细胞膜, 干扰细胞的新陈代谢等危害。降低自由基危害的途径主要有两条: 一是利用内源性自由基清除系统清除体内多余自由基; 二是发掘外源性抗氧化剂(自由基清除剂), 阻断自由基对人体的入侵^[6]。有研究报道一些精油具有抗自由基成分, 如肉桂精油^[7]、迷迭

收稿日期: 2014-04-23

基金项目: 广东省部产学研合作专项资金(2012A090300010, 2012B091100477, 2011A090200004); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040007305)

作者简介: 柴向华(1971-), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事食品化学研究

香油^[8]和薄荷油^[9]具有清除自由基的能力。植物精油是一类植物次生代谢物质,分子量较小,可随水蒸气蒸出,并具有一定挥发性^[10]。为此,本文研究比较一些植物精油气相和液相的自由基清除效果,并分析了精油清除自由基的活性成分。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物精油:百里香油、茶树油、丁香油、香紫苏油、香柠檬油、迷迭香油、肉桂精油、桉叶油、山苍子油、甘牛至油、薄荷油、八角茴香油、鼠尾草精油、香茅油均为食用级;

其他试剂均为分析纯。

1.2 液相精油实验方法

1.2.1 2×10^{-5} mol/L 二苯代苦味肼基(DPPH·)乙醇溶液的配制

准确称取 0.00197 g 二苯代苦味肼基溶解于无水乙醇中,并定容于 250 mL 容量瓶,低温储藏备用。

1.2.2 10%精油溶液的配制

取 0.5 mL 精油溶于 4.5 mL 无水乙醇中配制成体积分数为 10%的精油溶液,低温储藏备用。

1.2.3 精油液相对 DPPH·清除率的测定

吸取 2 mL 2×10^{-5} mol/L DPPH·溶液,再加入 2 mL 无水乙醇,置于带塞试管中,记作 A_0 。在另外 2 根带塞试管中加入 2 mL 10%精油样品溶液,分别加入 2 mL 2×10^{-5} mol/L DPPH·溶液、2 mL 无水乙醇溶液,分别记作 A_i 和 A_j 。用力摇匀,将 A_0 、 A_i 、 A_j 所表示的样品在室温下暗处静置 30 min 后,加入比色皿中于波长 517 nm 处进行吸光度的测定,以无水乙醇做为对照调零,分别测出 A_0 、 A_i 、 A_j 所表示样品的吸光度值。

$$SR\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

1.3 气相精油实验方法

1.3.1 2×10^{-4} mol/L 二苯代苦味肼基(DPPH·)乙醇溶液的配制

准确称取 0.0197 g 二苯代苦味肼基溶解于无水乙醇中,并定容于 250 mL 容量瓶,低温储藏备用。

1.3.2 10%精油溶液的配制

取 0.5 mL 精油溶于 4.5 mL 无水乙醇中配制成体积分数为 10%的精油溶液,低温储藏备用。

1.3.3 精油气相对 DPPH·清除率的测定

取直径为 6 cm 培养皿 3 个,分别编号为 1、2、3。

(1) 取 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH·乙醇溶液 2 mL 于 1 号培养皿中,置于室温自然挥发干无水乙醇,准确移取 17 μ L 精油溶液滴加在培养皿的盖子内中央,然后将培养皿倒扣盖子上,迅速用封口膜密封,在黑暗中反应 30 min,打开培养皿,加入 2 mL 无水乙醇,充分摇匀,再加入 18 mL 无水乙醇,摇匀,吸取一部分,于波长 517 nm 处测得吸光值 A_1 ;

(2) 另取 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH·乙醇溶液 2 mL 于 2 号培养皿中,准确移取与(1)中精油溶液等量的无水乙醇滴加在培养皿的盖子内中央,再按(1)所述的方法同样操作,测得吸光值 A_2 ;

(3) 在 3 号培养皿中加入无水乙醇 2 mL,按(1)所述的方法同样操作,测得吸光值 A_3 ;按下式计算精油对 DPPH·自由基的清除率:

$$SR\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2}\right) \times 100\%$$

1.4 精油 GC-MS 分析

气相色谱-质谱条件:型号:Agilent 6890-5973。色谱柱:AB-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m),进样口温度:250 $^{\circ}$ C,柱温:70 $^{\circ}$ C (2 min)---280 $^{\circ}$ C (17 min) (8 $^{\circ}$ C/min),柱流量:0.7 mL/min,进样量:0.2 μ L,离子源温度:230 $^{\circ}$ C,连接线温度:280 $^{\circ}$ C,扫描范围:29.0~350.0u。通过图库中的荷质比自动检索来对色谱峰代表的成分进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 不同植物精油清除 DPPH 自由基的研究

2.1.1 不同植物精油液相清除 DPPH 自由基的研究

研究百里香油、茶树油、丁香油、香紫苏油、香柠檬油、迷迭香油、肉桂精油、桉叶油、山苍籽油、甘牛至油、鼠尾草精油、薄荷油、八角茴香油、香茅油 14 种精油在液相对 DPPH·的清除效果,结果如表 1 所示。

由表 1 可见,当精油浓度为 10% 时,14 种精油均对 DPPH 自由基具有不同程度清除效果,其中山苍籽油、香茅油、肉桂精油、甘牛至油、百里香油、八角茴香油、丁香精油、桉叶油、鼠尾草精油 9 种精油的清除率高于或接近 90%,这些精油中大多富含酚类和醛类。进一步降低 9 种精油浓度发现,精油清除 DPPH 自由基的效果随精油浓度降低而降低,其中桉叶油受浓度影响最为显著,其次是鼠尾草精油、甘牛至油、八角茴香油、山苍籽油受浓度影响也较为明显,相对

而言,肉桂精油、百里香油、丁香精油受浓度影响较小。抗氧化剂所表现出来的抗氧化活性强弱主要取决于其吸收孤对电子后能稳定化能力:酚类>醛类>醇类,由于丁香酚、百里香酚、肉桂醛结构中活性部位吸收自由基孤对电子后能通过苯环杂化而稳定化,因此三者表现出杰出的 DPPH· 的清除活性。

表 1 不同植物精油液相对 DPPH 自由基的清除率

Table 1 Scavenging rates of DPPH free radical using different plant essence oils in the liquid phase

精油	精油浓度% ^a		
	10	1	0.01
山苍籽油	98.15±1.05	70.08±3.79	12.21±1.35
香茅油	97.78±0.59	93.43±1.54	31.50±1.12
肉桂精油	97.15±1.27	97.58±2.14	67.37±1.26
甘牛至油	96.36±1.19	46.70±1.33	4.33±0.92
百里香油	95.28±1.91	91.60±0.48	81.58±0.84
八角茴香油	93.55±2.48	30.21±2.94	12.82±2.98
丁香精油	92.39±2.23	94.70±0.14	81.39±1.89
桉叶油	90.22±1.03	9.61±1.12	3.85±2.87
鼠尾草精油	89.32±1.13	32.25±1.88	1.25±0.55
茶树油	84.39±0.58		
香柠檬油	38.50±3.09		
迷迭香油	30.23±1.18		
薄荷油	83.50±4.86		
香紫苏油	67.88±9.76		

注:^a 每组均为 3 次平行实验,以平均数±标准偏差来表示。

2.1.2 不同植物精油气相清除 DPPH 自由基的研究

固定精油用量 0.05 μL/mL (以空间体积计),在室温下研究 14 种精油气相对 DPPH· 的清除效果,结果表 2 所示。

由表 2 可见,14 种精油中,丁香精油对 DPPH· 的清除效果最佳,清除率高达 70.62%,其次为甘牛至油,清除率为 59.65%,百里香油和肉桂精油次之,清除率分别为 50.95% 和 35.13%,其他精油对 DPPH· 的清除效果都较差,其中桉叶油对 DPPH· 的清除效果最差,仅为 2.58%。实验结果可见,精油气相对 DPPH· 的清除效果与液相有较为明显的差异,这与精油气相和液相组成的差异密切相关。液态精油中对 DPPH· 具有清除作用的活性成分,只有易于挥发到气相中才能发挥活性,若非活性成分较活性成分易于挥发,则气相中活性成分比例就低,不同精油中活性成分挥发性有差异,所以精油气相与液相对 DPPH· 的清除效果出现差异。

表 2 不同植物精油气相对 DPPH· 的清除率

Table 2 Scavenging rates of DPPH free radical using different plant essence oils in the gas phase

精油	清除率/% ^a
百里香油	50.95±0.28
茶树油	10.76±1.19
丁香油	70.62±0.75
香紫苏油	6.12±1.15
香柠檬油	3.97±0.23
迷迭香油	8.65±0.65
肉桂精油	35.13±0.17
桉叶油	2.58±0.93
山苍子油	6.23±0.79
甘牛至油	59.65±0.14
薄荷油	4.74±1.36
八角茴香油	3.26±1.44
鼠尾草精油	11.98±0.08
香茅油	9.21±1.02

注:^a 每组均为 3 次平行实验,以平均数±标准偏差来表示。

2.2 植物精油清除 DPPH 自由基的协同效应研究

选择气相和液相对 DPPH· 均具有很好清除效果的肉桂精油、百里香油、丁香精油等比例复配,研究其协同效应。液相精油浓度为 0.01%,气相精油浓度 0.05 μL/mL (以空间体积计),结果如表 3 所示。

表 3 三种植物精油清除 DPPH· 的协同效应

Table 3 Synergic effects of DPPH free radical scavenging using three kinds of plant essential oils

精油复配	液相清除率% ^a	气相清除率% ^a
丁香精油+肉桂精油+百里香油	84.02±1.02	54.00±0.13
丁香精油+肉桂精油	77.36±0.52	81.70±0.07
丁香+百里香	83.90±0.01	81.03±0.56
肉桂+百里香	73.52±0.53	45.03±0.77
丁香	74.47±0.01	63.18±0.34
肉桂	69.79±0.02	24.89±0.17
百里香	81.25±0.01	66.52±0.65

注:^a 每组均为 3 次平行实验,以平均数±标准偏差来表示。

由表 3 可见,丁香精油分别与肉桂精油、百里香油复配产生了协同增效效应,而肉桂精油与百里香油复配未表现出增效效应;在丁香精油与肉桂精油、丁香精油与百里香油复配的基础上,分别进一步复配百

里香油、肉桂精油时发现,对液相清除 DPPH 的效果无影响,但导致气相清除 DPPH 的效果出现协同减效效应。总体而言,丁香精油和百里香油复配时气相、液相均具有很好清除 DPPH 的效果。

2.3 温度和精油复配比例对清除 DPPH 自由基影响的研究

固定精油液相浓度为 0.01%,精油气相浓度 0.05 μL/mL (以空间体积计),研究 19 °C、28 °C 丁香精油和百里香油复配比例对清除 DPPH 自由基的影响,结果如表 5 所示。

表 4 温度和精油复配比例对清除 DPPH 的影响

Table 4 Effect of temperatures and compounding ratios of essential oils on DPPH free radical scavenging

复配比例%		气相清除率% ^a		液相清除率% ^a
丁香精油	百里香油	19 °C	28 °C	28 °C
0	100	12.12±0.01	53.62±0.03	58.12±0.06
20	80	30.43±0.38	73.25±0.02	52.74±0.07
40	60	22.56±0.02	64.34±0.01	62.45±0.10
60	40	35.23±0.03	64.46±0.12	63.26±0.14
80	20	37.56±0.21	59.85±0.15	64.83±0.16
100	0	26.38±0.19	63.67±0.17	58.82±0.21

注:^a 每组均为 3 次平行实验,以平均数±标准偏差来表示

由表 4 可见,19 °C 气相清除率明显较 28 °C 低,因为高温促进精油挥发而提高了空间精油浓度;对于气相,19 °C 时丁香精油占 60~80% 产生复配增效效应,28 °C 时丁香精油占 20~60% 产生复配增效效应;而对于液相,丁香精油占 40~80% 产生复配增效效应。

表 5 丁香精油与百里香油复配时主要成分

Table 5 Main ingredients in compounded clove and thyme oils

丁香油比例%	丁香香酚	石竹烯	α-葑草烯	乙酸丁香酚酯	百里酚	对-伞花烃	γ-松油烯	柠檬烯	总酚	总烯
0	0	0	0	0	46.33	26.35	21.15	1.11	46.33	48.61
20	15.47	3.35	0.51	0.24	37.06	21.08	16.92	0.89	52.53	42.99
40	30.94	6.70	1.01	0.48	27.80	15.81	12.69	0.67	58.74	37.36
60	46.40	10.04	1.52	0.73	18.53	10.54	8.46	0.44	64.93	31.73
80	61.87	13.39	2.02	0.97	9.27	5.27	4.23	0.22	71.14	26.1
100	77.34	16.74	2.53	1.21	0	0	0	0	77.34	20.48

从表 5 可见,丁香精油含有的酚类成分比百里香油高出 67%,百里香油含有的烯类成分比丁香精油高出 137%。因此,当丁香精油与百里香油复配时,相对于丁香精油而言,酚类成分有所减少了,但烯类成分能大幅度增加。虽然酚类会优先烯类与自由基发生

反应,但烯类对酚类可能具有协同增效效应,所以丁香精油与百里香油按一定比例复配时出现增效效应。

2.4 丁香和百里香复合精油组成成分分析

采用气-质联进行成分的分析鉴定,丁香精油与百里香油总离子图如图 1~2 所示,复配时主要成分如表 5 所示。

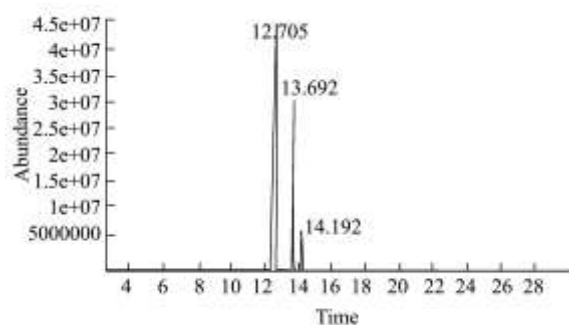


图 1 丁香精油的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of clove essential oil

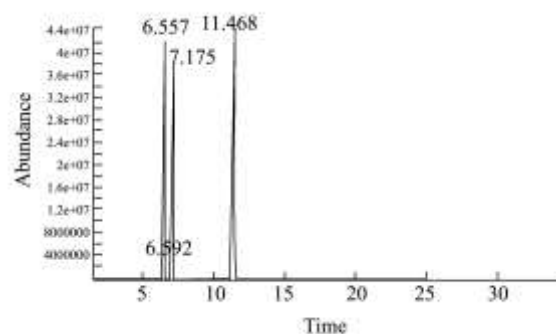


图 2 百里香精油的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatogram of thyme oil

3 结论

不同植物精油在液相和气相状态下清除 DPPH 自

由基的能力有所差异。实验结果表明肉桂精油、百里香油、丁香精油在液相和气相中的清除率较高,并且在液相中清除率受浓度影响较小。肉桂精油、百里香油、丁香精油复配时,会产生不同的协同效应,其中丁香精油和百里香油复配时在气相和液相中均具有很好清除 DPPH 的效果。高温可促进精油挥发而提高了空间精油浓度,所以高温条件下的气相清除率会明显高于低温,并且丁香精油和百里香油产生增效效应时在液相和气相中的复配比例不同。在丁香精油和百里香油的复配物中,酚类和烯类物质等抗自由基活性成分间会产生协同增效效应。植物精油作为一种具有天然、高效和安全性的芳香物质,具有广阔的应用前景,研究植物精油清除自由基及其活性成分,可以为开发食品保鲜剂、空气净化剂和抗脂质氧化等研究提供重要理论依据。

参考文献

- [1] Chyong Fang Hsu, Lijuan Zhang, Hui Peng, et al. Scavenging of DPPH free radicals by polypyrrole powders of varying levels of overoxidation and/or reduction [J]. *Synthetic Metals*, 2008, 158: 946-952
- [2] 黄益民,赵辉,虞欣,等.自由基损伤红细胞膜分子的机理研究[J].*生物物理学报*,1997,13(2):315-323
HUANG Yi-min, ZHAO Hui, YU Xin, et al. Damaging mechanism of free radical to the membrane molecules of red blood cell [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1997, 13(2): 315-323
- [3] 贾曾荣.污染空气中自由基反应的研究[J].*北京教育学院学报*,1998,3:40-44
JIA Zeng-rong. Research of free radical reaction of polluted air [J]. *Journal of Beijing Institute of Education*, 1998, 3: 40-44
- [4] 李晓勤.聚乙烯和聚苯乙烯塑料生产过程中空气自由基的测定[J].*新疆环境保护*,1988,4:48-49
LI Xiao-qin. The determination of air free radicals in the production of polyethylene and polystyrene plastics [J]. *Xinjiang Environmental Protection*, 1988, 4: 48-49
- [5] 曾召录,王潇,陈军军.X 线机房空气自由基浓度测定及对人淋巴细胞 DNA 的损伤[J].*解放军预防医学杂志*,1993, 11(4):273-274
ZENG Zhao-lu, WANG Xiao, CHEN Jun-jun. Air free radicals concentration determination in x-ray machine room and damage to lymphocyte DNA [J]. *The People's Liberation Army of Preventive Medicine Magazine*, 1993, 11(4): 273-274
- [6] 李云.综述自由基对人体健康的影响及目前的预防措施[J].*内蒙古石油化工*,2011,1:87-89
LI Yun. The effect of free radicals on human health and the preventive measures [J]. *Inner Mongolia Petrochemical Industry*, 2011, 1: 87-89
- [7] Lan Su, Jun-Jie Yin, Denys Charles, et al. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100: 990-997
- [8] Adriana M Ojeda-Sana, Catalina M van Baren, Miguel A Elechosa, et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components [J]. *Food Control*, 2013, 31: 189-195
- [9] Anshul Kumar Khare, Ashim Kumar Biswas, Jhari Sahoo. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55: 286-293
- [10] Karina Araus, Edgar Uquiche, José M del Valle. Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material [J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 92: 438-447