

油菜蜂花粉超临界提取物 HPLC-FLD 分析及体外清除自由基活性研究

吕欢欢^{1,2}, 王小艳^{1*}, 王洪伦¹, 索有瑞¹

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 本实验通过柱前荧光衍生 HPLC-FLD 对油菜蜂花粉超临界提取物(Rape bee pollen supercritical fluid extract, PSFE)中的主要成分进行了定性及定量分析, 并采用超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)体系、二苯代苦味酰基自由基(DPPH \cdot)体系和羟基自由基(\cdot OH)体系考察了 PSFE 提取物的体外清除自由基活性。结果表明, PSFE 中含有丰富的游离脂肪酸, 其中饱和脂肪酸占总游离脂肪酸的 58%, 不饱和脂肪酸占 42%, 尤其是不饱和脂肪酸 C18:3 的含量最高, 达到了 10933.69 μ g/g。同时, PSFE 对 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH \cdot 和 \cdot OH 这三种典型的自由基均具有不同程度的清除作用, 其中对 DPPH \cdot 的清除能力高于阳性对照物 L-抗坏血酸, 并且随浓度的增大清除效果更显著, 最高可达 60.29%; 而对 $O_2^{\cdot-}$ 和 \cdot OH 的清除效果在实验浓度范围内最高可分别为 11.99% 和 7.59%, 比阳性对照物低。

关键词: 油菜蜂花粉超临界提取物; 柱前荧光衍生; HPLC-FLD; 超氧阴离子自由基; 羟基自由基; 二苯代苦味酰基自由基

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

Analysis of Rape Bee Pollen Supercritical Fluid Extract Using HPLC-FLD and Its Free Radicals Scavenging Activity Investigation

LV Huan-huan^{1,2}, WANG Xiao-yan^{1*}, WANG Hong-lun¹, SUO You-rui¹

¹Northwest Institution of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In the present study, the main components of rape bee pollen supercritical fluid extract (PSFE) were qualitatively and quantitatively analyzed by HPLC with fluorescence detector (FLD) using pre-column fluorescence derivatization. In addition, superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$), DPPH free radical (DPPH \cdot) and hydroxyl free radical (\cdot OH) assays were used to evaluate the free radicals scavenging activities of PSFE. The results indicated that PSFE contained abundant free fatty acid (FFA), in which the saturated FFA accounted for 58% of the total FFA and the unsaturated FFA accounted for 42%. The unsaturated FFA C18:3 was determined to have the highest concentration (10933.69 μ g/g). Moreover, PSFE showed various degrees of ability to scavenge these three typical free radicals. The scavenging effects of PSFE on DPPH \cdot were much higher than the positive control L-ascorbic acid. As the concentration increased, the scavenging rate was getting more significant, even reach to 60.29%. Nevertheless, the scavenging rates of PSFE on $O_2^{\cdot-}$ and \cdot OH were both less significant than the positive control and were 11.99% and 7.59%, respectively, in the range of experimental concentrations.

Key words: rape bee pollen supercritical fluid extract; pre-column fluorescence derivatization; HPLC-FLD; superoxide anion free radical; DPPH free radical; hydroxyl free radical

青藏高原平均海拔 3000 m 以上, 高寒、缺氧、昼夜温差大、日照时间长、紫外线辐射强、植物病虫害

少等, 独特的地理条件和高原气候, 十分有利于蜜源植物的生长。青藏高原每年油菜蜂花粉产量约 800 ~ 1000 吨。油菜蜂花粉具有多种生物活性, 可用于延缓衰老^[1]、治疗和预防癌症^[2]、调节免疫功能^[3]、降血脂^[4]、抗炎抗过敏^[5]、抗氧化^[6]等。

近年来, 由于超临界 CO_2 提取技术低温、无毒、

收稿日期: 2013-01-18 接受日期: 2013-05-24

基金项目: 青海省自然基金青年项目(2012-Z-923Q)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: xywang@nwipb.cas.cn

无污染、无溶剂残留等优点的显现,该提取技术已逐渐规模化地应用于医药、食品等领域。本实验室通过超临界设备提取获得的油菜蜂花粉超临界提取物(rape bee pollen supercritical fluid extract, PSFE)主要以油脂的形式存在,其中主要含有脂肪酸。最常见的脂肪酸分析方法是 GC-MS 法,该方法成本低、速度快,但缺点是灵敏度欠佳、稳定性差、衍生重现性不够理想等。为了明确 PSFE 提取物中的主要成分及含量,本文采用本实验室自行合成的 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯(BDETS)^[7]作为柱前衍生化试剂,利用柱前衍生-高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)法对 PSFE 提取物进行了成分分析和测定。该方法具有较高的灵敏度。同时,本文对 PSFE 提取物分别进行了羟基自由基、超氧阴离子自由基和二苯代苦味酰基自由基体外清除效果的考察,以期对青藏高原油菜蜂花粉资源的高附加值开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉产自青海省海北州门源县,由青海友林科技发展有限公司提供。将蜂花粉干燥、除杂后,粉碎至粒度为 0.6 mm 左右作为提取材料。

1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯(BDETS, 自制);30 种饱和脂肪酸标准品(上海试剂厂);9 种不饱和脂肪酸标准品(Sigma 公司);色谱纯乙腈(ACN, 德国 Merck 公司);碳酸钾、氢氧化钾、盐酸、硫酸(分析纯,西安化学试剂厂);甲醇(色谱纯,山东禹城化学试剂厂);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)经减压蒸馏后使用;二苯代苦味酰基自由基(Sigma 公司);邻二氮菲(上海中秦化学试剂有限公司);*L*-抗坏血酸(天津市恒兴化学试剂制造有限公司);Tris(成都化学试剂厂);邻苯三酚、双氧水、无水乙醇、七水合硫酸亚铁、磷酸二氢钠、石油醚(沸程 60~90℃)、乙酸乙酯、磷酸氢二钠、DMSO 均为国产分析纯;纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 仪器与设备

Agilent 1100 型高效液相色谱(Agilent 公司)配备四元梯度泵,在线真空脱气机,655-10S 型荧光检测器,100 位自动进样器;CARY300Bio 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司);HA221-50-06 超临界 CO₂ 萃取装置(南通仪创实验仪器有限公司);CO₂ 纯度为 99.99%(西宁大通二氧化碳厂);ALC-

1104 电子天平(德国 Sartorius 公司);HH-4 恒温水浴锅(国华电器有限公司);电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器厂);9FZ-19 型齿爪式粉碎机(四川省永兴机械厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的制备及其衍生过程

准确定量脂肪酸标品,用色谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液。称取 8.32 mg BDETS,用 DMF 定容至 10 mL,浓度为 1.0×10^{-2} mol/L。相应低浓度的脂肪酸标准液(1.0×10^{-4} mol/L)用色谱纯乙腈稀释而成。向盛有 10 mg 无水 K₂CO₃ 催化剂的 1.5 mL 安培瓶中依次加入 400 μL DMF、100 μL 混合脂肪酸(1.0×10^{-4} mol/L)、200 μL BDETS 溶液,封口后于 90℃ 水浴下振荡反应 30 min,放冷后,取出 200 μL 衍生液加 200 μL 色谱纯乙腈溶液稀释 2 倍后摇匀,进样 10 μL 分析。

1.3.2 HPLC-FLD 分析条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₈ 色谱柱(4.6 (150 mm, 5 μm)。流动相 A:50% 乙腈(色谱纯);流动相 B:100% 乙腈(色谱纯);流动相 D:乙腈/*N,N*-二甲基甲酰胺 = 2/1 (v/v)。流速为 1.0 mL/min,进样量为 10 μL,柱温为 30℃。梯度洗脱程序如下:0~20 min,100%~60% A,0~40% B;20~20.2 min,60~45% A,40~55% B;20.2~40 min,45~15% A,55~85% B;40~60 min,15~0% A,85~100% B;60~65 min,100% B;65~65.2 min,100~0% B,0~100% D;65.2~85 min,100% D。荧光检测的激发波长为 $\lambda_{ex} = 333$ nm,发射波长为 $\lambda_{em} = 390$ nm。

1.3.3 PSFE 样品及各供试液的制备

取经前处理后的油菜蜂花粉装填于超临界 CO₂ 萃取装置的萃取釜中,设定萃取釜的萃取条件为:温度 45℃、压力 35 MPa、时间 90 min、CO₂ 流量 40 kg/h。设定分离釜 I 的条件为:温度 30℃、压力 7.0 MPa;分离釜 II 的条件为:温度 30℃、压力 5.3 MPa。经上述条件萃取得到油菜蜂花粉超临界提取物(PSFE)。

称取 0.1 g PSFE 提取物(精确到 0.0001),加入 3.0 mL DMF 后超声摇匀。向盛有 10 mg 无水 K₂CO₃ 催化剂的安培瓶中依次加入 200 μL DMF,150 μL PSFE 样品溶液,100 μL BDETS 衍生试剂(0.01 mol/L),封口后于 90℃ 水浴下振荡反应 30 min,取 100 μL 衍生液加入 300 μL 色谱纯乙腈稀释

4 倍后摇匀,取 10 μL 进样,做 HPLC-FLD 成分分析。

称取适量的 PSFE 提取物,用石油醚:无水乙醇 = 1:1 (v/v) 的溶剂系统溶解得到母液。然后稀释配成 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 5 个浓度梯度的样品溶液,作为体外清除自由基实验的供试液(配置同浓度 L-抗坏血酸作阳性对照)。

1.3.4 超氧阴离子自由基清除能力测定^[8]

采用邻苯三酚自氧化法。取 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 20 min 的 5.0×10^{-2} mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,依次加入 1 mL 不同浓度的样品溶液(或蒸馏水)及 0.4 mL 2.5×10^{-2} mol/L 邻苯三酚溶液,立即混匀置 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中准确反应 5 min,然后加入 8 mol/L 的 HCl 1.0 mL 终止反应。以 Tris-HCl 缓冲液作参比,于实验扫描确定的最大吸收波长处测定

其吸光度。每个处理均做三个重复,并以同浓度 L-抗坏血酸作为阳性对照。对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率按如下公式计算:

$$\text{IP}(\%) = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100$$

式中, A_1 : Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 加蒸馏水 1 mL 加邻苯三酚溶液 0.4 mL; A_2 : 以 1.0×10^{-2} mol/L 盐酸代替 A_1 中的邻苯三酚; A_3 : 以样品溶液代替 A_1 中的蒸馏水; A_4 : 以 1.0×10^{-2} mol/L 盐酸代替 A_3 中的邻苯三酚。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力测定^[9]

取 0.2 mL 原溶剂加入 7.8 mL 浓度为 2.5×10^{-3} mg/mL DPPH · 甲醇溶液,立即混匀,避光室温放置 30 min,以原溶剂调零,于实验扫描确定的最大吸收波长处测定其吸光度,得 A_0 值;以不同浓度的样品溶液代替 A_0 中的 0.2 mL 原溶剂,测吸光度得

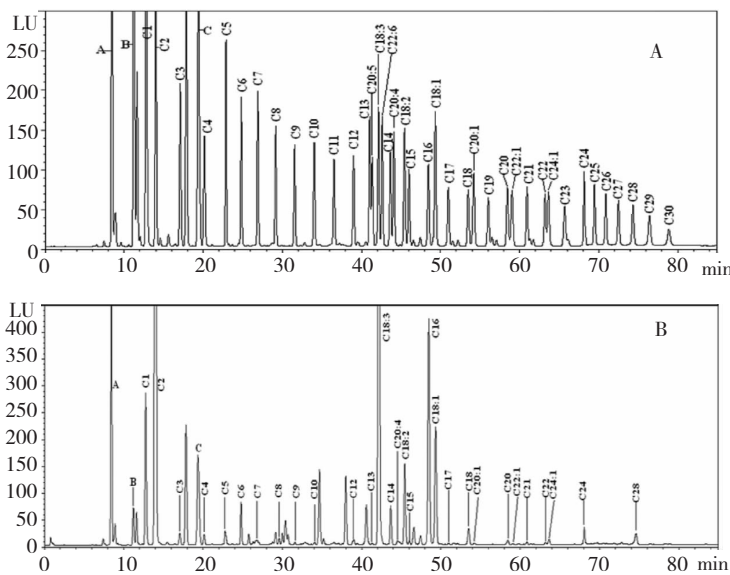


图 1 标准脂肪酸衍生物 (A) 及油菜蜂花粉超临界提取物 (B) 的色谱分离图

Fig. 1 HPLC-FLD chromatograms of standard fatty acid derivatives (A) and fatty acid derivatives of rape bee pollen supercritical fluid extract (B)

注:峰标注:C1(甲酸);C2(乙酸);C3(丙酸);C4(丁酸);C5(戊酸);C6(己酸);C7(庚酸);C8(辛酸);C9(壬酸);C10(癸酸);C11(十一酸);C12(十二酸);C20:5(5,8,11,14,17-二十碳五烯酸);C13(十三酸);C18:3(8,11,14-十八碳三烯酸);C22:2(2,5,8,11,14,17-二十碳六烯酸);C14(十四酸,tetradecanoic acid);C20:4(6,9,12,15-二十碳四烯酸);C18:2(9,12-十八碳二烯酸);C15(十五酸);C16(十六酸);C18:1(12-十八碳烯酸);C17(十七酸);C18(十八酸);C20:1(11-二十碳烯酸);C19(十九酸);C20(二十酸);C22:1(12-docosenoic acid);C21(二十一酸);C22(二十二酸);C24:1(20-二十四碳烯酸);C23(二十三酸);C24(二十四酸);C25(二十五酸);C26(二十六酸);A(1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基);B(未知);C(1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸盐)

Note: Peak labels; C1 (formic acid); C2 (acetic acid); C3 (propionic acid); C4 (butyric acid); C5 (valeric acid); C6 (hexanoic acid); C7 (heptanoic acid); C8 (octoic acid); C9 (pelargoic acid); C10 (decoic acid); C11 (undecanoic acid); C12 (dodecanoic acid); C20:5 (5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid); C13 (tridecanoic acid); C18:3 (8,11,14-octadecatrienoic acid); C22:2 (2,5,8,11,14,17-docosahexenoic acid); C14 (tetradecanoic acid); C20:4 (6,9,12,15-arachidonic acid); C18:2 (9,12-octadecadienoic acid); C15 (pentadecanoic acid); C16 (hexadecanoic acid); C18:1 (12-octadecenoic acid); C17 (heptadecanoic acid); C18 (octadecanoic acid); C20:1 (11-eicosenoic acid); C19 (nonadecanoic acid); C20 (eicosoic acid); C22:1 (12-docosenoic acid); C21 (heneicosoic acid); C22 (docosanoic acid); C24:1 (20-tetracosenoic acid); C23 (tricosanoic acid); C24 (tetracosanoic acid); C25 (pentacosanoic acid); C26 (hexacosanoic acid); A (1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethanol); B (unidentified); C (2-(5-benzocridine) ethyl-n-toluenesulfonate)

A_i 值;以原溶剂代替 A_i 中的 7.8 mL DPPH·溶液,测吸光度得 A_j 值。每个处理均做三个重复,并以同浓度 L-抗坏血酸作阳性对照。按下式计算(DPPH·)的清除率:

$$IP(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100$$

1.3.6 羟基自由基清除能力测定^[10]

采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法。取 7.5×10^{-4} mol/L 邻二氮菲溶液 1 mL 于试管中,依次加入 0.2×10^{-3} mol/mL (pH = 7.4) 的磷酸盐缓冲液 2 mL 和蒸馏水 1 mL,充分混匀后,加入 7.5×10^{-4} mol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL,混匀再加 1 mL 0.01% H_2O_2 后在 37 °C 下水浴反应 60 min,于实验扫描确定的最大吸收波长处测定其吸光度,得 A_p 值;将上述方法中的 H_2O_2 用 1 mL 蒸馏水代替,测吸光度得 A_b 值;用样品溶液代替 1 mL 蒸馏水,测吸光度得 A_s 值。同时分别对每个样品做本底组,每个处理均做三个重复,并以同质量浓度的 L-抗坏血酸作为阳性对照。对·OH 的清除率按如下公式计算:

$$IP(\%) = \frac{AS - AP}{Ab - AP} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 标准品的 HPLC-FLD 色谱分离

如图 1(A)所示,39 种标准脂肪酸衍生物获得良好的基线分离。其中,本实验在流动相 D 中添加了溶解能力极强的 DMF,可以使难以洗脱的高碳长链脂肪酸实现快速洗脱,避免过长的分离时间。

2.2 PSFE 样品 HPLC-FLD 分析及含量测定

按上述实验条件,对脂肪酸标准品衍生后进行 HPLC-FLD 分析测定,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,得到各标准脂肪酸衍生物的回归方程、相关系数和检出限,见下表 1。各种脂肪酸的检测限为 6.05 ~ 98.86 fmol,各种脂肪酸的线性相关系数均大于 0.9989。以相同的实验条件,对 PSFE 提取物衍生后进行了 HPLC-FLD 分析测定,色谱分离图见图 1(B),样品中各类脂肪酸的种类及含量见表 1。结果表明,PSFE 提取物中含有丰富的游离脂肪酸,其中饱和脂肪酸占总游离脂肪酸的 58%,不饱和脂肪酸占总游离脂肪酸的 42%。PSFE 提取物中含量较高的不饱和脂肪酸种类主要是 C18:3、C18:2 和 C18:1,其中 C18:3 的含量最高,达到了 10933.69 $\mu\text{g/g}$ 。PSFE 提取物中含量较高的饱和脂肪酸为 C16,含量达到了 4116.436 $\mu\text{g/g}$ 。

表 1 线性方程、相关系数、检测限及 PSFE 样品中脂肪酸的含量

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and fatty acids contents of PSFE

脂肪酸 FFA	回归方程 ^a Regression equation	相关系数 Correlation	检出限 Limit of detection (fmol)	样品峰面积 Peak area	样品脂肪酸含量 Content ($\mu\text{g/g}$)
C1	$Y = 104.07X + 1.03$	0.9999	6.05	3471.1	83.66216
C2	$Y = 58.79X - 0.69$	0.9999	10.59	41948.3	2335.22
C3	$Y = 37.17X - 0.79$	0.9999	17.98	304.2	33.11947
C4	$Y = 26.41X - 1.88$	0.9999	26.85	272.1	49.79568
C5	$Y = 33.69X - 0.96$	0.9999	14.23	408.5	67.61907
C6	$Y = 26.64X - 3.55$	0.9999	20.07	828.6	197.6441
C7	$Y = 30.78X - 5.76$	0.9999	19.26	251.4	59.24296
C8	$Y = 25.56X - 7.41$	0.9998	25.42	148.4	47.88015
C9	$Y = 22.66X - 7.29$	0.9997	30.26	72.5	30.34619
C10	$Y = 24.55X - 1.38$	0.9999	30.26	72.2	28.1187
C11	$Y = 21.91X - 25.79$	0.9997	37.38	0	0
C12	$Y = 21.34X - 10.36$	0.9995	35.30	185.2	99.97103
C13	$Y = 28.79X - 10.36$	0.9997	24.13	62.1	29.37846
C20:5	$Y = 20.28X - 10.83$	0.9995	36.66	0	0
C18:3	$Y = 31.12X - 13.93$	0.9996	23.25	22392.8	10933.69
C22:6	$Y = 28.16X - 12.26$	0.9996	25.08	0	0
C14	$Y = 22.43X - 9.39$	0.9996	34.04	1022.6	572.1892

C20:4	$Y = 27.18X - 13.29$	0.9995	28.04	214.9	139.4418
C18:2	$Y = 28.41X - 17.76$	0.9995	28.04	2091.3	1135.414
C15	$Y = 19.03X - 13.10$	0.9995	44.33	103.9	81.15607
C16	$Y = 21.51X - 15.88$	0.9991	40.56	6325.2	4116.436
C18:1	$Y = 36.95X - 22.88$	0.9995	24.44	3430.6	1439.679
C17	$Y = 15.93X - 13.26$	0.9989	57.77	57	64.95532
C18	$Y = 15.39X - 11.65$	0.9990	59.57	500.8	563.9402
C20:1	$Y = 21.01X - 12.67$	0.9993	45.39	61.2	57.15008
C19	$Y = 13.80X - 10.67$	0.9989	68.08	0	0
C20	$Y = 16.77X - 11.59$	0.9991	56.07	165.1	179.3049
C22:1	$Y = 17.97X - 10.70$	0.9993	59.57	48.4	60.72348
C21	$Y = 15.16X - 10.42$	0.9991	56.07	78.8	104.65
C22	$Y = 14.48X - 8.86$	0.9993	63.55	75.2	107.661
C24:1	$Y = 15.72X - 8.92$	0.9993	59.57	181.7	242.475
C23	$Y = 13.31X - 7.93$	0.9995	86.65	0	0
C24	$Y = 15.77X - 1.65$	0.9998	39.72	412.6	527.275
C25	$Y = 15.18X - 3.10$	0.9999	48.88	0	0
C26	$Y = 13.91X - 2.99$	0.9998	56.07	0	0
C27	$Y = 12.86X - 1.61$	0.9997	61.50	0	0
C28	$Y = 12.95X - 2.46$	0.9999	65.74	436.5	783.9342
C29	$Y = 10.98X + 2.28$	0.9999	86.65	0	0
C30	$Y = 7.14X + 1.56$	0.9999	98.86	0	0

^a: 回归方程 $Y = AX + B$, Y: 峰面积; X: 进样量 (pmol)。

^a: In the regression equation $Y = AX + B$, Y refers to the peak area, X refers to the injection amount (pmol)。

2.3 PSFE 样品对超氧阴离子自由基的清除作用

实验首先对邻苯三酚自氧化中间产物的吸收波长进行了扫描测定。由图 2 可知, 邻苯三酚自氧化中间产物 $O_2^{\cdot-}$ 在波长 268 nm 和 299 nm 两处分别有特征吸收峰, 当加入实验浓度范围内的 L-抗坏血酸后, 在 299 nm 处的吸收峰明显降低, 而 268 nm 处的吸收峰基本不变, 因此, 本实验确定该超氧阴离子自由基体系的检测波长为 299 nm。

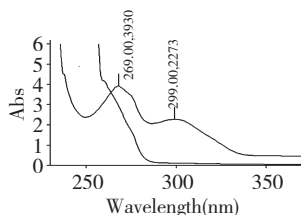


图 2 邻苯三酚自氧化产物最大紫外吸收光谱及 L-抗坏血酸清除 $O_2^{\cdot-}$ 的光谱

Fig. 2 UV absorption spectra of pyrogallol autoxidation product and L-ascorbic on scavenging $O_2^{\cdot-}$

随着样品浓度逐渐增大, L-抗坏血酸对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率趋于稳定且均高于 60%, 而 PSFE 样品的清除率略有上升但维持在 10% 左右。由此可见, PSFE 对 $O_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用, 但与 L-抗坏血酸相比, 其清除效果不强。

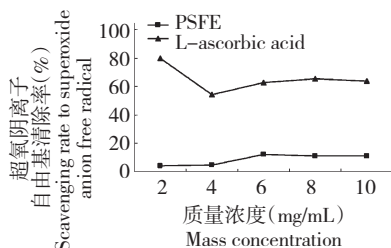


图 3 PSFE 及 L-抗坏血酸对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

Fig. 3 The scavenging effects of PSFE and L-ascorbic acid on $O_2^{\cdot-}$

2.4 PSFE 样品对 DPPH 自由基的清除作用

由图 4 可知, 经扫描测定发现 DPPH· 甲醇溶液在 320 nm 和 515 nm 处分别有两个特征吸收峰, 当加入实验浓度范围内的 L-抗坏血酸溶液后, 其位于 515 nm 处的吸收峰明显降低, 因此, 本实验确定

PSFE 及 L-抗坏血酸对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果见图 3。由图 3 可知, 在实验浓度 2.0 ~ 10.0 mg/mL 范围内,

用 515 nm 作为测定 DPPH · 含量变化的检测波长。

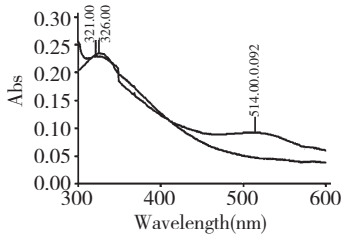


图 4 DPPH · 的吸收光谱和 L-抗坏血酸清除 DPPH · 的吸收光谱

Fig. 4 UV absorption spectra of DPPH · and L-ascorbic acid on scavenging DPPH ·

由图 5 可知,在实验浓度 2.0 ~ 10.0 mg/mL 的范围内,阳性对照物 L-抗坏血酸对 DPPH · 的清除率变化不大,保持在 50% 上下。而 PSFE 样品对 DPPH · 的清除作用随着其样品浓度的增大而逐渐升高,达到 60% 以上,高于阳性对照。

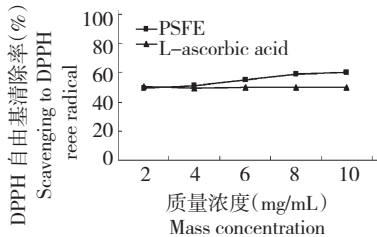


图 5 PSFE 及 L-抗坏血酸对 DPPH · 的清除作用

Fig. 5 The scavenging effects of PSFE and L-ascorbic acid on DPPH ·

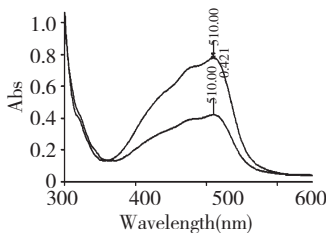


图 6 邻二氮菲-Fe²⁺ 的吸收光谱和 L-抗坏血酸清除 ·OH 的吸收光谱

Fig. 6 UV absorption spectra of 1,10-Phenanthroline mono-hydrate-Fe²⁺ and L-ascorbic acid on scavenging ·OH

2.5 PSFE 样品对羟基自由基的清除作用

由图 6 可见,经实验扫描发现邻二氮菲-Fe²⁺ 反应液在 510 nm 处有最大吸收峰,当加入实验浓度范围内的阳性对照物 L-抗坏血酸后,由于抑制了双氧水与邻二氮菲-Fe²⁺ 发生反应产生 ·OH,因而在一

定程度上使得邻二氮菲-Fe²⁺ 反应液产生的最大吸收峰降低或甚至消失,因此,本实验确定以 510 nm 作为各反应液的检测波长。

PSFE 样品及 L-抗坏血酸对 ·OH 的清除效果由图 7 可知,在实验浓度 0.2 ~ 1.0 mg/mL 的范围内,PSFE 对 ·OH 有一定清除效果,且其清除能力随着样品浓度的逐渐增加而略有增大。但与 L-抗坏血酸相比,其清除效果不强。据有关研究报道,·OH 是所有氧自由基中最活泼的,许多自由基清除剂即使能够清除 O₂^{·-},但是却不能清除 ·OH。这个结论在一定程度上有可能解释 PSFE 对 ·OH 的清除效果不显著的原因。

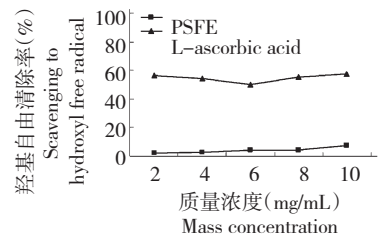


图 7 PSFE 及 L-抗坏血酸对羟基自由基的清除作用

Fig. 7 The scavenging effects of PSFE and L-ascorbic acid on ·OH

3 讨论

本实验利用 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基对甲苯磺酸酯作为柱前荧光衍生试剂,通过 HPLC-FLD 法对青高原油菜蜂花粉超临界提取物中的主要成分游离脂肪酸进行了定性和定量分析。结果表明,各种脂肪酸标准品的检测限为 6.05 ~ 98.86 fmol,线性相关系数均大于 0.9989。PSFE 提取物中含有丰富的游离脂肪酸,其中饱和脂肪酸占总游离脂肪酸的 58%,不饱和脂肪酸占总游离脂肪酸的 42%。PSFE 提取物中含量较高的不饱和脂肪酸种类主要是 C18:3、C18:2 和 C18:1,其中 C18:3 的含量最高,达到了 10933.69 μg/g。

同时,本实验对 PSFE 的体外清除自由基效果考察结果表明:该超临界提取物 PSFE 对 DPPH 自由基表现出很高的清除能力且呈量效关系,即在实验浓度范围内其清除率最高可达 60.29%,高于阳性对照物;而对于羟基自由基和超氧阴离子自由基,该超临界提取物也表现出不同程度的清除能力,即在实验浓度范围内其最高清除率分别为 7.59% 和 11.99%。据报道,新鲜的蜂花粉抗氧化活性最高,

其后随着贮存年头的增加其抗氧化能力减小,经过3年以上贮存后其抗氧化活性会减少50%。本实验所用材料为自然贮存两年的油菜蜂花粉,其超临界提取物的自由基清除能力是否比当年采收的蜂花粉有所降低,还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Wang XY(王小艳),Cao Y(曹越),Zhang R(张蕊),*et al.* Study on free radical scavenging activities of ethanol extract from rape bee-pollen in Qinghai-Tibet plateau. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技),2008,29:115-117.
- 2 Yang XP(杨晓萍),Wu MC(吴谋成). Study on the antitumor effect of rape bee-pollen polysaccharide in tumor bearing mice. *Acta Nutri Sin*(营养学报),2006,28:160-162.
- 3 Sun LP(孙丽萍),Liao L(廖磊),Wang DQ(王大仟),*et al.* Effects of rape bee-pollen and its different extracts on immune function in mice. *Food Sci*(食品科学),2008,29:547-549.
- 4 Chen XX(陈小夏),Chen B(陈冰). Effects of extract from rape pollen on blood lipids in experimental hyperlipidemic rats. *Pharm Clin Mater Med*(中药药理与临床),2004,20(3):18-19.
- 5 Sun Y(孙毅),Yang YF(杨义芳),Yang BC(杨必成),*et al.* Advances in studies on physiological activities and mechanisms of Bee Pollen of *Brassica campestris*. *Apiculture China*(中国蜂业),2006,61(9):5-9.
- 6 Zhao JX(赵剑喜),Bu LN(卜令娜),Liu YW(刘晔玮),*et al.* Antioxidant activity of rape bee pollen. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,7:959-962.
- 7 Li GL,Song CH,You JM,*et al.* Composition analysis of free fatty acid from *Swertia Species* by a novel pre-column fluorescence labelling method using HPLC-FLD. *J Am Oil Chem Soc*,2012,89:585-595.
- 8 Xu JG(徐建国),Hu QP(胡青平). Study on free radical scavenging capacity by *Cassia* seed water extract *in vitro*. *Food Sci*(食品科学),2006,27(6):73-76.
- 9 Jing Y(金莹),Sun AD(孙爱东). Activity of apple polyphenols as DPPH radical scavenger. *China Brewing*(中国酿造),2006(5):48-51.
- 10 Ling GT(凌关庭). Antioxidant Food and Health(抗氧化食品与健康). Beijing:Chemical Industry Press,2004. 344.

(上接第1630页)

- 6 Chen J(陈静),Wang SJ(王淑军),Yang CF(杨从发),*et al.* Screening and breeding of pectinase producer. *J Huaihai Inst Technol:Nat Sci Ed*(淮海工学院学报),1999,8(3):63-65.
- 7 Gu YS(顾燕松). Method for determination of pectinase activity used as biological textile auxiliaries. *Tex Sci Res*(纺织科学研究),2002,3:29-35.
- 8 Wang Y(王媛),Han SY(韩舜愈),Zhu X(祝霞),*et al.* Screening of pectinase producing strains and optimizing of its fermentation condition. *J Gansu Agric Univ*(甘肃农业大学学报),2010,45:117-121.
- 9 Zhai QM(翟秋梅),Xue WW(薛卫巍),Xue YC(薛永常),*et al.* The optimization of pectinase fermentation from *Bacillus subtilis* FM208849. *J Dalian Polytech Univ*(大连工业大学学报),2010,29(2):93-97.