

# 6-姜酚的分离纯化及抗氧化能力研究

马龙利<sup>1,2</sup>, 李 岗<sup>1,2</sup>, 叶菲菲<sup>1,2</sup>, 张情亚<sup>1,2</sup>, 余德顺<sup>1,2\*</sup>, 于 海<sup>1,2</sup>

(1.贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550025; 2.中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 超临界流体研究中心, 贵阳 550002)

**摘要:** 研究以超临界CO<sub>2</sub>萃取6-姜酚含量12.82%的姜油为原料, 用硅胶柱层析进行常压柱分离得到52%含量的6-姜酚分离物, 之后再经过加压和减压的硅胶柱层析分离, 得到纯度为98%含量的6-姜酚。对6-姜酚含量为12.82%姜油、52% 6-姜酚姜油分离物及98%高纯度的6-姜酚, 用ABTS法与FRAP法进行了抗氧化能力的实验研究及比较。结果表明: 不论ABTS法还是FRAP法, 总抗氧化能力与不同6-姜酚含量(P<0.01)以及不同浓度(P<0.05)之间均存在着较高的显著性差异, 随着6-姜酚含量的提高, 抗氧化能力均显著提高, 显示6-姜酚是姜油中最主要的抗氧化活性成分; 随着6-姜酚含量的提高, 特别是对高纯度6-姜酚而言, 随浓度的增加其抗氧化能力增加逐渐减小(FRAP法)甚至降低(ABTS法), 表明姜油抗氧化过程中存在不同成分间协同抗氧化以及姜酚自氧化等复杂作用机制。

**关键词:** 超临界CO<sub>2</sub>萃取; 姜油; 6-姜酚; 柱层析法; 抗氧化能力; ABTS; FRAP

中图分类号: TS 201.4 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2016)08-0206-04

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2016.08.048

## Separation, purification and antioxidant capacities of 6-gingerol

MA Long-li<sup>1,2</sup>, LI Gang<sup>1,2</sup>, YE Fei-fei<sup>1,2</sup>, ZHANG Qing-ya<sup>1,2</sup>, YU De-shun<sup>1,2\*</sup>, YU Hai<sup>1,2</sup>

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025; 2.Supercritical Fluids Research Center, State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002)

**Abstract:** 12.82% 6-gingerol of ginger oil was extracted by supercritical CO<sub>2</sub> as materials, 52% 6-gingerol was isolated with silica gel column of atmospheric pressure, during separation by increased and reduced the pressure silica gel column, 98% 6-gingerol was obtained. The antioxidant capacities of ginger oil (include 12.82% 6-gingerol), 52% 6-gingerol isolate and 98% 6-gingerol were studied and compared by ABTS and FRAP methods. The results shown both for ABTS and FRAP methods, total antioxidant capacities enhanced with the increased of 6-gingerol contents, and had signification differences both in different 6-gingerol content(P<0.01) and different concentration(P<0.05). This meant that 6-gingerol was the most important antioxidant compound in ginger oil. With the increasing of 6-gingerol content, especially for high purity 6-gingerol, the increasing of antioxidant capacity started to tail off (FRAP method) even the

收稿日期: 2016-04-13

\*通讯作者

基金项目: 贵州省社发攻关项目(2014SY3080)。

作者简介: 马龙利(1990—), 男(布依族), 硕士研究生, 研究方向为精细化工技术。



antioxidant capacity gradually reduced (ABTS method). These phenomenon could be explained as some complicated mechanization such as synergistic antioxidant and self-oxidation of 6-gingerol.

**Key words:** supercritical CO<sub>2</sub> extraction; ginger oil; 6-gingerol; column separation; antioxidant capacity; ABTS; FRAP

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是姜科姜属植物,在中国作为传统中药用于治疗伤风感冒、呕吐腹泻、消化不良、关节炎等疾病,为药食两用<sup>[1]</sup>。生姜主要有效部位是姜油及姜油树脂<sup>[2]</sup>,其主要化学成分为姜烯、姜酮和姜酚类<sup>[3-4]</sup>,姜酚类化合物包括6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚等,其中又以6-姜酚含量最高<sup>[5]</sup>,是生姜中生物活性物质的代表性成分。研究表明6-姜酚具有抗氧化、抗肿瘤、杀菌消炎<sup>[6-8]</sup>等多种药用价值。包括生姜在内的天然产物及其提取物抗氧化性能的研究是相关研究的热点<sup>[9]</sup>,黄雪松<sup>[10]</sup>等研究了利用各种溶剂得到的生姜提取物的抗氧化性,得出生姜中的抗氧化物质具有较强的脂溶性。林茂<sup>[11]</sup>等也指出生姜中具抗氧化性的物质主要是姜辣素(Gingerols,姜酚类)和二苯基庚烷(Diarylheptanoids)类化合物,该类物质几乎不溶于水,因此生姜抗氧化性的研究主要集中在姜油及姜油树脂的抗氧化性研究<sup>[12-13]</sup>,以及针对其中总姜辣素或总姜酚含量抗氧化性能的研究<sup>[14-16]</sup>,但具体在6-姜酚这个生姜中最具生物活性之一且在姜油及姜油树脂中含量最高的化合物,对其不同含量的提取分离物在不同浓度下抗氧化性能的研究还不多见。

本研究采用超临界CO<sub>2</sub>萃取生姜得到的姜油为原料,通过三步柱层析法对6-姜酚进行分离提纯,获得高纯度的6-姜酚,并检测原料姜油、分离提纯过程得到的6-姜酚含量较高的主要提取分离物及高纯度6-姜酚的抗氧化能力。实验选择用最常用的2种体外总抗氧化能力检测方法<sup>[17]</sup>,即2-2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)法及铁离子还原/抗氧化能力测定(Ferrie Reducing/Antioxidant Power assay, FRAP)法同时对抗氧化能力进行检测及比较研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

6-姜酚含量为12.83%的姜油:中科院地化所超临界流体中心超临界CO<sub>2</sub>萃取得到<sup>[18]</sup>; ABTS、

FRAP试剂盒:江苏碧云天生物技术研究所; 98% 6-姜酚标准品:天津中新药业; 硅胶G60:青岛海洋化工厂; 其余试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

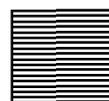
HA-05-1A超临界流体萃取设备:江苏南通华安超临界萃取公司; PATROL UPLC超高效液相色谱仪:美国Waters公司; Instrument S-190酶标仪:美国Molecular Devices公司; RE-52A旋转蒸发器:上海亚荣公司; 常压、加压及减压玻璃层析柱。

### 1.3 6-姜酚的分离提纯

1.3.1 常压柱分离 将30.00 g超临界CO<sub>2</sub>萃取的姜油,用流动相溶解并且上样,常压柱内径为9.6 cm,高105 cm,内填充1900 g,(300~400)目的硅胶,用乙酸乙酯和石油醚的体积比为1:5作为流动相进行洗脱,洗脱速度控制在7 mL/min;用薄层层析色谱法进行监测,监测条件为:乙酸乙酯和石油醚的体积比为1:3作为展开剂,R<sub>f</sub>值控制在0.3~0.4,收集洗脱液并用旋转蒸发器浓缩回收,干燥后得淡黄色油状物5.90 g,用超高效液相色谱进行检测,6-姜酚含量为52.0%。

1.3.2 加压柱及减压柱分离 取上述常压柱粗分物5.00 g用流动相溶解并上样,加压柱内径为5 cm,高70 cm,内填充253 g,(300~400)目硅胶,用乙酸乙酯和石油醚的体积比为1:5作为流动相进行洗脱,洗脱速度为10.9 mL/min,薄层层析色谱法监测条件为:乙酸乙酯和石油醚的体积比为1:3作为展开剂,R<sub>f</sub>值控制在0.3,将收集到的洗脱液进行适度浓缩后直接进行减压柱分离,减压柱分离条件为:减压柱内径为4.4 cm,高51.5 cm,内填充200 g,(300~400)目硅胶,正己烷混合(0%~15%)乙酸乙酯作为流动相进行梯度洗脱,洗脱速度为2.5 mL/min,薄层层析色谱法监测条件为:正己烷和乙醚的体积比为4:6作为展开剂,R<sub>f</sub>值控制在0.3,将收集洗脱液并用旋转蒸发器进行真空减压浓缩,低温挥干得无色油状物1.64 g,用UPLC进行检测,6-姜酚含量为98%。

### 1.4 分析检测



1.4.1 6-姜酚含量的UPLC检测 色谱柱采用Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)柱, 流动相为0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速0.30 mL/min, 柱温45 °C, 进样体积1 μL。

1.4.2 ABTS和FRAP法总抗氧化能力检测 对12.82%超临界CO<sub>2</sub>萃取姜油、常压柱层析得到的52% 6-姜酚产物以及经加压和减压柱层析得到的98% 6-姜酚高纯物, 分别用无水乙醇配制成浓度为0.05、0.08、0.1、0.2、0.3 mg/mL待测样品, 参照文献[19]进行。

1.4.2.1 ABTS法 在过硫酸钾氧化剂存在下被氧化成绿色ABTS·<sup>+</sup>, 在抗氧化物存在时ABTS·<sup>+</sup>的产生被抑制, 在734 nm测定ABTS·<sup>+</sup>的吸光度即可测定样品的总抗氧化能力, 即获得同样抑制率时待测样品的浓度与标准品Trolox浓度的比值, 用TEAC值(Trolox Equivalent Antioxidant Activity)表示。

1.4.2.2 FRAP法 在酸性条件下抗氧化物可以还原Ferric-tripyridyltriazine(Fe<sup>3+</sup>-TPTZ)产生蓝色的Fe<sup>2+</sup>-TPTZ, 随后在593 nm测定蓝色Fe<sup>2+</sup>-TPTZ即可得到样品总抗氧化能力, 即得同样吸光度时FeSO<sub>4</sub>溶液浓度与待测样品浓度的比值即EC(Equivalent Concentration)值表示其抗氧化能力。

## 1.5 统计分析

所有的实验平行3次, 全部数值显示为均值(means) ± 标准偏差(SD), 采用SPSS16.0分析软件的Analysis of variance (One-Way ANOVA)的LSD和Duncan方程对不同6-姜酚含量(P<0.01)以及不同浓度梯度之间(P<0.05)进行显著性分析, 线性拟合采用origin8.0(显著性水平设为0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 6-姜酚的分离及检测

常压柱和加压柱及减压柱得到产物的6-姜酚含量UPLC的检测结果见图1, 其6-姜酚含量分别

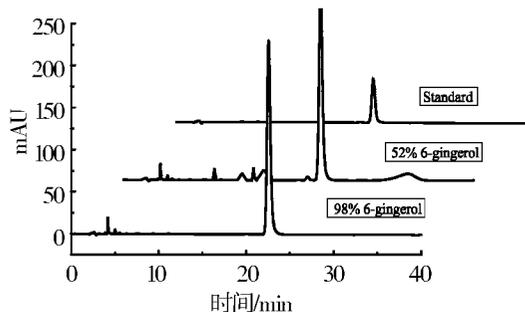


图1 不同含量6-姜酚在282nm时的超高压液相色谱图

为52%和98%。

### 2.2 抗氧化能力检测

2.2.1 ABTS法 如表1所示, 随着6-姜酚含量的增加, 低浓度时TEAC值增加显著, 差异性大; 而高浓度时, TEAC值也增加但显著性差异变小。说明对于ABTS法, 起主要抗氧化能力的物质是6-姜酚。12.82% 6-姜酚姜油的TEAC值随着浓度的增加而增加, 而52% 6-姜酚姜油分离物及98%高纯度6-姜酚的TEAC值随浓度的增加逐渐减小, 且减小趋势随6-姜酚纯度的提高较为显著。

2.2.2 FRAP法 如表2所示, 所有相同浓度下, 随6-姜酚含量的增加抗氧化能力均明显增加, 且显著性差异大, 表明6-姜酚是主要抗氧化物质。12.82% 6-姜酚姜油, 52% 6-姜酚姜油分离物的抗氧化能力随着浓度的增加而增加, 但显著性差异变小; 98%高纯度6-姜酚的抗氧化能力随着浓度的增加而降低, 但减小趋势不显著。

2.2.3 ABTS和FRAP法的相关性 ABTS和FRAP法都是基于电子转移的SET法, 所以它们之间有更好的相关性<sup>[20]</sup>, 但检测数值的不同也说明了2种方法检测原理仍有差异, ABTS法主要反映的是清除ABTS·<sup>+</sup>自由基的能力, 而FRAP法主要是对Fe<sup>3+</sup>的还原能力。

表1 不同含量6-姜酚分离物的总抗氧化能力(ABTS法)

浓度/ (mg/mL)	TEAC值		
	12.82% 6-姜酚	52% 6-姜酚	98% 6-姜酚
0.05	1.916 ± 0.406Cb	9.204 ± 0.085Ba	14.546 ± 0.213Aa
0.08	2.905 ± 0.337Ca	8.799 ± 0.344Bb	10.012 ± 0.265Ab
0.1	2.988 ± 0.156Ca	7.893 ± 0.170Bc	9.046 ± 0.312Ac
0.2	3.288 ± 0.123Ba	5.891 ± 0.060Ad	6.036 ± 0.061Ad
0.3	3.180 ± 0.110Ba	5.072 ± 0.080Ae	5.028 ± 0.033Ae

注: TEAC值为3次平均值 ± 标准差; A~C数据行间显著性差异(P<0.01); a~e数据栏间显著性差异(P<0.05)。

表2 不同含量6-姜酚分离物的总抗氧化能力(FRAP法)

浓度/ (mg/mL)	EC值		
	12.82% 6-姜酚	52% 6-姜酚	98% 6-姜酚
0.05	0.601 ± 0.057Cc	3.589 ± 0.189Bd	15.394 ± 0.396Aa
0.08	1.449 ± 0.124Cb	4.967 ± 0.369Bc	13.645 ± 0.371Ab
0.1	1.671 ± 0.103Cb	6.723 ± 0.174Bb	13.603 ± 0.200Ab
0.2	2.742 ± 0.149Ca	7.109 ± 0.303Bb	13.152 ± 0.151Ac
0.3	2.940 ± 0.116Ca	7.670 ± 0.079Ba	13.062 ± 0.069Ac

注: EC值为3次平均值 ± 标准差; A~D数据行间显著性差异(P<0.01); a~d数据栏间显著性差异(P<0.05)。

从表1及表2可以看出, 不管是ABTS法或FRAP法, 在各种浓度条件下, 随6-姜酚含量的提高, 抗氧化能力均显著提高, 总抗氧化能力与



不同6-姜酚含量( $P < 0.01$ )以及不同浓度( $P < 0.05$ )之间均存在着较高的显著性差异,显示6-姜酚仍然是姜油中主要抗氧化活性成分。但其抗氧化能力在低6-姜酚含量和高纯6-姜酚时随浓度的变化存在一些差异。2种方法中12.82% 6-姜酚姜油抗氧化能力都随浓度增加而增加;但52% 6-姜酚分离物抗氧化能力在ABTS法中是随浓度增加而减少,在FRAP法中是增加;98%高纯6-姜酚在2种方法中均随浓度增加而减少,且在ABTS法中差异更显著。Swarnalatha<sup>[20]</sup>等研究发现生姜中同时存在的8,10-姜酚及6-姜醇比6-姜酚更具抗氧化能力,这些物质在6-姜酚低含量时存在,起到了协同抗氧化作用,随着分离提纯过程中6-姜酚含量的不断提高这些物质成分含量逐渐降低,特别在98%高纯度6-姜酚时失去协同抗氧化能力;于宁<sup>[15]</sup>等在对分光光度法测定含量为77.4%的超声萃取得到姜酚进行抗氧化性能研究时,也发现随浓度增加抑制率先增加后减少(SARF法)及更高浓度增加不显著现象(DPPH法),分析原因为姜酚的自氧化及其他待进一步探究的机制。因此可以推断在本研究中出现的12.82% 6-姜酚姜油抗氧化能力随浓度增加而明显增加的现象,以及52% 6-姜酚分离物和98%高纯度6-姜酚抗氧化能力随浓度增加,但增加幅度不明显甚至减小的现象是:低含量6-姜酚时其他成分协同抗氧化及高含量高浓度时姜酚自氧化分别起主导作用的结果,当然也不排除有更为复杂的协同作用机制。

### 3 结论

本研究以超临界 $\text{CO}_2$ 萃取6-姜酚含量为12.82%的姜油作原料,经过常压硅胶柱层析,得到6-姜酚含量为52%的姜油分离物,再对该分离物进行加压及减压柱层析分离提纯,得到含量98%的6-姜酚高纯物。

对上述3种分离提取物用ABTS及FRAP这2种方法进行抗氧化能力实验测定,结果显示,相同浓度下,6-姜酚含量越高,抗氧化能力越高,显示6-姜酚仍然是姜油中主要抗氧化活性成分,总抗氧化能力与不同6-姜酚含量( $P < 0.01$ )以及不同浓度( $P < 0.05$ )之间均存在着较高的显著性差异。

随着6-姜酚含量的提高,特别是对高纯度6-姜酚而言,ABTS及FRAP法均表明其抗氧化能力随浓度增加逐渐减小,结合相关文献分析表明,姜油中确实存在6-姜酚与不同成分间协同抗氧化

作用,以及高纯度并高浓度时的姜酚自氧化作用的存在,这些作用交织在一起的复杂机制值得进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 胡炜彦,张荣平,唐丽萍,等.生姜化学和药理研究进展[J].中国民族民间医药,2008,(9):10-14
- [2] 陈燕,倪元颖,蔡同一.生姜提取物-精油与油树脂的研究进展[J].食品科学,2000,21(8):6-8
- [3] 战琨友,王超,徐坤,等.气相色谱-质谱技术分析姜油树脂中的挥发性及非挥发性成分[J].色谱,2008,26(6):692-696
- [4] DINESH C B, DAE D S, YONG H K. Influence of the Solvent, Hydrodistillation- Headspace Solvent Microextraction and Composition of Korean Ginger[J]. Food Analytical Methods,2011,4(1):84-89
- [5] 韩燕全,左冬,夏伦祝,等.不同干燥方法和温度对于姜中6,8,10-姜酚含量的影响[J].中药材,2011,34(10):1512-1514
- [6] 鲁昊浩,焦睿,黄雪松,等.6-姜酚与6-姜酚醇抗氧化性质的比较研究[J].现代食品科技,2015,31(9):106-111
- [7] 杨光.6-姜酚生物学作用的细胞与分子机制研究[D].大连:大连医科大学博士论文,2011:1-3
- [8] 张云玲,郑一敏,胡少南,等.6-姜酚对幽门螺旋杆菌的抑菌作用研究[J].现代食品科技,2013,29(6):1259-1261
- [9] 刘微微,任虹,曹学丽,等.天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J].食品科学,2010,31(17):415-419
- [10] 黄雪松,王建华,路福绥.生姜抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,1997,(4):16-17
- [11] 林茂,阙建全.生姜中天然抗氧化剂的应用研究概况[J].中国食品工业,2006,(12):50-51
- [12] 邹纲明,郑品梅,李彦威,等.姜精油的超临界 $\text{CO}_2$ 提取及其抗氧化性研究[J].食品科技,2007,(2):136-138
- [13] 徐勇,梁丽敏,寇秀颖,等.姜油树脂的抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2010,31(6):32-35
- [14] 王丽霞,杨事维,李彬,等.超临界 $\text{CO}_2$ 萃取生姜姜辣素的抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2014,(8):96-101
- [15] 于宁,曾虹燕,邓欣,等.姜酚的提取、鉴定及其抗氧化性研究[J].食品科学,2007,28(8):201-204
- [16] 韩菊,魏福祥,王改珍,等.生姜中姜酚的性能研究[J].食品科技,2004,(4):63-65
- [17] 李华,李佩洪,王晓宇,等.抗氧化检测方法的相关性研究[J].食品与生物技术学报,2008,27(4):6-11
- [18] 杨明,余德顺,田弋夫,等.超临界 $\text{CO}_2$ 萃取与水蒸气蒸馏提取姜油的GC-MS分析[J].贵州化工,2011,36(3):34-37
- [19] 李岗,余德顺,杨军,等.超临界 $\text{CO}_2$ 萃取薄荷挥发油及其抗氧化能力的研究[J].食品科技,2013,38(1):276-279
- [20] SWAMALATHA D, MALLIKARJUNA R P, VISHNA D N, et al. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol[J]. Ethnopharmacol,2010,127:515-520

