

文章编号:1000-8551(2011)04-0754-06

夏桑叶的体外抗氧化活性及其主要功能成分研究

潘剑用 汪志平 党江波 谢彦广 董丹丹 邵斌 王景梅 蓝瑾瑾 陈子元

(浙江大学原子核农业科学研究所/农业部核农学重点开放实验室,浙江 杭州 310029)

摘要:利用体外清除自由基评价技术,测定并比较了夏桑叶与冬桑叶对3种氧中心自由基 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$ 的清除活性。结果显示,夏桑叶对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性与冬桑叶相近,而且清除 $^1\text{O}_2$ 能力较冬桑叶的高61%,提示夏桑叶也是一种极具研发应用前景的天然医药保健资源。进一步分别用干叶热水提取法、鲜叶热水提取法和鲜叶温水提取法制得上、中、下部位夏桑叶的9种提取液,并分别测定其抗氧化活性,以及多酚、黄酮、多糖和蛋白质含量,分析相关性。结果表明,夏桑叶提取液对3种氧中心自由基的清除能力与其多酚和黄酮含量分别呈极显著正相关,多糖含量仅与 $^1\text{O}_2$ 的清除能力呈显著正相关,而蛋白质则几乎不具自由基清除能力;夏桑叶中起抗氧化等作用的依然是多酚和黄酮这2类主要的生物活性成分;叶位与提取工艺对夏桑叶提取液的自由基清除能力和主要成分含量均有影响;夏桑叶生物活性物质的提取生产,以上部叶和中部叶为原料,且采用干叶热水提取法为佳,当提取车间离桑园较近时,也可以中部鲜叶为主要原料直接用鲜叶热水提取法,而上、下部鲜叶是否被选用则视实际情况而定。

关键词:夏桑叶;抗氧化;叶位;提取工艺;成分;相关性

ANTIOXIDANT ACTIVITIES *in vitro* AND MAIN EFFICACY COMPONENTS IN SUMMER MULBERRY LEAVES

PAN Jian-yong WANG Zhi-ping DANG Jiang-bo XIE Yan-guang DONG Dan-dan
SHAO bin WANG Jing-mei LAN Jin-jin CHEN Zi-yuan

(Institute of Nuclear-Agricultural Sciences of Zhejiang University, Key Laboratory of Chinese Ministry of Agriculture for Nuclear-Agricultural Science, Hangzhou, Zhejiang 310029)

Abstract: Scavenging activities of $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $^1\text{O}_2$ of summer mulberry leaves and the winter mulberry leaves were determined by evaluation technology of scavenging free radicals *in vitro*. The results showed that the $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging activities of summer mulberry leaves were similar to that of winter mulberry leaves, and the capacities to $^1\text{O}_2$ scavenging activity of summer mulberry leaves were even 61% higher than that of the winter mulberry leaves. It indicated that the summer mulberry leaf is also a kind of ideal natural resources for medicine and health food. Furthermore, using 3 different extracting methods of dried leaves with hot water (Process 1), extracting from fresh leaves with hot water (Process 2) and extracting from fresh leaves with warm water (Process 3), 9 extracts were obtained from the upper, middle and lower parts of summer mulberry leaves, respectively. The antioxidant activities and main components contents (polyphenols, flavonoids, polysaccharides and proteins) of the extracts were measured, and

收稿日期:2010-07-29 接受日期:2011-02-18

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(200803034),国家自然科学基金项目(30771669),浙江省院士基金(J20080388)

作者简介:潘剑用(1983-),男,江西婺源人,硕士研究生,研究方向为天然产物的研发与产业化。Tel: 0571-86971702; E-mail: pan_john2002@163.com

通讯作者:汪志平(1968-),男,浙江建德人,博士,副研究员,研究方向为天然产物的研发与产业化。Tel: 0571-86971021; E-mail: zhpwang@zju.edu.cn

the correlations between antioxidant activities and main components were analyzed. The results were as follows: (1) The correlation between the antioxidant capacities and polyphenols and flavonoids contents were highly significant, and the contents of polysaccharides were only significantly correlated with the capacity for scavenging¹O₂, while the proteins were almost no scavenging radicals capacity. It indicated that the flavonoids and polyphenols in the summer mulberry leaves played the main role of antioxidation just as in winter mulberry leaves. (2) The effects of leaf position and extraction method on the antioxidant activities and contents of main components in summer mulberry leaves needed to be considered. (3) As for extracting the bioactive substances from the summer mulberry leaves, it's better to choose the middle and upper leaves and the Process 1. In addition, if the material was fresh, it's better to choose the middle leaves and the Process 2. And the upper or lower leaves might also be utilized in some cases.

Key words: summer mulberry leaf; antioxidation; leaf position; extraction processing; components; correlation

桑叶为桑科 (Moraceae) 桑属 (*Morus L.*) 植物桑树的叶子, 是一种纯天然的药食两用资源。桑叶味甘苦、性寒凉、具疏散风热、清肺润燥、平肝明目、凉血止血之功效^[1]。现代医药学研究表明, 桑叶还具有抗衰老、抗肿瘤和抗心脑血管疾病的作用^[1-4], 且已证实这些功效与桑叶中所含的具抗氧化、清除自由基作用的黄酮和多酚等活性成分有关^[1, 5-8]。传统中医药典记载, 桑叶入药一般以经初霜的冬桑叶为佳^[9], 有关桑叶的医药保健功能及活性成分等研究一直也多以冬桑叶为主, 而对长期以来主要用作养蚕的夏桑叶, 虽在黄酮和多酚等成分方面作过一些研究^[10, 11], 但未见有关夏桑叶成分与生理活性相关性, 以及不同叶位叶和提取加工工艺对夏桑叶活性成分与功效影响等方面的报道。我国是世界植桑养蚕纺丝制绸的发源地, 桑树种植面积巨大。但近年来我国蚕业因多种因素影响而经常出现较大的波动, 严重影响养蚕规模与经济效益, 大量夏桑叶未用于养蚕便直接遗烂在田间地头。因此, 探明夏桑叶新型、高效、高附加值的应用领域与技术途径, 对有效提升我国蚕桑业综合经济效益和抗风险能力, 营造蚕桑业新的发展模式与经济增长点具有重要意义。本文利用体外清除自由基评价体系对夏桑叶的抗氧化能力及其主要活性成分进行较系统的研究, 为将夏桑叶应用于医药保健品、天然抗氧化剂等领域提供了理论依据与技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

桑叶为杭州健港生物科技有限公司建德大同桑树种质资源圃的白桑 (*Morus alba* Linn.), 夏桑叶于 6 月下旬采摘, 冬桑叶于经初霜 (11 月中、下旬) 后采摘。

1.2 主要试剂与仪器

邻菲罗啉 (上海三爱思化学试剂有限公司), 鲁米

诺 (上海贝基生物科技有限公司), 芦丁标准品 (西安惠丰生化股份有限公司), 葡萄糖标准品 (厦门星隆达化学试剂有限公司), 焦性没食子酸标准品 (上海富蔗化工有限公司), 其他试剂均为分析纯。Ultraspec2000 紫外-可见分光光度仪 (Amersham 公司), Smart Line TL 超微弱发光仪 (上海科端生物科技有限公司)。

1.3 桑叶提取液的制备

参照文献 [2, 10~12], 将夏桑叶按其 在枝条上的位置分为 3 组: 顶端到桑枝总长的 1/4 处为上部叶, 基端到桑枝总长的 1/4 处为下部叶, 中间部分为中部叶。每组称取鲜叶 300g, 剪成长和宽均小于 3mm 的碎片后充分混匀备用。各称取上、中、下部鲜叶 50g, 50℃ 烘干至恒重并测得水分含量依次为 76.9%、75.7% 和 75.2%。按以下 3 种工艺制备各部叶的提取液: ①干叶热水提取: 称取 1g 干叶于 100ml 圆底烧瓶中, 加入 25ml 蒸馏水, 80℃ 水浴中回流浸提 2h, 离心取上清, 残渣用 10ml 温度为 80℃ 的蒸馏水润洗 2 次, 离心后合并 3 次所得上清液, 定容至 50ml 备用; ②鲜叶热水提取: 根据已测得的水分含量, 称取相当于 1g 干重的鲜碎叶, 研磨后转入 100ml 圆底烧瓶中, 加入 25ml 蒸馏水, 80℃ 水浴中回流浸提 2h, 离心取上清, 后续处理同工艺①; ③鲜叶温水提取: 称取相当于 1g 干重的鲜碎叶研磨后转入 100ml 磨口圆底烧瓶中, 加入 25℃ 的蒸馏水 25ml, 轻柔混匀后离心并取上清, 后续处理同工艺①。冬桑叶的叶位分类与夏桑叶相同, 且按工艺①制备提取液。以上每种工艺对同一材料均设 3 个重复。所得提取液分别用于抗氧化活性和主要成分含量测定。

1.4 桑叶提取液抗氧化活性的测定

1.4.1 羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力的测定 采用 Phen-Cu²⁺-Vit C-H₂O₂ 体系, 参照杨世园^[7] 的方法并略作改进。取适量桑叶提取液, 蒸馏水稀释成 0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0mg/ml (以桑叶干重计) 待测。依

次向测量管中加入待测样品 50 μ l、 0.1×10^{-3} mol/L Vc 溶液 70 μ l、 1.0×10^{-3} mol/L CuSO₄ 溶液 50 μ l、0.05 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液 (pH 8.0) 730 μ l、 1.0×10^{-3} mol/L 邻菲罗啉溶液 50 μ l, 混匀后迅速放入超微弱发光仪测量室内, 自动进样 0.5% 的 H₂O₂ 50 μ l, 测量每隔 0.6s 的发光强度, 记录发光峰值 A_{样品}。以蒸馏水替代样品为对照, 记录发光峰值 A_{对照}。清除率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{噪音本底}}) \times 100\%$ 。其中, A_{噪音本底} 为用蒸馏水替代 H₂O₂ 时 2min 内的发光峰值。

1.4.2 超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除能力的测定

采用联苯三酚自氧化体系, 参照田兵等^[13]的方法测定。样品配置方法同 1.4.1。依次向反应体系中加入 0.312×10^{-3} mol/L 联苯三酚 200 μ l, 50×10^{-3} mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 10.2) 180 μ l, 样品 20 μ l, 混匀后迅速放入微弱发光仪内, 自动进样 1×10^{-3} mol/L 鲁米诺 200 μ l, 测量每 0.2s 间隔内的发光强度, 并计算 2min 内发光峰面积 CL_{样品}。以蒸馏水替代样品作为对照试验 (CL_{对照})。清除率 (%) = $[(CL_{\text{对照}} - CL_0) - (CL_{\text{样品}} - CL_0)] / (CL_{\text{对照}} - CL_0) \times 100\%$ 。其中, CL₀ 为用蒸馏水替代联苯三酚时 2min 内的发光峰面积。

1.4.3 单线态氧(¹O₂)清除能力的测定 采用 H₂O₂-NaClO 体系, 参照 Yu 等^[14]的方法并略作改进。样品配制方法同 1.4.1。依次向测量管中加入 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 350 μ l, 0.3mmol/L NaClO 20 μ l, 样品 50 μ l, 混匀后迅速放入超微弱发光仪测量室内, 自动进样 0.03% 的 H₂O₂ 80 μ l, 测量每 0.2s 的发光强度, 并计算 2min 的发光峰面积 CL_{样品}。以蒸馏水替代样品作为对照得 CL_{对照}。清除率 (%) = $(CL_{\text{对照}} - CL_{\text{样品}}) / (CL_{\text{对照}} - CL_{\text{噪音本底}}) \times 100\%$ 。其中, CL_{噪音本底} 为用蒸馏水替代 H₂O₂ 时 2min 内的发光峰面积。

1.5 桑叶提取液中主要活性成分含量测定

1.5.1 多酚含量测定 用 Folin-Denis 试剂法测定提取液中多酚含量^[15]。分别吸取 0.1mg/ml 的焦性没食子酸标准溶液 0、2、4、6 和 8ml 于 5 个 100ml 容量瓶中, 加入 50ml 蒸馏水; 混匀后加入 Folin-Denis 试剂 2ml; 混匀并静置 5min 后, 加入饱和碳酸钠溶液 5ml; 混匀并定容后, 540nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线。吸取适量待测液替代没食子酸标准溶液, 按上述步骤测定样品的多酚含量。

1.5.2 黄酮含量测定 用 AlCl₃ 法测定提取液中总黄酮的含量^[16]。分别移取 0.1g/L 的芦丁标准液 0、2、4、6 和 8ml 于 25ml 的比色管中, 加入 1.5% AlCl₃ 8ml 和醋酸/醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 4ml, 并用 50% 乙醇水溶液定容至刻度; 摇匀后静置 0.5h; 摇匀后于 415nm

处测定吸光度, 绘制标准曲线。吸取适量待测液替代芦丁标准溶液, 按上述步骤测定样品的黄酮含量。

1.5.3 多糖含量测定 用硫酸-苯酚法测定提取液中多糖的含量^[17, 18]。分别移取 80 μ g/ml 的葡萄糖标准液 0、0.4、0.8、1.2、1.6 和 2.0ml 于 15ml 的具盖刻度试管中, 用重蒸水补齐至 2.0ml; 加入 6% 苯酚溶液 1ml; 摇匀后加入浓硫酸 5.5ml; 摇匀后在 30 $^{\circ}$ C 反应 30min; 摇匀后于 490nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线。取 10ml 桑叶提取液, 加入 30ml 无水乙醇, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱沉降 48h 后离心弃上清, 沉淀再用 75% 的乙醇 5ml 洗 2 次, 减压干燥后用 5ml 重蒸水溶解待测。取适量待测液替代葡萄糖标准溶液, 按上述步骤测定样品的多糖含量。

1.5.4 蛋白质含量测定 用 Bradford 法测定提取液中蛋白质含量^[19]。分别移取 100 μ g/ml 的小牛血清蛋白 (BSA) 标准液 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5ml 于 10ml 的具盖刻度试管中, 用重蒸水补齐至 0.5ml; 加入 Bradford 显色液 2.5ml, 摇匀后静置 5min; 摇匀后于 595nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线。吸取适量待测液替代蛋白标准溶液, 按上述步骤测定样品的蛋白质含量。

1.6 IC₅₀ 的计算及统计分析

IC₅₀ 指自由基清除率为 50% 时样品的浓度。以提取液浓度 (设 5 个梯度) 为自变量, 清除率为因变量进行曲线拟合, 根据拟合方程计算 IC₅₀^[20]。用 SAS 8.0 以最小显著性差异法 (least significant difference, LSD), 对不同叶位和工艺提取液的 IC₅₀ 和主要成分含量进行方差分析; 用 SPSS 13.0 以相关系数法和 P 检验, 对不同叶位及提取方式的 9 种提取液 (每种 3 个重复) 的主要成分含量 (μ g/ml, 5 个梯度) 与自由基清除率 (%) 作相关性分析。

2 结果与分析

2.1 夏桑叶与冬桑叶抗氧化活性的比较

无论是夏桑叶还是冬桑叶, 中部叶的产量都是最大的, 是桑叶资源开发利用的主要部位^[2, 10-12]。由图 1 可知, 夏、冬桑叶提取液均具有清除羟自由基 (\cdot OH)、超氧阴离子自由基 (O₂⁻·) 和单线态氧 (¹O₂) 这 3 种自由基的能力, 且呈明显的剂量效应关系。其中, 对 \cdot OH 的 IC₅₀ 分别为 42.25 和 41.21 μ g/ml, 对 O₂⁻· 的 IC₅₀ 分别为 272.34 和 262.58 μ g/ml, 差异均不显著 ($P > 0.05$); 而对 ¹O₂ 的 IC₅₀ 分别为 63.07 和 101.64 μ g/ml, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

2.2 叶位及提取工艺对夏桑叶抗氧化活性的影响

为进一步比较不同叶位及提取工艺对夏桑叶抗氧化活性的影响,对上、中、下部叶位的夏桑叶分别用干叶热水提取法、鲜叶热水提取法和鲜叶温水提取法制得 9 种提取液,测定他们对 3 种氧中心自由基的清除能力。测得夏桑叶上、中、下部鲜叶的水分含量依次为 76.9%、75.7% 和 75.2%,用于提取各叶位鲜叶的量相当于 1g 干重。由表 1 可知,无论采用何种叶位的夏桑叶及提取工艺制得的提取液,对 3 种自由基的清除能力都不尽相同,对应的 IC_{50} 总体上为 $\cdot OH < {}^1O_2 < O_2^{\cdot -}$,与图 1 中的结果相似,说明叶位与提取工艺对夏

桑叶的自由基清除能力具有影响。同时,当采用工艺①即传统的干叶热水提取时,夏桑叶提取液对 3 种自由基的清除能力均表现为上部叶 > 中部叶 > 下部叶,其中对 $\cdot OH$ 的作用没有达到显著水平,随着叶龄的增大自由基清除能力逐渐下降;当采用工艺②即鲜叶热水提取时,夏桑叶提取液对 3 种自由基的清除能力均表现出上部叶 > 中部叶,其中,对 $\cdot OH$ 的作用没有达到显著水平,而下部叶无规律可循;当采用工艺③即鲜叶温水提取时,夏桑叶 3 个部位叶片提取液对 3 种自由基的清除能力也无规律可循。

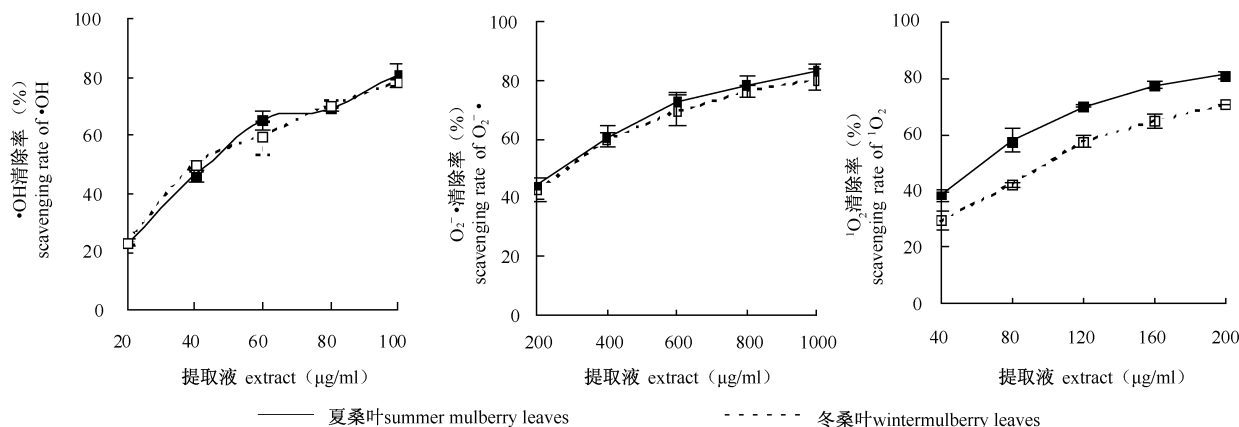


图 1 夏、冬桑叶提取液对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 和 1O_2 的清除能力

Fig. 1 Scavenging activities of $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ and 1O_2 of summer and winter mulberry leaves extracts

表 1 叶位与提取工艺对夏桑叶提取液自由基半数清除浓度 (IC_{50}) 的影响

Table 1 Effects of leaf position and extraction processing on IC_{50} values of summer mulberry leaves extracts

叶位 mulberry leaf	提取工艺 extraction process	自由基 free radical		
		$\cdot OH$	$O_2^{\cdot -}$	1O_2
上部叶 upper leaf	①	37.50 ± 4.44 B	219.67 ± 9.81 DE	28.84 ± 4.34 G
	②	51.15 ± 3.27 A	195.65 ± 12.20 E	36.99 ± 7.40 FG
	③	29.48 ± 1.01 C	339.14 ± 6.23 B	53.49 ± 2.97 E
中部叶 middle leaf	①	42.25 ± 2.30 B	272.34 ± 14.98 C	63.07 ± 7.30 DE
	②	52.20 ± 4.05 A	236.50 ± 5.66 D	80.19 ± 5.27 BC
	③	37.15 ± 1.93 B	206.71 ± 22.77 E	82.01 ± 1.89 B
下部叶 lower leaf	①	42.64 ± 3.50 B	374.87 ± 22.91 A	71.65 ± 4.61 CD
	②	39.94 ± 7.16 B	268.51 ± 13.56 C	42.05 ± 2.90 F
	③	52.91 ± 0.43 A	155.62 ± 12.09 F	113.84 ± 11.7 A

注:①、②和③依次为干叶热水提取、鲜叶热水提取和鲜叶温水提取。同列中不同字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: ①, ② and ③ represent the processes of dried leaves extracted with hot water, fresh leaves extracted with hot water and warm water, respectively. Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.3 夏桑叶不同叶位及不同提取工艺间主要成分含量的比较

为考察夏桑叶的活性成分与抗氧化功能的相关

性,对 9 种提取液的多酚、黄酮、多糖及蛋白质含量分别进行了测定。由表 2 可知,夏桑叶中多酚和黄酮的含量较接近;多糖含量为多酚和黄酮的 2~3 倍。采用

工艺③鲜叶温水提取的3种提取液中蛋白质含量明显高于用工艺①干叶热水提取和工艺②鲜叶热水提取,而用工艺①和工艺②提取的桑叶提取液间的蛋白质含

量相差不大。同时,当采用工艺①即干叶热水提取时,除上部叶的黄酮含量略小于中部叶的外,4种成分的含量均呈现出上部叶>中部叶>下部叶的规律。

表2 叶位与提取工艺对夏桑叶提取液中主要成分的含量的影响

Table 2 Effects of leaf position and extraction processing on main components contents of summer mulberry leaves extracts (mg/10ml)

叶位 mulberry leaf	提取工艺 extraction proces	成分 component			
		多酚 polyphenols	黄酮 flavonoids	多糖 polysaccharides	蛋白质 protein
上部叶 upper leaf	①	1.04 ± 0.06 A	0.92 ± 0.10 BC	2.53 ± 0.03 B	2.82 ± 0.18 D
	②	0.70 ± 0.05 DE	0.71 ± 0.02 EF	2.29 ± 0.02 D	2.82 ± 0.35 DE
	③	1.12 ± 0.08 A	1.19 ± 0.10 A	1.48 ± 0.01 H	12.36 ± 0.16 A
中部叶 middle leaf	①	0.82 ± 0.06 BC	0.97 ± 0.02 B	2.44 ± 0.02 C	2.43 ± 0.12 E
	②	0.77 ± 0.06 CD	0.88 ± 0.01 C	2.64 ± 0.05 A	2.01 ± 0.06 F
	③	0.92 ± 0.07 B	0.63 ± 0.01 F	2.05 ± 0.01 F	5.37 ± 0.44 B
下部叶 lower leaf	①	0.64 ± 0.04 E	0.77 ± 0.01 DE	2.20 ± 0.07 E	1.58 ± 0.10 G
	②	0.75 ± 0.07 CD	0.80 ± 0.02 D	1.76 ± 0.03 G	1.71 ± 0.12 FG
	③	0.77 ± 0.06 CD	0.69 ± 0.01 EF	1.81 ± 0.06 G	3.44 ± 0.19 C

2.4 夏桑叶抗氧化活性与主要成分的相关性分析

为进一步考察夏桑叶中黄酮、多酚、多糖和蛋白质对抗氧化功能所起的作用,分别对夏桑叶清除3种自由基能力和主要成分含量进行相关性分析并作显著性

检验(表3)。结果显示,夏桑叶中黄酮和多酚与3种氧中心自由基清除能力均呈极显著正相关($P < 0.01$);而多糖仅与清除 1O_2 能力达显著正相关($P < 0.05$),蛋白质与3种自由基清除能力的相关性均不显著。

表3 夏桑叶自由基清除能力与主要成分的相关性

Table 3 Correlation analysis between radicals scavenging capacities and main components in summer mulberry leaves

主要成分 main component	$\cdot OH$		$O_2^{\cdot -}$		1O_2	
	相关系数 correlation	检验概率 P	相关系数 correlation	检验概率 P	相关系数 correlation	检验概率 P
多酚 polyphenols	0.462	<0.01	0.803	<0.01	0.781	<0.01
黄酮 flavonoids	0.723	<0.01	0.724	<0.01	0.872	<0.01
多糖 polysaccharides	0.051	0.37	-0.013	0.47	0.332	0.01
蛋白质 proteins	0.166	0.14	0.209	0.09	0.007	0.48

注:相关系数为 Pearson 相关系数。

Note: The correlation is Pearson Correlation.

3 讨论

自由基是含有未成对电子的原子、原子团或分子。生物体内的自由基按其化学结构可分为氧中心自由基、半醌类自由基、碳/氮/硫中心自由基3大类,其共同特点是具有很高的反应活性。本研究所考察的 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 和 1O_2 属第1大类,是生物体内最常见和活泼的类型。研究表明,适量的自由基为维持正常的生命活动所必需,但体内过多的自由基会引发生物膜脂质过氧化而损伤、酶和核酸等生物大分子氧化而破坏,进

而引起细胞和组织损伤,加速机体衰老、诱发癌症等多种疾病发生^[21, 22]。分析结果表明,夏桑叶提取液清除自由基的能力与冬桑叶相近,且其清除 1O_2 的能力比冬桑叶还高61%。因此,夏桑叶在医药保健品和天然抗氧化剂等领域,与冬桑叶一样,具有很好的研究与开发应用前景。

国内外已有研究报道表明,桑叶中黄酮、多酚、多糖和蛋白质等成分含量因品种、产地、叶龄和提取工艺等差异而不尽相同。一般而言,多酚和蛋白质含量往往随叶龄的增加而减少,多糖含量多以中部叶的较高,而黄酮含量不随叶龄呈规律性变化^[11, 12],而本文的研

究结果与有关报道的相近。同时,诸多研究表明,多酚和黄酮是冬桑叶起抗氧化、抗衰老等功效的主要活性成分^[2-5]。本文采用3组叶位叶和3种提取工艺交叉制备9种夏桑叶提取液,分别测得它们对3种氧自由基的清除能力及4种主要成分的含量,通过统计学分析确证了夏桑叶中起抗氧化作用的主要活性成分依然是多酚和黄酮;而多糖只对 1O_2 有稍有清除活性,对 $\cdot OH$ 和 $O_2\cdot^-$ 几乎没有清除作用;蛋白质对3种氧中心自由基均无清除作用(表3)。关于多糖的抗氧化活性,Wang等^[23]曾报道桑叶多糖具有明显清除氮中心自由基DPPH \cdot 的活性;邢东旭等^[24]也报道桑叶多糖对DPPH \cdot 有一定的清除作用,但对 $O_2\cdot^-$ 的清除能力十分微弱。桑叶多糖对氮中心自由基与氧中心自由基清除活性的差异,可能是因自由基的种类、结构、活泼性及作用机制等不尽相同而引起。

从表1和表2可知,3种叶位与3种提取工艺对夏桑叶的自由基清除能力和主要成分含量均有影响。因用工艺③鲜叶温水提取法制得上、中、下叶位提取液的蛋白质含量依次比用干叶热水提取法制备的提取液蛋白含量分别高3.4、1.2和1.2倍,比用工艺②鲜叶热水提取法制备的高3.4、1.7和1倍,而在提纯多酚和黄酮等天然活性成分时面临的主要难题之一就是如何去除蛋白质,因而一般不宜选用工艺③生产夏桑叶活性物质。从图1和表1~3可知,用工艺①提取夏桑叶中的多酚和黄酮是合适的,该工艺在冬桑叶和茶叶等多酚和黄酮等生物活性物质提取中也得到广泛应用^[2, 8, 10-12, 24]。同时,中部叶是桑叶资源开发利用的主要部位^[2, 10-12],本文所研究的白桑是我国种植面积最大且具代表性的桑叶品种,据我们统计表明,夏桑叶上、中、下部叶的产量(干重)之比约为1:7:2,即中部叶约占总叶的70%,而且本文结果表明中部夏桑叶的自由基清除能力较强、主要成分含量也较高,因而在夏桑叶的研发中充分利用中部叶是毋庸置疑的。因此,夏桑叶的生物活性物质提取生产,可选其中部叶为主要原料,并主要采用工艺②干叶热水提取法。

对于工艺②,虽然它在对夏桑叶上部叶多酚和黄酮的提取率分别比工艺①的约低49%和30%,但对中、下部叶多酚和黄酮的提取率则与工艺①相近,且提取液中蛋白质含量也与工艺①的相近(表2),而上部叶产量仅为总叶产量的10%左右。因此,工艺②也可用于夏桑叶生物活性物质的提取产生。它可与工艺①形成优势互补,如当提取车间建在桑园附近时,可将鲜叶直接用工艺②提取,以免去桑叶干燥的工序与能耗等;当来不及对鲜叶进行提取或提取车间远离桑园时,

则可将鲜叶先制成干品后再用工艺①进行提取。

在上述已确立夏桑叶的主要活性成分为多酚和黄酮,以及提取加工时以中部叶为主要原料且主要采用工艺①可辅以工艺②的基础上,可分析探讨是否将夏桑叶的上、下部叶用于提取生产生物活性物质。当采用工艺①时,夏桑叶上部叶提取液中的多酚含量比中部叶的高27%,且黄酮含量与中部叶的接近,而下部叶提取液中的多酚和黄酮含量均比中部叶的低21%左右(表2),因而上部叶可以利用,下部叶建议剔除。而当提取车间离桑园较近、鲜叶直接用工艺②提取时,因夏桑叶上部叶和下部叶提取液中的多酚含量均与中部叶的相近,而黄酮含量依次比中部叶的低19%和9%(表2),因而可根据提取车间的加工能力和原料供求状况等实际情况,确定选用上部叶或下部叶。对夏桑上部叶和下部叶的剔除还要综合考虑相应人工成本等因素。目前在桑叶采摘时一般都兼顾整枝修剪,因而大多以人工操作为主,按叶部采摘是可行的。若能实现机械化对桑枝上的不同叶位进行分级采摘,将会使成本进一步降低。

研究结果为夏桑叶应用于医药保健品等研究与开发,促进桑叶资源综合利用,提升蚕桑业综合经济效益等,提供了必要依据。

4 结论

本文首次明确了夏桑叶的抗氧化能力不亚于冬桑叶,而且对 1O_2 的清除能力还比冬桑叶的高61%;夏桑叶与冬桑叶一样,起抗氧化等作用的依然是多酚和黄酮这两类主要的生物活性成分;夏桑叶生物活性物质的提取生产,以上部叶和中部叶为原料,且采用干叶热水提取法为佳,当提取车间离桑园较近时,也可以中部鲜叶为主要原料直接用鲜叶热水提取法提取。

参考文献:

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:309
- [2] 何雪梅,廖森泰,刘吉平. 桑树的营养功能性成分及药理作用研究进展[J]. 蚕业科学,2004,30(4):390-394
- [3] Varadacharyulu B A. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats [J]. Clin Chim Acta, 2003, 338(1):3-10
- [4] Doi K, Kojima T, Fujimoto Y. Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 23(9):1066-1071
- [5] Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, et al. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity [J]. Food Chem, 2006, 97:25-31

(下转第778页)

年有效剂量率和外照射指数

Table 3 The dose rate in air, annual effective dose rate and external hazard index of soil in Qingdao area

地点 location	剂量率 dose rate (nGy/h)	年有效剂量率 annual effective dose rate (mSv/a)	外照射指数 external hazard index
青岛 Qingdao	84.2	0.10	0.46
山东省 Shandong	73.1	0.09	—
全国 * China	81.5	—	1.0
世界 ** world	80	0.46	—

注: * 引自文献[4]; **引自文献[1]。表中数据均为均值。

Note: * Data from references[4]; **Data from references[1]. Data in the table are the mean.

建议的公众照射年剂量限值 1.0mSv 和世界平均年有效外部剂量限值 0.46mSv, 环境 γ 辐射属于较安全的地区。

虽然青岛市区地面放射性核素浓度偏高, 但未形成放射性核素浓度高背景区, 尤其是作为 γ 射线辐射外照射贡献较大的放射性核素²³⁸U 浓度并不高, 因此认为青岛市区土壤放射性核素浓度形成的辐射环境仍属于正常的本底范围, 是比较安全的。

参考文献:

- [1] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Exposure from Natural Sources of Radiation, United Nations, New York, 1993
- [2] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources, Effects and Risk of Ionizing Radiation [M]. New York: United Nations, 1982
- [3] DZ/T 0205—1999, 地面 γ 能谱测量技术规程[S]
- [4] Wang Zuo-yuan. Natural radiation environment in China, International Congress Series, 2002, 1225: 39–46
- [5] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation, United Nations, New York, 2000.
- [6] UNSCEAR. Ionizing Radiation: Source and Biological Effect, United Nations, 1988
- [7] Beck H L, DeCompo J, Gogolak G. In-situ Ge (Li) and NaI (Tl) Gamma-ray Spectrometry [J]. USAEC, 1972, HASL-258
- [8] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Effects and Risks of Ionizing Radiations [M]. New York: United Nations, 2000

(责任编辑 邱爱枝)

(上接第 759 页)

- [6] Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves [J]. Food Chem, 2007, 102: 1233–1240
- [7] 杨世国, 汪志平, 缪云根, 朱祥瑞. 桑叶粗提物清除羟自由基能力的比较[J]. 蚕业科学, 2005, 31(3): 351–353
- [8] 叶文峰, 赵林牙. 桑叶提取物抗氧化性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(1): 39–41
- [9] 国家药典委员会. 中国国家药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 244
- [10] 杨普香, 管帮福, 黎小萍. 桑叶中黄酮类化合物、氨基酸、桑多酚的含量变化探讨[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2003(2): 2–3
- [11] 刘春莲, 李东升. 不同品种不同部位的桑叶中多酚和黄酮类物质含量[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(4): 356, 402
- [12] 王娜, 褚衍亮, 方荣俊, 郭秀莲. 几种桑树品种和叶位主要营养及可利用分析[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(8): 146–150
- [13] 田兵, 徐步进, 华跃进. 耐辐射球菌清除活性氧自由基及对 DNA 的保护作用[J]. 核农学报, 2004, 18(5): 376–380
- [14] Yu W, Zhao Y. Chemiluminescence evaluation of oxidative damage to biomolecules induced by singlet oxygen and the protective effects of antioxidants [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1725: 30–4
- [15] 肖纯, 张凯农. Folin-Denis 试剂测定茶叶酚类化合物[J]. 茶叶通讯, 1996, 21(4): 27–29
- [16] 何书美, 刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法的研究分析[J]. 化学研究简报, 2007, 35(9): 1365–1366
- [17] Michel D, Gilles K A, Hamilton J k, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28(3): 350–356
- [18] 汪志平, 刘艳辉. 高产多糖钝顶螺旋藻新品系的选育及蛋白质 SDS-PAGE 鉴定[J]. 核农学报. 2004, 18(5): 349–352
- [19] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 42–46
- [20] 吕禹泽, 宋钰, 吴国宏. 葡萄多酚的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2007, 27(12): 213–216
- [21] 李勇, 孔令青, 高洪, 严玉霖. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85–88
- [22] 高斌, 高洪. 氧自由基与细胞损伤[J]. 动物医学进展, 2002, 23(5): 34–36
- [23] Wang F, Li J R, Jiang Y M. Polysaccharides from mulberry leaf in relation to their antioxidant activity and antibacterial ability [J]. J Food Process Eng, 2010, 33(1): 39–50
- [24] 邢东旭, 廖森泰, 邹宇晓, 刘吉平, 唐翠明, 吴娉明. 桑叶多糖的抗氧化作用研究[J]. 广东蚕业, 2008, 42(1): 36–39

(责任编辑 高美须 裴颖)