

应用生物活性追踪法对香椿抗氧化活性的研究



WANG Chang-lu

王昌禄¹, 江慎华^{1,2}, 陈志强¹, 陈勉华¹, 王玉荣¹,
刘常金¹, 周庆礼³, 夏廉法⁴

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院;天津市食品营养与安全重点实验室, 天津 300457;
2. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 3. 天津市食品加工工程中心, 天津 300457;
4. 河南省农业科学研究院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 采用生物活性追踪法,将香椿老叶甲醇提取物划分为 4 个不同极性部位,通过测定其总还原力、1,1-二苯基-2-苦基-肼(DPPH) 自由基清除能力和三价铁还原抗氧化能力(FRAP)测试值,确定香椿老叶提取物抗氧化活性及其组成。结果表明:香椿老叶提取物中的强抗氧化活性物质主要集中在乙酸乙酯部位,该部位的总还原力相当于 467.53 mg/g Vc 的总还原值,FRAP 值相当于 10 578 $\mu\text{mol/g}$ 硫酸亚铁的 FRAP 值,质量浓度 50 mg/L 的 DPPH 自由基清除率为 92.84%,均比同浓度的 2,4-二叔丁基甲基苯酚(BHT)强。相关性研究表明,香椿老叶提取物的抗氧化活性主要在于其含有较高的黄酮类化合物所致。TLC 和 HPLC 分析表明:香椿老叶提取物强抗氧化活性物质主要由 4 个黄酮-糖苷类化合物组成。

关键词: 抗氧化;香椿;生物活性追踪法;评价

中图分类号:TQ91;R151.4

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2008)04-0039-05

Study on Antioxidative Activity of *Toona sinensis*(A. Juss.) Roem. Based on Bioassay-guided Method

WANG Chang-lu¹, JIANG Shen-hua^{1,2}, CHEN Zhi-qiang¹, CHEN Mian-hua¹, WANG Yu-rong¹,
LIU Chang-jin¹, ZHOU Qing-li³, XIA Lian-fa⁴

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety;College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Tianjin Engineering Center of Food Processing, Tianjin 300457, China; 4. Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Methanol extract of old leaves of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. was separated into four subfractions of different polarities based on bioassay-guided method. The antioxidative activities and the related responsible compounds in *T. sinensis* were studied by evaluating reducing power, ferric reducing ability of plasma (FRAP) value and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity of four subfractions with different polarities. The results showed that reducing power, FRAP value and DPPH radical scavenging capacity of ethyl acetate subfraction at a concentration of 50 mg/L had the strongest antioxidant activities of 467.53 mg/g (ascorbic acid) Vc equivalents, 10 578 ($\mu\text{mol/L}$)/g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ equivalents and 92.84%, respectively. All these antioxidant values of ethyl acetate subfraction were much higher than BHT at the same concentration. The correlation study showed that the powerful antioxidative activity of *T. sinensis* was mainly resulted from high contents of flavonoids. The antioxidants mainly consist of four flavonoid glucosides. These results laid a solid foundation for further researching and developing *T. sinensis*.

Key words: antioxidation; *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.; bioassay-guided method; evaluation

收稿日期:2007-06-29

基金项目:天津市农业科技成果转化与推广(0502170);“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD27B06)

作者简介:王昌禄(1960-),男,河北秦皇岛人,教授,博士生导师,研究方向为天然产物研究与开发;

E-mail: changluwang@yahoo.com.cn.

香椿 (*Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.), 楝科, 香椿属, 多年生落叶乔木, 原产于我国中部地区, 在我国已有 2 000 多年的栽培历史, 主要分布在黄河至长江流域之间, 山东、安徽、河南和陕西等地栽培广泛。香椿顶端嫩芽、嫩叶脆嫩多汁, 芳香馥郁, 风味独特、营养丰富全面, 是我国人民喜爱的传统名贵木本蔬菜。每年, 香椿嫩芽被采摘消费后留下大量的香椿老叶未被利用。研究表明, 香椿具有抗肿瘤、降血糖、增强人精子活力等众多药理功效^[1-4]。抗氧化剂由于能捕获、淬灭引起细胞或机体损伤的自由基而引起人们的普遍关注。部分水果、蔬菜以及由它们制作的饮料等食品由于富含多酚、黄酮类化合物而被证实具有很强的抗氧化活性^[5], 其提取物被广泛运用^[6]。本实验室前期研究结果表明, 香椿老叶富含黄酮类化合物、多酚和皂苷等化合物, 具有很高的抗氧化活性。作者首次采用活性追踪的方法对香椿老叶提取物的抗氧化活性进行了研究, 以期为深入研究与开发香椿系列功能性食品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

香椿老叶, 2006 年 9 月采摘于天津科技大学苗圃, 于阴凉处晾干、粉碎过筛 (孔径 350 μm), 于冰箱保存备用。

1.2 化学试剂

三吡啶三吡嗪 (tripyrindyl triazine, TPTZ)、 β -胡萝卜素、1,1-二苯基-2-苦基-肼 (DPPH) 自由基, 购自 Sigma 公司, 其余为国产分析纯或色谱纯试剂。

1.3 实验方法

1.3.1 香椿老叶抗氧化活性物质的提取 按照生物活性追踪的处理方法^[7], 称取 500 g 香椿老叶粉, 按 1:10 (g:mL) 的料液比加入甲醇常温提取 3 次, 每次 10 d, 提取液合并浓缩至黏稠状, 加入蒸馏水调稀后依次用极性逐渐增大的有机溶剂正己烷、乙酸乙酯和正丁醇充分萃取得到正己烷相、乙酸乙酯相和正丁醇相, 最后剩余部分为水相。分别真空浓缩、干燥后冷冻干燥得到干粉, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3.2 总黄酮含量的测定 将 0.5 mL 提取液加入到 4.5 mL 蒸馏水中, 然后加入 0.3 mL 质量分数 5% 亚硝酸钠, 反应 5 min 后加入 0.6 mL 质量分数 10% 三氯化铝, 6 min 后加入 2 mL 浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠, 最后补足蒸馏水至 10 mL, 于 510 nm 比色测定。以芦丁为标准品做标准曲线, 总黄酮含量以 mg/g (相对样品, 下同) 表示^[8]。

1.3.3 总还原力的测定 按照 Oyaizu 等^[9]方法, 1.0 mL 提取液加入到 2.5 mL 磷酸缓冲液中 (0.2 mol/L, pH 值 6.6), 然后加 2.5 mL 质量分数 1% 六氰合铁酸钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$), 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后加 2.5 mL 质量分数 10% 三氯乙酸, 混匀后 3 000 r/min 离心 10 min, 上清液 2.5 mL 与 2.5 mL 水和 0.5 mL 质量分数 0.1% 三氯化铁混匀, 于 700 nm 比色测定。以 Vc 为标准品做标准曲线, 以 mg/g 表示样品总还原力的大小。

1.3.4 三价铁还原抗氧化能力 (FRAP) 测试法总抗氧化能力的测定 采用 Benzie 等^[10]方法, 100 μL 样液中加入 1.0 mL FRAP 工作液 (0.3 mol/L pH 值 3.6 乙酸钠缓冲液、10 mmol/L TPTZ 和 20 mmol/L 三氯化铁以体积比 10:1:1 混匀), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 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 ($\mu\text{mol/L}$)/g 表示。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力的测定 采用 Yamaguchi 等^[11]方法, 0.5 mL 提取液与 1.0 mL 体积分数 95% 的 DPPH 乙醇溶液混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min 后 517 nm 比色。DPPH 自由基抑制率采用下式计算。

$$I = (d_0 - d_1) / d_0 \times 100 \% \quad (1)$$

式中: I —抑制率, %; d_0 —对照品在 517 nm 的光密度; d_1 —样品在 517 nm 的光密度。

1.3.6 采用 TLC、HPLC 对乙酸乙酯部位的组成进行初步定性研究 选取乙酸乙酯萃取物, 与标准物芦丁和槲皮素溶液同时展层 (TLC), 展开剂为乙酸乙酯-甲酸-水 (体积比 13:1:1), 以质量分数 2% 无

水三氯化铝无水乙醇溶液作为显色剂对香椿乙酸乙酯部位物质组成进行薄层色谱分析。

以甲醇、水为流动相,对香椿乙酸乙酯部位组成成分进行初步分析。色谱条件为:色谱柱,ODS 4.6 mm × 250 mm × 5 μm,流动相:甲醇-水(体积比 50:50,磷酸调 pH 值至 2.53),柱温 25 °C,流速 1.0 mL/min,检测波长 368 nm,进样量 20 μL。

1.3.7 统计分析 所有试验均重复 3 次,各实验数据均以平均值 ± 标准偏差表示,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 各极性部位冻干得率

采用活性追踪的试验方法,将香椿老叶的活性成分按极性从小到大依次划分为正己烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水溶性部位,为继续深入分离香椿老叶中抗氧化活性物质单体奠定基础。各极性部位冻干得率见表 1。

从表中可以看出,香椿老叶中非极性和强极性物质含量最多,而中极性和弱极性化合物含量相对较低。非极性和强极性化合物可能分别主要由色素和水溶性蛋白、多糖类物质组成,而黄酮类弱极性和中极性化合物主要存在于乙酸乙酯和正丁醇部位。

2.2 各极性部位总黄酮含量

研究表明,总黄酮、多酚类化合物是植物等起抗氧化作用的主要活性物质^[12]。同时,为确定总黄酮与抗氧化活性之间的相关性,测定各极性部位的总黄酮含量(相对样品),其结果如表 1 所示。

由表 1 可以看出,乙酸乙酯部位的总黄酮质量分数最高,为 (500.24 ± 13.47) mg/g;水相部位质量分数最低,为 (19.29 ± 1.68) mg/g。所有样品之间均存在显著性差异($P < 0.05$)。这说明香椿老叶所含的黄酮类化合物主要以弱极性化合物为主。

2.3 总还原力的测定

提供电子使自由基被还原是总黄酮、多酚类化合物抗氧化的机制之一^[13]。据报道^[14],抗氧化活性与总还原力之间存在极大的相关性。本研究采用 Fe^{3+} 被还原成 Fe^{2+} 的方法测定总还原力^[9],其结果一并列入表 1。

由表 1 可知,各样品的总还原力,最低的水相部位仅为 (11.35 ± 9.14) mg/g,最高的阳性对照 Vc 的为 (990.07 ± 0.02) mg/g,所有样品的总还原力之间均存在显著性差异($P < 0.05$)。总还原力与总黄酮含量之间存在显著的相关性, $y = 0.9399x + 1.4902$, R^2 为 0.9824。该结论表明香椿强大的总还原力主要由总黄酮所贡献,进一步验证了 Yildirim^[15] 等的研究结果。

2.4 FRAP 值的测定

Fe^{3+} -TPTZ 可被样品中还原性物质还原为二价铁,呈现出明显的蓝色,于 593 nm 处具有最大光吸收,根据吸光度的大小计算试样抗氧化活性的强弱,如表 1 所示。

由表 1 可以看出,在 4 个极性部位中,乙酸乙酯部位具有最高的 FRAP 值,比 BHT(阳性对照)强,但弱于另一个阳性对照 Vc($P < 0.05$)。同时,FRAP 值与总黄酮含量也存在很强的相关性, $y = 18.448x + 1537.5$, R^2 为 0.9800。

2.5 DPPH 自由基清除率的测定

DPPH 自由基是一种人工合成的、在有机溶剂中能稳定存在的自由基,其乙醇溶液呈深紫色,在 517 nm 有最大吸收,实验结果如表 1 所示。

由表 1 可以看出,香椿老叶提取物对 DPPH 自由基具有明显的清除能力,其中乙酸乙酯部位在极低的质量浓度(50 mg/L)表现出非常高的清除能力(92.84%),比相同质量浓度 BHT 的清除率(52.72%)高 76.10%,与同质量浓度 Vc 的清除能力无显著性差异($P > 0.05$)。在该质量浓度下,DPPH 自由基清除能力与总黄酮含量存在较高的相关性, $y = 0.1279x + 34.447$, R^2 为 0.6791。

表1 香椿不同极性部位及 BHT 和 Vc 性质比较¹⁾Table 1 Comparison of properties of different subfractions from *T. sinensis* with those of BHT and Vc

极性部位 subfractions	得率/% yield	总黄酮质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) total flavonoid contents	总还原力/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) total reducing power	FRAP 值/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) FRAP value	DPPH 清除率/% DPPH radical scavenging activity
正己烷 hexane	4.73	96.67 ± 0.84 c	62.47 ± 0.39 ef	2885.14 ± 123.91 f	29.62 ± 5.91 c
乙酸乙酯 ethyl acetate	2.35	500.24 ± 13.47 a	467.53 ± 6.75 b	10578.71 ± 148.99 b	92.84 ± 0.62 a
正丁醇 <i>n</i> -butanol	1.46	176.43 ± 13.46 b	175.11 ± 13.5 d	5233.48 ± 522.25 d	70.92 ± 1.52 b
水 aqueous	4.57	19.28 ± 1.68 d	11.35 ± 9.14 f	1465.38 ± 34.01 g	25.15 ± 2.09 c
BHT			347.87 ± 13.57 c	7943.24 ± 286.88 c	52.72 ± 9.01 b
Vc			990.07 ± 0.02 a	15136.57 ± 444.467 a	95.68 ± 0.20 a

1) 同一列不含相同字母表示各样品之间存在显著性差异 Different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

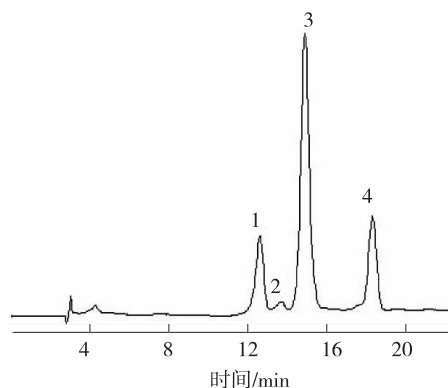
2.6 TLC、HPLC 的分析结果

由于香椿老叶提取物抗氧化活性物质主要集中在弱极性的乙酸乙酯部位,选取该部位的甲醇溶液与标准物质芦丁和槲皮素的甲醇溶液同时进行薄层色谱分析,结果如图 1 所示。乙酸乙酯部位 HPLC 的分析结果如图 2 所示。



1. 芦丁 rutin; 2. R_{f1} ; 3. R_{f2} ;
4. R_{f3} ; 5. R_{f4} ; 6. 槲皮素 quercetin

图 1 乙酸乙酯部位 TLC 展层图



1. R_{f1} ; 2. R_{f2} ; 3. R_{f3} ; 4. R_{f4}

图 2 乙酸乙酯部位 HPLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of ethyl acetate fraction

Fig. 2 HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction

由图 1 可以看出,乙酸乙酯部位主要由 4 种化合物组成,其 R_f 值位于芦丁和槲皮素中间位置,分别以 R_{f1} 、 R_{f2} 、 R_{f3} 、 R_{f4} 简称之。4 个化合物的含量有一定差别,以 R_{f3} 含量最大, R_{f1} 和 R_{f4} 含量次之, R_{f2} 含量最低。三氯化铝显色后 $R_{f1} \sim R_{f4}$ 呈现出明显的黄酮类化合物的荧光。

图 2 进一步验证了 TLC 的研究结果。芦丁为槲皮素 3-O-芸香糖(α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 6)-D-葡萄糖),属于槲皮素的二糖苷,槲皮素属于黄酮类苷元。结合芦丁、槲皮素的极性性质以及 4 个化合物的色谱行为,基本说明香椿老叶抗氧化物质主要由 4 个黄酮-糖苷类化合物组成。以乙酸乙酯部位为研究对象,运用柱层析等各种分离手段,对单体化合物进一步的分离工作正在进行之中。

3 结论

通过生物活性追踪法初步研究发现,香椿老叶提取物具有非常明显的抗氧化活性,抗氧化物质主要集中在弱极性的乙酸乙酯部位,该部位的抗氧化活性比同质量浓度的 BHT 强。相关关系的计算结果发现,香椿老叶提取物强抗氧化活性主要由于其高含量的总黄酮所致。这与国外很多专家、学者^[15]得出的结论完全一致。运用 TLC 和 HPLC 分析发现,乙酸乙酯部位主要由 4 个黄酮-糖苷类化合物组成。该结论为本研究室深入、细致的分离活性单体化合物、并最终阐明其强抗氧化活性的物质基础、以香椿老叶为原料提取强抗氧化活性物质制备抗氧化、抗动脉粥样硬化、降血脂等功能性食品奠定了坚实的基础。该方面的研究工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] CHANG H L, HSU H K, SU J H, et al. The fractionated *Toona sinensis* leaf extract induces apoptosis of human ovarian cancer cells and inhibits tumor growth in a murine xenograft model[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102(2): 309-314.
- [2] CHANG W H, CHEN C H, LU F J. Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines[J]. *Planta Med*, 2002, 68: 128-132.
- [3] CHANG H C, HUNG W C, HUANG M S, et al. Extract from the leaves of *Toona sinensis* Roem. exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2002, 30: 307-314.
- [4] YANG F Y. Study on the physiological functions of *Toona sinensis* Roem. in human spermatozoa[D]. Taiwan: Master Thesis in National Cheng Kung University, ROC, 2003.
- [5] ANGELES M A, REMEDIOS C M, CARMEN R, et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from sherry wines and correlation with their content in polyphenols[J]. *Food Res Int*, 2004, 37: 715-721.
- [6] KYE-TAEK L, CHUN H U, KITTS D D. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract[J]. *Food Chem Toxicol*, 2001, 39: 229-237.
- [7] DORMAN H J D, HILTUNEN R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions[J]. *Food Chem*, 2004, 88: 193-199.
- [8] JIA Zhi-shen, TANG Meng-cheng, WU Jian-ming. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals[J]. *Food Chem*, 1999, 64: 555-559.
- [9] OYAZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction[J]. *Jpn J Nutr*, 1986, 40: 307-315.
- [10] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay[J]. *Anal Biochem*, 1996, 239: 70-76.
- [11] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62: 1201-1204.
- [12] RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. *Free Radical Biol Med*, 1996, 20: 933-956.
- [13] YILDIRIM A, MAVI A, KARA A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 4083-4089.
- [14] DORMAN H J D, KOSAR M, KAHLOS K, et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 4563-4569.
- [15] ZHENG W, WANG S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 5165-5170.

欢迎订阅 2009 年下列刊物

《非织造布》期刊是目前我国唯一在国内外公开发行的非织造布专业刊物 (ISSN 1005-2054/CN 21-1308/TS), 为“中国期刊网全文收录期刊”、“中国学术期刊光盘版全文收录期刊”、“中国核心期刊(遴选)数据库来源期刊”、“中文科技期刊数据库收录期刊”和“万方数据—数字化期刊群全文上网期刊”。该刊设有行业动态、专论与综述、技术探讨、产品开发、应用研究、设备与工厂、纤维原料、新产品新工艺、分析与测试、简讯、企业与广告等 10 余个栏目, 主要刊登和报道国际和国内非织造布工业的技术、经济动态、工艺技术探讨、产品开发、引进技术的消化吸收、设备改造、企业管理以及信息简讯和企业广告(广告经营许可证 2100005000037)等。该刊为国际标准大 16 开本, 双月刊, 逢双月 25 日出版, 国内定价为 15 元/期(含邮费)。全年可随时订阅。读者可以通过邮局(邮发代号 8-300)或直接与编辑部联系订阅。订费通过银行或邮局汇款均可, 并在汇单上详细写明订阅者的邮编、地址、单位和姓名, 也可随时向编辑部索要订单。

地址: 110016 沈阳市南塔街 124 号; 联系人: 《非织造布》编辑部 王兰; 电话: 024-23916067、23916084-205; 传真: 024-23894580; E-mail: fzzb@chinajournal.net.cn, synwvl@sohu.com; 银行汇款单位: 辽宁天维纺织研究建筑设计有限公司; 开户银行: 建行南塔分理处; 帐号: 21001483601050002156。

《林业科学》是中国林学会主办、中国科协主管的林业综合性学术期刊。在三届“国家期刊奖”评选中, 两次荣获中国期刊最高奖——“国家期刊奖”, 一次名列“国家期刊奖提名奖”第一名。目前已被 CA、AJ、ZR、JST、CSCD 等国内外 20 多个重要检索系统与数据库收录。

主要刊登林业及相关领域的最新科研成果, 及时反映国家林业建设重点和热点, 评述学术动向, 开展学术讨论, 促进国内外学术交流。内容包括森林培育、森林生态、林木遗传育种、森林保护、森林经理、森林与环境、生物多样性保护、野生动植物保护与利用、园林植物与观赏园艺、经济林、水土保持与荒漠化治理、森林工程、木材科学与技术、林产化学加工工程、林业经济、林业可持续发展及林业宏观决策研究等方面。以学术论文、研究报告、综述为主, 还设有学术问题讨论、研究简报、植物新品种与良种、科技动态、新书评介等栏目。读者对象为国内外从事林业及相关领域研究的科技人员、管理人员以及高等院校的师生。该刊接受英文稿件(附中文摘要)。

月刊, 每月 25 日出版, 大 16 开, 每期 128 页。单价: 25 元, 全年 300 元。国内外公开发行。刊号: CN 11-1908/S, ISSN 1001-7488, 邮发代号 82-6; 国外发行代号: BM44。可以直接向编辑部订阅。

联系地址: 100091 北京万寿山后中国林学会《林业科学》编辑部; 电话: (010) 62889820、62888579; E-mail: linykx@forestry.ac.cn; 期刊主页: <http://lyke.chinajournal.net.cn>; 期刊博客: <http://blog.sina.com.cn/linykx>。