

青钱柳提取物体外抗氧化活性研究

董彩军, 谢明勇*, 聂少平, 谢建华, 贾素花, 黄 璞
(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 研究青钱柳不同溶剂提取物的体外抗氧化活性。测定了青钱柳不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用, 用化学发光法测定对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)的清除能力, 并用烘箱储藏法测定对油脂的抗氧化活性。实验结果表明, 醇提物具有较强的清除自由基能力和抗油脂氧化活性。

关键词: 青钱柳; 提取物; 抗氧化性

Study on Antioxidant Activity of *Cyclocarya paliurus*(Batal.) Iljinskaya Extracts *in vitro*

DONG Cai-jun, XIE Ming-yong*, NIE Shao-ping, XIE Jian-hua, JIA Su-hua, HUANG Pu
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: *In vitro* antioxidant activities of different extracts of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk leaves were studied. The activities of the extracts on scavenging DPPH radical were assayed. The chemiluminescence method was used to evaluate the effects of the extracts on scavenging superoxide anion radical and hydroxyl radical and the changes of the oil oxidation were determined by storage in baking oven. The results showed that the ethanol extract of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk significantly had free radical-scavenging activity and could inhibit the lipid peroxidation.

Key words *Cyclocarya paliurus*(Batal.) Iljinskaya extract; antioxidant activity

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0031-04

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*(Batal.) Iljinskaya)为胡桃科(*Juglandaceae*)青钱柳属植物, 该属植物现仅有1种, 为我国特产^[1]。青钱柳叶中含有黄酮类、萜类、甾醇、酸类、甙类及微量元素等营养成分。经研究表明, 用其叶子泡出的茶甘甜滋润, 生津止渴, 被认为具有清热解暑、防病治病和延年益寿等功效, 故又被当地老百姓称为“甜茶”、“神茶”^[2]。Hiroshi Kurihara 等人研究发现, 青钱柳提取物能降低血脂水平, 促进脂肪代谢, 能有效防治一些疾病: 如动脉硬化、脑中风、心肌梗塞等^[3]。此外青钱柳能抑制葡萄糖的吸收, 降低人体血糖, 从而预防由高血糖引起的一系列病症^[4]。黄酮类成分在人类饮食结构中占有重要的地位, 具有保肝、扩冠、抗炎、降低血管脆性, 能解除痉挛, 增强心脏收缩, 有一定程度的抗菌及抑制肿瘤细胞等作用。同茶叶相比, 青钱柳黄酮类化合物含量相对较高, 可作为这些物质的补充源^[5]。本实验主要对青钱柳不同提取物的体外抗氧化活性进行研究, 为更进一步开发青钱柳保健产品提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

青钱柳[*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja]由江西神茶实业有限公司提供; 食品级二丁基羟基甲苯(BHT); 可溶性淀粉; 市售猪油。

1.2 试剂

2,2-联苯基-1-苦味基苯肼和鲁米诺 Fluka公司; VE Sigmar公司; 甲醇、乙醇、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、VC、邻苯三酚、邻菲罗啉、碳酸钠、碳酸氢钠、FeSO₄·H₂O₂、三氯甲烷、冰乙酸、碘化钾、硫代硫酸钠等均为分析纯; 实验用水由蒸馏水经纯化器纯化制得。

1.3 仪器

BPCL微弱发光测量仪 中国科学院生物物理研究所; TU-1900双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; SHZ-III型循环真空泵 上海亚荣生化仪器厂; HH-4

收稿日期 2007-07-22

*通讯作者

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540); 江西省自然科学基金资助项目(9920029);

南昌大学测试基金资助项目(2006017)

作者简介: 董彩军(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品化学与天然产物化学研究。

数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; FA1104 电子天平 上海精天电子仪器厂; DGG-9140B 型电热恒温鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司; Millipore 超纯水系统 美国 Millipore 公司。

1.4 方法

1.4.1 青钱柳不同溶剂提取物的制备

准确称取烘干过筛的青钱柳粉末 7 份, 每份 5g, 用石油醚脱脂除色素后, 分别按固液比 1:20 加入甲醇、70% 乙醇、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和去离子水, 80℃ 水浴提取 2h, 过滤。滤渣再加等量溶剂提取 1 次, 合并滤液, 真空浓缩至膏状, 于 40℃ 真空干燥, 计算得率, 冷藏备用。

1.4.2 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用^[6]

准确称取 20mg DPPH 用无水乙醇溶解并定容于 250ml 容量瓶中, 配制成浓度为 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液。取 2ml 待测液及 2ml DPPH 溶液加入具塞试管中, 加入 1ml 无水乙醇使反应总体积达到 5ml, 摇匀, 反应 30min。在 517nm 波长下测吸光度, 计算羟自由基的清除率。以 BHT 和 VC 为对照。根据下列公式计算清除率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(1-A_i - A_j)}{A} \times 100$$

式中, A_e 为 2ml DPPH 溶液 + 2ml 样品溶剂 + 1ml 无水乙醇; A_i 为 2ml DPPH 溶液 + 2ml 样品液 (或对照品溶液) + 1ml 无水乙醇; A_j 为 2ml 无水乙醇 + 2ml 样品液 (或对照品溶液) + 1ml 无水乙醇。

1.4.3 不同溶剂提取物对超氧阴离子自由基的清除作用^[7]

微弱发光发射光谱在 180~800nm 范围, 光很弱, 只有 $10 \sim 10^4$ 光子 / s · cm², 量子效率为 $10^{-14} \sim 10^{-9}$ 。自由基、活性氧的产生、变化总是伴随着光子的发射, 因此可用化学发光法来检测自由基和活性氧。

超氧阴离子由邻苯三酚自氧化产生: 在样品管中加入 5μl 10mmol/L 的邻苯三酚溶液, 取待测样品 100μl 加入样品管, 然后加入 895μl 1mmol/L 鲁米诺 (luminol) 的碳酸盐缓冲溶液 (体积之比为 1:2), 使反应总体积为 1ml。立即测量, 每隔 6s 记录一次积分发光强度 (counts of per 6 seconds, 简称 CP_{6s}), 测定时间 240s, 温度 30℃, 用碳酸盐缓冲液代替样品做空白, 计算样品对化学发光的抑制率。清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品的积分值} - \text{本底积分值}}{\text{空白积分值} - \text{本底积分值}}\right) \times 100$$

1.4.4 不同溶剂提取物对羟自由基的清除作用^[8]

在样品管加入 60μl 1mmol/L 邻菲罗啉溶液、40μl

1mmol/L FeSO₄ 溶液和 50μl 0.6% 的 H₂O₂ 溶液, 取待测样品 50μl 加入样品管, 再加入碳酸盐缓冲液 (pH10.2), 使反应总体积为 1ml, 放入样品池, 立即开始测定 CP_{6s}, 测定时间 240s。用碳酸盐缓冲液代替样品做空白, 计算样品对化学发光的抑制率。清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品的积分值} - \text{本底积分值}}{\text{空白积分值} - \text{本底积分值}}\right) \times 100$$

1.4.5 乙醇提取物的油脂抗氧化作用^[9]

用 70% 乙醇提取浸膏配置成一系列浓度的溶液 (1、2、4mg/ml), 备用。采用烘箱储藏法测定抗油脂氧化性。取不同浓度提取物加到 50.00g 温热猪油中搅匀, 以在 50.00g 猪油中加入 5ml 相应溶剂为空白, 以加入 5ml 2mg/ml 的 BHT 和 VE 为对照。在 (60 ± 1)℃ 培养箱中强化保存, 定时搅拌, 于不同时间取样测定猪油中的过氧化值 (POV 值)。POV 值的测定按 GB5009.37 - 2003 方法进行。

1.4.6 半清除率的测定

半清除率指清除率为 50% 时所需样品的浓度, 根据不同浓度样品的清除率作曲线求出。所需浓度越低, 表明半清除率越高, 清除效果越好。

2 结果与分析

2.1 青钱柳不同溶剂提取物的浸膏得率

表 1 不同溶剂提取物的浸膏得率
Table 1 Yields of different extracts

不同溶剂提取物	70% 乙醇	水	甲醇	丙酮	乙酸乙酯	氯仿	正丁醇
浸膏得率 (%)	6.75	4.95	5.48	2.39	2.03	2.46	2.33

由表 1 可以得出, 70% 乙醇提取物的浸膏得率最高。

2.2 青钱柳不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除能力的测定^[4]

自由基消除反应是抑制机体过氧化过程的主要机制之一, 样品清除自由基的能力反映其抗氧化活性的高低, DPPH 是目前使用最为广泛的自由基试剂之一^[10]。2, 2-二苯基-1-苦基苯肼自由基 (DPPH·) 在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其结构中含有 3 个苯环, 1 个 N 原子上有 1 个孤对电子, 呈紫色, 在 517nm 有强吸收。DPPH· 和抗氧化剂相混合, 随着 DPPH· 与抗氧化剂给出的氢相结合, 孤对电子被配对, 使体系颜色由紫色变为淡黄, 光吸收值减少, 反应结束后达到稳定。DPPH· 剩余百分率与抗氧化剂的清除能力相对应, 因此可用分光光度法进行定量分析。

如图 1 所示, 体积分数 70% 乙醇、水、甲醇提取物都有较强的清除 DPPH 自由基的作用, 效果均强于

BHT, 但弱于VC。而丙酮、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇提取物的清除作用相对较弱。由图1可以得出不同溶剂提取物的IC₅₀值, 结果见图2。IC₅₀值越小说明抗氧化性越强。可知青钱柳70%乙醇提取物清除DPPH自由基能力最强。

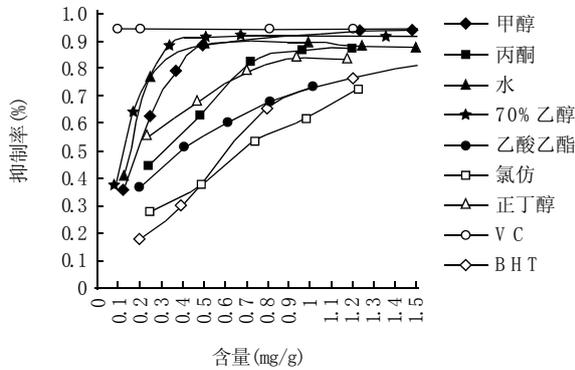


图1 不同溶剂提取物对DPPH·自由基的清除作用
Fig.1 Scavenging activities on DPPH· of different extracts

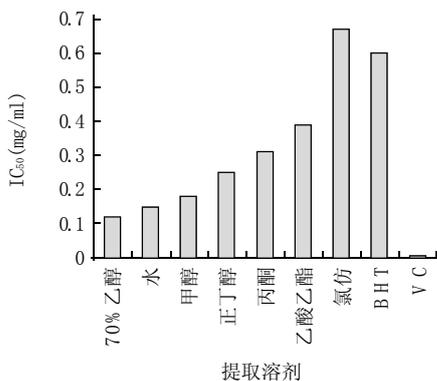


图2 不同溶剂提取物清除DPPH·自由基的IC₅₀值
Fig.2 IC₅₀ values of scavenging DPPH· of different extracts

2.3 青钱柳不同溶剂提取物对超氧阴离子清除能力的测定

碱性条件下(pH8.34), 邻苯三酚发生自氧化反应生成O₂⁻·和有色中间产物, 产生自由基的同时会伴有光子的产生。当加入O₂⁻·清除剂时, O₂⁻·的生成受到抑制, 邻苯三酚自氧化过程受阻, 产生的光子也会随之减少。故通过用微弱发光仪测定反应过程中的光子数的变化, 就能推断清除剂对O₂⁻·的清除作用, 并比较不同提取物清除作用的大小, 计算清除率。

图3和图4为70%乙醇提取物和水提取物在邻苯三酚自氧化发光体系中的微弱发光扫描图, 根据积分值的变化计算清除率。然后由浓度和清除率的关系, 可得出不同溶剂提取物的IC₅₀值(见表2)。由IC₅₀值得出, 对超氧阴离子的清除能力的大小为水提取物>70%乙醇提取物>甲醇提取物。

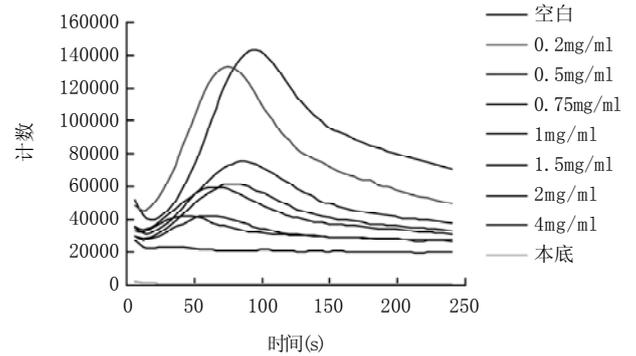


图3 70%乙醇提取物在邻苯三酚自氧化发光体系中的发光动力学曲线
Fig.3 Chemiluminescence kinetics of 70% alcohol extract in 1,2,3-benzotriol auto-oxidation system

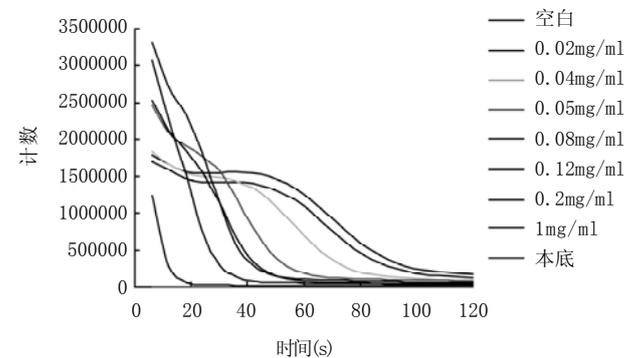


图4 水提取物在邻苯三酚自氧化发光体系中的发光动力学曲线
Fig.4 Chemiluminescence kinetics of water extract in 1,2,3-benzotriol auto-oxidation system

表2 不同溶剂提取物清除超氧阴离子的IC₅₀值
Table 2 IC₅₀ values of scavenging O₂⁻· of different extracts

不同溶剂提取物	70%乙醇提取	水提取	甲醇提取
IC ₅₀ 值(mg/ml)	0.55	0.04	0.65

2.4 青钱柳的不同溶剂提取物对羟自由基清除能力的测定

利用Fenton反应产生羟自由基: H₂O₂+Fe²⁺=·OH+OH⁻+Fe³⁺, Fe²⁺与邻二氮菲生成红色配合物, 加入提取液后, 减弱了·OH对Fe²⁺/邻二氮菲的氧化作用, 引起自由基的变化, 即体系产生的光子数变化。故通过测定反应过程中的光子数的变化, 就能推断清除剂对·OH的清除作用, 并比较不同清除剂清除作用的大小, 计算清除率。

图5和图6为70%乙醇提取物和水提取物清除羟自由基过程中的微弱发光扫描图, 根据积分值的变化计算清除率。由浓度和清除率的关系, 可得出不同溶剂提取物的IC₅₀值(见表3)。由IC₅₀值得出, 对超氧阴离子的清除作用的大小为70%乙醇提取物>水提取物>甲醇提取物。

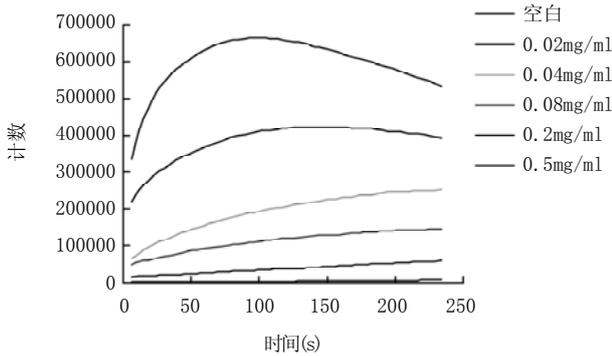


图5 70%乙醇提取物清除羟自由基的发光动力学曲线

Fig.5 Chemiluminescence kinetics of scavenging ·OH of 70% alcohol extract

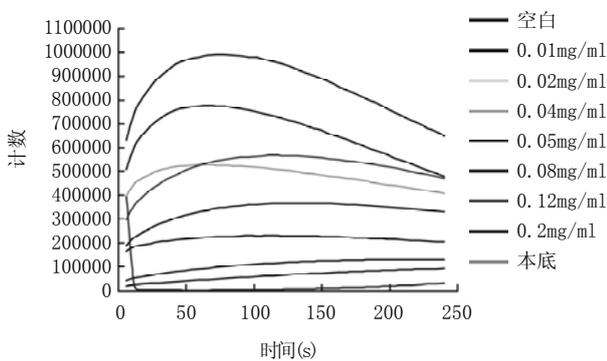


图6 水提取物清除羟自由基的发光动力学曲线

Fig.6 Chemiluminescence kinetics of scavenging ·OH of water extract

表3 不同溶剂提取物清除羟自由基的IC₅₀值
Table 3 IC₅₀ values of scavenging ·OH of differen extracts

不同溶剂提取物 IC ₅₀ 值(mg/ml)	70%乙醇提取	水提取	甲醇提取
	0.038	0.049	0.075

2.5 乙醇提取物油脂抗氧化作用的测定

油脂的POV值越大表明油脂的氧化程度越严重。由图7可以看出,70%乙醇提取物对油脂的氧化具有一定抑制作用,并且浓度从1mg/ml增加到4mg/ml其抗氧化性是逐渐增大的,但是相对于抗氧化剂BHT和VE(浓度

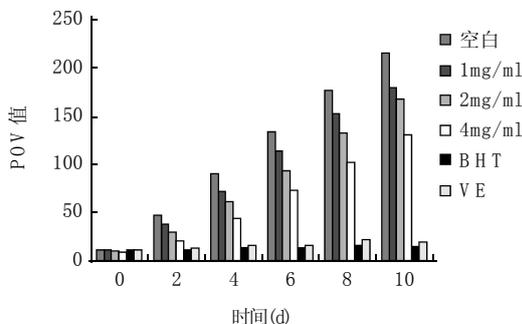


图7 70%乙醇提取物对油脂抗氧化作用

Fig.7 Antioxidation activity of 70% alcohol extract of lard

均为2mg/ml)的抗氧化活性较弱。

3 结论

在DPPH自由基体系中,青钱柳提取液对DPPH自由基有很好的清除作用,且其清除能力与浓度呈量效关系,其清除能力的大小依次为:VC > 70%乙醇提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物 > 正丁醇提取物 > 丙酮提取物 > 乙酸乙酯提取物 > BHT > 氯仿提取物;在邻苯三酚自氧化体系中,青钱柳提取液对超氧自由基也有很好的清除能力,且与浓度呈量效关系,其清除能力的大小依次为:水提取物 > 70%乙醇提取物 > 甲醇提取物;在羟基自由基体系中其清除能力的大小依次为:70%乙醇提取物 > 水提取物 > 甲醇提取物;70%乙醇提取物对油脂的氧化具有一定抑制作用,其抗氧化能力与浓度呈相关变化,但是弱于天然抗氧化剂BHT和VE。

由实验可知,青钱柳的抗氧化性比较高,具有天然抗氧化剂的应用价值。这可能与其中含有黄酮类化合物有关。黄酮类化合物具有的多酚结构,能够提供活泼的质子,与自由基结合成较稳定的产物,因而有较强的抗氧化作用^[10]。易醒^[11]等人已从青钱柳的醇提物中分离出槲皮素、山柰酚和异斛皮苷等化合物。据王开金^[12]等人报道这些黄酮类成分都具有较强的抗氧化活性。对青钱柳的抗氧化活性有待于更进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第21卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 18-19.
- [2] 谢明勇, 李磊. 青钱柳化学成和生物活性研究概况[J]. 中草药, 2001, 32(4): 365-366.
- [3] KURIHARA H, ASAMI S, SHIBATA H, et al. Hypolipemic effect of *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(3): 383-385.
- [4] KURIHARA H, FUKAMI H. Hypoglycemic action of *Cyclocarya Paliurus* (Batal.) Iljinskaja in normal and diabetic mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(4): 877-880.
- [5] 谢明勇, 王远兴, 温辉梁, 等. 青钱柳中黄酮甙和维生素含量的测定[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 66-68.
- [6] 高荫榆, 洪雪娥, 罗丽萍, 等. 甘薯叶柄藤类黄酮的体外抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 103-106.
- [7] 夏其乐, 陈健初, 吴丹. 杨梅叶提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 80-83.
- [8] 张斌, 高云, 付荣, 等. 中药红景天提取物抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 315-318.
- [9] 徐雅琴, 邵铁华, 付红. 黑穗醋栗(布劳德)叶片中黄酮类物质抗氧化性研究[J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(2): 196-198.
- [10] 张培刚, 郑鸿雁, 昌友权, 等. 松针黄酮的体外抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 506-508.
- [11] 易醒, 石建功, 周光雄, 等. 青钱柳化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 43-45.
- [12] 王开金, 陈列忠, 李宁, 等. 加拿大一枝黄花黄酮类成分及抗氧化与自由基清除活性的研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(7): 493-497.