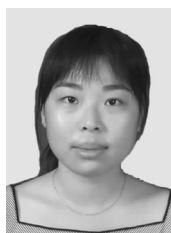


## 毛杨梅、余甘子、落叶松树皮原花色素抗氧化能力研究



XU Man

徐 曼<sup>1</sup>, 汪咏梅<sup>1,2</sup>, 张亮亮<sup>1,2</sup>, 吴冬梅<sup>1,2</sup>, 陈笳鸿<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局 林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042;  
2. 中国林业科学研究院 林业新技术研究所, 北京 100091)

**摘 要:** 从毛杨梅、余甘子、落叶松 3 种树皮中提取分离得到原花色素产物。通过测定 3 种树皮原花色素产物的清除 DPPH 自由基能力、三价铁还原抗氧化能力 (FRAP) 和抑制油脂过氧化能力, 综合评价了 3 种树皮原花色素的抗氧化活性。结果表明, 3 种树皮原花色素均显示出良好的抗氧化能力, 其抗氧化活性强弱顺序为: 毛杨梅树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素。验证了原花色素分子结构中羟基数目及位置差异对其抗氧化活性起重要作用, 酚羟基数目及相邻酚羟基多则活性更强的理论构效关系。

**关键词:** 原花色素; 抗氧化活性; 毛杨梅; 余甘子; 落叶松

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)06-0041-05

## Comparison of the Antioxidant Activity of the Bark Extracts of *Myrica esculenta*, *Phyllanthus emblica* and *Larix gmelinii*

XU Man<sup>1</sup>, WANG Yong-mei<sup>1,2</sup>, ZHANG Liang-liang<sup>1,2</sup>, WU Dong-mei<sup>1,2</sup>, CHEN Jia-hong<sup>1</sup>

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China; 2. Institute of New Technology of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Proanthocyanidins, which are the predominant compounds of the bark extracts of *Myrica esculenta*, *Phyllanthus emblica* and *Larix gmelini*, were separated and purified in the present study. Three different systems, i. e., the DPPH radical scavenging assay, FRAP and lipid peroxidation inhibitory activity were used to investigate the antioxidant activity of the extracts. The results showed that all three extracts had high antioxidant activity. The bark extracts of *M. esculenta* had a stronger antioxidant ability than those of *P. emblica* and *L. gmelini*. The structure-activity relationship of proanthocyanidins was confirmed on the basis of the results obtained. The more hydroxyl groups (—OH) of these compounds might contribute to the higher antioxidant activity.

**Key words:** proanthocyanidins; antioxidant activity; *Myrica esculenta*; *Phyllanthus emblica*; *Larix gmelinii*

原花色素是具有多羟基的植物多酚, 一般都具有很强的抗氧化生物活性, 能清除人体内有害的自由基<sup>[1-3]</sup>。国内外均有报道从葡萄籽、葡萄皮和松树皮等植物资源提取原花色素, 进入天然保健品市场<sup>[4-5]</sup>。我国对原花色素的提取、应用及产品开发已取得很大进展, 近年来针对众多植物资源富含的原花色素开展研究, 已成为新的热点。本课题组针对我国大宗植物单宁资源毛杨梅 (*Myrica esculenta* Buch. - Ham.) 树皮、余甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 树皮和落叶松 (*Larix gmelini* Rupr.) 树皮中原花色素的提取制备方法及其抗氧化活性开展研究<sup>[6-8]</sup>。在我国, 毛杨梅、余甘子主要分布于南部和西南部地区, 落叶松主要分布于东北地区<sup>[9-10]</sup>。3 种树皮均富含原花色素 (缩合单宁), 毛杨梅树皮提取物主要成分为局部酰化的聚原翠雀定; 余甘子树皮提取物主要成分为原翠雀定-原花青定的混合物 (3:1); 落

收稿日期: 2011-05-06

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划资助 (2006BAD18B0403)

作者简介: 徐 曼 (1981-), 女, 江苏沭阳人, 助理研究员, 硕士, 从事植物资源化学利用研究; E-mail: lhsxuman@163.com。

叶松树皮提取物主要成分为原花青定。这3种树皮提取物都是很有利用价值的天然产物<sup>[11-14]</sup>。本研究测定了从毛杨梅树皮、余甘子树皮和落叶松树皮提取的原花色素产物的清除 DPPH 自由基能力、三价铁还原抗氧化能力和抑制油脂过氧化能力等体外抗氧化活性,并进行比较评价。研究结果将为进一步开发新型天然抗氧化及自由基清除剂打下基础。

## 1 实验

### 1.1 材料与仪器

毛杨梅树皮、余甘子树皮由广西武鸣栲胶厂提供,落叶松树皮由内蒙古森工栲胶制品有限责任公司提供。3种树皮经风干、净化、粉碎处理,按 LY/T 1083-1993 方法测定单宁含量。

壳聚糖、乙酸、乙醇、铬皮粉、香草醛、甲醇、醋酸钠、FeCl<sub>3</sub>、FeSO<sub>4</sub> 均为国产分析纯试剂;D101 型大孔吸附树脂,南开大学化工厂;1,1-二苯基-2-苦基-胍基自由基(DPPH·),Sigma 公司;三吡啶三吡嗪(TPTZ),Sigma 公司;金龙鱼食用调和油(经过实验室处理);一级水。

层析柱,玻璃,内径 29 mm,长 500 mm(D101 树脂装柱体积 210 mL);SENCOR-R 型旋转真空蒸发器,上海申生科技有限公司;FD-1 型冷冻干燥机,日本 EYELA 公司;UV751-GD 型紫外/可见分光光度计,上海欣宜仪器仪表有限公司。

### 1.2 树皮提取物产物制备方法

**1.2.1 提取** 分别对经过预处理的毛杨梅、余甘子、落叶松3种树皮进行水常规提取。采用4罐组提取方法,每罐投料50g;首罐加入清水500mL浸提,提取液依次转入下一罐;每罐分别提取和出液5次;提取温度80℃,每次提取40min。收集合并提取液进行后处理。

**1.2.2 絮凝沉降** 将1.2.1节3种树皮的提取液分别用旋转蒸发器在真空度约0.09MPa下浓缩至约5°Be'。加入1%的壳聚糖-乙酸溶液作为絮凝剂(壳聚糖用量为树皮原料质量的0.05%)。充分搅拌后于5℃冰箱中静置沉降48h,取上层清液进行冷冻干燥得粗提物。

**1.2.3 树脂吸附分离** 将3种树皮粗提物分别配制成相当于总固物质量约4.5%的上柱液,在常温下通过层析柱进行大孔树脂吸附和乙醇洗脱分离;收集洗脱液,减压蒸除乙醇,再冷冻干燥得原花色素目标产物,用以进行有效成分测定分析和评价抗氧化活性。

### 1.3 原花色素含量测定方法

采用香草醛/盐酸法测定(以儿茶素为对照样)。分别称取3种目标产物0.05g(准确至0.0001g),溶于100mL甲醇作为试液。在用铝箔遮光的容量瓶内加入4%香草醛-甲醇溶液6mL,浓盐酸3mL和试液1mL,混合后在(20±2)℃下静置15min;立即以甲醇为参比在500nm处测定吸光值,同时做空白试验,按儿茶素对照样直线方程计算原花色素含量。儿茶素对照样的直线方程按上述方法,通过测定不同质量浓度(0.02~0.1g/L)儿茶素/甲醇溶液的吸光值获得。

### 1.4 抗氧化活性功能测定方法

**1.4.1 清除 DPPH· 自由基能力测定** DPPH· 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其乙醇溶液呈紫色,在可见光区最大吸收峰波长为517nm。当 DPPH· 溶液中加入自由基清除剂时,溶液颜色变浅,吸光度(A)值变小。吸光度变小的程度与自由基被清除的程度呈线性关系。因此可用自由基的清除情况来评价清除剂的抗氧化能力。清除剂的抗氧化能力用抑制率来表示,抑制率越大,抗氧化能力越强<sup>[15-18]</sup>。

将3种树皮原花色素目标产物分别配置成0.01%的无水乙醇溶液;将 DPPH· 配置成0.2mmol/L的无水乙醇溶液。精确吸取0.01%3种产物溶液各2.0mL,分别与2.0mL浓度为0.2mmol/L的 DPPH· 溶液混合。摇匀后放置30min,以各自溶剂为对照,分别测定波长517nm处的A,分别得到3个A值。同时测定2.0mL3种目标产物溶液与2.0mL无水乙醇混合液的吸光度值(A<sub>1</sub>);2.0mL DPPH· 溶液与2.0mL无水乙醇混合液的吸光度值(A<sub>0</sub>)。将所得数据代入下列公式计算其抑制率(I):

$$I = [1 - (A - A_1) / A_0] \times 100 \%$$

式中:A<sub>0</sub>—未加测定液时 DPPH· 的吸光度;A<sub>1</sub>—测定液在测定波长下的吸光度;A—加测定液后 DPPH· 的吸光度。

**1.4.2 三价铁还原抗氧化能力测定(FRAP法)** FRAP法原理<sup>[19-20]</sup>是基于氧化还原反应的比色法。在较低的pH值条件下 $Fe^{3+}$ -三吡啶三吡嗪(TPTZ)可被样品中还原物质还原为二价铁形式,呈现出蓝色,在波长593 nm处具有最大光吸收,根据吸光度大小计算样品抗氧化活性的强弱。

**1.4.2.1  $FeSO_4$ 标准曲线的制备** 精密移取0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mmol/L  $FeSO_4$ 标准溶液各0.10 mL分别置于6个微量试剂瓶中,分别加入预热至37℃的1.80 mL TPTZ工作液并用蒸馏水补足至5.0 mL,混匀,37℃反应10 min,以试剂做空白,在波长593 nm处测定吸光度值,以吸光度值为纵坐标,浓度为横坐标,计算回归方程。

**1.4.2.2 试验方法** 将3种树皮原花色素目标产物用无水乙醇溶液分别配置成1.00%的乙醇溶液,TPTZ工作液由10.0 mmol/L TPTZ溶液2.5 mL,0.30 mol/L 醋酸钠缓冲液25 mL,20.0 mmol/L  $FeCl_3$ 溶液2.5 mL组成。精确吸取目标产物乙醇溶液各0.1 mL,分别加入预热至37℃的1.80 mL TPTZ工作液混匀,终反应液用各自溶剂补足至5.00 mL,37℃反应10 min;分别以各自溶剂为空白对照,测定593 nm处的吸光度值。以1.00 mmol/L  $FeSO_4$ 为标准,样品抗氧化活性以达到同样吸光度所需的 $FeSO_4$ 的mmol数值表示。

**1.4.3 抑制油脂过氧化能力测定** 采用Schaal烘箱法<sup>[21]</sup>分别测定3种树皮原花色素目标产物对植物油脂热氧化的抑制能力。按1 kg底物油加入0.4 g抗氧化剂的比例计算所需加入试样量。植物调和油经过实验室处理后作为底物试验用油样。

称取试验用油样30.0 g(准确至 $\pm 0.1$  g)于洁净的三角瓶中;分别准确称取0.012 0 g的目标产物,使溶于2.0 mL 95%乙醇和3.0 mL蒸馏水。将试验用油样加热至60℃,搅拌下分别加入上述试样,超声波乳化成试料;将试料移入烘箱中,控制烘箱内温度( $63 \pm 1$ )℃;每隔12 h取样分析测定其过氧化值(POV,mg/kg)。过氧化值测定过程按GB 5009.37-2003《食用植物油卫生标准的分析方法》中4.2.2节进行,过氧化值的含量按公式<sup>[22]</sup>进行计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 树皮及其提取物的成分分析

毛杨梅树皮、余甘子树皮、落叶松树皮,提取、去渣后,滤液用壳聚糖絮凝沉降分离去除树胶、多糖和高聚单宁等获得粗提物,再经大孔吸附树脂分离获得原花色素目标产物。对3种树皮及其粗提物和目标产物分别进行成分分析。结果见表1。

表1 3种树皮及其提取物的成分分析结果

Table 1 Constitution analysis of three bark extracts

树皮品种 bark samples	树皮单宁质量分数/% tannin content in bark	粗提物单宁质量分数/% tannin content in product I	目标产物原花色素质量分数/% proanthocyanidin content in product II
毛杨梅树皮 <i>M. esculenta</i> bark	27.20	63.00	91.40
余甘子树皮 <i>P. emblica</i> bark	31.11	63.19	92.30
落叶松树皮 <i>L. gmelini</i> bark	16.42	65.54	97.50

### 2.2 目标产物的抗氧化活性

**2.2.1 清除DPPH·能力** 按1.4.1节,进行3种树皮原花色素目标产物清除DPPH·能力测定,结果表明3种树皮的目标产物均有较强的清除DPPH·能力,见表2。

表2 目标产物清除DPPH·自由基能力的测定结果

Table 2 Scavenging efficiency on DPPH radical

树皮品种 bark samples	吸光值 absorbance			抑制率/% inhibition
	A	$A_1$	$A_0$	
毛杨梅树皮 <i>M. esculenta</i> bark	0.080	0.015	0.796	91.8
余甘子树皮 <i>P. emblica</i> bark	0.082	0.014	0.780	91.3
落叶松树皮 <i>L. gmelini</i> bark	0.126	0.029	0.790	87.8

从表2可见,在相同试验条件下,3种树皮原花色素目标产物对DPPH·自由基的抑制率分别为

91.8%、91.3%、87.8%。抑制能力强弱为:毛杨梅树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素。

**2.2.2 三价铁还原抗氧化能力** 以  $\text{FeSO}_4$  为对照品配制标准溶液,绘制标准曲线。回归方程为: $y = 0.5356x + 0.0133$ ,  $R^2 = 0.9911$ ,其中  $x$  为  $\text{FeSO}_4$  浓度 (mmol/L),  $y$  为吸光度值。结果表明: $\text{FeSO}_4$  标准溶液在 0.100~1.00 mmol/L 浓度范围内吸光度值呈线性变化。

根据标准曲线计算各样品的 FRAP 值,如表 3 所示。

由表 3 可知,在试验条件下 3 种树皮原花色素目标产物的 FRAP 值分别为 3.145、2.819 和 1.879 mmol/L,还原能力强弱为:毛杨梅树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素。

**2.2.3 抑制油脂过氧化能力** 按 1.4.3 节,采用烘箱法进行目标产物抑制油脂过氧化能力试验,结果见表 4。从表 4 数据可见,目标产物对试验油样有明显的抗氧化作用。随着时间增加,各油样的过氧化值都在增大,氧化程度增加。但是添加了 3 种树皮原花色素目标产物的油样的过氧化值数值明显低于空白油样的过氧化值,说明添加树皮原花色素目标产物的抗氧化能力得到增强。

表 4 目标产物抑制油脂过氧化能力的测定结果

Table 4 Inhibition efficiency of lipid peroxidation

样品 samples	不同时间的过氧化值 POV/(mg·kg <sup>-1</sup> )					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
空白 blank	10.24	18.58	24.33	30.51	40.68	55.71
毛杨梅树皮 <i>M. esculenta</i> bark	9.43	16.96	22.47	28.04	33.45	42.89
余甘子树皮 <i>P. emblica</i> bark	9.88	17.04	23.13	29.45	34.67	46.74
落叶松树皮 <i>L. gmelini</i> bark	9.72	16.00	22.21	26.95	33.79	43.17

由表中测定值可见,3 种树皮原花色素产物对脂质氧化有较好的抑制作用。从总的趋势来看各试样对脂质氧化的抑制能力强弱为:毛杨梅树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素。随着试验时间的增加,抑制氧化的效果更明显。

**2.2.4 3 种树皮原花色素抗氧化活性的构效分析** 原花色素属黄烷醇类化合物。不同类型原花色素分子结构上的差异必然会导致其抗氧化活性强弱的区别。原花青定类型和原翠雀定类型原花色素的分子结构不同(见图 1),其主要区别在于:前者的分子结构基础单元为儿茶素(1),其 B 环为邻苯二酚,而後者的分子结构基础单元为槲儿茶素(2),其 B 环为邻苯三酚。上述分子结构中黄烷-3-醇 B 环上羟基数和相互位置对其抗氧化活性起重要作用,相邻的酚羟基多则活性更强;C 环上羟基的局部糖酰化也使活性增强。

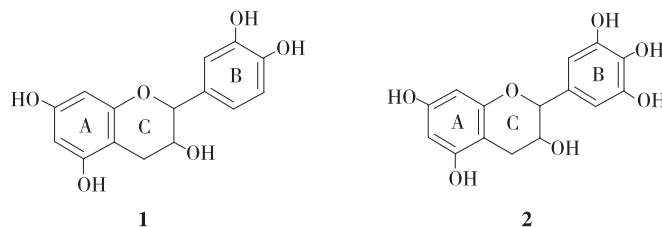


图 1 儿茶素(1)和槲儿茶素(2)的分子结构式

Fig. 1 Molecular structures of catechin(1) and gallocatechin(2)

本研究涉及的 3 种树皮原花色素中,毛杨梅树皮原花色素主要成分是 C 环上羟基局部糖酰化(糖酰化度约为 40%)的聚原翠雀定;余甘子树皮原花色素主要成分是 C 环上羟基局部糖酰化(糖酰化度约为 25%)的聚原翠雀定和聚原花青定混合物(3:1);落叶松树皮原花色素主要成分是聚原花青定。3

者相比,毛杨梅树皮原花色素拥有较多的酚羟基,余甘子树皮原花色素次之。因此可以推论,3种树皮原花色素的抗氧化活性强弱顺序为:毛杨梅树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素。本研究通过测定3种树皮原花色素的清除 DPPH· 能力、三价铁还原抗氧化能力和抑制油脂过氧化能力等抗氧化活性,以实验结果验证了这一推论。

### 3 结论

**3.1** 从毛杨梅、余甘子、落叶松树皮中提取分离获得原花色素产物,采用香草醛/盐酸法测定原花色素质量分数分别为:91.4%、92.3%、97.5%。

**3.2** 测定毛杨梅、余甘子、落叶松3种树皮原花色素产物的清除 DPPH 自由基的抑制率,分别为 91.8%、91.3%、87.8%;三价铁还原抗氧化能力(FRAP)值分别为 3.145、2.819 和 1.879 mmol/L;抑制油脂过氧化能力,72 h 油样的过氧化值分别 42.89、46.74 和 43.17 mg/kg(空白油样为 55.71 mg/kg)。测定结果表明3种树皮原花色素均显示出良好的抗氧化性能。

**3.3** 对在相同的实验条件下3种树皮原花色素产物的抗氧化能力测定结果进行综合比较,其抗氧化活性强弱顺序为:毛杨梅树皮原花色素 > 余甘子树皮原花色素 > 落叶松树皮原花色素。从而以实验结果验证了原花色素分子结构中羟基数目及位置差异对其抗氧化活性起重要作用,酚羟基数量及相邻酚羟基多则活性更强的理论构效关系。

#### 参考文献:

- [1] 张冰若,劳业兴,苏薇薇. 原花青素的研究现状及开发前景[J]. 中药材,2003,26(12):905-908.
- [2] 崔介君,孙培龙,马新. 原花青素的研究进展[J]. 食品科技,2003(2):92-95.
- [3] 石碧,杜晓. 植物原花色素研究利用进展与发展趋势[J]. 四川大学学报:工程科学版,2006,38(5):16-24.
- [4] 吕丽爽. 天然抗氧化低聚原花青素的研究进展[J]. 食品科学,2002,23(2):147-150.
- [5] 王建基,李汝雄. 国外对寡聚原花色素的研究与应用[J]. 现代化工,2002,22(增刊):91-94.
- [6] 陈箭鸿,汪咏梅,吴冬梅,等. 毛杨梅树皮提取物抗氧化及清除自由基活性初步研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(增刊):1-7.
- [7] 汪咏梅,陈箭鸿,吴冬梅,等. 余甘子树皮提取物抗氧化及清除自由基活性初步研究[J]. 林产化学与工业,2008,28(1):11-15.
- [8] 徐曼,陈箭鸿,汪咏梅,等. 落叶松原花青素的没食子酰化及其抗氧化活性增强效应[J]. 林产化学与工业,2010,30(6):55-60.
- [9] 李文军,唐自明,朱成兰. 傣药大树杨梅的生药学研究[J]. 云南中医学院学报,2000,23(2):13-15.
- [10] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M/OL]. 44卷. 中国科学院植物研究所,2005:87-89.
- [11] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京:中国林业出版社,1992.
- [12] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [13] 赵祖春,罗庆云,孙达旺. 毛杨梅及油柑树皮单宁组分的研究[J]. 林产化学与工业,1987,7(3):20-27.
- [14] 杜晓. 落叶松原花色素的分级及精细化利用研究[D]. 成都:四川大学博士学位论文,2007.
- [15] CCTELLE N, BERNIER J-L, CATTEAC J-P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1998, 20(1):35-43.
- [16] CHOI C W, KIM S C, HWANG S S, et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assay guided comparison[J]. Plant Science, 2002, 163:1161-1168.
- [17] LU Yin-rong. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68:81-85.
- [18] 张亮亮, 陈箭鸿, 汪咏梅, 等. 海南蒲桃叶黄酮的提取及抗氧化性研究[J]. 生物质化学工程, 2010, 44(2):27-30.
- [19] BENZIE I F F, STRIAN J J. The ferric reducing ability of plasma a measure of 'antioxidant power'. The FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239:70-76.
- [20] 郭长江, 杨继军, 李云峰, 等. FRAP 法测定水果不同部分抗氧化活性[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(7):841-843.
- [21] 赵新淮. 食品化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.
- [22] 中华人民共和国卫生部. GB5009.37-2003《食用植物卫生标准的分析方法》[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.