

桉叶提取物中抗氧化活性物分离纯化、结构鉴定及其活性的研究

陈洪璋¹, 李伟², 肖苏尧², 曹庸², 陈运娇²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510180) (2. 华南农业大学食品学院, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 为进一步探索桉叶提取物抗氧化活性的物质基础, 本文采用反相硅胶和制备液相等方法对桉叶提取物中高醇组分进行分离纯化得到4个化合物。接着应用¹H-NMR和¹³C-NMR光谱分析鉴定化合物的结构, 最终鉴定出3个化合物, 分别为金丝桃苷、番石榴苷和槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐。最后采用DPPH \cdot 、ABTS⁺和ORAC三种体外检测体系进行抗氧化活性的研究。在DPPH \cdot 和ORAC方法中, 番石榴苷的抗氧化能力最强, 槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐的抗氧化能力最低。在ABTS⁺方法中, 金丝桃苷的抗氧化能力最强, 番石榴苷的抗氧化能力最低。但与抗氧化剂Trolox相比, 三者都表现出更强的抗氧化能力, 是有较好发展前景的天然抗氧化剂。本文为桉叶资源的综合开发提供理论指导作用。

关键词: 桉叶; DPPH 自由基清除能力; 氧自由基吸收

文章编号: 1673-9078(2018)04-94-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.016

Identification, Isolation and Purification of the bioactive Compounds from Eucalyptus Leave Extract and their Antioxidant Activity

CHEN Hong-zhang¹, LI Wei², XIAO Su-yao², CAO Yong², CHEN Yun-jiao²

(1. Infinitus (China) Company, Guangzhou 510180, China) (2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Province Engineering Research Center for Bioactive Natural Products, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To further elucidate antioxidant compounds of Eucalyptus leave extract, four compounds were isolated and purified from the fraction P95 of eucalyptus leave extract by medium-pressure silica gel column chromatography and preparative high performance liquid chromatography (HPLC). And three of the compounds were identified as hyperoside, guava glycosides and quercetin-3-o-alpha-pyranol-2''-gallate, by comparison of their ¹H-NMR and ¹³C-NMR data. Then 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays were used for analyzing the antioxidant activity of the compounds. Among the DPPH and ORAC methods, guava glycosides showed the highest antioxidant activity, and quercetin-3-o-alpha-pyranol-2''-gallate showed the lowest antioxidant capacity. Hyperoside had the highest antioxidant activity, and guava glycosides had the lowest in ABTS⁺ assay. All of three compounds showed higher antioxidant activity than trolox, and they were natural antioxidants with better development prospects. This study provided a theoretical guidance for the comprehensive development of the Eucalyptus leaves.

Key words: eucalyptus leaves; DPPH free radical scavenging ability; oxygen free radical absorption

随着自由基医学和自由基生物学的发展, 人们逐

收稿日期: 2017-12-05

基金项目: 国家重点研发计划-人工林非木质林产资源高质化利用技术创新(2016YFD0600806); 广东省自然科学基金博士启动项目(2015A030310118); 广东省科技计划项目(2017A020208042)

作者简介: 陈洪璋(1988-), 男, 硕士, 主要从事功能性食品的开发研究
通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 主要从事天然活性物质提取、分离、鉴定及活性评价; 陈运娇(1984-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然活性物质抗氧化、抗衰老方面研究

渐认识到生物体内的自由基过高会起氧化胁迫, 而氧化胁迫与癌症、心血管病、衰老和其它退行性疾病相关^[1]。抗氧化剂是能帮助捕获并中和自由基, 从而祛除自由基对机体损害的一类物质^[2], 因此抗氧化剂的研究越来越热门。然而, 人工合成抗氧化剂如BHT的使用常因产生一些副作用而受到质疑^[3]。所以寻找高效廉价的阻断自由基反应的抗氧化剂的研究越来越重要, 从天然资源中提取抗氧化活性物质受到越来越多的关注^[4]。

由于纸浆和纸张生产的巨大需求,桉树在我国种植面积广阔^[5]。广林9号桉树是近年来新培育引种成功的新品种,属于尾巨桉(*Eucalyptus grandis*×*E. urophylla*),广泛种植于广东、广西和海南等地,人工林种植面积达到500多万 hm^2 ,每年桉树叶的产量大约为两万多万吨^[6,7]。作为生产木材和纸张的主要副产品,大部分的桉叶被用作提取精油的原料,其余都未加利用,不仅浪费了大量资源,而且不利于环境保护。大量研究表明桉叶提取物具有很强的抗氧化活性,日本等国对桉叶抗氧化活性进行了大量研究,已经开发出桉叶的抗氧化食品添加剂及桉多酚产品^[8]。国内主要对桉叶精油提取及成分分析进行了大量研究,对桉叶抗氧化物研究较少,而且对桉叶提取物起主要抗氧化作用的物质仍然不清楚。本团队前期研究也表明桉叶提取物具有很好的抗氧化活性,且已从广林9号桉叶中提取到了13种具有抗氧化活性的化合物^[9-12],但仍还有许多组分待分离鉴定。为了系统地探究桉叶提取物的化学成分与应用,本文继续对广林9号桉叶中抗氧化活性成分进行分离纯化鉴定并检测其抗氧化活性,目的是从作为副产品的树叶中回收有应用潜力的抗氧化物,以提高桉叶资源的开发和利用,减少对环境的污染。

1 材料与方法

1.1 试剂

提取、分离和纯化溶剂为:乙醇,石油醚,氯仿,乙酸乙酯,正丁醇和丙酮。抗氧化活性实验溶剂为:DPPH(Sigma-Aldrich)。制备高效液相色谱和抗氧化活性实验的溶剂均为分析纯。用于分析高效液相色谱法的溶剂为高效液相色谱级。

1.2 桉叶抗氧化物的提取、分离及纯化

广林九号桉叶采于广东省茂名市林业局,自然阴干后粉碎备用。将桉叶水洗干净,置于室内自然阴干。把干叶磨成粉末,过40~60目筛的桉叶粉末1kg,加入20倍体积的70%乙醇溶剂,超声波提取两次,每次30min,减压抽滤,合并滤液,减压旋转蒸发溶剂后,用蒸馏水定容到1L。

连续依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、水饱和正丁醇和水等不同极性溶剂进行萃取,各种溶剂重复萃取5次。萃取物用减压旋转蒸发仪浓缩后冷冻干燥,冷藏备用。从本团队前期研究^[10]可得知,乙酸乙酯萃取物显示出最强的清除能力,因此乙酸乙酯萃取物被用于进一步的分离。称取20g乙酸乙酯萃取物溶解于

用800mL蒸馏水中后上样,分别以水、5%、10%、20%、30%和95%的乙醇对桉叶乙酸乙酯组分进行洗脱分离,每个浓度洗脱5个柱体积,并将洗脱液收集在一起,得到的组分依次命名为:P0、P5、P10、P20、P30和P95不同组分。本团队已经分别从水、10%、20%、30%等组分分离纯化鉴定到13种物质^[9-12],因此本论文继续对P95进行分离纯化。

1.3 桉叶提取物的纯化

1.3.1 分析液相分析方法

岛津HPLC仪(LC-10AT二元高压梯度仪,SPD-10A紫外检测仪);色谱柱为Diamonsil C18色谱柱(250×4.6mm,5 μm);检测波长210/270nm,色谱洗脱条件0%~90%甲醇(含有0.2%乙酸)梯度洗脱1h,流速为1mL/min;进样量:10 μL 。

1.3.2 分析样品准备

各分析样品溶解于甲醇中,上样前过滤(0.45 μm)。称取定量分析样品,加甲醇溶解,过0.45 μm 微孔滤膜后。用微量进样器精密吸取20 μL 进行分析测定。

1.3.3 中压反相硅胶分离纯化方法

根据分析液相条件,对组分相对较纯样品进行反相硅胶分离,洗脱液为水,乙腈混合溶液。

1.3.4 制备液相条件

岛津HPLC仪(LC-8A HPLC二元高压梯度仪,SPD-10A紫外检测仪);色谱柱为岛津Shim-pack ODS型C18柱(250mm×20mm,5 μm);检测波长210nm/270nm,色谱洗脱条件根据分析液相分析的最佳分离条件,流速为12~15mL/min。

1.4 DPPH自由基清除能力的测定

参照凌关庭^[13]、刘微微^[14]等方法并做一定的修改。样品溶解于水或甲醇,稀释成将一系列浓度的溶液。取配好样品溶液0.2mL及 1×10^{-4} mol/L DPPH溶液3.8mL加入同一具塞试管中摇匀,在室温下密闭静置30min,用纯溶剂作参比,于517nm波长下测定吸光度。根据下列公式计算每种提取液对DPPH自由基的清除率:

$$\text{清除率}=[1-(A_s-A_{sb})/A_c]\times 100$$

其中: A_s 为加0.2mL提取液后DPPH溶液的吸光度; A_{sb} 为0.2mL提取液+3.8mL溶剂(甲醇)后的吸光度; A_c 为0.2mL溶剂(甲醇)+3.8mL DPPH溶液的吸光度。

根据回归方程求出清除率达到50%时候的半清除率浓度即 IC_{50} 。

1.5 清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 能力测定

参照朱玉昌^[15]、仇菊^[16]和 Miller^[17]的方法做适当修改。充分混合 5 mL 的 7 mmol/L ABTS 和 88 μL 的 140 mmol/L 过硫酸钾后使其在室温黑暗处反应 12~16 h 以制得 ABTS 自由基储备液。然后用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)稀释反应液制得在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02 的 ABTS 工作液。10 μL 不同浓度化合物的甲醇溶液与 96 孔板中 200 μL 工作液混合均匀并于黑暗条件下反应 6 min, 然后读取 734 nm 波长下吸光度 A。

$$ABTS^+ \cdot \text{清除速率} = (1 - A_1/A_0) \times 100\% \quad \text{式(1)}$$

其中, A₁ 是化合物混合液吸光度, A₀ 为对照组混合液吸光度。

结果用不同清除速率的线性回归方程得到的半清除率浓度 IC₅₀ (μM) 表示。

1.6 总抗氧化能力指数 (ORAC) 法抗氧化指数测定

参照 Wolfe^[18]方法并做适当修改。简单来说, 分别将已溶于 75 mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH 7.4, 缓冲液) 的对照、Trolox 标准液或样液 (50 μL) 加入到黑色光滑的 96 孔板中, 每个样品重复 3 个孔。接着把 100 μL 的 8×10⁻³ mmol/L 荧光素 (缓冲液制备) 加入到混合液中, 然后在 37 °C 下放置 10 min, 定期振荡。最后把现配好的 50 μL 153 mmol/L ABAP (缓冲液制备) 加入混合液中, 立即将 96 孔板放置到酶标仪中反应。反应条件为: 温度 37 °C, 发射波长 514 nm, 激发波长 490 nm, 每 1.5 min 测定一次, 直至荧光值衰减至直线, 每次读数前振荡数秒。

按式(2)计算荧光衰退曲线下的面积(AUC)、式(3)计算保护面积(Net AUC), 以 Trolox 溶液浓度为横坐标, 以 NetAUC 为纵坐标, 绘制曲线。最终 ORAC 值以每毫克化合物等同于 Trolox 的微摩尔数 (平均值±标准差) 来表示。

$$AUC = 0.5 \times [2 \times (A_0 + A_1 + \dots + A_{n-1} + A_n) - A_0 - A_n] \times \Delta t \quad (2)$$

$$Net\ AUC = AUC_{Sample} - AUC_{blank} \quad (3)$$

1.7 核磁共振分析

核磁共振用美国 Varian INOVA 仪器进行。

1.8 数据分析

所有结果表示为均值±误差 (n=3)。所有实验重复 3 次。数据用单向方差分析(p<0.05) (SPSS 13)。

2 结果与讨论

2.1 桉叶乙酸乙酯萃取物 P95 组分的液相分析

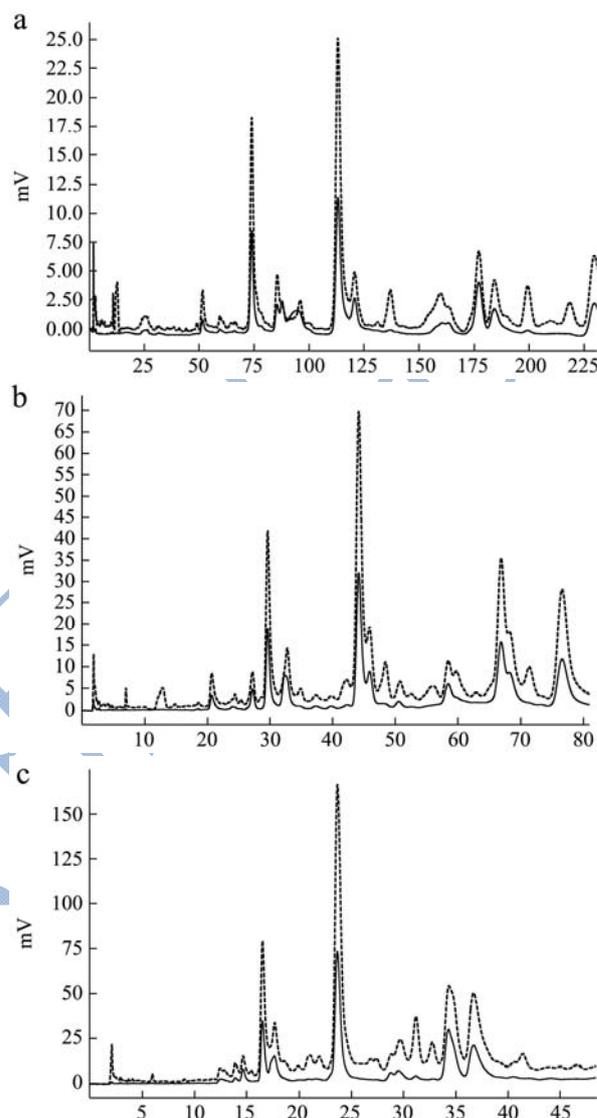


图 1 P95 组分在不同条件下洗脱液相分析图谱

Fig.1 Analytical RP-HPLC chromatogram of P95 under different conditions

注: (a) P95 组分 12% 乙醇等度洗脱液下相分析图谱; (b) P95 组分 15% 乙醇等度洗脱液相分析图谱; (c) P95 组分 18% 乙醇等度洗脱液相分析图谱 (图中虚线为 210 nm 波长、实线为 270 nm 波长检测线)。

本团队前期研究已从尾巨桉 (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) 广林 9 号桉叶乙酸乙酯萃取物中的洗脱组分 0% 乙醇、5% 乙醇、10% 乙醇、20% 乙醇和 30% 乙醇等中分离纯化到没食子酸、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖、英国栎鞣花素、水杨梅丁素和特里马素 I 等抗氧化物^[9-12]。为了进一步探究桉叶抗氧化成分, 回收有应用潜力的抗氧化物, 本论文继续对 95%

乙醇洗脱组分 (P95) 进行分离纯化。

首先采用乙腈与 0.2%磷酸水体系来优化 P95 组分的液相分析条件, 分别用 12%、15%和 18%的乙腈等度洗脱, 结果如图 1。乙腈与 0.2%磷酸水体系等度洗脱可有效使 P95 组分分离, 为了节省时间, 选用 18%的乙腈等度洗脱作为 P95 组分的液相洗脱条件。

2.2 桉叶乙酸乙酯萃取物 P95 组分的中压反相硅胶分离纯化

采用中压反相硅胶对 P95 组分进一步分离纯化, 采用乙腈与水体系, 按 0~25 min 20%乙腈, 25~118 min 25 乙腈, 118~158 min 50%乙腈来进行梯度洗脱。

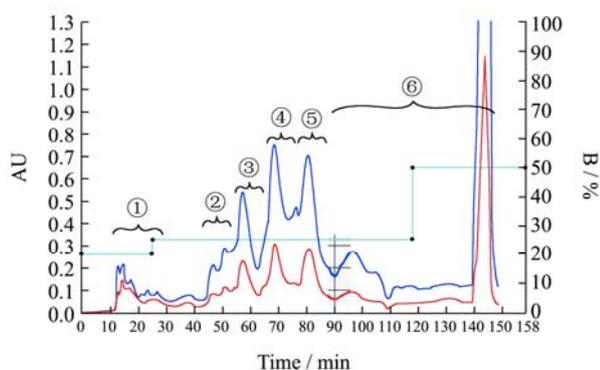


图 2 P95 组分中压反相硅胶洗脱组分

Fig.2 The different fractions of P95 by medium-pressure silica gel column chromatography

注: ①P95-1; ②P95-2; ③P95-3; ④P95-4; ⑤P95-5; ⑥P95-6

(图中上层峰为 210 nm 检测线; 下层峰为 270 nm 检测线)。

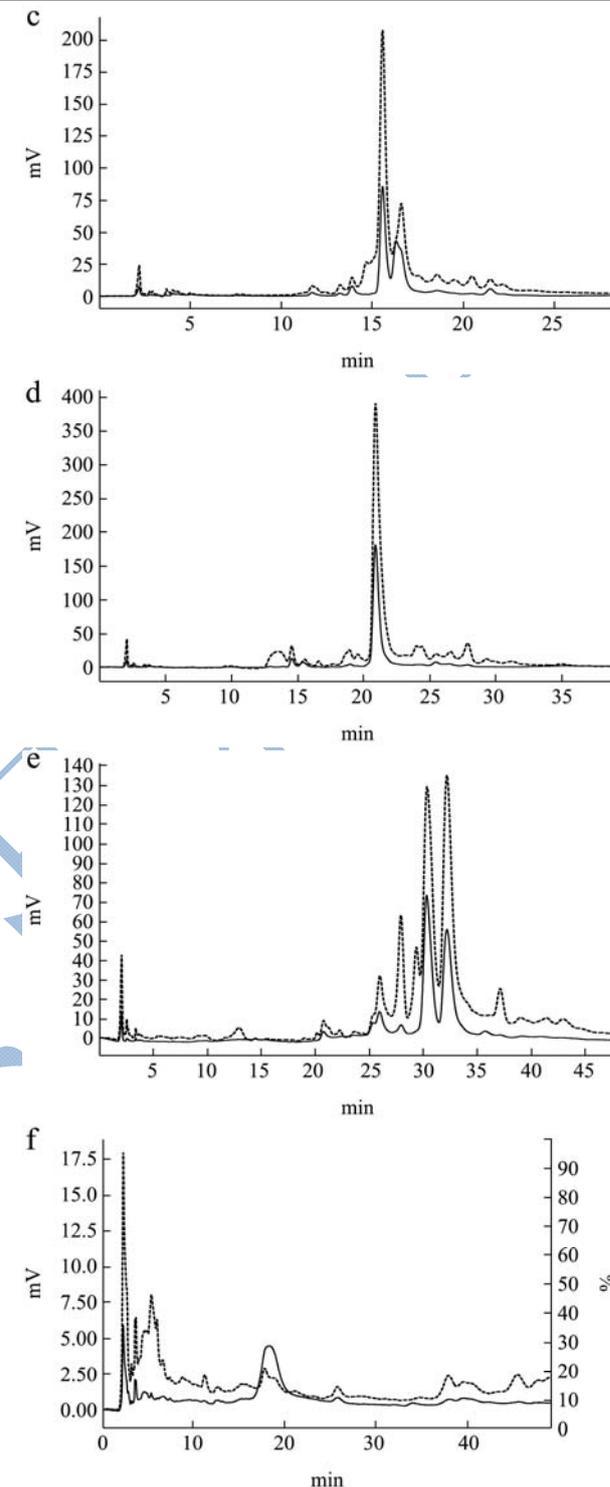
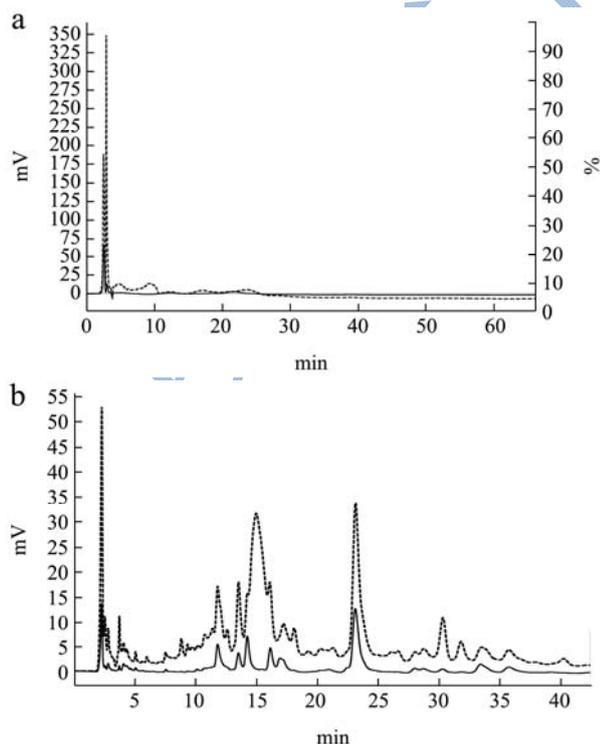


图 3 P95 组分经中压反相硅胶分离后的不同洗脱组分的液相分析图谱

Fig.3 Chromatogram of analytical RP-HPLC of different fraction collected when P95 injected through hmedium-pressure silica gel column chromatography

注: (a) P95-1; (b) P95-2; (c) P95-3; (d) P95-4; (e) P95-5; (f) P95-6 (图中虚线为 210 nm 波长、实线为 270 nm 波长检测线)。

洗脱液收集如下, 将洗脱液旋转蒸发浓缩冷冻干

燥,得到不同洗脱组分,并依次命名为: P95-1、P95-2、P95-3、P95-4、P95-5 和 P95-6 组分(图 2)。接着将中压反相硅胶各分离组分进行 HPLC 分析,结果如图 3。因此,反相硅胶对 P95 组分有一定的分离效果,且分离后,所得各组分峰较少,所得组分成分比较简单。

2.3 P95-3、P95-4 及 P95-5 组分的分离纯化及鉴定

2.3.1 P95-3 组分分离纯化

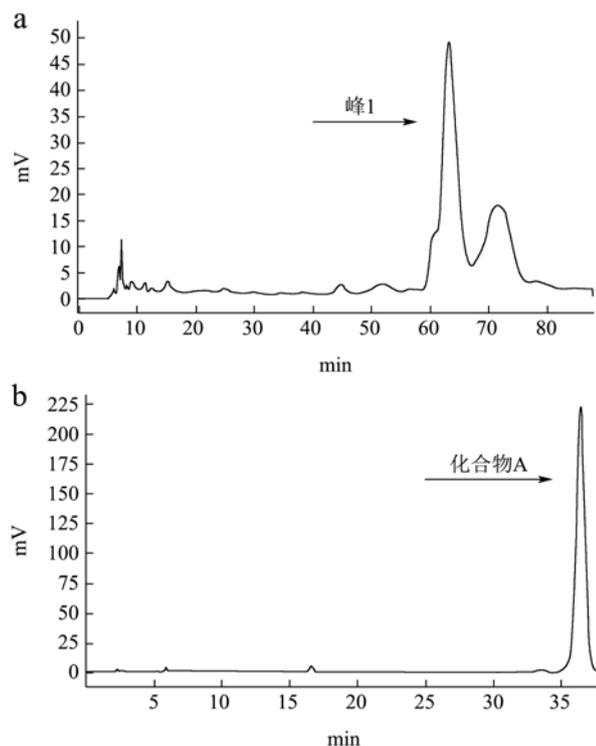


图 4 P95-3 组分制备液相图谱及制备后峰 1 的分析图

Fig.4 Preparative RP-HPLC chromatogram of P95-3 and the peak 1 in P95-3 after preparation

从图 3 可以看出, P95-3 组分成分较少,因此对其进行制备液相分离。根据分析液相条件及图谱确定制备液相分离条件为:检测波长 270 nm,流速 15 mL/min。

根据分析液相图谱,选择 13.8%乙腈等浓度洗脱,进样量 1 mL,进样质量为 100 mg,按照峰收集,制备液相图谱如下,收集峰,得到峰 1 组分,记为化合物 A(图 4)。

2.3.2 95-4 组分分离纯化

从分析液相图谱可以看出, P95-4 组分成分较少,因此可以对其进行制备液相分离,再进行结构鉴定。根据分析液相条件及图谱确定制备液相分离条件为:

检测波长 270 nm,流速 15 mL/min,根据分析液相图谱,选择 13.5%乙腈等浓度洗脱,进样量 1 mL,进样质量为 101 mg,按照峰收集,制备液相图谱如下,收集峰,得到峰 1 组分,记为化合物 B(图 5)。

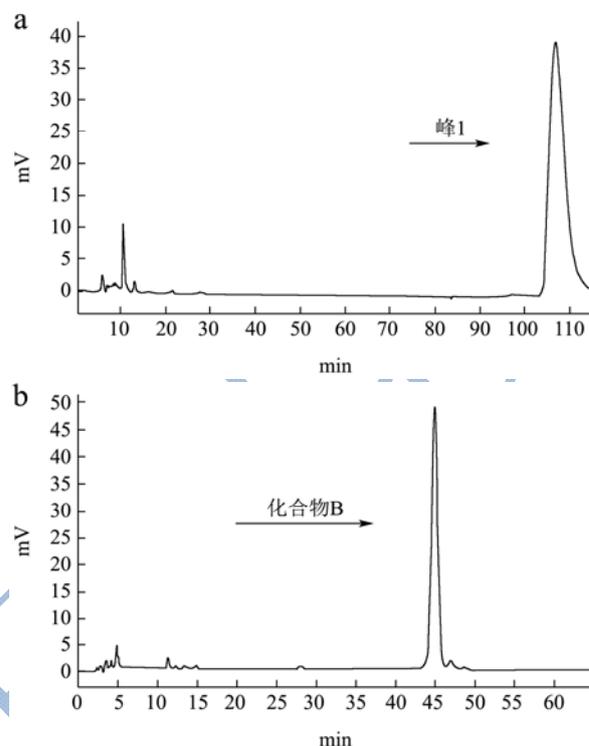
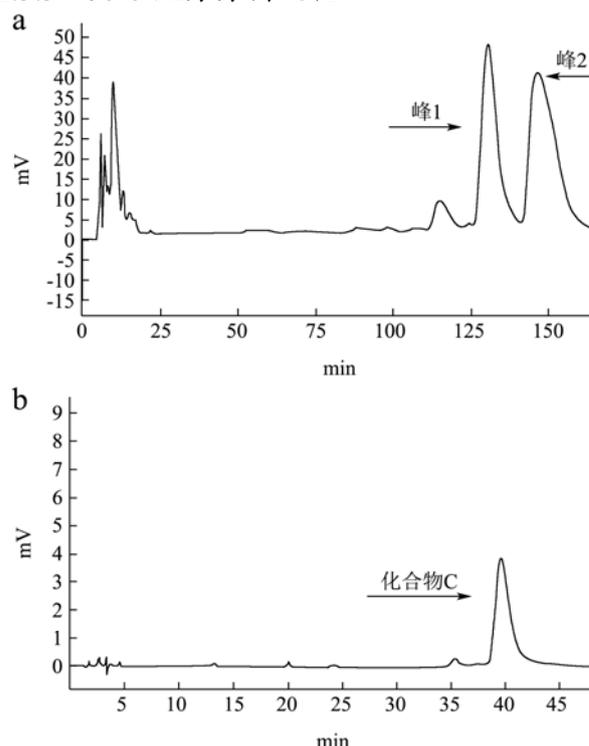


图 5 P95-4 组分制备液相图谱及制备后峰 1 的分析图

Fig.5 Preparative HPLC chromatogram of P95-4 and peak 1 in P95-4 after preparation

2.3.3 95-5 组分分离纯化



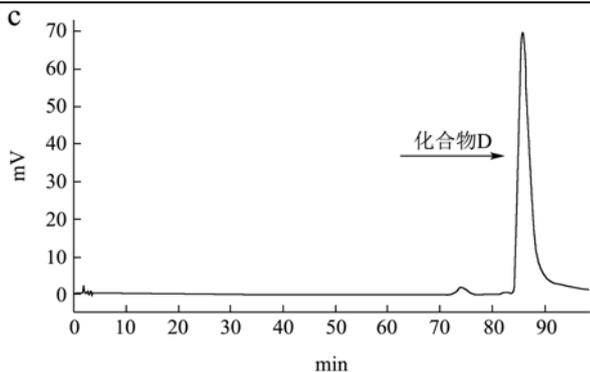


图6 P95-5 组分制备液相图谱、制备后峰1和制备后峰2的分析图

Fig.6 Preparative HPLC chromatogram of P95-5 and peak 1 and peak 2 in P95-4 after preparation

从分析液相图谱可以看出, P95-5 组分成分较少, 因此可以对其进行制备液相分离, 再进行结构鉴定。根据分析液相条件及图谱确定制备液相分离条件为: 检测波长 270 nm, 流速 15 mL/min, 根据分析液相图谱, 选择 13.8% 乙腈等浓度洗脱, 进样量 1 mL, 进样质量为 35 mg, 按照峰收集, 制备液相图谱如下, 收集峰, 得到峰 1 和峰 2 组分, 分别记为化合物 C 和 D (图 6)。

2.4 P95 组分分离纯化化合物的结构鉴定

2.4.1 P95-3 组分中化合物 A 的结构鉴定

化合物 A 为黄色粉末, 盐酸-镁粉反应显红色, 示其可能为一黄酮类化合物。

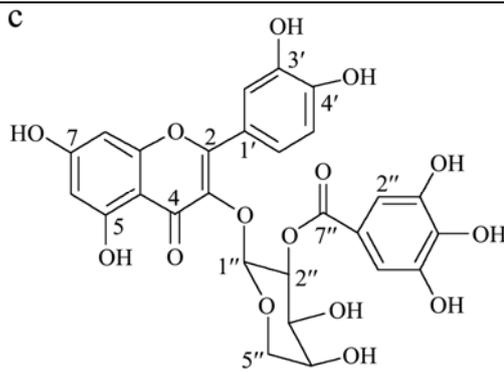
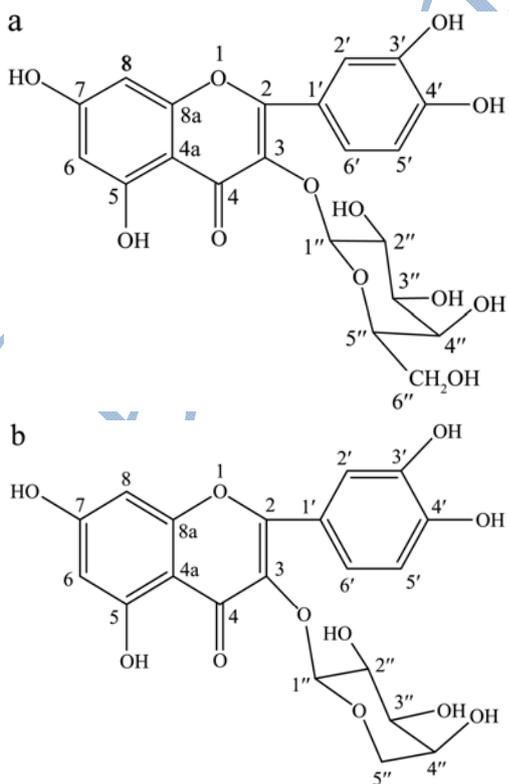


图7 各物质的化学结构图

Fig.7 The chemical structures of the compounds

注: (a) 金丝桃苷; (b) 番石榴苷; (c) 槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-糖酸盐。

在其氢谱中, δ H 6.21(1H, d, J=1.8 Hz)和 6.40(1H, d, J=1.8 Hz)显示为黄酮 A 环 6 位和 8 位质子 (间位耦合); δ H 7.83(1H, d, J=2.4 Hz)、6.87(1H, d, J=8.4 Hz)和 7.58 (1H, dd, J=2.4, 8.4 Hz)显示为典型的黄酮 B 环 3', 4'二取代特点, 其中 δ H 7.83、6.87 和 7.58 分别归属为 2', 5', 6'位; δ H 5.15(1H, d, J=7.8 Hz)显示分子中还一糖分子, 化合物 A 为一典型的黄酮苷类化合物。分析化合物的碳谱, δ C 105.5、73.2、75.1、70.0、77.2、62.0 进一步确证其糖分子为一六碳糖。另外其氢谱中给出 δ H 3.85(1H, d, J=2.4 Hz)及其他耦合常数信息, 确定该糖不是葡萄糖而是半乳糖, 由 δ H 5.15 的耦合常数为 7.8 Hz, 说明为一 β -D-半乳糖苷。将碳谱中碳部分信号扣除, 还剩 15 个碳信号, 并以上数据和陈跃龙等^[19]报道的槲皮素 3-O- β -D-半乳糖苷的碳谱数据比较, 完全一致, 故鉴定化合物 A 为金丝桃苷, 化学结构式如图 7a。

2.4.2 化合物 B 组分结构鉴定

黄色粉末, HCl-Mg 粉反应阳性, molish 反应阳性, 示化合物为一黄酮苷类化合物, 该化合物酸水解检出阿拉伯糖和槲皮素。¹H-NMR(DMSO-d₆): δ 12.64 (1H, S)示有 5-OH; 9.2、9.8、10.9 (各 1H, S)示分子中还有三个酚羟基; 7.65 (1H, dd, J=2.4, 8.4 Hz), 7.50(1H, d, J=2.4 Hz), 6.84(1H, d, J=8.4 Hz), 示黄酮母核 B 环为 3', 4'二取代; 6.39(1H, d, J=2.4 Hz), 6.19(1H, d, J=2.4 Hz)示 A 环为 5, 7 二取代; 5.27(1H, d, J=4.8 Hz)示糖的端基质子。¹³C-NMR(DMSO-d₆) 在 δ 101.4, 71.6, 70.7, 66.0, 64.2, 共振信号示该化合物为一五碳糖苷, 这些数据与甲基 α -L-阿拉伯吡喃糖苷化学位移基本一致, 其它碳共振信号与槲皮素 ¹³C-NMR 谱数据比较, C-2 向低场位移约 10×10^6 , C-3 向高场位移约 3×10^6 , 示化合物苷元为槲皮素, 且 3-OH 成苷, 通过查阅文献, 发现其与文献报道的

槲皮素-3-O- α -L-阿拉伯吡喃糖苷一致,即番石榴苷,因此确定化合物B为番石榴苷^[20]化学结构式如图7b。

2.4.3 化合物C和D的结构鉴定

化合物C因含量太少未能鉴定其结构。化合物D为黄色粉末, HCl-Mg粉反应阳性, molish反应阳性, 示化合物为一黄酮苷类化合物, 该化合物酸水解检出没食子酸、阿拉伯糖和槲皮素。¹H-NMR(DMSO-d₆): δ 12.64 (1H, S)示有5-OH; 9.2、9.8、10.9 (各1H, S)示分子中还有三个酚羟基; 7.65 (1H, d, J=2.4, 8.4 Hz), 7.50(1H, d, J=2.4 Hz), 6.84(1H, d, J=8.4 Hz), 示黄酮母核B环为3', 4'二取代; 6.39(1H, d, J=2.4 Hz), 6.19(1H, d, J=2.4 Hz)示A环为5, 7二取代; 5.27(1 H, d, J=4.8 H)示糖的端基质子。¹³C-NMR(DMSO-d₆)在 δ 101.4, 71.6, 70.7, 66.0, 64.2, 共振信号示该化合物为一五碳糖苷, 这些数据与甲基- α -L-阿拉伯吡喃糖苷化学位移基本一致, 其它碳共振信号与番石榴苷¹³C-NMR谱数据比较, C-2''向低场位移约 1.9×10^{-6} , C-3''向高场位移约 2.5×10^{-6} , 根据酰化位移规律, 判断没食子酰基连在阿拉伯糖的C-2''位上。通过查阅文献, 发现该波谱数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物D为槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐, 化学结构式如图7c。

2.5 分离鉴定化合物抗氧化活性研究

天然抗氧化物成分复杂, 抗氧化作用机制无法用单一机制解释, 因此常常需要用两种或两种以上抗氧化活性评价方法, 本文采用DPPH[·]、ABTS^{·+}和ORAC等化学抗氧化方法来测定金丝桃苷、番石榴苷和槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐等化合物的抗氧化活性。

2.5.1 DPPH[·]自由基清除能力测定

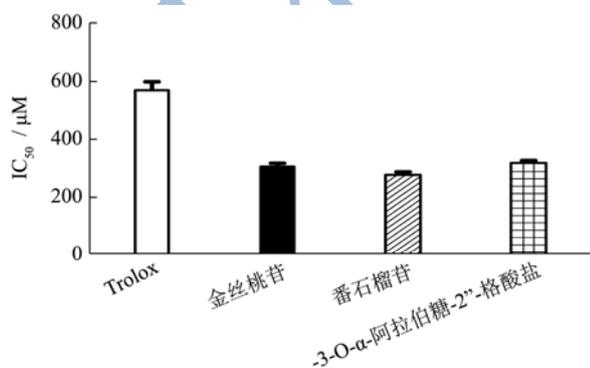


图8 各化合物清除DPPH自由基的IC₅₀值

Fig.8 IC₅₀ values of the compounds against DPPH radicals

在一定的质量浓度范围内, 浓度越高, 其清除率越高, 抗氧化活性越强。对不同化合物清除DPPH自由基能力的测定结果见图8。各组样品浓度在

0.01~0.16 mg/mL之间清除DPPH自由基有较佳的剂量效应线性关系。半清除率浓度IC₅₀越高, 其抗氧化活性越低, 因此各样品清除DPPH自由能力为番石榴苷>金丝桃苷>槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐>Trolox。3种抗氧化物均高于对照组维生素E水溶性类似物Trolox的清除能力。

2.5.2 ABTS^{·+}自由基清除能力测定

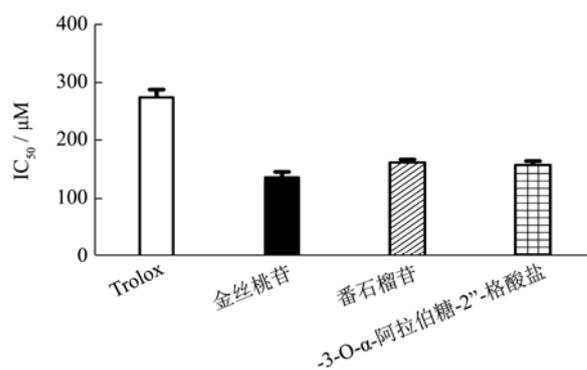


图9 各化合物清除ABTS自由基的IC₅₀值

Fig.9 IC₅₀ values of the compounds against ABTS radicals

在ABTS^{·+}自由基清除能力方法中, 在一定的质量浓度范围内, 浓度越高, 其清除率越高, 抗氧化活性越强。由图9可知, 各组样品浓度在0.01~0.15 mg/mL之间清除ABTS^{·+}自由基有较佳的剂量效应线性关系, 其中金丝桃苷清除ABTS^{·+}自由基的IC₅₀最低(136.64 μ M)。相同浓度下各样品清除ABTS自由能力为金丝桃苷>槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐>番石榴苷>Trolox。因此3种抗氧化物均高于对照组维生素E水溶性类似物Trolox的清除能力。

2.5.3 ORAC法抗氧化指数测定

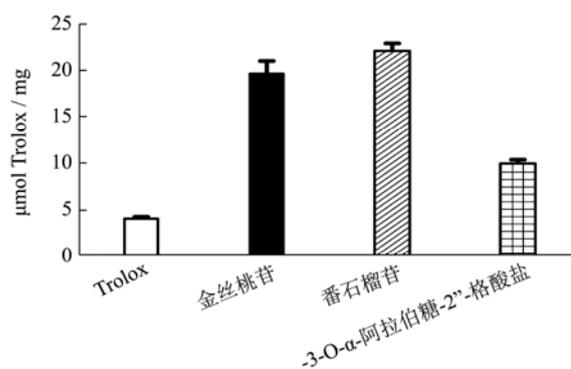


图10 各化合物ORAC值比较

Fig.10 Comparison of ORAC values of the compounds

由图10可以看出, 金丝桃苷、番石榴苷及槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐均有较强的抗氧化能力指数(ORAC)。相同当量的番石榴苷相当于Trolox的5.50倍ORAC值, 其中番石榴苷>金丝桃苷>槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-鞣酸盐>Trolox。

总之, 与Trolox相比, 3种化合物均显示更强的

氧化能力,有着广阔的应用前景。在 DPPH·和 ORAC 方法中,3 种化合物的抗氧化能力大小一致,番石榴苷的抗氧化能力最强,槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-葡萄糖的抗氧化能力最低。而在 ABTS·+方法中,金丝桃苷的抗氧化能力最强,番石榴苷的抗氧化能力最低。在不同方法中活性大小不一致这种现象产生的原因可能有两个:第一,不同化合物对 3 种自由基的清除能力不同;第二,化合物对 3 种自由基的清除速率也可能不一样。第三,各评价方法反应机理不尽相同。

3 结论

3.1 为进一步探索桉叶提取物抗氧化活性的物质基础,本文采用反相硅胶和制备液相等方法对桉叶提取物中高醇组分进行分离纯化得到 4 个化合物,确证了其中 3 个化合物,分别为金丝桃苷、番石榴苷和槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-葡萄糖。另外 1 个化合物还有待进一步鉴定。

3.2 采用 DPPH·、ABTS·+和 ORAC 等化学抗氧化方法确定了金丝桃苷、番石榴苷和槲皮素-3-O- α -吡喃阿拉伯糖-2''-葡萄糖等 3 种化合物比 Trolox 等抗氧化物的清除能力强,是有较好发展前景的天然抗氧化剂。

参考文献

- [1] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247
- [2] Lai L, Chou S, Chao W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsoa (*Mesona procumbens Hemsl*) leaf gum [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2): 963-968
- [3] Maura Y, Weisburger J H, Williams G M. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene [J]. Cancer Research, 1984, 44(4): 1604-1610
- [4] Zhong Y, Ma C, Shahidi F. Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 87-93
- [5] 吴琼辉,张浩.广东省桉树人工林发展现状与可持续发展对策[J].广东林业科技,2006,22(3):133-136
WU Qiong-hui, ZHANG Hao. The present condition of development and sustainable management of Eucalyptus plantation in Guangdong province [J]. Guangdong Forest Science Technology, 2006, 22(3): 133-136
- [6] 何耀松,张继东.桉树化学成分及药理作用研究进展[J].动物医学进展,2007,28(7):98-101
HE Yao-song, ZHANG Ji-dong. Progress on chemical constituents and pharmacological effects of Eucalyptus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 28(7): 98-101
- [7] 韦学丰,邓年方.桉树叶的开发利用[J].贺州学院学报,2008, 24(2):133-136
WEI Xue-feng, DENG Nian-fang. The exploitation of Eucalyptus leaves [J]. Journal of Hezhou University, 2008, 24(2): 133-136
- [8] Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Hydrolyzable tannins as antioxidants in the leaf extract of *Eucalyptus globulus* possessing tyrosinase and hyaluronidase inhibitory activities [J]. Food Science and Technology Research, 2009, 15(3): 331-336
- [9] 陈运娇,李伟,陈洪璋,等.桉叶抗氧化物分离纯化及其抗氧化活性的研究[J].桉树科技,2016,33(2):25-32
CHEN Yun-jiao, LI Wei, CHEN Hong-zhang, et al. The isolation and purification of compounds from Eucalyptus leaves and their antioxidant activity [J]. Eucalypt Science & Technology, 2016, 33(2): 25-32
- [10] 刘又豪,赵力超,卢嘉欣,等.桉叶提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性成分的分离纯化及其动力学研究[J].广东农业科学, 2014,41(14):100-105
LIU You-hao, ZHAO Li-chao, LU Jia-xin, et al. Inhibition effects on xanthine oxidase and kinetics research of extracts from eucalyptus leaves [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(14): 100-105
- [11] 曹素芳,陈运娇,陈洪璋,等.桉叶月见草素 B 的单体制备其体内外稳定性研究[J].林产化学与工业,2016, 14(1):112-118
CAO Su-fang, CHEN Yun-jiao, CHEN Hong-zhang, et al. Preparation and in vitro and in vivo stability of Oenotherin B from Eucalyptus Leaves [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2016, 14(1): 112-118
- [12] Chen Y, Wang J, Oua Y, et al. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from Eucalyptus leaves (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9) [J]. Journal of Functional Food, 2014, 7: 737-745
- [13] 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004
LING Guan-ting. Antioxidant food and Health [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [14] 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
LIU Wei-wei, REN Hong, CAO Xue-li, et al. Progress in evaluation techniques for antioxidant activity of natural

- products in vitro [J]. Food Science, 2010, 31(17): 415-419
- [15] 朱玉昌,焦必宁.ABTS 法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研究进展[J].食品与发酵工业,2005,31(8):77-80
ZHU Yu-chang, JIAO Bi-ning. Research progress on ABTS assay in determination of TAA in fruits and vegetables in vitro [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(8): 77-80
- [16] 仇菊,任长忠,李再贵.杂粮醋的抗氧化特性研究[J].食品科技,2009,1:218-221
QIU Ju, REN Chang-zhong, LI Zai-gui. Study of antioxidant activities in different varieties of vinegars produced from minor grain crops [J]. Food Science and Technology, 2009, 1: 218-221
- [17] Miller N, Rice-Evans C, Davies M, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [J]. Clinical Science, 1993, 84(4): 407-412
- [18] Wolfe K L, Kang X, He X, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426
- [19] 陈跃龙,冯宝民,唐玲,等.油茶叶的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2010,27(4):292-324
CHEN Yue-long, FENG Bao-min, TANG Ling, et al. Chemical constituents of leaves from *camellia oleifera abel* [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2010, 27(4): 292-324
- [20] 郭雷,龚邦强.金叶子中抑制膜结合型 PGE2 合酶-1 表达活性物质的分离与鉴定[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):839-841
GUO Lei, GONG Bang-qiang. Isolation and identification of Mpges-1 expression inhibitor from *craibiodendron yunnanense* [J]. Natural Production and Research Development, 2008, 20(5): 839-841
- [21] 陈蕙芳,马永华,卞学伟.植物活性成分辞典第二册[M].北京:中国医药科技出版社,2001
CHEN Hui-fang, MA Yong-hua, BIAN Xue-wei. The dictionary of active plant ingredient (Second edition) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2001