

凤眼果壳多酚的抗氧化和抗人肺癌细胞 A549 增殖活性

李原, 赵振刚

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究以凤眼果壳为原料, 提取凤眼果壳游离态和结合态多酚, 通过不同极性有机溶剂萃取游离态多酚获得四相提取物, 分别是正己烷相 (HF), 乙酸乙酯相 (EAF), 正丁醇相 (BF) 和水相 (AqF)。测量游离态、结合态和萃取后的四相提取物的总多酚和总黄酮含量, 结果表明游离态的多酚和黄酮含量均比结合态高。萃取后的四相提取物中, EAF 的多酚和黄酮含量最高。通过 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力对结合态多酚和萃取后的四相提取物的抗氧化活性进行综合评价, EAF 具有较好的抗氧化活性, 其 DPPH 自由基清除率的 EC_{50} 值为 2.08 mg/mL, ABTS 自由基清除率的 EC_{50} 值为 29.28 mg/mL, 在 10 mg/mL 时, EAF 的还原力达到 0.81。采用 HPLC 技术分析, 在 EAF 中鉴定出 11 种多酚类化合物: 分别是表儿茶素、香草酸、异荭草素、阿魏酸、(反)阿魏酸、芦丁、槲皮苷、杨梅素、三叶苷、槲皮素和山奈酚。此外, EAF 对人肺癌细胞 A549 的增殖具有剂量依赖性抑制作用, 其抑制 A549 细胞增殖的 EC_{50} 值为 85.70 μ g/mL。这项研究获得的结果表明, 凤眼果壳多酚提取物具有较好的抗氧化和抗 A549 细胞增殖活性, 有助于凤眼果壳的综合利用和开发新的功能性试剂。

关键词: 凤眼果壳; 多酚; 抗氧化活性; 抗增殖活性

文章编号: 1673-9078(2021)04-16-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0426

Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Polyphenols from *Sterculia nobilis* Smith Huskon Human Lung Cancer Cells A549

LI Yuan, ZHAO Zhen-gang

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, the free and bound polyphenols were extracted from *Sterculia nobilis* Smith husk using *Sterculia nobilis* Smith husk as the raw materials. Then, the free polyphenols were extracted with organic solvents of different polarities to yield a four phase-extract, namely *n*-hexane phase (HF), ethyl acetate phase (EAF), *n*-butanol phase (BF) and aqueous phase (AqF). The total phenolic content and total flavonoid content of the free polyphenol extract, bound polyphenol extract and four-phase extract were measured. The results showed that the free polyphenol extract had higher total phenolic content and total flavonoid content than the bound polyphenol extract. Among the four phases in the four-phase extract, the EAF had the highest phenolic and flavonoid contents. DPPH free radical scavenging ability, ABTS free radical scavenging ability and reducing power assays were used to evaluate comprehensively the antioxidant activities of the bound polyphenol extract and four-phase extract. EAF showed a higher antioxidant activity, with the EC_{50} values for DPPH and ABTS free radicals being 2.08 mg/mL and 29.28 mg/mL. The reducing power of EAF reached 0.81 at a concentration at 10 mg/mL. Eleven phenolic compounds (epicatechin, vanillic acid, isoorientin, ferulic acid, rutin, quercitrin, myricetin, trilobatin, quercetin and kaempferol) were identified in EAF by HPLC. In addition, EAF had a dose-dependent inhibitory effect on the proliferation of human lung cancer cell A549 with an EC_{50} value of 85.70 μ g/mL. The results indicate that the polyphenol extract from *Sterculia nobilis* Smith husk has significant antioxidant activity and anti-proliferative activity towards A549 cells, which is helpful for the comprehensive utilization of *Sterculia nobilis* Smith husk and the development of new functional agents.

Key words: *Sterculia nobilis* Smith husk; polyphenols; antioxidant activity; antiproliferative activity

引文格式:

李原, 赵振刚. 凤眼果壳多酚的抗氧化和抗人肺癌细胞 A549 增殖活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 16-24

LI Yuan, ZHAO Zhen-gang. Antioxidant and anti-proliferative activities of polyphenols from *Sterculia nobilis* Smith huskon human lung cancer cells A549 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 16-24

收稿日期: 2020-05-08

基金项目: 广东省水资源科学技术创新计划 (201624); 111 项目 (B17018); 北京市食品营养与人类健康高级创新中心 (20182004)

作者简介: 李原 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与健康; 通讯作者: 赵振刚 (1979-), 男, 副教授, 研究方向: 植物天然产物活性

凤眼果 (*Sterculia nobilis* Smith) 是属于梧桐科苹婆属的一种木本植物, 在日本、东南亚和中国华南地区广泛分布^[1]。凤眼果种子的外形和风味与板栗相似, 但凤眼果种子香甜、多汁的口感却比板栗更胜一筹。在广东、广西地区凤眼果种子被当作一种可食用的水果, 受到人们的喜爱, 因此具有极高的食用价值。凤眼果种子富含蛋白质, 淀粉, 维生素, 多酚和微量元素等营养物质, 此前有研究表明凤眼果种子具有较好的抗氧化和胃保护作用^[1-3]。凤眼果壳别名凤眼果荚、苹婆壳, 常见的凤眼果壳为椭圆形, 具有皮革质感, 通常凤眼果壳于每年的六月到八月成熟, 成熟时表皮为红色, 短绒毛状^[2]。凤眼果壳作为一种中药被多本中药书籍所记录, 如《中药本草》等^[4], 具有较高的药用价值。然而, 目前对于凤眼果壳的加工利用率不高, 研究也尚为缺乏。

作为植物重要的次生代谢产物, 多酚类化合物在植物生长发育过程中起着相当重要的作用。许多研究表明植物多酚类化合物具有较好的抗氧化活性^[5-7], 同时也有研究表明植物多酚类化合物具有较好的抗癌细胞增殖活性^[8-10]。已有研究测定通过浸渍、索氏提取、微波辅助提取三种方法凤眼果壳提取物的总多酚和总黄酮含量, 其总多酚含量分别为 2.74 ± 0.69 、 2.56 ± 0.64 和 3.67 ± 0.80 mg GAE/g DW, 总黄酮分别为 0.30 ± 0.17 、 0.24 ± 0.10 和 0.45 ± 0.13 mg QE/g DW, 同时鉴定出凤眼果壳提取物含有的多酚类化合物主要包括表儿茶素, 原儿茶酸, 阿魏酸, 没食子酸, 对香豆酸, 咖啡酸, 槲皮素和对羟基肉桂酸, 同时该提取物表现出较好的抗氧化活性^[11]。但目前暂时还没有对凤眼果壳抗癌细胞增殖活性的相关报道。作为一种天然可再生的多酚化合物来源, 凤眼果壳中仍存在多种多酚类化合物及其活性未被研究报道。同时, 凤眼果壳作为一种食品工业的副产物, 人们可以通过低成本获得, 并回收其活性物质, 属于一种可再生资源, 因此, 其利用价值不可被忽视。本文对凤眼果壳游离态、结合态和萃取后的四相提取物的总多酚和总黄酮含量进行测定, 同时测定结合态多酚和萃取后的四相提取物的抗氧化活性, 对乙酸乙酯相提取物的多酚化合物进行鉴定并探究其抗 A549 细胞增殖活性, 以期对凤眼果壳的进一步研究与开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜凤眼果壳购自中国广州的当地市场, 用蒸馏水洗净, 切成小片, 晒干。使用实验室研磨机磨成细

粉, 过 60 目筛。得到的粉末存放于干燥皿内保存备用。

试剂: 表儿茶素、香草酸、异荭草素、阿魏酸、(反)阿魏酸、芦丁、槲皮苷、杨梅素、三叶苷、槲皮素和山奈酚、没食子酸、儿茶素水合物、福林酚试剂, 美国 Sigma 公司; 2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)、2,2'-偶氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸二铵盐(ABTS), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 人肺癌细胞 A549 细胞, ATCC 公司; 磷酸盐(PBS)、高糖 DMEM 培养基, Gibco 公司; 青霉素-链霉素溶液, 碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清, 浙江天航生物科技有限公司; 95%乙醇、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、碳酸钠、硼氢化钠、三氯化铝、四氯代苯对醌、四氢呋喃(THF)、乙酸、盐酸、香草醛、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钾、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、无水乙醇、磷酸氢二钾均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DFY-500 摇摆式中药粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; Basis Hei-VAP Value 真空旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; MX-RL-PRO 静音混合仪, MX-RL-PRO; DU730 核酸蛋白质分析仪, 美国 Beckman Coulter 公司; Filter Max F5 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Allegra X-15R 台式高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 凤眼果壳游离多酚的提取与分离

游离态多酚提取参考 Wen 等^[12]报道的方法并稍作修改, 称取一定量的凤眼果壳粉末样品, 按照一定液料比(1:3, *m/V*)加入 95%乙醇溶液, 浸泡, 抽滤, 得到的滤液通过真空旋转蒸发仪进行旋蒸, 滤渣备用。旋蒸获得的膏状液, 取一部分为乙醇提取物备用, 另一部分用蒸馏水稀释后依次采用有机溶剂正己烷、乙酸乙酯、正丁醇进行分相萃取, 体积比为 1:1, 每相萃取 3 次, 收集萃取后获得的液体。将得到的各有机相通过旋转蒸发仪进行浓缩, 得到正己烷相(HF)、乙酸乙酯相(EAF)、正丁醇相(BF)和水相(AqF)四个部分。

1.3.2 凤眼果壳的结合态多酚的提取

结合态多酚的提取参考 Wen 的方法^[13]并稍做修改, 称取 1.3.1 的滤渣 10.1757 g, 分装至 50 mL 离心管中, 向装有沉淀物的离心管中加入 10 mL NaOH 溶液(4 M), 将离心管放在静音混合仪上充分混合 1.5 h,

转速为 60 r/min; 混合结束后, 在通风橱中加浓盐酸调 pH 至 2.0 并加入等体积的乙酸乙酯, 混匀, 以 5000 r/min 离心 15 min, 每次将上清液转移至旋蒸瓶中混合摇匀, 重复萃取直至乙酸乙酯相澄清。将收集的萃取液用真空旋转蒸发仪在 45 °C 下旋蒸。加入超纯水定容至 25 mL, 低温下保存。

1.3.3 总酚含量测定

使用 Wang 等^[14]报道的福林酚比色法测定每个样品的总酚含量, 使用没食子酸作为标准参照物。配置一系列浓度的没食子酸标准品 (20~600 μg/mL), 将样品稀释到合适浓度。然后加入 100 μL 福林酚试剂。充分震荡混合后, 将混合物静置 6 min, 然后在避光条件下与 1 mL Na₂CO₃ (W/W, 7%) 反应 90 min。反应过后, 使用核酸蛋白质分析仪在 730 nm 下测定混合物的吸光度。绘制没食子酸标准曲线 (图 1), 得到回归方程: $Y=0.0037X+0.0264$, $R^2=0.9992$ 。通过回归方程计算各相提取物的儿茶素当量, 所有测定均重复三次。各相提取物的总酚含量的结果表示为 mg 没食子酸当量/100 g DW (mg GAE/100 g DW)。数据以平均值±标准差表示。

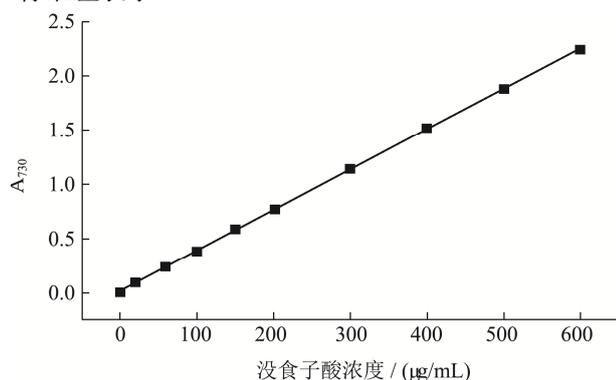


图 1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Reference curve of gallic acid

1.3.4 总黄酮含量测定

总黄酮含量的测定参考 Zhao 等^[15]道的硼氢化钠-四氯苯醌法进行测定, 使用儿茶素作为标准参照物。将适量的儿茶素和样品溶于 1 mL THF: 乙醇 (1:1, V/V) 溶液中, 配制成一系列浓度的儿茶素标准品 (0.3~10 mg/mL), 并将样品稀释到合适浓度。分别向儿茶素/样品中加入 0.5 mL 的 50.0 mM NaBH₄ 溶液和 0.5 mL 的 74.6 mM AlCl₃·6H₂O 并振荡溶液 30 min。然后加入 0.5 mL 的 50.0 mM 的 NaBH₄ 溶液, 振荡 30 min。分别加入 2.0 mL 的 0.8 mM 冰乙酸溶液, 并在避光的条件下振荡 15 min。随后加入 1 mL 20 mM 氯苯甲烷溶液, 使混合物在 95 °C 下反应 1 h, 然后取出试管使其冷却, 加入甲醇至总体积为 4 mL。加入 1 mL 16% (W/V) 的香兰素和 2 mL 12 M 的 HCl 溶液, 混

匀并在避光条件下放置 15 min, 然后使用核酸蛋白质测定溶液在 490 nm 处的吸光值, 所有测定均重复三次。通过绘制儿茶素标准曲线 (图 2) 得到回归方程: $Y=0.1531X-0.006$, $R^2=0.9991$ 。通过方程计算儿茶素当量, 各样品的总黄酮含量表示为 mg 儿茶素当量/100 g DW (mg CE/100 g DW)。数据以平均值±标准差表示。

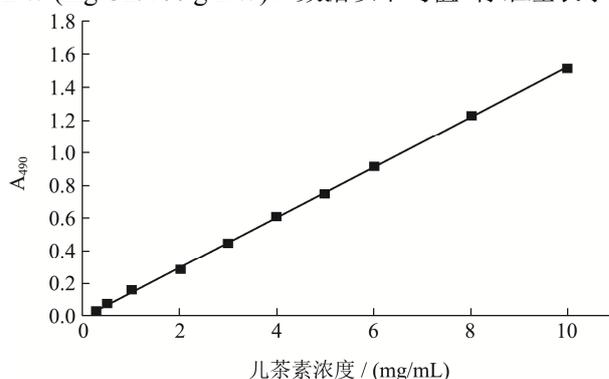


图 2 儿茶素标准曲线

Fig.2 Reference curve of catechin

1.3.5 抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除活性的测定

参考 Zhao 等人^[16]的方法测定各相提取物的 DPPH 自由基清除活性。称取 0.019 g 的 2,2-联苯基-1-苦基肼基粉末溶于 25 mL 无水乙醇中以配制 DPPH 储备溶液 (2 mM), 在 4 °C 避光储存。使用前用无水乙醇稀释 DPPH 储备液至 0.2 mM 作为 DPPH 工作液。用无水乙醇溶液将样品稀释到 0.5~5 mg/mL, 将 Vc 溶液稀释到 10~100 μM, 取 1 mL 稀释后的 Vc 溶液或样品, 等量与 DPPH 工作液混合均匀。在黑暗条件下于 25 °C 反应 30 min。反应后, 通过核酸蛋白质分析仪在 517 nm 下测定溶液的吸光度。以 Vc 溶液用作阳性对照。DPPH 的自由基清除率按照公式 (1) 计算。

$$\text{DPPH 自由基抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_0}{A_c}\right) \times 100\% \quad (1)$$

其中, A_s 为样品组, A_c 为不含样品的对照组的吸光度, A_0 为不含样品的 DPPH 工作溶液的吸光度。

1.3.5.2 ABTS 自由基清除活性的测定

参考 Zheng 等^[17]人的方法测定各相提取物的 ABTS 自由基清除活性。凤眼果壳的各相提取物和 Vc 溶液用无水乙醇稀释至不同浓度。分别配制 50 mL ABTS 溶液 (7 mM) 和 50 mL 过硫酸钾溶液 (4.9 mM), 混合均匀。将混合液在 25 °C 下避光放置 16 h, 作为 ABTS 储备液。在实验前, 把 ABTS 储备液用无水乙醇溶液稀释到适当浓度, 当在 734 nm 处测定到的吸光值为 0.700 ± 0.02 时该工作液即可使用。用无水乙醇溶液将样品稀释到 5~100 mg/mL, 将抗坏血酸溶液稀释到 200~3000 μM, 加入 20 μL 稀释后的样品溶液或

Vc 溶液到试管中, 加入 2 mL 的 ABTS 工作液在避光条件下混合均匀, 随后避光静置 15 min。以 Vc 作为阳性对照。通过核酸蛋白质分析仪在 734 nm 下测定溶液的吸光值。ABTS 自由基抑制率按照公式 (2) 计算。

$$\text{ABTS 自由基抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_0}{A_c}\right) \times 100\% \quad (2)$$

其中, A_c 为不加样品的空白对照组的吸光值, A_s 为样品加入 ABTS 工作液的吸光值, A_0 为不含样品的 ABTS 工作液的吸光值。

1.3.5.3 还原力测定

测定各相提取物的还原力参考文献报道的方法^[18]并稍作修改: 用超纯水分别配制的磷酸盐缓冲溶液 (0.2 M, pH=6.6)、1% (m/V) 的铁氰化钾溶液、10% (V/V) 的三氯乙酸溶液以及 0.1% (V/V) 的三氯化铁溶液。样品或 Vc 溶液用磷酸缓冲溶液稀释至不同浓度。用无水乙醇溶液将样品稀释到 1~10 mg/mL, 将抗坏血酸溶液稀释到 20~300 μM , 加入 2 mL 样品溶液或 Vc 溶液到试管中, 然后加入 2 mL 磷酸盐缓冲溶液和 2 mL 铁氰化钾溶液, 混合均匀。混匀后, 将试管置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中水浴加热 20 min, 然后加入 2 mL 的三氯乙酸溶液于试管。混匀, 以 3000 r/min 的速度离心 10 min, 取 2 mL 上清液加入到新的试管, 加入 2 mL 超纯水和 0.4 mL 三氯化铁, 混匀, 室温反应 10 min。反应结束后, 以 Vc 作为阳性对照, 用核酸蛋白质分析仪测定其在 700 nm 处的吸光值。

1.3.6 HPLC 分析凤眼果壳乙酸乙酯相提取物的多酚类化学成分

将凤眼果壳的乙酸乙酯相提取物溶解到甲醇中, 该溶液通过孔径为 0.45 μm 过滤膜过滤并注入 HPLC 系统。WATERS 的 HPLC 系统配备 WATERS 的 C18 色谱柱的 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)。样品的进样量为 20 μL , 流速为 0.5 mL/min。用溶液 A (0.1% TFA) 和溶液 B (甲醇) 洗脱多酚类化合物。溶剂 A 和 B 的比率 (V/V) 的梯度如下: 从 0~1 min, 0% B; 1~60 min, 0%~100% B; 60~62 min, 0% B。以样品的出峰时间与标准品的出峰时间进行比对, 通过相应标准品的校准曲线计算化合物的含量。多酚化合物的含量以 mg/100 g DW of EAF 表示。

1.3.7 凤眼果壳乙酸乙酯相提取物的抗增殖活性测定

1.3.7.1 细胞培养

人肺癌细胞系 A549, 代数为 8~20 代。培养在高糖 DMEM 培养基中, 并向其中加入 10% 的四季青胎牛血清和 1% 的青霉素-链霉素溶液。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 含

有 5% CO_2 的二氧化碳恒温培养箱中培养。

1.3.7.2 乙酸乙酯相提取物的毒性评价

参考 Felice 等人^[19]报道的亚甲基蓝测定法测定细胞毒性。先用培养基稀释 EAF 至 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将细胞以 4×10^4 个细胞/孔的细胞密度接种在 96 孔板上。在 5% CO_2 培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 除去培养基, 并向每个孔中添加 100 μL 不同浓度的 EAF。加入 100 μL 没有样品的培养基作为对照组。孵育 24 h 后, 除去培养基, 每孔加入 100 μL PBS 洗涤, 弃去洗液, 添加 50 μL 亚甲蓝溶液染色细胞。1 h 后, 除去亚甲蓝溶液, 用清水洗净 96 孔板, 拍干并加入 100 mL 洗脱液 (含有 49% PBS, 50% 乙醇和 1% 乙酸) 到每个孔中, 震荡 20 min。将 96 孔板放置在多功能酶标仪中, 在 570 nm 下测量每孔的吸光度。细胞毒性按照公式 (3) 计算。

$$\text{细胞毒性}/\% = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100\% \quad (3)$$

其中, A_s 是样品孔处理量减去空白孔的吸光度, A_c 是对照孔减去空白孔的吸光度。

1.3.7.3 乙酸乙酯相提取物的抗增殖活性

根据由 Li 等^[20]报道的方法测量抗增殖活性。先用培养基稀释 EAF 至 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将癌细胞以 2.5×10^4 个细胞/孔的细胞密度接种在 96 孔板上, 并在 CO_2 培养箱中于孵育 4 h。然后除去培养基, 每孔加入 100 μL 不同浓度的 EAF。加入 100 μL 没有样品的培养基作为对照组。孵育 72 h 后, 除去培养基, 每孔加入 100 μL PBS 洗涤, 弃去洗液, 并添加 50 μL 亚甲蓝溶液染色细胞。1 h 后, 除去亚甲蓝溶液, 用清水洗净 96 孔板, 拍干并加入 100 mL 洗脱液 (含有 49% PBS, 50% 乙醇和 1% 乙酸) 到每个孔中, 震荡 20 min。将 96 孔板放置在多功能酶标仪中, 在 570 nm 下测量每孔的吸光度。细胞增殖抑制率按照公式 (4) 计算。

$$\text{细胞增殖抑制率}/\% = \frac{A_s}{A_c} \times 100\% \quad (4)$$

其中, A_s 为样品孔减去空白孔的吸光度, A_c 为对照孔减去空白孔的吸光度。

1.4 数据处理

采用 Origin 2017 绘图, 用 CalcuSyn 计算 EC_{50} 值, 采用 IBM SPSS 21.0 统计分析软件并采用 Duncan's 检测对各个变量进行 ANOVA 分析, $p < 0.05$ 时, 表明具有显著性差异。实验结果通过三次重复试验测定之后计算平均值和标准差。

2 结果与讨论

2.1 凤眼果壳各相提取物的总多酚和总黄酮含量

凤眼果壳游离态和结合态的总多酚和总黄酮含量如图3所示。凤眼果壳游离态的总多酚和总黄酮含量高于结合态的总多酚和总黄酮含量。其中,凤眼果壳游离态多酚含量为468.18 mg GAE/100 g DW,黄酮含量为2063.49 mg CE/100 g DW。结合态多酚含量为107.22 mg GAE/100 g DW,黄酮含量为666.45 mg CE/100 g DW,游离态总多酚含量是结合态的4.36倍,总黄酮含量是结合态的3.10倍。表明凤眼果壳的多酚和黄酮类化合物主要存在于游离态中。

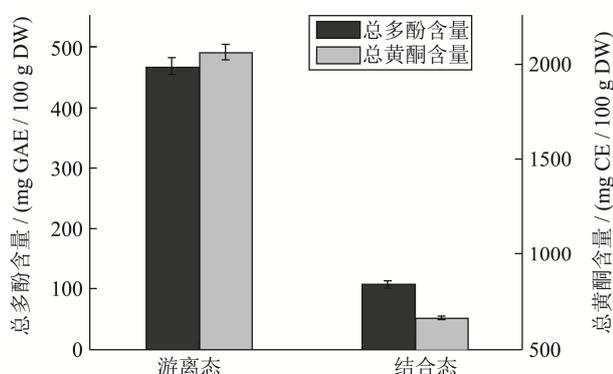


图3 游离态、结合态的总多酚和总黄酮含量

Fig.3 Total phenolic contents and total flavonoid content of free

fraction and bound fraction

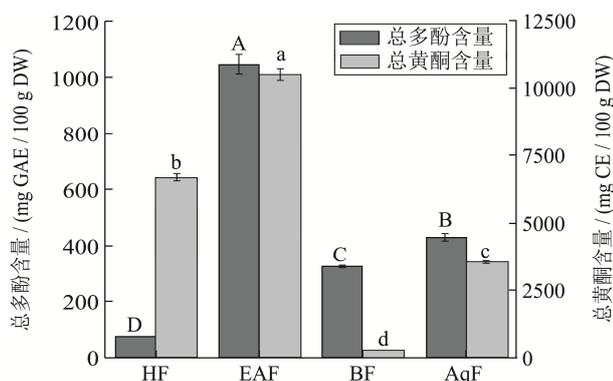


图4 四相提取物的总多酚和总黄酮含量

Fig.4 Total phenolic contents and total flavonoid content of four fractions

注:不同大写字母表示样品间的总多酚含量存在显著性差异 ($p < 0.05$),不同小写字母表示样品间的总黄酮含量存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

萃取后的四相提取物的总多酚和总黄酮含量如图4所示,四相提取物总多酚含量大小次序为: EAF>AqF>BF>HF,总黄酮含量大小次序为 EAF>HF>AqF>BF,结果表明凤眼果壳的各相提取物均含有一定量的多酚和黄酮类化合物,同时发现 EAF

的总多酚和总黄酮含量高于其他三相提取物,表明较多的多酚和黄酮类物质被乙酸乙酯萃取到 EAF 当中。Zheng 等^[21]在研究甘蔗渣多酚时发现,甘蔗渣提取得到的乙酸乙酯相的多酚含量高于石油醚,正丁醇相和水相,该结果与本研究结果相似。同时胡惠刚等^[22]在研究芒果多酚的提取分离时也发现乙酸乙酯相的多酚含量高于石油醚,正丁醇相和水相,结果与本研究结果相似。上述研究结果对凤眼果壳提取物的分离提供了一定的理论基础,同时为后续对凤眼果壳各相提取物的进一步研究提供参考依据。

2.2 凤眼果壳结合态多酚和萃取后的四相提取物抗氧化活性分析

2.2.1 DPPH 自由基清除能力比较

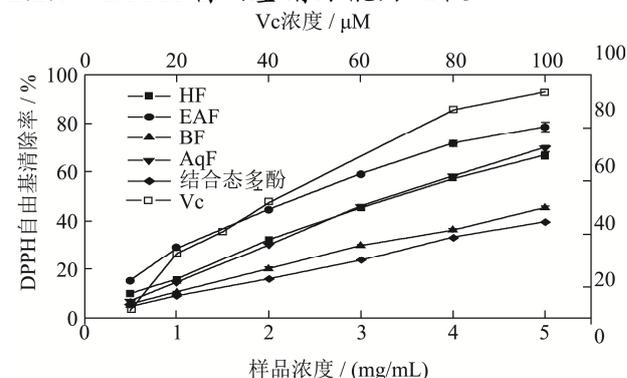


图5 结合态多酚、萃取后的四相提取物和 Vc 的 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 The DPPH radical scavenging activity of bound extract, four fractions extract and Vc

凤眼果壳结合态多酚、萃取后的四相提取物和 Vc 的 DPPH 自由基清除能力如图5所示,在提取物浓度为 0.5~5 mg/mL 时,结合态多酚和萃取后的四相提取物的 DPPH 自由基清除能力均随样品浓度的增大而增强。抗氧化剂 Vc 的 DPPH 自由基清除能力高于五相不同提取物。在结合态多酚和萃取后的四相提取物中, EAF 的 DPPH 自由基清除能力显著高于其他四相提取物 ($p < 0.05$),其 EC_{50} 值为 2.08 mg/mL。AqF 和 HF 的 DPPH 自由基的清除能力大小无显著性差异, EC_{50} 值分别为 3.19 mg/mL 和 3.21 mg/mL。BF 的 DPPH 自由基的清除能力大于结合态多酚提取物,其 EC_{50} 值为 6.26 mg/mL,结合态多酚的 EC_{50} 值为 7.87 mg/mL。结合态多酚和萃取后的四相提取物对 DPPH 自由基的清除能力大小次序为 EAF>AqF>HF>BF>结合态多酚。

2.2.2 ABTS 自由基清除能力比较

凤眼果壳结合态多酚、萃取后的四相提取物和 Vc 的 ABTS 自由基清除能力如图6所示,抗氧化剂 Vc

的 ABTS 自由基清除能力高于凤眼果壳结合态多酚和萃取后的四相提取物, 结合态多酚和萃取后的四相提取物的 ABTS 自由基清除率与样品浓度成正相关, 其中 ABTS 自由基清除能力最强的是 AqF, 其 EC₅₀ 值为 8.51 mg/mL。EAF 的 ABTS 自由基清除能力仅次于 AqF, 其 EC₅₀ 值为 29.28 mg/mL。结合态多酚和萃取后的四相提取物对 ABTS 自由基的清除能力大小次序为 AqF>EAF>HF>结合态多酚>BF。

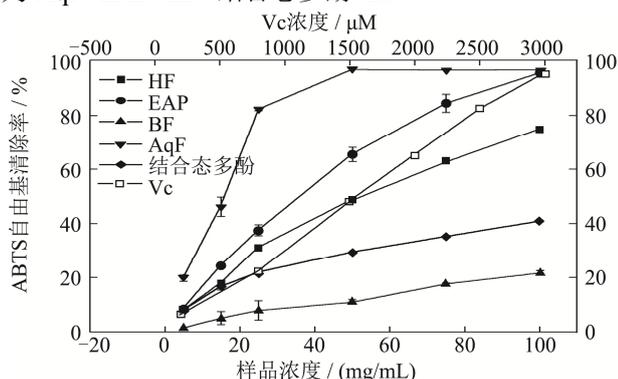


图6 结合态多酚、萃取后的四相提取物和 Vc 的 ABTS 自由基清除能力

Fig.6 The ABTS radical scavenging activity of bound extract, four fractions extract and Vc

2.2.3 还原力比较

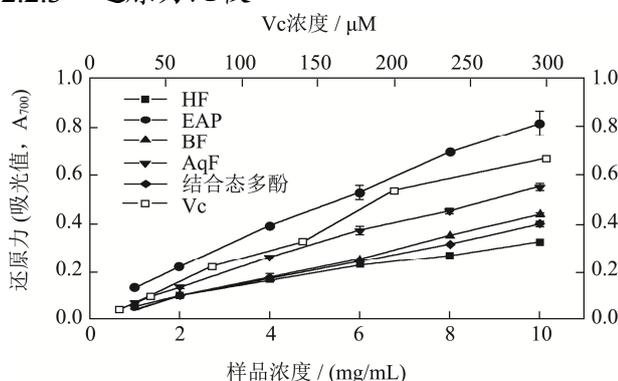


图7 结合态多酚、萃取后的四相提取物和 Vc 的还原力

Fig.7 The reducing power of bound extract, four fractions extract and Vc

凤眼果壳结合态多酚和萃取后的四相还原力结果如图 7 所示, 抗氧化剂 Vc 的还原力高于凤眼果壳结合态多酚和萃取后的四相提取物, 还原力大小与各样品浓度成线性相关。在结合态多酚和萃取后的四相提取物中, EAF 的还原力显著高于其他四相提取物, 在样品浓度为 10 mg/mL 时, EAF 的还原力达到 0.81。AqF 的还原力次之, 结合态多酚的还原力大于 HF 的还原力, 在样品浓度为 10 mg/mL 时, 结合态多酚的还原力为 0.39, HF 还原力只有 0.32。结合态多酚和萃取后的四相提取物对还原力大小次序为 EAF>AqF>BF>结合态多酚>HF, 与各相提取物的总多

酚含量的大小次序一致。

利用 Pearson 相关性分析对凤眼果壳结合态多酚和萃取后的四相提取物的总多酚含量 (TPC)、总黄酮含量 (TFC) 以及 3 种抗氧化实验结果进行相关性分析, 分析结果发现 TPC 与还原力测定结果显著正相关 ($r=0.989, p<0.01$)。此外, 还发现 TFC 与 DPPH 测定结果显著正相关 ($r=0.960, p<0.01$)。另外, 从相关性分析结果中可知结合态多酚和萃取后的四相提取物的 TPC、TFC 和其他抗氧化测定结果与 ABTS 法测定的结果相关性较低, 这可能与不同的抗氧化活性方法的测定原理以及样品与抗氧化剂作用方式有关。

综合 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力的抗氧化活性的测定结果可以发现, 结合态多酚和萃取后的四相提取物均表现出一定的抗氧化能力。Zhang 等^[11]通过 TEAC 法测定凤眼果壳的抗氧化活性, 结果表明凤眼果壳提取物表现出较好的抗氧化活性, 与本实验的结果相似。综合四相提取物的总酚、总黄酮含量和抗氧化活性的结果可发现, 在结合态多酚和萃取后的四相提取物中 EAF 拥有最高的总酚、总黄酮含量和最强抗氧化活性, EAF 表现出较强抗氧化活性与其含有的多酚黄酮类化合物有关。选择 EAF 作为优选组分, 进一步探究其多酚化合物的组成及抗人肺癌细胞 A549 增殖活性。

2.2.4 凤眼果壳乙酸乙酯相提取物的多酚类化学组成

表 1 通过 HPLC 在 EAF 中检测到的多酚类化合物

Table 1 Phenolic compounds that have been detected in EAF by HPLC

HPLC			
化合物	保留时间 / (min)	多酚化合物	含量 / (mg/100 g DW of EAF)
1	34.408	表儿茶素	1.13±0.08
2	35.808	香草酸	2.89±0.02
3	38.991	异荭草素	8.29±0.06
4	40.833	阿魏酸	0.33±0.01
5	41.758	(反)阿魏酸	3.42±0.05
6	42.941	芦丁	21.54±0.09
7	45.208	槲皮苷	3.67±0.04
8	45.725	杨梅素	1.41±0.02
9	46.275	三叶苷	9.42±0.07
10	49.408	槲皮素	2.83±0.02
11	52.733	山奈酚	2.37±0.03

由图 8 可知, 乙酸乙酯相提取物含有的多酚类化合物主要包括表儿茶素、香草酸、异荭草素、阿魏酸、(反)阿魏酸、芦丁、槲皮苷、杨梅素、三叶苷、槲皮素和山奈酚。多酚化合物的含量如表 1 所示, 其中

含量最高的是芦丁，接着是三叶苷和异荳草素。此前 Zhang 等^[11]报道了从凤眼果壳提取物鉴定出八种多酚类化合物，包括表儿茶素、原儿茶酸、阿魏酸、没食子酸、对香豆酸、咖啡酸、槲皮素和对羟基肉桂酸，并对其分别进行定量，其中表儿茶素和原儿茶酸的含量高于其他 6 种多酚类化合物，分别为 56.6 μg/g DW 和 21.1 μg/g DW。其中鉴定出来的表儿茶素、阿魏酸和槲皮素与我们本次鉴定的结果一致。植物含有的多酚及黄酮类物质因其良好的抗氧化活性等特性受到广泛关注，如芦丁、表儿茶素、槲皮素等均具有较好的抗氧化活性^[23-25]，乙酸乙酯相提取物所表现出的抗氧化活性与其含有的多酚类化合物具有一定的联系。

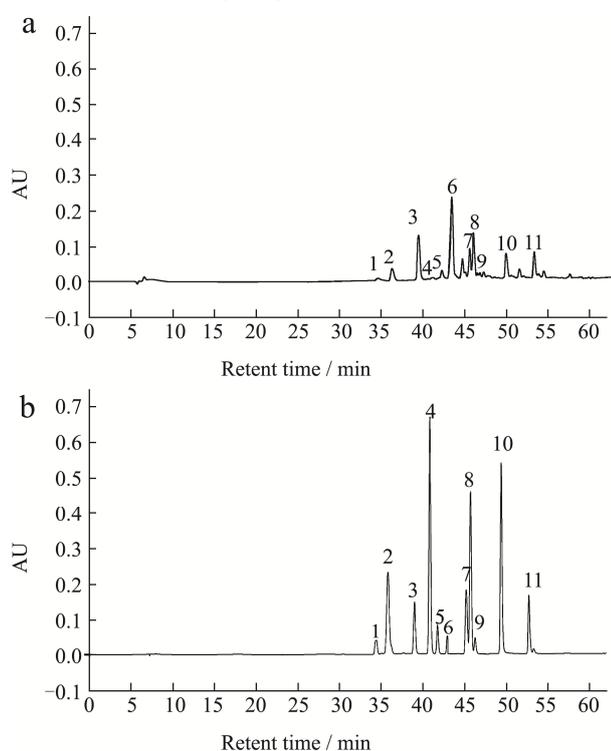


图 8 乙酸乙酯相提取物和标准品的高效液相分析图

Fig.8 The chromatogram for EAF and the standards

注：a：EAF；b：标准品；各化合物依次为 1-表儿茶素、2-香草酸、3-异荳草素、4-阿魏酸、5-（反）阿魏酸、6-芦丁、7-槲皮苷、8-杨梅素、9-三叶苷、10-槲皮素和 12-山奈酚。

2.2.5 凤眼果壳乙酸乙酯相提取物的抗增殖活性

选择抗氧化活性较好的 EAF，测定 EAF 对人肺癌细胞 A549 的抗增殖作用。结果如图 9 所示，与对照组相比，乙酸乙酯相提取物对 A549 细胞的增殖具有剂量依赖性抑制作用。当 EAF 的浓度为 0~50 μg/mL 时，对 A549 细胞的增殖抑制率并不明显，抑制率在 20% 以下。当 EAF 的浓度为 60 μg/mL 时，A549 细胞的增殖抑制率为 24.84%。EAF 浓度达到 70 μg/mL 时，A549 细胞的增殖抑制率为 47.47%。EAF 的浓度达到

100 μg/mL 时，对 A549 细胞的增殖抑制率达到 64.72%。同时从 EAF 对 A549 细胞的细胞毒性评价结果发现，当 EAF 提取物的浓度为 0~90 μg/mL 时，细胞毒性均小于 10%，当浓度达到 100 μg/mL 时，细胞毒性为 17.33%，说明 EAF 提取物的浓度为 0~90 μg/mL 时，EAF 的细胞毒性对 A549 细胞的增殖影响较小。通过计算可得到 EAF 抑制 A549 细胞增殖的 EC₅₀ 值为 85.70±3.60 μg/mL。已有研究表明槲皮素能有效抑制癌细胞的增殖^[26]，Anna 等^[27]通过 MTT 法测定槲皮素抑制 A549 细胞的增殖，发现 A549 细胞生长受到 50% 抑制时，槲皮素的浓度为 22.35 μg/mL，与本研究相比，槲皮素对 A549 细胞的增殖抑制能力强于 EAF，是 EAF 的 3.83 倍，同时也说明 EAF 具有较好的抑制 A549 细胞的增殖的能力。除了槲皮素之外，表儿茶素、槲皮苷等多酚类化合物均被发现具有一定的抗癌细胞增殖活性，表儿茶素的抗癌细胞增殖活性与其抗氧化活性、抗血管生成作用及其细胞毒性有关^[28]，槲皮苷能通过调节免疫反应抑制肺癌细胞的增殖并促进其发生细胞凋亡^[29]。此外，乙酸乙酯相中含有其他的有效成分，如山奈酚和芦丁等多酚类化合物都是具有抗癌细胞增殖活性的常见化合物^[30,31]，因此，乙酸乙酯相提取物含有的多酚类化合物与其抗增殖活性具有重要联系。

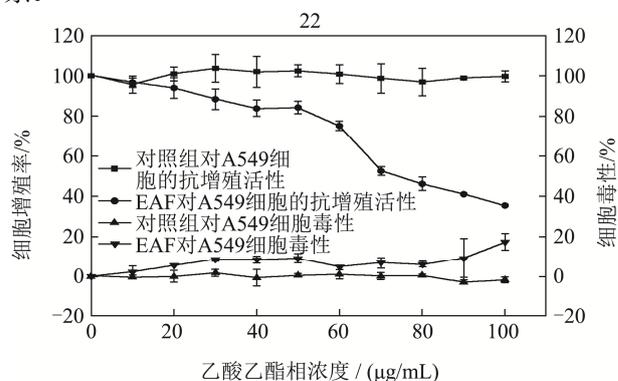


图 9 EAF 对 A549 细胞的细胞毒性和抗增殖活性

Fig.9 The cytotoxicity and antiproliferative activities of EAF against A549 cells

3 结论

结果显示凤眼果壳游离态多酚的总多酚和总黄酮含量比结合态多酚高，表明凤眼果的多酚和黄酮类化合物主要以游离态的形式存在。在萃取后的四相提取物中，乙酸乙酯相提取物的总多酚和总黄酮含量最高。综合 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和还原力三个抗氧化实验结果，发现乙酸乙酯相提取物的抗氧化能力高于结合态多酚和其它三相萃取后的提取物。此外，乙酸乙酯相提取物显示出对人肺癌细

胞 A549 的剂量依赖性抑制作用。从这项研究获得的结果表明, 凤眼果壳的多酚和黄酮类化合物主要以游离态的形式存在, 同时凤眼果壳多酚提取物具有较好的抗氧化和抗人肺癌细胞 A549 增殖活性, 可发现凤眼果壳是天然多酚类化合物的潜在来源, 并且可能有助于开发新的如抗氧化剂, 抗癌潜在药物等功能性试剂, 为凤眼果壳后期的开发和利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 李一伟,陆玉英,陈香玲,等. 苹婆(*Sterculia nobilis* Smith)种胚营养及保健性评价[J].南方农业学报,2012,43(5):641-648
LI Yi-wei, LU Yu-ying, CHEN Xiang-ling, et al. Nutritional and health care valuation of seed embryo *Sterculia nobilis* Smith [J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(5): 641-648
- [2] 任惠,周婧,李一伟,等. 苹婆种子营养及抗氧化活性[J].植物科学学报,2013,31(2):203-208
REN Hui, ZHOU Jing, LI Yi-wei, et al. Study on nutrition and antioxidant activities of *Sterculia nobilis* Smith seeds [J]. Plant Science Journal, 2013, 31(2): 203-208
- [3] SONG Jia-le, SUN Peng, WANG Rui, et al. Gastroprotective effects of methanolic extract of *Sterculia nobilis* Smith seeds in reserpine - induced gastric ulcer in mice [J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 39(3): 230-237
- [4] 国家中医药管理局编委会. 中华本草[M]. 上海科学技术出版社, 1999
Editorial Board of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica [M]. Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999
- [5] TANG Yao, LI Xi-hong, ZHANG Bing, et al. Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 380-388
- [6] Wojdyło Aneta, Nowicka Paulina, Carbonell-barrachina Ángel A, et al. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 25: 421-432
- [7] WANG Rong-rong, DING Sheng-hua, ZHAO Dan-dan, et al. Effect of dehydration methods on antioxidant activities, phenolic contents, cyclic nucleotides, and volatiles of jujube fruits [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(1): 137-143
- [8] Direito Rosa, Lima Ana, Rocha João, et al. *Dyospiros kaki* phenolics inhibit colitis and colon cancer cell proliferation, but not gelatinase activities [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 46: 100-108
- [9] CHEN Chao, WANG Li, WANG Ren, et al. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats [J]. Food Chemistry, 2018, 239: 260-267
- [10] Baby Bincy, Antony Priya, Vijayan Ranjit. Antioxidant and anticancer properties of berries [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(15): 2491-2507
- [11] ZHANG Jiao-jiao, LI Ya, LIN Sheng-jun, et al. Green extraction of natural antioxidants from the *Sterculia nobilis* fruit waste and analysis of phenolic profile [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1059
- [12] WEN Ling-rong, YOU Li-jun, YANG Xiao-man, et al. Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 84: 171-184
- [13] WEN Ling-rong, GUO Xing-bo, LIU Rui-hai, et al. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" [J]. Food Chemistry, 2015, 186: 54-62
- [14] WANG Hong, QIU Cai-sheng, Abbasi Arshad M, et al. Effect of germination on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(12): 2545-2553
- [15] ZHAO Yi, CHEN Ming-shun, ZHAO Zhen-gang, et al. The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 112-118
- [16] ZHAO Zhen-gang, YAN Huai-feng, ZHENG Rui, et al. Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 113: 38-45
- [17] ZHENG Rui, SU Shan, ZHOU Hui-fang, et al. Antioxidant/antihyperglycemic activity of phenolics from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 101: 104-114
- [18] 游丽君,张云林,温玲蓉,等. 不同提取方法对龙须菜多糖性质的影响[J].现代食品科技,2016,32(6):148-155
YOU Li-jun, ZHANG Yun-lin, WEN Ling-rong, et al. Effect of extraction method on the properties of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 148-155

- [19] Felice Dana L, SUN Jie, LIU Rui-hai. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 109-118
- [20] LI Yuan, WANG Cheng-tao, TAO Zi, et al. Enhanced antioxidant and antiproliferative activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils in microemulsion [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(18): 15173-15181
- [21] ZHENG Rui, SU Shan, LI Jian-bin, et al. Recovery of phenolics from the ethanolic extract of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 107: 360-369
- [22] 胡会刚,赵巧丽. 芒果皮渣多酚的提取分离及抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 53-62
- HU Hui-gang, ZHAO Qiao-li. Extraction, separation and antioxidant activity of polyphenols from mango pomace [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 53-62
- [23] Yilmaz Yusuf, Toledo Romeo T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(2): 255-260
- [24] YANG Jianxiong, GUO Juan, YUAN Jiangfeng. *In vitro* antioxidant properties of rutin [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41(6): 1060-1066
- [25] Bentz Alexandra B. A review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability [J]. Journal of Young Investigators, 2017
- [26] Gibellini Lara, Pinti Marcello, Nasi Milena, et al. Quercetin and cancer chemoprevention [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 2011(3): 591356
- [27] Klimaszewska-wisniewska Anna, Hałas-wisniewska Marta, Izdebska Magdalena, et al. Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton [J]. Acta Histochemica, 2017, 119(2): 99-112
- [28] Abdulkhaleq Layth Abdulmajeed, ASSI Mohammed Abdulrazzaq, Noor Mohd Hezmee Mohd, et al. Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer [J]. Veterinary World, 2017, 10(8): 869
- [29] CINCIN Zeynep Birsu, UNLU Miray, KIRAN Bayram, et al. Molecular mechanisms of quercetin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer [J]. Archives of Medical Research, 2014, 45(6): 445-454
- [30] Chen Allen Y, Chen Yi Charlie. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention [J]. Food Chemistry, 2013, 138(4): 2099-2107
- [31] Perk Aliye Aras, Shatynska-mytsyk Iryna, Ger ek Yusuf Can, et al. Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells [J]. Cancer Cell International, 2014, 14(1): 124

(上接第 301 页)

- [18] Rothman I. The Use of Just-about-right (JAR) Scales in Food Product Development and Reformulation in Consumer-led Food Product Development [M]. USA: Blackwell Pub Professional, 2009
- [19] Romano R, Davino C, Naes T. Classification trees in consumer studies for combining both product attributes and consumer preferences with additional consumer characteristics [J]. Food Quality and Preference, 2014, 33: 28-33
- [20] Estiaga C E. Bootstrapping Penalty Analysis in Sensory Evaluation of Pizza Products [M]. Manila: The Philippine Statistician, 2015: 70-92