

胡椒叶抗氧化能力分析及其活性成分分离鉴定

张水平^{1,2}, 谷凤林^{1,3}, 贺书珍^{1,3}, 王庆煌^{1,3}

(1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533)(2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

(3. 农业部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海南万宁, 571533)

摘要: 胡椒果与叶都具有抗氧化活性, 而叶还具有抗动脉粥样硬化功能, 但胡椒叶的活性因子并不明确, 另摘叶可以提高胡椒产量, 为给胡椒叶开发利用提供理论依据, 本文用氧自由基清除能力 (ORAC) 方法评价了胡椒叶的抗氧化活性, 结果表明胡椒叶 ORAC 值为 3639.05 $\mu\text{mol TE/g}$, 高于胡椒果 (胡椒鲜果、白胡椒和黑胡椒); 通过系统溶剂提取法, 确定了胡椒叶的乙醇提取物的 ORAC 值最高; 以 ORAC 检测方法作为分离鉴定抗氧化活性物质的追踪方法, 对胡椒叶乙醇提取物依次萃取和采用硅胶层析、凝胶层析、反相层析、薄层层析及 HPLC 等方法分离纯化得到活性目标物, 通过核磁共振和质谱等手段鉴定与表征, 首次从胡椒中分离得到两种具有较高抗氧化活性的扁柏脂素和野漆树苷, 其 ORAC 值分别为 16070 $\mu\text{mol TE/g}$ 和 10823 $\mu\text{mol TE/g}$.

关键词: 胡椒; 氧自由基清除能力 ORAC; 扁柏脂素; 野漆树苷

文章编号: 1673-9078(2015)2-63-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.012

Separation and Identification of the Active Ingredients in *Piper nigrum* L.

Leaves and Analysis of Their Antioxidant Activity

ZHANG Shui-ping^{1,2}, GU Feng-lin¹, HE Shu-zhen^{1,3}, WANG Qing-huang^{1,3}

(1. Spice and Beverage Research Institute, CATAS, Wanning 571533, China) (2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China) (3. National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research, Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture, Wanning 571533, China)

Abstract: The leaves and fruit of *Piper nigrum* Linnaeus (black pepper) exhibit antioxidant activities; the leaves also possess anti-atherosclerotic properties, and the removal of black pepper leaves can increase the yield of pepper fruits. However, the active components in the leaves of *Piper nigrum* L. were not clear. In order to provide a theoretical basis for the exploitation of *Piper nigrum* leaves, the antioxidant activity was analyzed by oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The results indicated that the ORAC value of the *Piper nigrum* leaves was 3639.05 $\mu\text{mol TE/g}$, which was greater than that of the *Piper nigrum* fruits (fresh, black, and white). Through serial solvent extractions, the ethanol extract of *Piper nigrum* leaves was determined to have the highest ORAC value. Using the ORAC detection method as the tracing method for the separation and identification of antioxidative components, the active target compounds were isolated after successive extractions of the ethanol extracts of *Piper nigrum* leaves, followed by silica gel chromatography (Sephadex LH-20 resin), gel-filtration chromatography, reversed-phase chromatography, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography. The identification and characterization experiments carried out using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS) confirmed that hinokinin and rhoifolin-two active ingredients with high antioxidant activities-were separated from *Piper nigrum* leaves, and their ORAC values were 16070 $\mu\text{mol TE/g}$ and 10823 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively.

Key words: *piper nigrum* Linnaeus; oxygen radical absorbance capacity; hinokinin; rhoifolin

胡椒是一种世界著名辛辣调味品,同时是印度传统医学广泛应用的香辛料药物之一^[1],胡椒在世界香

收稿日期: 2014-07-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD03)

作者简介: 张水平 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 谷凤林 (1976-), 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 食品化学

料作物中占有重要地位, 为国际贸易总量较大的农产品之一, 且长期以来, 国际胡椒市场存在需求旺盛与供应不足的矛盾^[2]。中国胡椒种植面积和产量分别约为 3 万公顷和 3 万 t, 分别居世界的第 6 位和第 5 位, 其中海南省就占据了 90% 以上, 但是胡椒加工产品多为初级产品, 导致胡椒产品附加值低, 限制了胡椒产业的发展。

胡椒叶的粗提物有显著抗氧化效果。Agbor 等^[3]发现胡椒叶甲醇提取物具有显著抗氧化和抗动脉粥样硬化功能,首次证明 *Piper nigrum*、*P.guineense* 和 *P.umvellatum* 的叶片能够阻止喂食易导致动脉粥样硬化发展的仓鼠的动脉粥样硬化的发展,胡椒提取物通过清除活性氧可以使生物体内的抗氧化防御状态保持住,同时提出,胡椒叶提取物能够降低血浆胆固醇的能力可以用来开发减肥产品。但胡椒叶的活性因子并不清楚,因此有必要对其进行活性成分的鉴定。另外,人们具有胡椒叶的食用实践。在泰国的生药市场上可以买到胡椒的叶和茎,说明当地人已经用胡椒叶来治疗某些疾病了^[4]。另外同属胡椒科胡椒属的蒟(蒟叶)也有食用途径,一是制作调味品蒟酱,二是取叶与槟榔一起嚼食^[5]。开发利用胡椒叶一举两得。张华昌^[6]研究表明,胡椒叶面积与胡椒产量成极显著的负相关,采取摘叶的方法可以促进开花。

综上,胡椒叶可能具有潜在的开发应用价值。如可用胡椒叶来开发抗动脉粥样硬化的功能食品或相关抗氧化功能食品,则更具实用意义。关于胡椒的植物化学的研究可以追溯到很久以前,但以抗氧化活性为指标进行活性追踪进行的胡椒叶化学成分的分纯化则鲜见。

1 材料与方法

1.1 实验原料

胡椒鲜果、胡椒叶,采摘于中国热带农业科学院香料饮料研究所基地;胡椒鲜果八、九成熟,冻藏于-25℃冰箱内;黑胡椒,白胡椒,中国热带农业科学院香料饮料研究所采用传统方法加工;系统溶剂提取用完全稳定胡椒叶,2012年12月10日采于中国热带农业科学院香料饮料研究所基地,真空冷冻干燥粉碎待用;分离纯化用完全稳定胡椒叶,2013年4月3日左右于中国热带农业科学院香料饮料研究所采摘印度大叶种胡椒叶。

1.2 主要试剂与仪器设备

1.2.1 实验试剂

荧光素钠(FL),分析纯,阿拉丁生产;2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH),纯度99%,沃凯生产;6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸(Trolox),纯度为97%,SIGMA生产。

1.2.2 仪器设备

RV10 旋转蒸发器, IKA; MB45 快速水分测定仪, OHAUS; HJ-4 恒温磁力加热搅拌器, 金坛市宏华仪

器厂; FD-2 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; QE-300 g 高速万能粉碎机, 浙江屹立工贸有限公司; MS3 basic 漩涡混合器, 德国 IKA 公司; Z36HK 全能台式高速冷冻离心机, 德国 Hermle 公司; Infinite F200 Pro 多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; 配有 DAD 检测器的安捷伦 1290 HPLC, 美国安捷伦公司; Nicolet6700 傅里叶变换近红外光谱, 美国 Thermo Fisher; AV-500 型超导核磁仪(TMS 为内标, 500 MHz, 5×180 mm 核磁管, 1~30 mg 样品, 氘代溶剂溶解), 瑞士 Bruker 公司; Auto spec-3000 质谱仪(约 0.1 mg 样品, 色谱甲醇溶解, 扫描分子量范围 100~1000), 瑞士 Bruker 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

1.3.1.1 胡椒叶与胡椒果抗氧化能力比较用提取液制备

胡椒果与胡椒叶经真空冷冻干燥, 粉碎后过 60 目筛。称取相同干重质量 2.00 g 的样品, 胡椒鲜果、黑胡椒、白胡椒分别加入高纯水(1:4 m/V)均质, 胡椒叶加入高纯水(1:8 m/V)漩涡振荡混匀, 低温冷冻离心(4℃, 离心力 10000×g) 10 min, 收集上清液, 并冲洗合并水溶液, 得水溶性提取物。沉淀物加入丙酮(1:4 m/V), 室温下漩涡振荡混合 30 min, 低温冷冻离心(4℃, 离心力 10000×g) 10 min, 收集上清液, 得脂溶性提取物, 用提取溶剂定容至相同体积 50 mL, 得 8 个样品。水提取物分别记为鲜-W (F-W)、黑-W (B-W)、白-W (W-W) 和叶-W (L-W), 丙酮提取物分别记为鲜-A (F-A)、黑-A (B-A)、白-A (W-A) 和叶-A (L-A)。

同上再次提取, 丙酮提取液挥干去除丙酮, 与水提取液进行真空冷冻干燥, 计算收率, 并把这 8 个提取物用提取溶剂配成相同质量浓度(0.5 mg/mL)的待测液, 分别记为鲜-1 (F-1)、黑-1 (B-1)、白-1 (W-1) 和叶-1 (L-1)、丙酮提取物分别记为鲜-2 (F-2)、黑-2 (B-2)、白-2 (W-2) 和叶-2 (L-2)。

1.3.1.2 胡椒叶系统溶剂提取物制备

参考戴冰等^[7]系统溶剂法提取工艺研究, 并做适当调整。称取 50 g 稳定胡椒叶粉末, 加入 1000 mL 石油醚(bp 60~90℃), 常温搅拌浸提 10 h, 过滤得浸提液于下 50℃旋转蒸发出大部分有机试剂后, 转移出来于 50℃烘箱中干燥得 L1; 过滤所得残渣中加入同样体积乙酸乙酯同以上方法得 L2; 乙酸乙酯过滤所得滤渣同样方法用无水乙醇浸提得 L3; 最后在残渣中加入 1000 mL 高纯水浸提 10 h, 70℃旋转蒸发, 真空

冷冻干燥得 L4。L1、L2、L3 和 L4 存放在-23 °C 冰箱内待用。

1.3.1.3 抗氧化成分分离鉴定用叶片制备

把采摘叶片于 50±2 °C 烘箱内烘约 12 h, 用万能粉碎机粉碎, 过 20 目筛, 共得 2.67 kg 胡椒叶粉末。胡椒叶粉末用工业乙醇浸泡 3 次, 合并三次浸泡液, 50 °C 下真空旋转蒸发浓缩至无醇味, 然后把浓缩物分散于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 2 次, 分别 50 °C 减压浓缩得各部分浸膏。

1.3.2 ORAC 测定

参考 Huang 等^[8]的方法, 并做适当改动。首先用 8 通道移液枪在 96 孔板上用磷酸缓冲液把待测样品和标准液稀释成为 6 个不同浓度的待测液, 并做一个重复; 然后, 用 96 孔板检测, 每个板孔加入待测样品 30 μL, 荧光素溶液 140 μL, 将反应板放入酶标仪中 37 °C 恒温 20 min 后, 每孔加入 30 μL AAPH, 用移液枪吹打充分混匀。开始测定, 480 nm 激发光, 520 nm 发射光, 3 min 循环一次, 共循环 40 次, 即测量 2 个小时。

1.3.3 抗氧化活性成分分离纯化

1.3.3.1 乙酸乙酯部分

其中乙酸乙酯部分 170 g, 先用 200~300 目硅胶减压层析柱进行粗分, 流动相为氯仿:甲醇=1:0~0:1, 对流份进行 ORAC 活性测定, 然后对高活性流份①进行 200~300 目硅胶加压层析柱进一步分离, 流动相为石油醚:乙酸乙酯=10:1~1:1, 对流份进行 ORAC 活性测定, 最后用硅胶 H 减压层析柱对 E-①-8 进行纯化, 得到高抗氧化性物质 E-①-8-3。层析过程用硅胶薄层层析点板、紫外荧光显色和 10% 硫酸乙醇溶液显色追踪。

1.3.3.2 正丁醇部分

其中正丁醇部分 70 g, 先用硅胶 H 减压层析柱进行粗分, 流动相为氯仿:甲醇=1:0~0:1, 对流份进行 ORAC 活性测定。用 Sephadex LH-20 进一步纯化 n-6, n-6-2 过 Sephadex LH-20 柱, 甲醇洗脱, 得 n-6-2 主部分; n-6-2 主部分过型号为 YMC-ODS-A-HG 的反相柱, 甲醇水溶液梯度洗脱, 得 n-6-2c。层析过程用硅胶薄层层析点板、紫外荧光显色和 10% 硫酸乙醇溶液显色追踪。

1.3.4 纯度鉴定

1.3.4.1 E-①-8-3

显色纯度鉴定: 薄层层析用三个流动相系统(石油醚:乙酸乙酯=4:1、石油醚:丙酮=4:1、石油醚:二氯甲烷=1:4)展开, 分别用紫外荧光、10% 硫酸的乙醇溶液与碘蒸气显色;

HPLC 纯度鉴定: 少量样品用色谱甲醇溶解, 进样量 10 μL, 流速 0.300 mL/min, 流动相为乙腈:水=35:65 (20 min), 然后梯度洗脱到乙腈:水=80:20, 空白为纯色谱甲醇溶液。

1.3.4.2 n-6-2c

HPLC 纯度鉴定: 少量样品用色谱甲醇溶解, 进样量 10 μL, 流速 0.300 mL/min, 流动相为 40% 的甲醇水溶液 (25 min), 空白为纯色谱甲醇溶液。

1.3.5 结构鉴定

1.3.5.1 E-①-8-3

红外分析: KBr 压片, 丙酮溶解的样品滴于 KBr 片上, 挥干溶剂, 红外扫描, 得红外光谱;

质谱分析: 用色谱甲醇溶解, 送样中国热带农业科学院生物技术研究所;

核磁共振分析: 称取约 10 mg 样品, 样品用氘代氯仿溶解, 核磁管高度装到 4 cm 左右, 盖上管帽, 用封口膜密封, 在标签纸上注明样品编号, 用透明胶带贴于核磁管上端。送样中国热带农业科学院生物技术研究所。

1.3.5.2 n-6-2c

质谱分析: 用色谱甲醇溶解, 送样中国热带农业科学院生物技术研究所;

核磁共振分析: 称取约 4 mg 样品, 样品用氘代甲醇溶解, 核磁管高度装到 2.8~4 cm 之间, 盖上管帽, 用封口膜密封, 在标签纸上注明样品编号, 用透明胶带贴于核磁管上端。送样中国热带农业科学院生物技术研究所。

1.3.6 数据分析

所有数据用 Excel、Origin、SAS 软件处理及仪器自带软件处理, 差异显著性水平 $p < 0.05$, 平均数之间的比较采用极差检验。

2 结果与讨论

2.1 ORAC 方法评价胡椒叶抗氧化能力

从图 1 和图 2 中, 可以看出胡椒叶的提取物活性显然高于胡椒果, 且三种胡椒果之间的活性大小依次为鲜果 > 黑胡椒 > 白胡椒; 总之, 由 ORAC 活性的比较得到胡椒叶提取液清除氧自由基的能力是显著大于相同质量胡椒果提取液, 这与用 DPPH 自由清除能力与多酚含量测量的结果是一致的^[9]。

由表 2 可知, 胡椒叶的 ORAC 值为 3639.05 μmol TE/g。与文献报道中的具有抗氧化活性的香辛料、果蔬等比较, 胡椒叶的抗氧化能力是较强的。

意大利科学家 Paolino Ninfa^[10]对 27 种蔬菜、15

种芳香草药和意大利中部消费的一些香辛料的抗氧化能力进行了研究，其中抗氧化能力最强的小茴香（768.00 $\mu\text{mol TE/g}$ ）和鲜姜（148.40 $\mu\text{mol TE/g}$ ）也没有本文中胡椒果和胡椒叶的总抗氧化能力高，不过表中酚类物质的提取跟本文并不是一致的，文献中的提取方法为样品粉末用丙酮和 5% 的高氯酸来提取，二者比例为 1:5 (m/V)，这在一定程度上可能会影响结果。

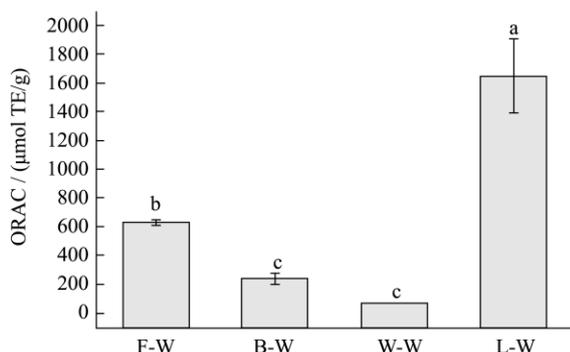


图1 胡椒果与叶水提取物 ORAC 比较

Fig.1 Comparison of ORAC values of *Piper nigrum* fruit and leaves, extracted by water from leaves and fruits

注：数据组间字母不同表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)，下同。

下同。

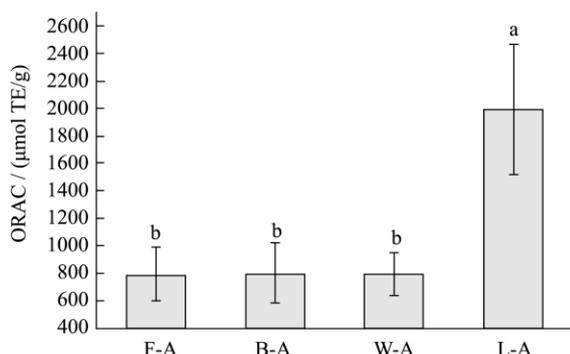


图2 胡椒果与叶丙酮提取物 ORAC 比较

Fig.2 Comparison of ORAC values of *Piper nigrum* fruit and leaves, extracted by acetone

表2 胡椒果与胡椒叶的 ORAC 值

Table 2 Comparison of ORAC values of fruits and leaves from

	<i>Piper nigrum</i>			
	ORAC 值/($\mu\text{mol TE/g}$)			
	F	B	W	L
水提取液	638.68	251.98	56.07	1649.25
丙酮提取液	786.76	799.53	791.37	1989.80
总体	1425.44	1051.51	847.44	3639.05

张芳轩等对黑大豆种皮的抗氧化活性进行了研究^[11]，60 个黑大豆种质的 ORAC 值的变幅为 212.5~1834.6 $\mu\text{mol TE/g}$ ，由本文可知，黑大豆的清除氧自由

基的能力与胡椒果大致相当，且显著低于胡椒叶的清除氧自由基的能力。但是张芳轩等的研究与本文对样品的提取方法有些差别，前者的提取方法为：先用石油醚脱脂，再用 60% 的酸化甲醇提取。

Wu 等^[12]的研究表明美国市场上香味料的总 ORAC 值是显著高于其他种类的食物：水果 (<100 $\mu\text{mol TE/g}$)、蔬菜 (<150 $\mu\text{mol TE/g}$)、坚果 (<200 $\mu\text{mol TE/g}$)、干水果 (<100 $\mu\text{mol TE/g}$)、谷物 (<30 $\mu\text{mol TE/g}$) 等总 ORAC 的。其中肉桂 (2675.36 $\mu\text{mol TE/g}$) 和丁香 (3144.46 $\mu\text{mol TE/g}$) 的抗氧化能力最强，但都低于胡椒叶的 ORAC 值，而有一点是值得注意的，在样品的制备方面，本实验与 Wu 等^[12]方法有区别，Wu 等用 hexane/dichloromethane (1:1, Hex/Dc) 提取脂溶性抗氧化成分，之后用 acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5; AWA) 提取水溶性抗氧化成分，而本实验是用蒸馏水提取水溶性抗氧化成分，之后用纯丙酮提取脂溶性抗氧化成分。这使比较的可靠性降低。

Ou 等^[13]用 ORAC 法评价普通蔬菜，50% 丙酮水溶液提取测试，其值均低于 200 $\mu\text{mol TE/g}$ 。Ou 等^[14]根据中医的阴阳理论，提出了阴-阳平衡即时抗氧化-氧化平衡(阴代表抗氧化，阳代表氧化)的理论，对中药里的属阴属阳药物进行了 ORAC 能力测量，得出属阴本草的 ORAC 值高于属阳的。作者对样品的处理是 50% 丙酮水溶液提取得测试样品，它们的 ORAC 值也没有本实验中胡椒叶的高。

根据塔夫茨实验室检测，大多数美国人每天应该摄入抗氧化剂 3500 ORAC 以上才能显著提高体内的抗氧化活性。每天进食 5000 ORAC 到 6000 ORAC 单位抗氧化剂会使保护性能更完善。由本实验可知，每天进食添加有 2 g 胡椒叶提取物的食物即可满足要求。

2.2 胡椒叶系统溶剂提取物抗氧化能力分析

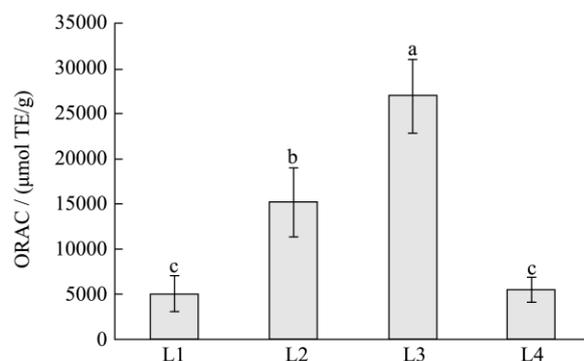


图3 胡椒叶系统溶剂提取物 ORAC 值

Fig.3 ORAC values of serial solvent extractions of *Piper nigrum* leaves

通过比较不同溶剂提取部位的 ORAC 值, 如图 3 所示, 胡椒叶乙醇提取物的抗氧化活性最高。

2.3 胡椒叶抗氧化活性成分分离鉴定

2.3.1 分离纯化

2.3.1.1 E-①-8-3

胡椒叶乙酸乙酯萃取部位用减压硅胶柱粗分得 14 个流份, ORAC 检测结果如图 4 所示。

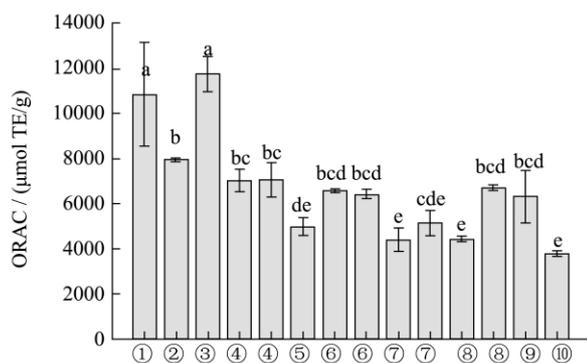


图 4 乙酸乙酯部位各洗脱梯度 ORAC 值

Fig.4 ORAC values of 14 fractions of ethyl acetate extraction

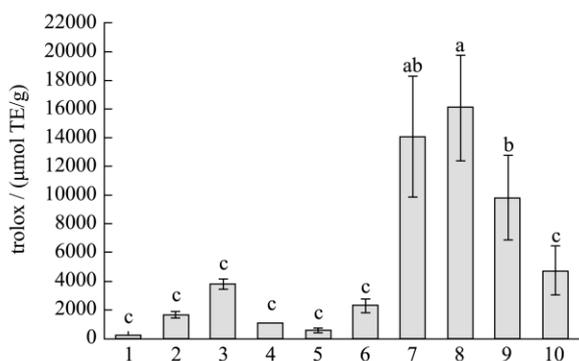


图 5 乙酸乙酯高活性流份①各洗脱部分 ORAC 值

Fig.5 ORAC values of ten sub-fractions of ethyl acetate fraction

1 with high activity

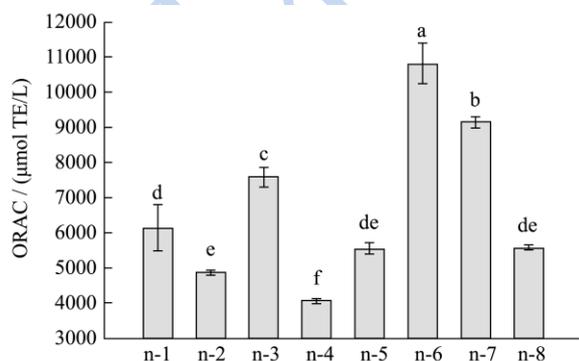


图 6 正丁醇部位 8 个流份的 ORAC 值

Fig. 6 ORAC values of eight sub-fractions of butanol fraction

为了找到抗氧化活性的物质基础, 用加压硅胶柱对流份①进行细分, 得到 10 个流份, ORAC 检测结果如图 5 所示。可知, E-①-8 和 E-①-7 活性没有显

著性差异, E-①-9 次之, 但 E-①-7 和 E-①-9 的主要成分为 E-①-8。

为了进一步得到纯物质, 用硅胶减压柱对组分 E-①-8 进行纯化, 除去了及少量的较小极性其他成分, 得约 1.1 g 淡黄色半固态物 E-①-8-3。

2.3.1.2 n-6-2c

正丁醇部位过硅胶柱, 得流份 8 个, 各流份的抗氧化活性如图 6, 其中流份 n-6 的活性最高, 除去少量其他成分得到黄色结晶状物质 n-6-2c。

2.3.2 纯度鉴定

薄层色谱鉴定 E-①-8-3 与 n-6-2c 均为单点纯。高效液相鉴定 E-①-8-3 为色谱纯, n-6-2c 的纯度也达到了 97% 以上。如图 7 所示。

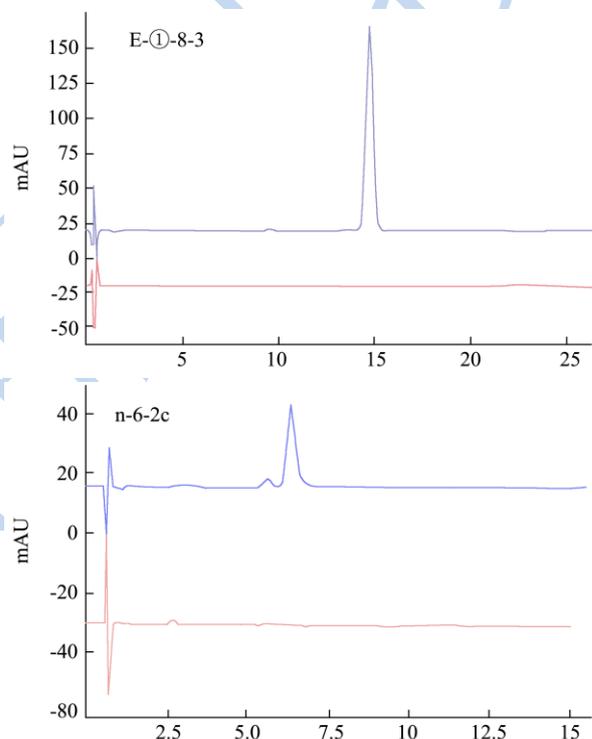


图 7 E-①-8 与 n-6-2c 的 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of E-①-8 and n-6-2c

2.3.3 结构鉴定

2.3.3.1 E-①-8-3

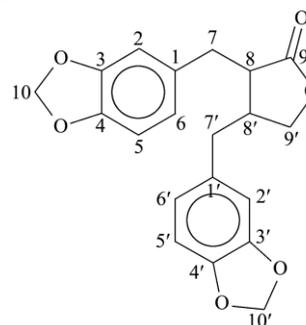


图 8 E-①-8-3 的分子结构式及编号

Fig.8 Chemical structure of E-①-8-3 and serial number

该物质为黄色半油状物，易溶于氯仿等有机溶剂。化合物经 ESI-MS 分析，分子质量为 354(m/z 377.2 [M+Na]⁺)，经氢谱、碳谱和 dept135 分析，并结合文献^[15-16]报道确定该化合物为 E-①-8-3 为二苯基丁内酯类化合物扁柏脂素，结构式及编号见图 8，E-①-8-3 波谱归属见表 3。

表 3 E-①-8-3 溶于 CDCl₃ 的 NMR 数据

Table 3 NMR Data for E-①-8-3 in CDCl₃

position	δc, mult	δH(J/in Hz)
1	131.7, qC	
2	109.6, CH	6.57, s
3	148.0, qC	
4	146.6, Qc	
5	108.5, CH	6.64, d(8.5)
6	122.4, CH	6.64, d(8.0)
7a	38.5, CH ₂	2.53, d(8.3)
7b	38.5, CH ₂	2.40, m
8	46.6, CH	2.48, dd(8.4, 13.7)
9	178.6, qC	
10(-OCH ₂ O-)	101.2, CH ₂	5.88, s
1'	131.5, qC	
2'	109.0, CH	6.41, s
3'	148.0, qC	
4'	146.5, qC	
5'	108.4, CH	6.68, d(8.0)
6'	121.7, CH	6.41, d(3.5)
7'a	35.0, CH ₂	2.78, dd(7.3, 14.1)
7'b	35.0, CH ₂	2.93, dd(5.0, 14.1)
8'	41.4, CH	2.40, m
9'a	71.3, CH ₂	3.87, m
9'b	71.3, CH ₂	4.01, m
10'(-OCH ₂ O-)	101.2, CH ₂	5.88, s

注：500MHz 下做 ¹H NMR，125 MHz 下做 ¹³C NMR，由 DEPT 和 HSQC 推测碳上氢的数量。

从乙酸乙酯部位分离纯化得到的高抗氧化活性物质 E-①-8-3 经结构鉴定为木脂素类物质扁柏脂素，首次从 *Piper nigrum* L 中分离得到。本文测得的扁柏脂素的活性为 16070 μmolTE/g。

抗氧化剂的抗氧化原理有充当还原剂（如维生素 C）、自由基终止剂（如 BHA）、氢过氧化物分解剂（如硫二丙酸）等^[17]。目前，根据文献报道^[17]ORAC 实验的原理是典型的氢原子转移终止自由基反应机制。从扁柏脂素的结构来看，它不含有活泼的氢质子，本实验测得它具有高抗氧化活性与 ORAC 实验的原理不相符，这可能是扁柏脂素在反应系统里生成了活泼

氢或者该实验可能存在其它的反应机制，这需要进一步的探讨。另外 Timple 等^[18]发现扁柏脂素具有调节人类单胺和 GABA 转运体的活性。

2.3.3.2 n-6-2c

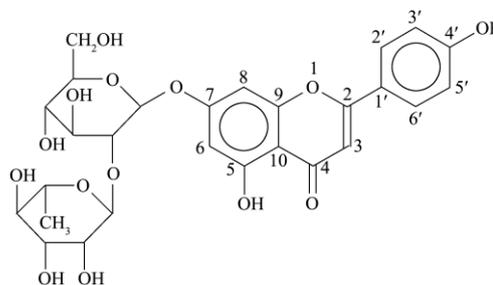


图 9 n-6-2c 分子结构式及编号

Fig.9 Chemical structure of n-6-2c and serial number

表 6 n-6-2c 溶于 CD₃OD 的 NMR 数据

Table 6 NMR Data for n-6-2c in CD₃OD

position	δc, mult	δH(J in Hz)
2	166.8, qC	
3	104.2, CH	6.67, s
4	184.1, qC	
5	163.0, qC	
6	102.7, CH	5.22, d(2)
7	164.3, qC	
8	95.9, CH	6.76, d(2.5)
9	163.0, qC	
10	107.0, qC	
1'	123.1, qC	
2'	129.7, CH	7.9, s
3'	117.1, CH	6.95, s
4'	159.0, qC	
5'	117.1, CH	6.93, s
6'	129.6, CH	7.89, s
Glu-1	100.1, CH	5.17, d(7)
2	77.1, CH	4.00, m
3	77.0, CH	4.00, m
4	69.9, CH	3.87, m
5	74.0, CH	3.40, tri(9.5)
6	67.0, CH ₂	3.96, m
Rha-1	100.9, CH	6.46, d(2.0)
2	72.3, CH	3.94 ^c , m
3	72.2, CH	3.61 ^c , m
4	74.6, CH	3.81, m
5	70.0, CH	3.90, m
6	18.2, CH ₃	1.32, d (10.0)
羟基质子		0.98, tri (7.0), 3.79 (1.5), 4.62, s;

注：上标“c”表示不确定，可交换；500 MHz 下做 ¹H NMR，125

MHz下做¹³C NMR, 由DEPT和HSQC推测碳上氢的数量。

黄色晶体, 易溶于甲醇等, 该化合物 ESI-MS m/z: 255.5[M+H-Oglu. Rha], 339.7[M+CH₃OH-Api.], 其分质量 M=578; 经氢谱、碳谱和 dept135 分析, 并结合文献^[19]解析得 n-6-2c 为野漆树苷, 是黄酮苷类物质。分子式如图 9 所示, 波谱归属见表 6。

从正丁醇部位分离纯化得到的高抗氧化活性物质 n-6-2c 经结构鉴定为黄酮苷类物质野漆树苷, 首次从 *Piper nigrum* L. 中分离得到, 含野漆树苷的分离物的活性为 10823 μmolTE/g。

黄酮的抗氧化活性在于它能提供氢质子, 它显著的抗氧化活性已有了大量的实验和实践来证明, 但是关于其构效关系的研究一直在进行中, 其中, Cai 等^[20]发现黄酮糖苷的糖配基种类对其抗氧化性就有显著的影响。此外, Eldahshan 等发现野漆树苷还具有防止伽马辐射损伤的作用和抗恶性肿瘤增生的潜力^[21]。

3 结论

3.1 胡椒叶的抗氧化活性高于胡椒果, 胡椒果中以鲜果的抗氧化活性最高, 另外胡椒叶的抗氧化活性均高于文献报道中的香辛料抗氧化能力, 胡椒叶的高抗氧化活性使其具有较高的开发价值;

3.2 以 ORAC 为指标, 最终得到高抗氧化活性成分木脂素类化合物扁柏脂素和黄酮糖苷类化合物野漆树苷, 为胡椒叶抗氧化活性提供了物质基础, 也为胡椒叶科学开发利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] Chatterjee S, Niaz Z, Gautam S, et al. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*) [J]. Food Chem., 2007, 101(2): 515-523
- [2] 杨建峰, 郭华松, 孙燕, 等. 我国胡椒产业现状及发展对策[J]. 热带农业科学, 2010, 30(3): 52-55
YANG Jian-feng, WU Hua-song, SUN Yan, et al. Status and development countermeasures of pepper industry in China [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2010, 30(3): 52-55
- [3] Agbor GA, Vinson JA, Sortino J, et al. Antioxidant and anti-atherogenic activities of three piper species on atherogenic diet fed hamsters [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(4): 387-391
- [4] Kazuya Murata, Kikuyo Nakao, Noriko Hirata. Hydroxy chavicol: a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle* [J]. Journal of Natural Medicines, 2009, 63(3): 355-359
- [5] 郭声波. 蒟酱(萎叶)的历史与开发[J]. 中国农史, 2007, 26(1): 8-17
- [6] Guo Sheng-bo. The history and the exploitation of the piper betel [J]. Agricultural History of China, 2007, 26(1): 8-17
- [6] 张华昌, 梁淑云, 谭乐和. 胡椒叶片营养诊断采样方法的研究 [J]. 热带作物学报, 1996, 17(1): 45-48
ZHANG Hua-chang, LIANG Shu-yun, TAN Le-he. Study of sampling method for nutrient diagnosis of pepper leaves [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1996, 17(1): 45-48
- [7] 戴冰, 冷旺, 邹双华, 等. 新疆软紫草系统溶剂法提取工艺研究 [J]. 中成药, 2008, 30(10): 1461-1465
DAI Bing, LENG Wang, ZOU Shuang-hua, et al. Study on technology of the system solvent extraction of *Arnebia euchroma* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2008, 30(10): 1461-1465
- [8] Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format [J]. J. Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(16): 4437-4444
- [9] 张水平, 谷凤林, 王庆煌, 等. 胡椒果与胡椒叶抗氧化能力比较 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 130-134
ZHANG Shui-ping, GU Feng-lin, WANG Qing-huang, et al. Comparative analysis of antioxidant activity between the fruits and leaves of *Piper Nigrum* L. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(20): 130-134
- [10] Ninfali P, Mea G, Giorgini S, et al. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition [J]. British Journal of Nutrition, 2005, 93(2): 257-266
- [11] 张芳轩, 张名位, 张瑞芬, 等. 不同黑大豆种质资源种皮花色苷组成及抗氧化活性分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(24): 5088-5099
ZHANG Fang-xuan, ZHANG Ming-wei, ZHANG Rui-fen, et al. Comparative analysis of the anthocyanin profiles and antioxidant activity of seed coats from different black soybean germplasm resources [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(24): 5088-5099
- [12] Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. Lipophilic and hydrophilic anti-oxidant capacities of common foods in the United States [J]. J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 4026-4037
- [13] Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 3122-3128

- [14] Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, et al. When east meets west, the relationship between yin-yang and antioxidation-oxidation [J], *FASEB J*, 2003, 17(2): 127-129
- [15] Gottlieb WE, Gottlieb HE, Gottlieb OR, et al. ¹³C NMR spectroscopy of neolignans [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15, 1547-1551
- [16] Haworth RD, Wilson L. The constituents of natural phenolic resins. Part XXII. Reduction of some lactonic lignans with lithium aluminium hydride [J]. *J Chem Soc*, 1950, 71-72
- [17] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53(6): 1841-1856
- [18] Timple JM V, Magalhães LG, Souza Rezende KC, et al. The lignan(-)-hinokinin displays modulatory effects on human monoamine and GABA transporter activities [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(10), 1889-1895
- [19] Kaneko T, Sakamoto M, Ohtani K, et al. Secoiridoid and flavonoid glycosides from gonocay yum calleryanum [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(1), 115-120
- [20] Cai WR, Chen Y, Xie LL, et al. Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 10.007/s00217-013-2091-x
- [21] El-Shawi OE, Eldahshan OA. Protective effect of rhoifolin on gamma irradiation induced cardiac dysfunctions in albino mice [J]. *Arab J Nuc Sci App*, 2014, 47(1): 198-207