

# 诃子活性成分的抗氧化活性及其结构鉴定

陈丽华, 潘自红, 马庆一

(平顶山学院化学化工学院, 河南平顶山 467000)

**摘要:** 本实验中制备了诃子不同溶剂粗提物及部分纯化物, 并考察了它们的清除自由基活性。1,1-二苯基-2-苦肟基 (DPPH·) 清除实验结果表明, 所有粗提物均具有很强的活性, 其顺序为: 甲醇>乙酸乙酯>丙酮>乙醚>石油醚。其中甲醇粗提物 (1 mg/mL) 活性略高于等浓度的 TBHQ; 色谱纯样 a 比其原粗提取物 (乙酸乙酯) 的抑制率提高最多, 为其 1.6 倍, 而甲醇粗提物纯化样 c 的绝对活性最高, 约为同浓度 TBHQ (1 mg/mL) 的 1.2 倍, 且略高于茶多酚。它们的化学结构经显色反应、UV-Vis 和  $^1\text{H}$  NMR 检测推定: a 为诃黎勒酸, b 为鞣酸衍生物, 是诃子单宁的小水解碎片, 而 c 是诃黎勒酸的变体。

**关键词:** 诃子; 1,1-二苯基-2-苦肟基; 自由基清除剂; 诃子单宁

**文章编号:** 1673-9078(2012)7-780-783

## Free-Radical-Scavenging Activity of Various Components in *Terminalia Chebula* Ritz

CHEN Li-hua, PAN Zi-hong, MA Qing-yi

(Chemistry and Chemical Engineering College of Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China)

**Abstract:** In this experiment the free radical-scavenging activity of various components from terminalia chebula ritz was studied. The results showed that all extracts of terminalia chebula ritz stems had strong DPPH· scavenging effects. The activity-decreased sequence of the extracts by different extracting reagents was: methanol>ethyl acetate>acetone>ether>petroleum-ether. The methanol extract (1mg/mL) had better activity than that of TBHQ. The activities of the component A was 1.6 folds higher than the original. The chromatographically purified component C showed the strongest activity among all samples. Its activity was a little stronger than that of tea polyphenol, as 1.2 folds higher than that of TBHQ. By color test, UV-Vis and  $^1\text{H}$  NMR analysis, all of the purified components were confirmed to be the derivatives of myrobalanin-tannin or their hydrolyzed segments.

**Key words:** *Terminalia chebula* ritz; DPPH·; scavenger; myrobalanin-tannin

氧化产生的自由基会引起生物体细胞结构的破坏和功能丧失, 并进一步损害生物体的膜、酶、维生素、蛋白质及活细胞, 是公认的致癌物<sup>[1]</sup>。目前广泛用于食品中的抗氧化剂大多为化学合成抗氧化剂, 但这些抗氧化剂具有一定的毒副作用, 或者在降解过程中也形成致癌物质<sup>[2]</sup>。天然来源的自由基清除剂因其毒副作用小而备受关注, 植物提取物的抗氧化活性研究正在兴起, 据文献报道<sup>[3]</sup>, 诃子在《药性论》中记载“味酸涩、温无毒”, 具有敛肺、涩肠、下气之功效。早在唐代我国就有类似于现在可乐型饮料的“诃子汤”曾让“士大夫争相饮之”, 但是在宋朝诃子汤不幸失传。现

收稿日期: 2012-03-13

基金项目: 平顶山学院高层次人才科研启动经费资助项目 (2008013)

作者简介: 陈丽华(1979-), 女, 硕士, 讲师, 研究领域为天然产物化学与食品保健功能因子

通讯作者: 马庆一(1944-), 男, 博士, 教授, 研究领域为保健食品功能因子和食品添加剂

代研究发现诃子富含鞣质, 是诃子主要活性成分, 具有明显的抗氧化及抑菌、抑制恶性肿瘤等功能<sup>[4-7]</sup>。

本实验对诃子进行梯度提取、分离和色谱纯化, 并对化合物进行结构类型跟踪 (显色法) 和清除自由基活性跟踪 (DPPH·法)。最后用紫外可见、核磁共振等手段推测色谱纯组分的化学结构, 从而为进一步探讨诃子清除自由基活性的量效和构效关系以及开发利用其为食品和化妆品功能因子提供理论依据。

### 1 仪器和试剂

721 紫外可见分光光度计; TGL-18C 高速台式离心机; HG101-1B 电热鼓风干燥箱; 2110 Fraction collector 离心沉淀器; Mercury-plus400 核磁共振仪。

诃子, 购于郑州中药城; DPPH·, 购于 Sigma-Aldrich 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

### 2 实验方法

## 2.1 诃子中清除自由基活性成分的提取、分离及活性检测

### 2.1.1 诃子活性成分的提取

取过40目筛的诃子粉200g以甲醇回流提取两次(固液比1:8和1:4,各2h),合并滤液,挥干,依次用石油醚、乙醚、乙酸乙酯、丙酮和甲醇索氏抽提,分别减压浓缩至干,称重,定容并计算得率和浓度。

### 2.1.2 不同溶剂提取物的DPPH·法活性检测<sup>[8]</sup>

将上述5种组分(分别以提取剂为溶剂)、茶多酚和TBHQ(以甲醇为溶剂)分别配成5个浓度梯度溶液。再将DPPH用各对应溶剂分别配成 $1 \times 10^{-4}$  mol/L的溶液7份。取2 mL不同浓度的样品溶液分别加入到2 mL相对应的DPPH溶液中去,总体积4 mL,摇匀,25℃保温30 min,于517 nm测定吸光值( $A_{\text{样品}}$ )(以2 mL样液+2 mL对应溶剂混合调零)。2 mL相应溶剂加到2 mL DPPH液中空白对照,测定空白的吸光值( $A_{\text{空白}}$ )(以4 mL对应纯溶剂调零)。

计算抑制率公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

### 2.2 纯化成分的DPPH·抑制活性检测

乙酸乙酯、甲醇和丙酮组分硅胶柱层析纯化:从乙酸乙酯组分得色谱纯组分a、b(洗脱剂为:二氯甲烷:丙酮:甲醇:冰乙酸=6:3:1.5:0.5);甲醇组分得到色谱纯组分c(洗脱剂为:二氯甲烷:丙酮:甲醇:冰乙酸=7:2:1.5:0.5)。丙酮组分重结晶法纯化得产物为d。

色谱纯样品的抑制DPPH·活性检测:方法同2.1.2中所述。

### 2.3 色谱纯成分的结构检测

挑选较高活性的色谱纯成分进行圆滤纸、条形滤纸层析和 $\alpha$ -萘酚显色跟踪试验:滤纸条层析(3.5 cm $\times$ 17 cm),展开剂为BAW(正丁醇:醋酸:水=4:1:5混合液的上层)和6%的醋酸。展开完毕后吹干,紫外分析仪254 nm下观察。圆滤纸显色试验<sup>[9]</sup>:取直径为8 cm的圆滤纸,分为8个大小均等的区域,在每个区域距圆心为1.2 cm处的中央位置,用毛细管点样,同时用风机快速吹干,以防止扩散。每个样点4个为一组(以便层析后分别喷以三氯化铁溶液、茴香醛-硫酸、亚硝酸钾醋酸溶液、碘酸钾饱和溶液显色),每张滤纸点两种不同的组分,用甲醇作展开剂,点样结束后,滤纸中心穿一纸芯,放培养皿中,使滤纸芯与展开剂接触,再复盖一个培养皿,层析溶液前沿接近边缘时,取出用风机迅速吹干,将各色谱带剪开,显色,吹干,观察颜色及现象。

$\alpha$ -萘酚显色试验:取干净小试管,加入1 mL样液,再分别依次滴5%的 $\alpha$ -萘酚和浓硫酸各几滴,观

察现象。

样品还用紫外可见分光光度法(UV-Vis)和核磁共振法( $^1\text{H}$  NMR)进行结构检测。

## 3 结果与讨论

### 3.1 浓度和收率计算

甲醇粗提收率为40.8%,粗组分索氏梯度提取时石油醚、乙醚、乙酸乙酯、丙酮组分得率分别为2.74%、2.05%、4.18%、11.47%。

### 3.2 提取物的DPPH·自由基抑制活性

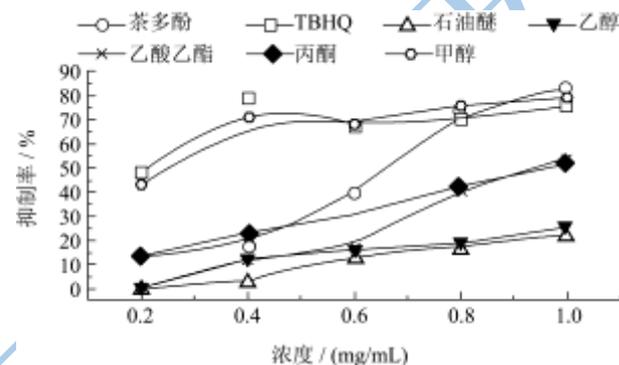


图1 各提取物、茶多酚和TBHQ对DPPH·的抑制曲线

Fig.1 Inhibitory activity of extracts, polyphenol and TBHQ on DPPH·

采用2.1.2的方法测定不同浓度下的A值,并用其公式计算抑制率,结果绘制相应曲线于图1。由抑制率曲线可知,各提取物浓度较小时(0.2 mg/mL),其清除能力弱,随着浓度的上升,它们抑制DPPH·自由基的能力逐渐升高,1.0 mg/mL时,清除DPPH·的能力顺序为:甲醇>乙酸乙酯>丙酮>乙醚>石油醚;与茶多酚和TBHQ相比,抑制率最高的甲醇组分其DPPH·自由基的清除能力为78.38%,略大于该浓度下的TBHQ,小于茶多酚。

### 3.3 乙酸乙酯、丙酮和甲醇组分的纯化

乙酸乙酯组分纯化,最后得色谱纯样品2个,重量分别为2.69 g和0.03 g,用甲醇分别定容到50 mL后,浓度各为53.79 g/L和0.52 g/L,分别命名为样a和b。甲醇组分最后的色谱纯产物重0.39 g,用甲醇定容50 mL,其浓度为7.04 g/L,命名为样c。丙酮组分色谱纯化后重结晶得到略带红色的晶体d。

### 3.4 纯化样品抑制DPPH·活性的检测结果

样品的活性测定结果绘制曲线展示于图2。

从曲线得知:a抑制率虽高,但量效关系不显著;b量效关系显著,但在低浓度下,抑制效果较差;c量效关系显著。试验结果表明:(1)纯化后a、b、c样的清除DPPH·自由基的效果有提高,a、b样的最大抑制率分别为其粗提取物的1.6和1.1倍,c样的最大

抑制率为其粗提取物的 1.1 倍, 是 TBHQ 的 1.2 倍, 其清除效果最好。(2) a、b、c、d 样清除 DPPH· 自由基的最适的清除浓度为: 0.8、1.0、1.0、1.0 mg/mL, (3) 样 a、b、c、d, 茶多酚和 TBHQ (0.8 mg/mL) 对 DPPH· 的抑制率顺序为: c>a>茶多酚>TBHQ>b>d。

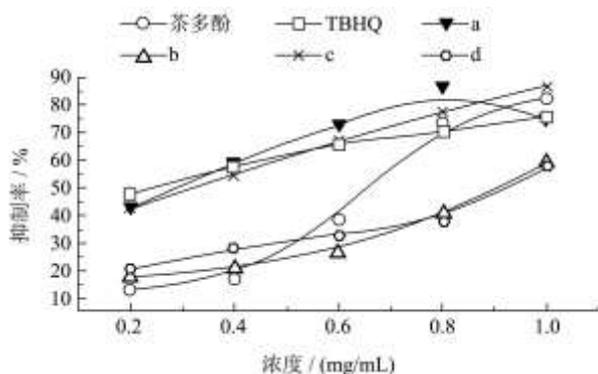


图 2 各色谱纯组分以及茶多酚、TBHQ 对 DPPH· 的抑制活性  
Fig.2 Inhibitory activity of purified component, polyphenol and TBHQ on DPPH·

### 3.5 纯化组分结构检测

#### 3.5.1 显色法定性试验结果

圆滤纸层析对色谱纯组分显色结果见图 3, 综合  $\alpha$ -萘酚法显色结果为表 1。条形纸层析其显色结果见表 2。

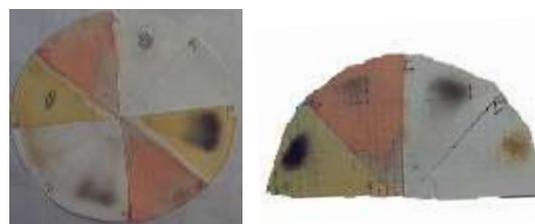


图 3 圆滤纸显色结果

Fig.3 Results of coloration filter paper  
表 1 色谱纯组分 a、b、c 的显色情况

样品	FeCl <sub>3</sub>	茴香醛-硫酸	亚硝酸钾醋酸	碘酸钾饱和	$\alpha$ -萘酚
a	蓝色	-	褐色	红转褐色	紫红环
b	绿色	-	-	浅红色	红棕色沉淀
c	蓝色	-	褐色	红转褐色	紫红色的环

表 2 条形纸层析显色结果

显色	a	b	c
BAW 的上层	R <sub>f</sub> 0.65, 天蓝色, 条状	R <sub>f</sub> 0.66, 浅蓝色	R <sub>f</sub> 0.42, 紫色到深蓝色
6% 醋酸	R <sub>f</sub> 0.43, 淡红色	R <sub>f</sub> 0.42, 淡红色	R <sub>f</sub> 0.12, 淡红色锥形斑

#### 3.5.2 紫外(UV)和核磁(NMR)结构测定

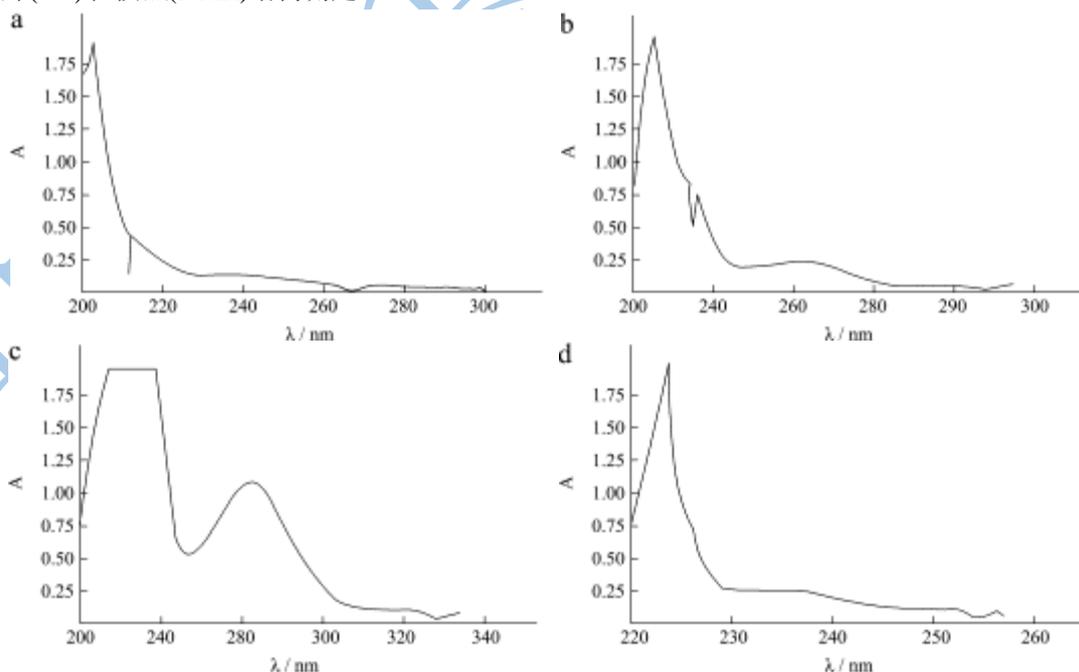


图 4 样 a, b, c 的紫外波谱图

Fig.4 UV spectrum of the sample a, b and c

注: d 为样品 c 的稀释样。

综合表 1~2 的显色结果可以推断, 样 a 属水解单宁中的槲单宁, 是多个槲酸与邻苯三酚型酚羟基醇形成的六羟基联苯二酸酯, 从紫外图谱上观察, a 样的 UV (MeOH) 的波峰: 219 nm、202.5 nm、275 nm, 根据参考文献<sup>[4]</sup>的数据, a 样与诃黎勒酸的波峰相对应, 可推断为诃黎勒酸。

综合表 1~2 的显色结果可以推断, 样 b 为缩合单宁, 由于含有邻苯二酚的单宁在三氯化铁溶液显色下才呈绿色, 它是羟基黄烷类单体形成的缩合物, 单体间以碳-碳键连接, 遇浓硫酸生成暗红棕色沉淀。得到 b 样紫外(UV)UV (MeOH) 的波峰: 200 nm、220 nm, 再结合紫外(UV)和核磁(NMR)结构测中的数据, 可知 b 样为槲酸衍生物, 是诃子单宁的小水解碎片

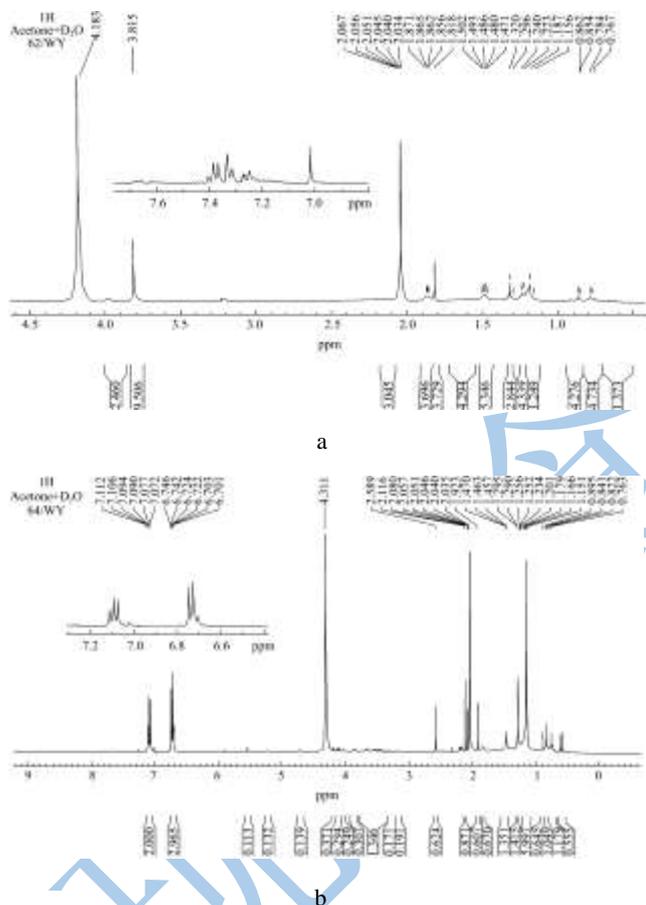


图 5 核磁(NMR)结构测定结果

Fig.5 <sup>1</sup>H NMR of the sample b(a) and c(b)

注: a-样 b 的结果, b-样 c 的结果。

根据参考文献<sup>[10]</sup>, 样 c 的纸层析在紫外灯 254 nm 下观察呈紫色, 在 BAW 的上层和 6% 的醋酸中它们的 R<sub>f</sub> 值分别为 0.42 和 0.12, 这与葡萄糖槲酸酯在紫外光下的呈色以及纸色谱上以 BAW 为展开剂的比移值 (R<sub>f</sub>) 大体相近。根据上述推测, 它的结构应为 1β,2,3,4,6-五-O-槲酰-β-D-吡喃葡萄糖。c 样的 UV (MeOH) 的波峰: 274 nm、205 nm、222.5 nm。再

结合紫外(UV)和核磁(NMR)结构测中的数据, 推测 c 样是诃黎勒酸的变体。它们的推测结构见图 6 和 7。

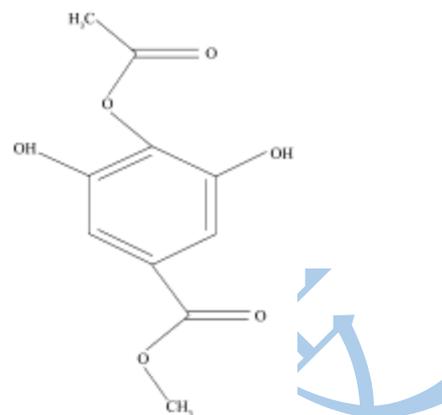


图 6 推测组分 (b) 结构

Fig.6 The structure of the component b

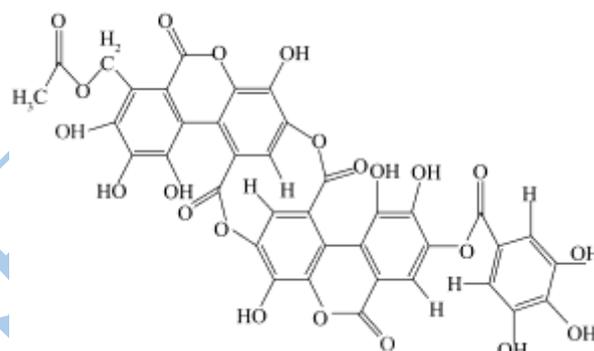


图 7 推测组分 (c) 结构

Fig.7 The structure of the component c

#### 4 结论

诃子资源丰富, 具有开发潜力, 应用前景广阔。诃子梯度提取物经纯化后, 清除 DPPH· 自由基的效果明显增强, 其中最好的 c 样效果是 TBHQ 的 1.2 倍。c 样清除 DPPH· 自由基的最好的浓度分别为 1.0 mg/mL, 量效之间并不是严格的线性关系。结构检测显示 a 为诃黎勒酸, b 为槲酸衍生物, 是诃子单宁的小水解碎片, 而 c 是诃黎勒酸的变体。

#### 参考文献

- [1] 郑建仙. 功能性食品 (第二卷) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [2] 龙秀, 李国基, 耿予欢. 茶多酚对干果类食品抗氧化作用的研究[J]. 现代食品科技, 2005, 3: 24-26
- [3] 资名扬, 王琴, 温其标. 紫甘薯花色苷光谱特性及抗氧化性的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 11: 33-35
- [4] 丁岗, 刘延泽, 等. 诃子中主要可水解丹宁的结构鉴定[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(3): 91-93
- [5] 张海龙, 华会明. 诃子化学成分及药理活性的研究[J]. 沈阳

- 药科大学学报,2001,6:18
- [6] 魏安池,周瑞宝.诃子抗氧化剂的研究[J].中国油脂,1998,23(3):43-45
- [7] 孟洁,杭瑚.诃子抗氧化作用的研究[J].食品科学,2000,21(2):9-10
- [8] 王威.四种辛辣蔬菜抗氧化活性的研究[J].食品与工业发酵,2001,27(5):28-31
- [9] 余促建.现代有机分析[M].天津:天津科学技术出版社,1986
- [10] 王威.4种辛辣蔬菜抗氧化活性的研究[J].食品与工业发酵,2001,27(5):28-31

现代食品科技