

香桃木叶非精油组分体外清除自由基和 抗氧化作用研究

方献平¹, 陈季武¹, 肖露萍¹, 高秋月¹, 李海燕¹, 肖洋炯¹, 姚雷²

(¹华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; ²上海交通大学 植物学系, 上海 201101)

[摘要] **【目的】**探索香桃木叶非精油组分提取物的清除自由基和抗氧化作用, 为进一步开发利用香桃木资源提供理论依据和试验资料。**【方法】**采用水提取法、甲醇-水提取法和乙酸乙酯提取法 3 种方法从香桃木叶中提取非精油组分, 然后用 4 种化学发光体系和 2 种比色体系检测其清除自由基和抗氧化作用。**【结果】**香桃木叶的非精油组分 3 种提取物均能有效清除 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、DPPH $\cdot$ 和 ONOO $^-$, 减轻或消除 $\cdot OH$ 对 DNA 的氧化损伤, 抑制脂质过氧化, 其中甲醇-水提取物清除 O_2^- 和 ONOO $^-$ 能力最强, 乙酸乙酯提取物清除 $\cdot OH$ 和 DPPH $\cdot$ 的效果最佳。**【结论】**香桃木叶非精油组分是有效的、多功能的天然抗氧化剂和自由基清除剂, 具有综合开发利用的价值。

[关键词] 香桃木叶提取物; 非精油组分; 自由基; DNA 氧化损伤; 抗氧化剂

[中图分类号] R284.2; Q949.762.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)05-0201-05

In vitro scavenging free radical and antioxidant effects of extracts from *Myrtus communis* Linn. leaves

FANG Xian-ping¹, CHEN Ji-wu¹, XIAO Lu-ping¹, GAO Qiu-yue¹,
LI Hai-yan¹, XIAO Yang-jiong¹, YAO Lei²

(¹ School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

² Department of Plant Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: **【Objective】** The effects of nonessential oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on scavenging free radical and antioxidant role were studied in order to provide an experimental basis for its further development. **【Method】** Water, methanol and ethyl acetate extraction method were used to extract non-oil components from *Myrtus communis* Linn. leaves, and then radical scavenging activity and antioxidant role of these extracts were investigated using four chemiluminescence systems and two colorimetric systems. **【Result】** Extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves not only effectively scavenged O_2^- , $\cdot OH$, DPPH $\cdot$ and ONOO $^-$, but reduced or prevented DNA oxidative damage caused by $\cdot OH$ and inhibited lipid peroxidation. **【Conclusion】** Extracts of *Myrtus communis* Linn. are effective, multifunctional natural antioxidants and radical scavenger, and are the natural products worthy of further exploitation and utilization.

Key words: extract of *Myrtus communis* Linn. leaf; nonessential oil extract; free radical; DNA oxidative damage; antioxidant

现已研究证实, 许多疾病的诱发促进机制都涉及自由基的产生^[1], 自由基清除剂在清除机体自

* [收稿日期] 2008-06-20

[基金项目] 上海市科学委员会项目(06DZ22110)

[作者简介] 方献平(1983—), 男, 浙江杭州人, 硕士, 主要从事自由基和抗氧化研究。E-mail: fxp2009@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈季武(1956—), 男, 浙江平阳县人, 副教授, 主要从事植物资源开发和自由基医学研究。

E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

由基、保护机体免受氧化损害中起重要作用。因此,近年来自由基清除剂的研究倍受关注,其中芳香植物的抗氧化作用是研究热点之一^[2-3]。

享有“爱神木”美称的香桃木(*Myrtus communis* Linn.)是一种芳香植物,是桃金娘科(Myrtaceae)香桃木属(*Myrtus* Linn.)的常绿灌木,高达 3~5 m,小枝密集,叶革质,对生,深绿色,有光泽,原产地中海沿岸,目前我国长江以南部分地区已有栽植。香桃木叶由于含桃金娘烯醇,有强烈的杀菌效果,药用价值较高,对气管炎等呼吸道疾病疗效较好,还有镇静、安眠作用。近年来又发现,香桃木植物体内不仅含有抗生素物质,而且其水提物还具有灭螺活性^[4]。目前,国内外对香桃木叶精油含量和精油成分的研究较多^[3],但对其非精油组分功效的关注甚少。本研究采用 6 种体系检测了国产香桃木中非精油组分,体外清除自由基能力及抗氧化作用,旨在为进一步开发利用香桃木资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 香桃木于 2006-04 播种于上海交通大学农学院种植场,在大棚下弱碱性土壤中生长,生存环境温暖、湿润,于 2007-10 初采集植株的中上部叶片(距地面约 70 cm)。将新鲜的香桃木叶片在室温下晾干后,置 60 ℃ 烘箱烘至恒质量,再用高速微量粉碎机粉碎成粉末。

1.1.2 试剂及仪器 鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼),Sigma 公司产品;二苯代苦味肼基自由基(DPPH·),日本东京化成工业株式会社产品;DNA 购自中国科学院东风生化试剂公司;其余试剂均为国产分析纯。主要仪器有 78-1 型高速微量粉碎机(浙江温岭粮食检验仪器厂产品)、SHG-1 型生物化学发光测量仪(上海技术监督局实验工厂产品)和 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂产品)等。

1.2 非精油组分提取方法

参考文献[5]的方法提取叶片粉末中的精油,收集提取出精油后的全部残渣。精油提取重复 4 次,合并所有残渣,再分别采用水提法、甲醇-水提法和乙酸乙酯提法从残渣中提取非精油组分。

1.2.1 水提取法^[6] 称取香桃木叶粉末提取精油后的残渣约 58 g,置蒸馏瓶中,加入 300 mL 超纯水,置于 100 ℃ 水浴锅中,5 h 后过滤,保存滤液;在残渣中再加入 180 mL 超纯水,置 100 ℃ 水浴锅中,5 h 后过滤,保存滤液;在残渣中再加入 60 mL 超纯

水,置 100 ℃ 水浴锅中,5 h 后过滤,保存滤液,合并 3 次滤液于培养皿中,冷冻干燥。

1.2.2 甲醇-水提取法^[6] 称取香桃木叶残渣约 40 g,置蒸馏瓶中,加入 200 mL 甲醇与超纯水的混合溶液[V(甲醇):V(超纯水)=9:1],置于 40 ℃ 水浴锅中,12 h 后过滤,保存滤液;在残渣中再加入 200 mL 甲醇与超纯水的混合溶液[V(甲醇):V(超纯水)=1:1],置 40 ℃ 水浴锅中,12 h 后过滤,保存滤液。

合并 2 次滤液,加入等体积的氯仿,静置萃取 10 min,弃除下层氯仿,收集上层液体,重复 3 次。将所得滤液置于旋转蒸发仪中,于 60 r/min、45 ℃ 下减压蒸发 2 h,收集剩余混合液于培养皿中,冷冻干燥。

1.2.3 乙酸乙酯提取法^[7] 称取香桃木叶粉末残渣约 35 g,置蒸馏瓶中,加入 200 mL 乙酸乙酯,置于 65 ℃ 水浴锅中回流提取,5 h 后过滤,保存滤液;在残渣中再加入 200 mL 乙酸乙酯,置 65 ℃ 水浴锅中回流提取,5 h 后过滤,保存滤液;在残渣中再加入 200 mL 乙酸乙酯,置 65 ℃ 水浴锅中回流提取,5 h 后过滤,保存滤液;合并 3 次滤液,置旋转蒸发仪中,在 60 r/min、45 ℃ 下减压蒸发 2 h,收集剩余混合液于培养皿中,冷冻干燥。

1.3 分析方法

1.3.1 产生 O_2^- 的化学发光体系 采用邻苯三酚自氧化产生 O_2^- 的化学发光体系^[8]。

1.3.2 产生 $\cdot OH$ 的化学发光体系 参考文献[9],采用 $CuCl-Phen-H_2O_2$ 的化学发光体系。

1.3.3 DNA 损伤的化学发光体系 采用 $CuSO_4-Phen-Vit. C-DNA-H_2O_2$ 化学发光体系^[10]。

1.3.4 产生过氧亚硝基阴离子自由基($ONOO^-$)的化学发光体系 参考文献[11],采用羟胺自氧化产生 $ONOO^-$ 的化学发光体系。

1.3.5 产生脂质过氧化的比色体系 参考文献[12],采用以 Fe^{2+} 诱发卵黄磷脂 C-2 位上的极低密度脂蛋白(VLDL)和低密度脂蛋白(LDL)过不饱和脂肪酸(PUFA)的过氧化模型。卵黄悬液中卵黄与 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.45)的体积配比为 1:30。

1.3.6 二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)的比色体系 参考文献[13]的 DPPH· 分析法并略加修改:在 2.5 mL、 6.5×10^{-5} mol/L DPPH· 溶液中,加入 0.5 mL 试样(空白对照用等体积三蒸水代替),总体积 3 mL,混匀,室温下放置 15 min 后,于光径 1 cm 比色皿中测定 DPPH· 混合溶液在 517 nm 处吸光值。抑制率/%=(空白对照值-样品值)/空白对照值 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 香桃木叶非精油组分提取物对 O_2^- 的清除能力

由邻苯三酚自氧化所产生的 O_2^- ，能与发光剂鲁米诺反应产生化学发光， O_2^- 的浓度与鲁米诺发光强度成正比^[8]。图 1 显示，香桃木叶的水提取物、甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物，对由邻苯三酚体系产生的 O_2^- 所引起的化学发光均有明显抑制作用，且量效关系明显，其化学发光半抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 415、232 和 369 $\mu\text{g/mL}$ ，表明香桃木叶的甲醇-水提取物对 O_2^- 的清除效果最为明显。当质量浓度大于 380 $\mu\text{g/mL}$ 时，甲醇-水提取物对 O_2^- 引起的化学发光的抑制率开始趋于平缓；当质量浓度大于

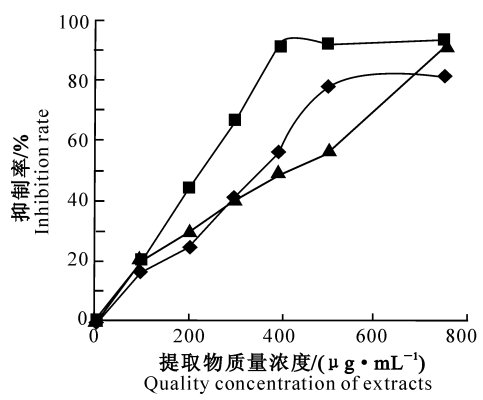


图 1 香桃木叶非精油组分提取物对 O_2^- 的清除作用
—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物

Fig. 1 Effects of nonessention oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on scavenging O_2^-
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

2.3 香桃木叶非精油组分提取物对 $\cdot\text{OH}$ 引起的 DNA 氧化损伤的保护作用

$\text{CuCl-Phen-H}_2\text{O}_2^-$ 化学发光体系生成的 $\cdot\text{OH}$ 氧化损伤 DNA，并伴随化学发光，该发光峰值与 DNA 氧化损伤程度呈正相关关系，所以加入抗氧化剂可使该发光动力学曲线发生明显变化，表现为峰值下降(抑制效应)^[10]。图 3 显示，香桃木叶水提取物、甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物，均对 DNA 损伤产物发光峰值具有强烈抑制作用，其抑制率均随着各种提取物质量浓度的增加逐渐增大，且呈剂量依赖性，其 IC_{50} 分别是 322、116.7 和 153.5 $\mu\text{g/mL}$ 。提示香桃木叶 3 种提取物清除了链延伸自由基，起到了断链型抗氧化剂的作用。

2.4 香桃木叶非精油组分提取物对 ONOO^- 的清除作用

图 4 显示，随着质量浓度的增加，香桃木叶水提

500 $\mu\text{g/mL}$ 时，乙酸乙酯提取物对 ONOO^- 所引起的化学发光的抑制作用也趋于恒定。

2.2 香桃木叶非精油组分提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

CuCl 与 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$ ， $\cdot\text{OH}$ 与 Phen 作用产生化学发光^[9]。图 2 显示，香桃木叶水提取物、甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用量效关系明显，其抑制率均随各种提取物质量浓度的增加而逐渐升高，它们的 IC_{50} 分别为 42.25、26.72 和 23.05 $\mu\text{g/mL}$ ，表明乙酸乙酯提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果最为明显。当质量浓度大于 20 $\mu\text{g/mL}$ 以后，香桃木叶甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果迅速增加。

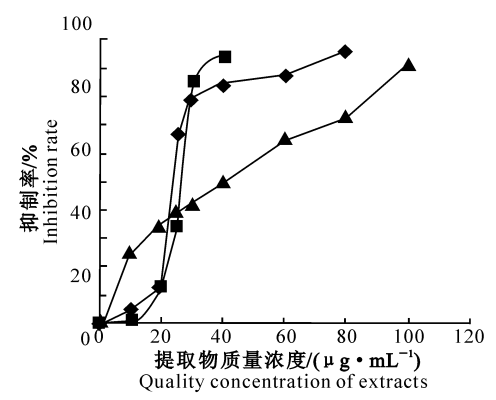


图 2 香桃木叶非精油组分提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用
—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物

Fig. 2 Effects of nonessention oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on scavenging $\cdot\text{OH}$
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

物、甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物，对 ONOO^- 引起的化学发光的抑制作用逐渐增强，其 IC_{50} 分别为 18.2、10.6 和 13.9 $\mu\text{g/mL}$ ，其中甲醇-水提取物对 ONOO^- 的清除效果最佳。

2.5 香桃木叶非精油组分提取物的抗脂质过氧化作用

Fe^{2+} 可诱发卵黄中脂蛋白 PUFA 过氧化产生烷氧基($\text{RO}\cdot$)和烷过氧基($\text{ROO}\cdot$)，继而引发自由基的链式反应。在加热条件下，过氧化产物丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)反应产生红色化合物，并在波长 532 nm 处有显著光吸收^[12]，加入抗氧化剂可抑制脂质过氧化作用，使光吸收值降低。图 5 表明，香桃木叶水提取物、甲醇-水提取物和乙酸乙酯提取物均能有效抑制 Fe^{2+} 诱发的脂质过氧化，且随着提取物质量浓度的增加，抑制作用增强，其 IC_{50} 分别是 3.82、2.65 和 2.49 mg/mL 。由此可知，乙酸

乙酯提取物的效果优于水提物和甲醇-水提物,提示乙酸乙酯提物能更有效地清除 RO $\cdot$ 和 ROO $\cdot$,从而

防止或减缓 PUFA 发生自由基链式反应。

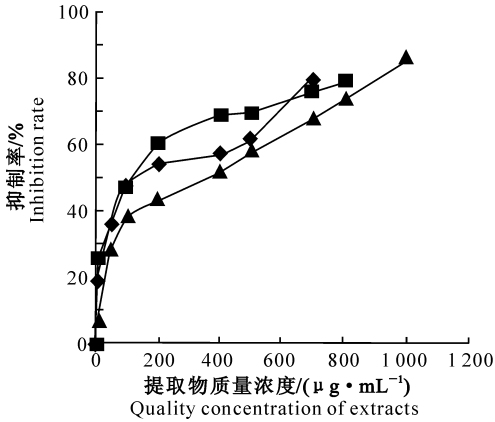


图 3 香桃木叶非精油组分提取物对 DNA 氧化损伤的抑制作用

—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物
Fig. 3 Effects of nonessential oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on inhibiting DNA oxidative damage
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

2.6 香桃木叶非精油组分提取物对 DPPH $\cdot$ 的清除作用

DPPH $\cdot$ 是一种稳定的有机自由基,该体系依据 DPPH $\cdot$ 在 517 nm 处有一强吸收峰,自由基清除剂与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,吸光值的变化与其接受的电子数成定量关系,因而通过分光光度法检测生物试剂对 DPPH $\cdot$ 的清除能力,即可

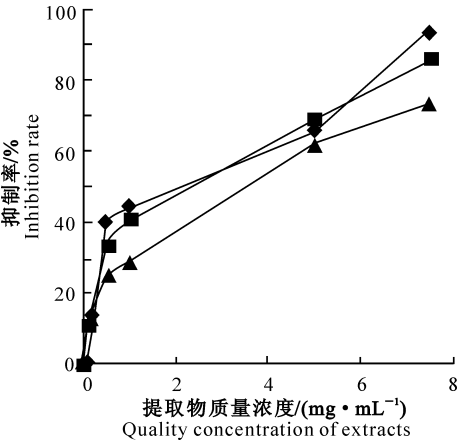


图 5 香桃木叶非精油组分提取物的抗脂质过氧化作用

—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物
Fig. 5 Effects of nonessential oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on inhibiting peroxidation
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

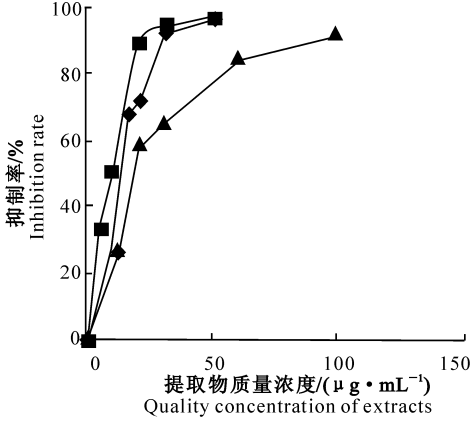


图 4 香桃木叶非精油组分提取物对 ONOO $^{-}$ 的清除作用

—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物
Fig. 4 Effects of nonessential oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on scavenging ONOO $^{-}$
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

表示其抗氧化性能强弱^[13-14]。图 6 显示,香桃木叶 3 种提取物都表现出了较好的清除 DPPH $\cdot$ 能力,随着提取物质量浓度的增加,清除能力迅速增强,直至抑制率约为 80% 时才趋缓。其中水提物和甲醇-水提物的 IC $_{50}$ 分别是 42.3 和 21.9 μ g/mL,而乙酸乙酯提取物清除能力更强,IC $_{50}$ 为 15.29 μ g/mL。

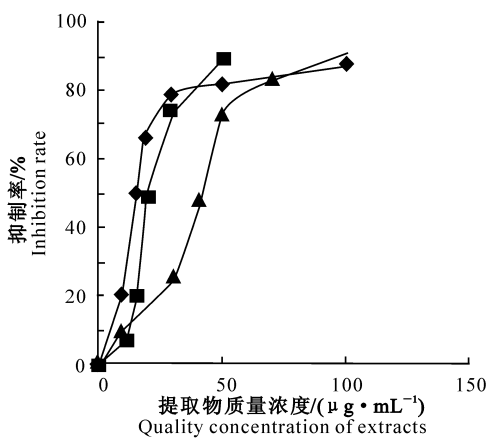


图 6 香桃木叶非精油组分对 DPPH $\cdot$ 的清除作用

—▲—, 水提取物; —■—, 甲醇-水提取物; —◆—, 乙酸乙酯提取物
Fig. 6 Effects of nonessential oil extracts of *Myrtus communis* Linn. leaves on scavenging lipid peroxidation DPPH $\cdot$
—▲—, Distilled water extraction; —■—, Methanol-distilled water extraction; —◆—, Ethyl acetate extraction

3 讨 论

在体内多种活性氧和活性氮中, O_2^- 是各种活性氧的源头, $\cdot OH$ 是毒性最强的活性氧, $ONOO^-$ 是毒性最强的活性氮, 后两者是造成生物有机体过氧化损伤的主要元凶, 许多疾病的发生及发展都与这 3 种活性氧和活性氮密切相关。本研究结果表明, 香桃木叶非精油组分 3 种提取物既可以控制机体活性氧发生的源头 O_2^- , 也可以清除危害人体健康的活性氧元凶 $\cdot OH$ 和活性氮元凶 $ONOO^-$, 在防止机体氧化损伤中具有重要的作用。但这 3 种提取物的清除能力存在差异, 其中甲醇-水提取物清除 O_2^- 和 $ONOO^-$ 能力最强, 乙酸乙酯提取物清除 $\cdot OH$ 效果最佳。

$\cdot OH$ 可使 DNA 突变, 引发癌基因活化和抑癌基因失活, 引起细胞恶性增殖, 因此保护 DNA 免受氧化损伤可防止肿瘤的发生和发展。本研究中, 香桃木叶非精油组分 3 种提取物均能有效地减轻或消除 $\cdot OH$ 对 DNA 的氧化损伤。

活性氧也可氧化损伤生物膜, 导致膜脂质过氧化, 继而损伤细胞, 引起机体病变。本研究显示, 香桃木叶非精油组分 3 种提取物均能有效抑制脂质过氧化, 其清除 DPPH $\cdot$ 的能力进一步旁证了这一作用。

由此可见, 香桃木叶非精油组分是一种有应用价值的天然抗氧化剂和自由基清除剂, 可以作为外源性的天然抗氧化剂和自由基清除剂, 协同人体内自由基清除系统有效地抵御多种自由基的损害。

文献已报道, 香桃木叶中含有大量的黄酮类和酚类物质^[15], 而这些物质往往具有清除自由基和抗氧化作用^[13]。所以推测香桃木叶非精油组分抗氧化、清除自由基的作用, 可能与其含有黄酮类和酚类物质等组分有一定的相关性。

目前, 世界各国对于芳香植物的开发和研究, 主要集中于精油研究, 而本研究结果提示, 其非精油组分也具有一定的营养保健价值和药用功效。非精油组分存在于芳香植物叶提取精油之后的残渣中, 也存在于传统药用成分提取之后的废物中, 提取出其中的有效成分, 研究清楚其营养保健和药用价值, 无疑对延长产业链, 降低生产成本, 提高芳香植物的综合利用效益, 具有积极的指导意义。

[参考文献]

[1] Gao P, Zhang H F, Ramani D, et al. HIF-dependent antitumori-

genic effect of antioxidants *in vivo* [J]. Cancer Cell, 2007, 12 (3): 230-238.

[2] 姚 雷, 张少艾, 王霞平. 三种芳香植物的抗氧化性研究 [J]. 香料香精化妆品, 2002(4): 4-8.

Yao L, Zhang S A, Wang X P. Research on the antioxidation of three aroma herbs [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2002(4): 4-8. (in Chinese)

[3] 吕洪飞. 药用芳香植物资源的开发和研究 [J]. 中草药, 2000, 31(9): 711-715.

Lv H F. Development and research on medicinal aromatic plant resources [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31 (9): 711-715. (in Chinese)

[4] 左安连, 姚 雷. 香桃木不同生长期及干鲜叶精油成分分析 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(4): 150-153.

Zuo A L, Yao L. Composition analysis of essential oil of *Myrtus communis* L. in different vegetal periods and in dry and fresh leaves [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition, 2006, 24(4): 150-153. (in Chinese)

[5] 卢艳花. 中药有效成分提取技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 289.

Lu Y H. Extraction technology of chinese medicine effective ingredient [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 289. (in Chinese)

[6] 秦海燕, 陈季武, 胡 斌, 等. 鼠尾草叶提取物清除自由基抗氧化作用的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(7): 89-92.

Qin H Y, Chen J W, Hu B, et al. Study on scavenging free radical and antioxidation effects of extracts from *Salvia of ficinalis* leaves [J]. Food Science, 2006, 27(7): 89-92. (in Chinese)

[7] 常楚瑞. 乙酸乙酯回流法提取木瓜总黄酮及含量测定 [J]. 贵阳医学院学报, 2001, 26(4): 326-327.

Chang C R. Extraction and quantity determination of total flavanone from Chinese quince by aceticacid ethyl circumfluence method [J]. Journal of Guiyang Medical College, 2001, 26(4): 326-327. (in Chinese)

[8] 郭嵩光, 王振铤. 邻苯三酚自氧化-化学发光法测定 SOD 活性 [J]. 植物生理学通讯, 1989(3): 54-57.

Guo A G, Wang Z Y. Measurement on SOD activity by means of pyrogallol oxidation-c-Hemiluminescence system [J]. Plant Physiology Communication, 1989(3): 54-57. (in Chinese)

[9] 许申鸿. 一种测定 $\cdot OH$ 产生与清除的新化学发光体系 [J]. 分析测试学报, 2000, 19(2): 11-13.

Xu S H. A new chemiluminescence system for measuring $\cdot OH$ radical [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2000, 19(2): 11-13. (in Chinese)

[10] 马文建, 曹摠华, 张 健, 等. 十几种天然抗氧化剂对 DNA 保护作用的结构分析与理论计算 [J]. 生物物理学报, 1998, 14 (1): 155-160.

Ma W J, Cao E H, Zhang J, et al. The analysis of molecular structures and quantum mechanical calculations on the protection effect of several natural antioxi-dants against damage [J]. Acta Biophysica Sinica, 1998, 14 (1): 155-160. (in Chinese)