

番石榴叶有机溶剂提取物清除过氧自由基能力及抑制酪氨酸酶活力研究

叶伟 (岭南师范学院, 广东湛江 524048)

摘要 [目的]研究番石榴叶不同有机溶剂提取物对自由基清除能力以及对酪氨酸酶活性的抑制作用,可为番石榴叶在抗氧化抗衰老方面的应用奠定基础。[方法]采用乙醇、乙酸乙酯、石油醚和丙酮4种不同有机溶剂并采取超声、浸提及萃取的方法提取番石榴叶粗提取物。采用邻苯三酚自氧化法和L-DOPA法分别测定粗提取物对过氧自由基的清除作用和酪氨酸酶活性的抑制作用。[结果]乙醇、丙酮和乙酸乙酯番石榴叶提取物清除过氧自由基的 IC_{50} 值分别为47.1、35.5和21.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而丙酮提取物和乙酸乙酯提取物抑制酪氨酸酶活性的 IC_{50} 值分别为165.3和115.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。[结论]番石榴叶提取物具有开发作为抗氧化抗衰老药物以及酪氨酸酶抑制剂的应用前景。

关键词 番石榴叶;粗提取物;过氧自由基;酪氨酸酶活性

中图分类号 R 284 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)02-0186-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Scavenging Peroxy Radical Activity and Inhibitory Effect on Tyrosinase of Guava Leaves Extract

YE Wei (Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract [Objective] The effects of different organic solvent extracts on free radical scavenging and tyrosinase activity of guava leaves were studied. [Method] The crude extract of guava leaves was extracted by ultrasonic, immersion and extraction methods using four different organic solvents (ethanol, ethyl acetate, petroleum ether and acetone). The scavenging effect of peroxy free radicals and inhibition of tyrosinase activity of crude extracts were determined by catechol autooxidation method and l-dopa method respectively. [Result] The IC_{50} values of ethanol, acetone and ethyl acetate guava leaf extracts for scavenging peroxy radicals were 47.1, 35.5 and 21.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; but the IC_{50} values for the inhibition of tyrosinase activity by acetone extract and ethyl acetate extract were 165.3 and 115.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. [Conclusion] The extract of guava leaf has the prospect of developing as antioxidant and anti-aging drug and tyrosinase inhibitor.

Key words Guava leaves; Crude extract; Peroxy radical; Tyrosine activity

番石榴为桃金娘科植物番石榴 (*Psidium guajava* Linn.) 的叶或果,主要分布在福建、台湾、广东、广西、四川和云南等地。干燥幼果具有收敛止泻、止血之功效,常用于泻痢无度、崩漏。成熟果实具有健脾消积、涩肠止泻之功效,常用于食积饱胀、疝积、腹泻、痢疾、脱肛、血崩^[1]。番石榴叶具有多方面的药理作用,具有燥湿健脾、清热解毒之功效^[2],常用于泻痢腹痛、食积腹胀、消渴病、齿龈肿痛、风湿痹痛、湿疹糜烂、疔疮肿毒、跌打肿痛、外伤出血、蛇虫咬伤。鲜叶具有止血之功效,常用于跌打损伤、外伤出血、糜烂久不愈合、提高免疫力、抗肿瘤、抗炎镇痛和抗氧化抗衰老的功效^[3-4]。

许多研究表明,番石榴叶具有抗氧化功能。赵玉静等^[5]从番石榴叶醇提取物中分离获得了6种黄酮类化合物,并且证明了其具有抗氧化活性。但番石榴叶中是否还有其他具有显著抗氧化活性的天然产物,仍需要进一步评价。对番石榴叶不同类型提取物的抗氧化能力进行评价,可以为开发抗氧化抗衰老类药物奠定基础^[6-7]。而对过氧自由基清除能力是不同物质抗氧化能力的重要评价指标,不同的抗氧化剂包括过氧化物歧化酶(SOD)等可采用邻苯三酚自氧化法测定对过氧自由基的清除能力,以评价其抗氧化抗衰老的功效。酪氨酸酶的活力过强,会加速有机体的衰老过程,通过抑制酪氨酸酶的活力能延缓衰老进程。笔者采用不同的有机溶剂提取番石榴叶的代谢产物,并用邻苯三酚自氧化法测定粗提取物对过氧自由基的清除能力,检测番石榴叶粗提取物抑制酪氨酸酶的活力,以期作为农业作物的抗氧化活性和抗氧化抗衰老

剂的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试材 番石榴叶采样于广东省湛江市。酶(酪氨酸酶)、邻苯三酚和3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, L-dopa)均购自Sigma公司;其他试剂购自天津大茂试剂厂。

1.2 主要仪器 旋转蒸发仪 Heidolph ML G6 购自上海巴玖实业有限公司;超净工作台购自上海恒益科技有限公司;超声波清洗仪购自宁波新芝有限公司;Multiskan 酶标仪购自 Thermo scientific 公司。

1.3 方法

1.3.1 不同溶剂的番石榴叶提取物制备。

1.3.1.1 乙醇提取物的制备。将番石榴叶在液氮条件下充分磨碎,用80%乙醇在超声波频率为25 kHz下超声提取2次,每次30 min,8 000 r/min离心10 min,取上清,合并提取液,旋转蒸发仪于45 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩至干即得到番石榴叶乙醇粗提取物浸膏。

1.3.1.2 乙酸乙酯提取物的制备。将番石榴液氮充分研磨,超声破碎,用乙酸乙酯80 $^{\circ}\text{C}$ 萃取2次,每次1 h,8 000 r/min离心10 min,取上清,采用旋转蒸发仪于60 $^{\circ}\text{C}$ 将有机溶剂蒸发完全,即得到番石榴叶丙酮粗提取物浸膏。

1.3.1.3 丙酮提取物的制备。将番石榴叶在液氮中充分研磨,用丙酮于60 $^{\circ}\text{C}$ 萃取2次,每次1 h,8 000 r/min离心10 min,取上清,采用旋转蒸发仪将有机溶剂蒸发完全,即得到番石榴叶丙酮粗提取物浸膏。

1.3.1.4 石油醚提取物的制备。将番石榴液氮磨碎,用石油醚冷浸2次,每次24 h,过滤,8 000 r/min离心10 min,取上

作者简介 叶伟(1986—),男,湖南常德人,副研究员,博士,从事天然产物研究。

收稿日期 2019-07-11; **修回日期** 2019-07-20

清,合并提取液,采用旋转蒸发仪将有机溶剂蒸发完全,即得到番石榴叶石油醚提取物浸膏。

1.3.2 番石榴叶提取物清除过氧自由基能力的测定。

1.3.2.1 番石榴叶提取物清除过氧自由基能力的测定。采用邻苯三酚自氧化法方法^[8-9],将无水乙醇加入番石榴叶有机提取物和维生素 C 中,配制浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液。邻苯三酚用无水乙醇配制成 0.2 mmol/L 的溶液。加 100 μL 有机溶剂提取物溶液至 96 孔板,然后加入等浓度过氧自由基溶液,以无水乙醇作为阴性对照组,以维生素 C 溶液作为阳性对照组,在酶标仪中 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件温育 30 min,用酶标仪检测反应溶液 320 nm 处的吸光度(A),计算不同有机溶剂提取物对过氧自由基的清除率^[9]:

$$\text{清除率} = [1 - (A_{\text{样品组}/\text{阳性组}} - A_{\text{背景组}}) / A_{\text{阴性组}}] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2.2 不同浓度的番石榴叶提取物清除过氧自由基能力的测定。将番石榴叶有机溶剂提取物溶液用无水乙醇稀释至 400、200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“1.3.2.1”方法反应,用酶标仪分析反应溶液 320 nm 处的吸光度,计算番石榴叶有机溶剂提取物对过氧自由基的清除率,并计算对其过氧自由基清除的 IC_{50} 值^[9]。

1.3.2.3 番石榴叶提取物在不同作用时间下清除自由基能力的测定。将各提取物溶液用乙酸乙酯溶液稀释至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“1.3.2.1”方法测吸光度,每隔 10 min 测 1 次,共测 7 次,分析番石榴叶各种有机溶剂提取物作用不同时间对其清除能力的影响。

1.3.3 番石榴叶提取物抑制酪氨酸酶活性的测定。参照二酚酶活力的测定方法^[9],将番石榴叶各提取物用 DMSO 溶解,然后用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液分别稀释至浓度为 2 000、

1 000、500、200 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,酪氨酸酶用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液配成 10 U/mL 酶液,L-dopa 用 PBS 配制成 10 mmol/L 溶液。取 160 μL L-dopa 于 96 孔板,加 20 μL 各浓度番石榴叶有机溶剂提取物及 20 μL 酪氨酸酶溶液,以 PBS 缓冲液代替酪氨酸酶溶液作为样品组,以 PBS 缓冲液代替提取物溶液作为空白对照,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 30 min,用 Multiska 酶标仪测定 96 孔板各个样品于 475 nm 处的吸光度(A),按以下公式计算番石榴叶各有机溶剂提取物对酪氨酸酶活性的抑制率,并计算 IC_{50} 值^[9]。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{样品组}/\text{阳性组}} - A_{\text{空白组}}) / A_{\text{阴性组}}] \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 番石榴叶提取物清除过氧自由基的能力 通过邻苯三酚自氧化法分析,番石榴叶的不同有机溶剂提取物在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时有很强的过氧自由基的清除能力,其清除率均超过 90%,乙醇提取物、乙酸乙酯提取物和丙酮提取物对过氧自由基的清除率分别为 92.5% \pm 0.6%、96.8% \pm 0.7%、93.9% \pm 0.3%。而番石榴叶石油醚提取物则对过氧自由基的清除作用很弱,其清除率仅为 7.9% \pm 0.5%。

2.2 不同浓度的番石榴叶提取物清除过氧自由基能力分析 酶标仪检测结果表明(表 1),番石榴叶不同有机溶剂提取物对过氧自由基的清除能力存在较大差异,其清除过氧自由基的能力从弱到强依次为乙酸乙酯提取物、丙酮提取物、乙醇提取物。另外,不同溶剂的番石榴叶提取物对自由基的清除率与其浓度呈线性相关。经计算,乙醇、丙酮和乙酸乙酯番石榴叶提取物清除过氧自由基的 IC_{50} 值分别为 47.1、35.5 和 21.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同浓度的番石榴叶提取物对过氧自由基的清除率($\bar{x} \pm S, n=4$)

Table 1 The peroxy radical scavenging rates of different concentrations of guava leaves extracts %

提取溶剂 Extraction solvent	提取物浓度 Extract concentration// $\mu\text{g}/\text{mL}$						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200
乙醇 Ethanol	12.1 \pm 0.6	18.3 \pm 0.2	22.3 \pm 0.3	33.8 \pm 0.4	53.1 \pm 0.5	80.5 \pm 0.3	92.5 \pm 1.5
丙酮 Acetone	15.6 \pm 0.3	24.3 \pm 0.5	28.0 \pm 0.3	42.6 \pm 0.6	59.5 \pm 0.3	86.1 \pm 0.4	93.9 \pm 0.5
乙酸乙酯 Ethyl acetate	17.7 \pm 0.2	27.8 \pm 0.9	33.2 \pm 1.0	53.2 \pm 0.2	66.9 \pm 0.4	90.0 \pm 1.6	96.8 \pm 0.5

2.3 番石榴叶提取物在不同作用时间下对过氧自由基的清除能力 从表 2 可以看出,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 番石榴叶各有机溶剂提取物对过氧自由基清除能力随着作用时间的延长而增强,

作用 30 min 时,其对过氧自由基清除率在 75%~85%,当作用 30 min 后,各提取物对过氧自由基的清除率在 85%左右。

表 2 番石榴叶提取物在不同作用时间下对过氧自由基的清除率($\bar{x} \pm S, n=4$)

Table 2 The peroxy radical scavenging rates of guava leaves extracts in different reaction time %

提取溶剂 Extraction solvent	作用时间 Reaction time//min						
	0	10	20	30	40	50	60
乙酸乙酯 Ethyl acetate	50.7 \pm 0.2	56.7 \pm 1.0	72.9 \pm 0.5	81.8 \pm 0.4	84.9 \pm 0.2	85.2 \pm 0.5	84.7 \pm 0.2
乙醇 Ethanol	35.2 \pm 0.2	50.4 \pm 0.2	60.8 \pm 0.2	78.2 \pm 0.7	82.7 \pm 0.6	84.6 \pm 0.4	83.3 \pm 0.2
丙酮 Acetone	42.1 \pm 1.7	52.3 \pm 0.3	65.9 \pm 0.5	79.1 \pm 0.3	83.6 \pm 0.4	84.9 \pm 0.3	83.9 \pm 0.3

2.4 番石榴叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用 从表 3 可以看出,番石榴叶的丙酮提取物和乙酸乙酯提取物为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对酪氨酸酶活性的抑制率超过 50%,其 IC_{50} 值分别为 165.3 和 115.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,乙醇提取物和石油醚提取物对酪氨酸酶的抑制作用则不明显。

3 结论与讨论

为了分析番石榴叶的抗氧化活性,该研究采取不同有机溶剂对番石榴叶进行了提取,并对其清除过氧自由基的能力和抑制酪氨酸酶活性进行了检测。结果表明,不同有机溶剂提取的番石榴叶提取物对过氧自由基的清除能力存在较大

表3 番石榴叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制率($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 The inhibitory ratio of guava leaves extracts on tyrosinase activity

提取溶剂 Extraction solvent	抑制率 Inhibitory ratio//%					IC ₅₀ μg/mL
	20 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/mL	500 μg/mL	
乙醇 Ethanol	4.6±0.5	11.5±0.5	14.6±0.3	21.2±0.6	31.5±0.4	—
丙酮 Acetone	15.5±0.3	23.0±0.3	33.2±0.4	55.3±0.3	72.3±0.3	165.3±0.4
乙酸乙酯 Ethyl acetate	18.4±0.2	31.8±0.1	45.3±0.4	65.6±0.3	82.5±0.7	115.9±0.5
石油醚 Petroleum ether	1.8±1.5	8.7±0.2	11.3±0.2	18.1±0.2	29.5±0.5	—

注:“—”表示未分析 IC₅₀值Note:“—” means that the IC₅₀ value is not analyzed

差异。乙醇、丙酮、乙酸乙酯提取物清除过氧自由基能力较强,而石油醚番石榴叶提取物对过氧自由基清除能力很弱,石油醚的极性远小于乙醇、丙酮和乙酸乙酯的极性,说明番石榴叶提取物中清除过氧自由基的主要活性成分可能极性相对较大。据报道黄酮为番石榴叶的主要活性成分^[10],而黄酮成分的极性相对较大。此外,番石榴叶不同有机溶剂提取物对酪氨酸酶活性的抑制率也存在较大差异,丙酮、乙酸乙酯番石榴叶提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用较为显著,而乙醇和石油醚番石榴叶提取物对酪氨酸酶的抑制效果不明显。丙酮和乙酸乙酯相对乙醇和石油醚为中等极性。根据相似相溶原理,推测番石榴叶有机溶剂提取物中抑制酪氨酸酶活性的主要成分为中等极性。该研究为后期番石榴叶具有清除过氧自由基能力和抑制酪氨酸酶活性化合物的分离奠定了基础,从而促进抗氧化制剂及抗氧化抗衰老药物的开发。

番石榴叶可入药,有许多研究者采用不同方法提取番石榴叶的有效成分并进行分析。但目前关于番石榴不同有机溶剂粗提物抗氧化活性的研究还比较少,该研究充分利用番石榴叶这一资源,研究其抗氧化活性,为后期抗氧化抗衰老药物和酪氨酸酶抑制剂的开发奠定了基础。体外抗肿瘤活性筛选表明,番石榴叶 95%乙醇提取物在 60 mg/L 下对肿瘤细胞 SW480 细胞有一定的抑制活性^[10],番石榴叶还具有

降血糖、降血脂、抗炎和止泻等功效,其主要活性成分包括黄酮类、多酚类、三萜类、杂源萜类等^[11]。该研究首次系统地研究番石榴叶不同有机溶剂提取物的抗氧化作用,为今后进一步通过活性跟踪分离提取不同活性的有效成分和生产应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 温靖,徐玉娟,肖更生,等.番石榴果实的营养价值和药理作用及其加工利用[J].农产品加工,2009(6):11-13,17.
- [2] 黄海军,黄桂琼,周迎春.番石榴叶药理作用及其机制的研究[J].中医药理论与实践,2007,23(5):243-245.
- [3] 李丹,程天印,董振生.番石榴叶药用研究现状[J].畜牧兽医科技信息,2008(2):15-16.
- [4] 韩满达,好毕斯哈拉图,毕力格.番石榴叶子的化学成分及药理作用的研究进展[J].内蒙古中医药,2011(1):81-83.
- [5] 赵玉静,李建宽,张鑫,等.番石榴叶黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究[J].中国中药杂志,2018,43(4):760-765.
- [6] 吴慧星,李尧帆,李荣,等.番石榴叶中抗氧化活性成分的研究[J].中草药,2010,41(10):1593-1597.
- [7] 王波,焦士蓉,刘衡川,等.番石榴叶提取物对小鼠肝脏抗氧化作用研究[J].卫生研究,2007,36(3):298-300.
- [8] 万军,黄国钧,周霞.邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性中检测波长的优化[J].安徽农业科学,2010,38(14):7315,7381.
- [9] 陈雷,赵春琳,周生学.无患子总皂苷体外抑制酪氨酸酶活性的研究[J].安徽农业科学,2015,43(21):56-58.
- [10] 邵萌,王英,翦雨青,等.番石榴叶乙醇提取物的化学成分研究[J].中国中药杂志,2014,39(6):1024-1029.
- [11] 汪梅花,魏文浩,吴振强.番石榴叶的生物活性研究进展[J].中药材,2015,38(10):2215-2219.

(上接第 185 页)

餐馆还以此作为养生药膳特色招揽顾客,如蒸地皮(葛仙米)、蒸薄荷以及蒸马铃薯等。

亳州蒸菜不仅种类丰富,技法纷呈,且蒸菜文化历史悠久。从原料的选取到制作工艺再到调味食用可初步看出亳州蒸菜对养生文化所起到的促进作用,不同年代食用蒸菜种类的变化也从侧面反映了人们愈来愈重视养生保健^[19-21]。

参考文献

- [1] 佚名.诗经·小雅[M].周振甫,译注.北京:中华书局,2002.
- [2] 集韵·证韵[M].上海:上海辞书出版社,1983.
- [3] 《安徽植物志》协作组.安徽植物志:第 2-3 卷[M].北京:中国展望出版社,1984-1988.
- [4] 《安徽植物志》协作组.安徽植物志:第 1,4,5 卷[M].合肥:安徽科学技术出版社,1990-1992.
- [5] 牛倩,王德群,刘耀武.亳州栽培药材的历史变迁[J].安徽医药,2010,14(2):232-234.
- [6] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2007:69.
- [7] 高学敏.中药学[M].2 版.北京:中国中医药出版社,2009:23.
- [8] 李淑媛.一日三餐与健康[M].北京:中国林业出版社,1995:13,42.
- [9] 陈静.中医药膳学[M].北京:中国中医药出版社,2011:1.

- [10] 吉宁,王瑞,韩泽峰,等.不同成熟度水晶葡萄贮藏品质研究[J].河南农业科学,2019,48(9):117-124.
- [11] 申瑞玲,张亚蕊,景新俊,等.藜麦淀粉-硬脂酸复合物的制备及性质研究[J].河南农业科学,2018,47(2):135-139.
- [12] 石庆,陈建平.常熟蒸菜在宴席团餐中的作用和地位[J].现代食品,2016(16):49-50.
- [13] 闻艺.烹饪技法“蒸”之起源考论[J].武汉商学院学报,2016,30(4):43-47.
- [14] 刘新,王盛莉,王海滨.蒸肉蒸菜粉的营养及开发进展研究[J].粮食科技与经济,2015,40(2):66-68.
- [15] 孙晓腾.促进农业机械化、产业化发展的策略[J].南方农机,2019(16):48.
- [16] 聂媛媛,曲泽静,杨善喆,等.安徽生态农业产业发展模式探析[J].安徽农业大学学报(社会科学版),2017,26(4):19-27.
- [17] 王世晖,王月华,王维峰.药食两用中药性味归经总结分析[J].实用医技杂志,2019,26(4):500-502.
- [18] 黄秀珍,邹秀红.泉州区域药食两用中药资源调查[J].中国中医药信息杂志,2019,26(5):1-7.
- [19] 王红丽.常用药食两用中药药食相关性分析[J].光明中医,2018,33(6):869-871.
- [20] 林红强,王涵,谭静,等.药食两用中药——芡实的研究进展[J].特产研究,2019,41(2):118-124.
- [21] 夏英杰,谭振鹏,王柳萍,等.药食两用中药桑椹的研究进展[J].中国医药科学,2013,3(1):52-54.