



黄兰叶乙醇提取物的活性研究和成分分析

彭思敏, 杨小满, 魏孝义, 潘丽珠, 王瑛

引用本文:

彭思敏, 杨小满, 魏孝义, 等. 黄兰叶乙醇提取物的活性研究和成分分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(1): 135–143.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4395>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

番石榴4个品种叶和幼果的生物活性和酚类成分研究

Biological Activities and Phenolic Constituents in Extracts from Leaves and Young Fruits of Four Guava Cultivars

热带亚热带植物学报. 2021, 29(6): 694–702 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4416>

秋石斛花青素提取液成分分析及其体外抗氧化活性和刺激性研究

Component Analysis of *Dendrobium phalaenopsis* Anthocyanin Extract and Its Antioxidant Activity and Irritation *in vitro*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 374–381 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4327>

青钱柳叶的化学成分研究

Chemical Constituents from the Leaves of *Cyclocarya paliurus*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(3): 317–322 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3820>

喙果皂帽花根的化学成分研究

Chemical Constituents from the Roots of *Dasymaschalon rostratum*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(2): 202–206 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3830>

木槿的化学成分研究

Chemical Constituents from the Stems of *Hibiscus syriacus*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 331–338 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4288>

向下翻页, 浏览PDF全文

黄兰叶乙醇提取物的活性研究和成分分析

彭思敏^{1,2,3,4}, 杨小满^{1,2,3,5}, 魏孝义^{1,3,6}, 潘丽珠^{1,2,3}, 王瑛^{1,2,3,5*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650; 3. 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; 4. 中国科学院大学, 北京 100049; 5. 中国科学院核心植物园, 广州 510650; 6. 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要: 为挖掘黄兰(*Michelia champaca*)叶的开发潜力, 采用抗氧化评价、细胞评价和仪器分析方法对超声提取的黄兰叶乙醇提取物进行活性研究和化学成分的定性分析。DPPH·自由基清除和铁离子还原力测定结果表明, 黄兰叶的 20% 和 80% 乙醇提取物具有抗氧化潜能。黄兰叶 20% 乙醇提取物的质量浓度超过 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 80% 乙醇提取物的质量浓度超过 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 对 HacaT 细胞具有细胞毒性。采用超高效液相-质谱联用方法结合软件谱库搜索对黄兰叶乙醇提取物进行成分分析, 共检索到 206 个化合物, 包括黄酮、生物碱、脂肪酸、醇等多种类型, 通过标准品验证可明确鉴定出芦丁、槲皮素、山奈酚等黄酮类物质。不同月份的黄兰叶乙醇提取物的成分含量不相同, 成分分布在春夏季与秋冬季存在明显差异, 某些成分具有季节独特性。因此, 黄兰叶在日化产品开发上存在潜力, 可结合实际根据成分选择采收时间。

关键词: 黄兰; 叶; 乙醇提取物; 抗氧化; 细胞增殖; 超高效液相质谱联用分析; 化学成分

doi: 10.11926/jtsb.4395

Bioactivity and Chemical Composition of Ethanol Extract from *Michelia champaca* Leaves

PENG Simin^{1,2,3,4}, YANG Xiaoman^{1,2,3,5}, WEI Xiaoyi^{1,3,6}, PAN Lizhu^{1,2,3}, WANG Ying^{1,2,3,5*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement, Guangzhou 510650, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Guangzhou 510650, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 5. Core Botanical Gardens, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 6. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In order to excavate the development and utilization potential of *Michelia champaca* leaves, the bioactivity and chemical composition of ethanol extract from leaves obtained by ultrasonic extraction were studied. The results showed that 20% and 80% ethanol extracts had antioxidant potential ability by using DPPH· free radical scavenging assay and reducing power of iron ion. There was cytotoxicity to HacaT cells, when the concentration of 20% or 80% extracts was more than 12.5 or 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. A total of 206 compounds were obtained from ethanol extract from *M. champaca* leaves by UPLC-MS combined with software spectrum library, including flavonoids, alkaloids, fatty acids, alcohols and so on. Among the flavonoids, rutin, quercetin and kaempferol could be identified clearly by standard product verification. The contents of compounds in ethanol extracts of *M. champaca* leaves were different among different months, and the distribution of components in spring and summer were significantly different from that in autumn and winter. Besides, some compositions had

收稿日期: 2021-03-01

接受日期: 2021-04-30

基金项目: 广东省林业科技创新项目(2019KJCX027)资助

This work was supported by the Project for Forestry Science and Technology Innovation of Guangdong (Grant No. 2019KJCX027).

作者简介: 彭思敏, 女, 硕士研究生, 主要从事植物资源开发利用工作。E-mail: Siminpeng17@scbg.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yingwang@scib.ac.cn

seasonal characteristics. In conclusion, *Michelia champaca* leaves had potential in the development of daily chemical products, and the harvest time could be selected according to the actual composition.

Key words: *Michelia champaca*; Leaf; Ethanol extract; Antioxidant; Cell proliferation; UPLC-MS; Chemical composition

我国林产资源丰富, 树种繁多。除传统的水土维持、空气净化、美化环境等生态建设功能外, 林业资源还具有经济功能, 可用在木制品制造业、医药行业、日化工业、食品工业等领域。作为林业资源下的重要材料之一, 黄兰值得关注。黄兰(*Michelia champaca*)为木兰科(Magnoliaceae)含笑属常绿乔木, 具有独特香气, 在亚洲南部和我国南部地区多有分布, 在广东地区有栽培^[1]。目前对于黄兰的利用多体现在园艺^[2]、医药和提香制香上。黄兰的化学成分有糖类、黄酮类、生物碱类、酚类、鞣酸类、萜类和脂肪酸类等^[3-7], 研究多集中在挥发油成分解析上。研究和应用较多的是黄兰花部位, 作为可开发化妆品的植物原料, 黄兰花已被收录到我国已使用化妆品原料名称目录中。相对黄兰花而言, 叶的研究报道却较少, 黄兰叶与花类似均具有香气, 且叶材料的采集不受季节影响, 产量丰富。在印度民间地区有使用黄兰叶用于清洁头发的历史^[8], 现阶段对于黄兰叶的研究多见于包括抗溃疡^[9]、抗炎^[10]、抗高血糖^[11]、抗菌^[12]等生物药理活性上, 植物化学解析上只有叶的挥发油部分有报道。可见, 黄兰叶的研究还处于初期阶段。因此, 本文作者在查阅黄兰研究文献的基础上, 利用常用的抗氧化活性评价方法以及色谱质谱分析手段, 对黄兰叶的乙醇提取物进行分析, 以期为黄兰叶的开发利用提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

新鲜材料采自中国科学院华南植物园, 经本园夏念和研究员和杨科明老师鉴定为黄兰(*Michelia champaca*)叶片。分别于 2019 年 3、6、9 和 12 月采收, 经低温干燥、粉碎和过筛得到黄兰叶粉末, 存于低湿恒温储存柜中待用。

1.2 仪器和试剂

超声波清洗机(JP-040PLUS, 深圳市洁盟清洁技术有限公司); 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); 4 °C 和 -20 °C 冰箱(青岛海尔股份有

限公司); 低湿恒温储存柜(明日百傲科技有限公司); 恒温振荡器(CRYSTAL); 旋转蒸发仪(N-1300, EYELA)、水浴锅(SB-1300, EYELA)、低温冷却水循环泵(SHB-III)、循环水式真空泵(DLSB-5L/10)(巩义市予华仪器有限责任公司); 万分之一分析天平(赛多利斯公司); 组织研磨机(MM400, Retsch); 台式冷冻离心机(5810R, Eppendorf); 冷冻干燥机(SCIENTZ-12N, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 酶标仪(Epoch, Biotek); 制冰机(SM-F140AY651, SANYO); 倒置生物显微镜(XDS-1B); 二氧化碳培养箱(MOO-15AC, SANYO); 超高分辨液相-质谱仪(LTQ-Orbitrap-Elite, ThermoFisher Scientific)。

超纯水(ddH₂O, Millipore 高纯水系统); 无水乙醇(分析纯, 天津百世化工有限公司); 无水甲醇(分析纯, 天津富宇化工有限公司); L-抗坏血酸、DPPH·、细胞级 DMSO 和噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO, Coolaber); 总抗氧化能力(FRAP)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司); DMEM 培养基、澳洲胎牛血清(FBS)及双抗(Gibco 公司); 胰酶(大连美仑生物技术有限公司); HPLC 级无水甲醇和 HPLC 级乙腈(上海安谱实验科技股份有限公司); HPLC 级甲酸(Aladdin)等。

1.3 细胞株

人永生角质细胞 HacaT 细胞株, 购自中国科学院昆明细胞库。

1.4 提取物的制备

黄酮提取参考前人^[13-14]的方法略做修改。分别用 20% 和 80% 乙醇作为提取溶剂, 按 1:9 的料液比进行投料, 预浸泡后用 240 W 超声处理 20 min, 真空抽滤收集滤液, 再加入提取溶剂重复超声提取 1 次, 滤液合并抽滤, 粗提液经浓缩干燥分别得到 20% 乙醇提取的提取物(HLY20)和 80% 乙醇提取的提取物(HLY80), 密封后存于 -20 °C 冰箱待用。

1.5 抗氧化评价方法

参考杨丹^[15]的 DPPH· 自由基清除法。用 DMSO

溶解黄兰叶乙醇提取物和 L-抗坏血酸, 取样品或阳性对照样品 20 μL , 加入 180 μL 0.1 mmol/L DPPH 溶液进行反应。设置样品对照以排除叶绿素的影响, 取样品 20 μL 加入 180 μL 的甲醇; 阴性对照为 20 μL 样品加 180 μL DMSO; 空白对照为 20 μL DMSO 加 180 μL 甲醇; 室温避光反应 30 min 后在 517 nm 波长下测定吸光度 A_{517} 。DPPH 清除率(%) = $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$ 。每个样品重复 3 次, 计算半数清除浓度 IC_{50} 值, 用 Excel 和 SPSS 20.0 进行统计学分析, 显著性分析采用 t 检验方法, 所有数据以平均值 \pm 标准差表示。

铁离子还原法参照 FRAP 检测试剂盒说明书操作, 样品用 DMSO 溶解并稀释成 0.1 mg/mL 的溶液, 如不在标准曲线内, 再稀释进行调整。

1.6 细胞增殖活性评价方法

细胞增殖活性测定采用 MTT 法^[16-17]。取对数生长期的 HacaT 细胞, 按每孔 5×10^4 个/mL 的量吸取细胞悬液 100 μL 接种到 96 孔细胞培养板中。在 CO_2 生化培养箱中培养 24 h, 加入不同质量浓度的待测样品 HLY80 和 HLY20 各 100 μL , 正常细胞组以 100 μL 培养液代替, 空白组为 200 μL 的培养液, 继续培养 24 h。然后往每孔中加入 20 μL 的 MTT, 再培养 2 h, 每孔加入 150 μL DMSO 以结束培养。混匀后在酶标仪下检测 OD_{570} 。细胞存活率(%) = $(\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{正常细胞}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$, 每处理 3 次生物学重复, 用 GraphPad Prism 6.0 进行计算。

1.7 UPLC-MS 检测

以 1 : 10 的料液比进行投料, 重复超声提取 3 次, 合并滤液浓缩冻干得到 80% 和 20% 乙醇提取物, 3、6、9、12 月叶片的 80% 乙醇提取物分别命名为 80M、80J、80S 和 80D; 相应的 20% 乙醇提取物分别命名为 20M、20J、20S 和 20D。

采用超高分辨液相-质谱仪(UPLC-MS)对黄兰叶乙醇提取物进行成分分析。80% 甲醇重溶后用 0.22 μm 滤膜除杂, 存于棕色进样瓶中。UPLC 中所用色谱柱为 Hypersil GOLD column, 1.9 μm , 2.1 mm \times 100 mm; A 相为 1% 甲酸-水, D 相为乙腈; 流速为 0.4 mL/min; 进样量为 1 μL 。梯度洗脱程序为: 0~2 min, 90% A; 2~27 min, 90%~10% A; 27~28 min, 10%~5% A; 28~31 min, 5% A; 31~36 min, 90% A, 总时长为 36 min。

Compound Discoverer 3.1 软件、R 软件和 TBtools 软件用于数据分析。

2 结果和分析

2.1 体外抗氧化活性评价

HLY20 和 HLY80 均表现出有效的 DPPH 自由基清除效果, 在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内, HLY20 和 HLY80 的质量浓度越高, 对 DPPH 自由基的清除效果越好(图 1)。HLY20、HLY80 和 L-抗坏血酸对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为(55.3 \pm 11.9)、(22.9 \pm 1.6) 和(5.2 \pm 0.2) $\mu\text{g/mL}$, 且 HLY80 与 HLY20 间的 IC_{50} 差异显著($P < 0.01$)。

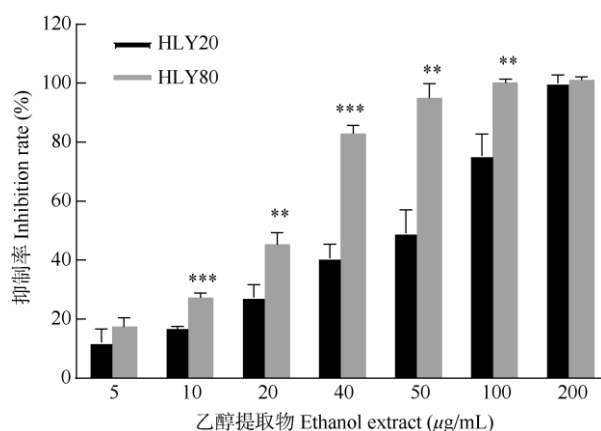


图 1 黄兰叶乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力。**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

Fig. 1 Scavenging activity of ethanol extract from *Michelia champaca* leaves on DPPH. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

采用 FRAP 法进行抗氧化能力评估, 以 Trolox 为阳性对照, 用 FeSO_4 作标准曲线, 得到标准方程 $y = 0.2191x - 0.109$, $R^2 = 0.998$, 说明拟合度较好。FRAP 值与样品的还原力相关, FRAP 值越大说明样品的还原力越强, 抗氧化活性也就越高。HLY20、HLY80 和 Trolox 的 FRAP 值分别为(1.593 \pm 0.046)、(2.764 \pm 0.07) 和(4.608 \pm 0.525) mmol/g, HLY80 约为 HLY20 的 1.7 倍, 存在极显著差异($P < 0.01$)。

2.2 细胞增殖活性评价

HLY20 与 HLY80 对 HacaT 细胞的增殖均表现出剂量抑制性, 且影响程度以 HLY80 较高(图 2)。结果表明, 当 HLY20 为 12.5 $\mu\text{g/mL}$, HLY80 为 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率大于 80%; 当 HLY20

超过 200 $\mu\text{g/mL}$, HLY80 超过 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, HacaT 细胞的增殖会受到影响。

2.3 化学成分分析

将 2019 年 3、6、9、12 月采集的黄兰叶用 80% 和 20% 乙醇提取后, 将提取物进行 UPLC-MS 分析, 然后将数据导入 Compound Discoverer 3.1 软件, 在本地和线上代谢组数据库中进行组分分析, 共得到 206 个化合物的质谱数据(图 3)。大致可分为脂肪酸类、黄酮类及其衍生物、酰胺类、醇类、酯类、生物碱类等(表 1)。其中黄酮类成分有芦丁、槲皮素和山奈酚。

对 4 个月份采集叶片的 HLY80 和 HLY20 进行主成分分析, 从第一主成分和第二主成分各点的分

值来看, 不同乙醇浓度和不同月份的样品能够明显区分开(图 4)。HLY80 和 HLY20 在第一主成分维度上能够明确区分; 3 和 6 月的样品作为一个整体与 9 和 12 月的样品整体在第二主成分维度可区分开。从聚类分析热图中可以明显看出, HLY80 的大部分化合物含量较 HLY20 高。3 月 HLY80 以 3-(2-氨基乙基)-5-甲氧基-1, 3-二甲基-2-咪唑酮、(10*E*)-10-十七碳烯-8-辛炔酸等含量较高; 6 月 HLY80 以鼠李素、7-羟基-2,2-二甲基-2,3-二氢-4*H*-苯并吡喃-4-酮、2-(4-甲氧基苄叉)-1*H*-茚-1,3(2*H*)-二酮等含量较高; 9 月 HLY80 以 2,2,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-6-喹啉基-2-糠酸酯、阿扑吗啡、泛酸等含量高; 12 月 HLY80 以(*E*)-十八碳四烯酸、槲皮素-3- β -D-葡萄糖甙、山奈酚、槲皮素等含量高。而 3 月 HLY20 含量较

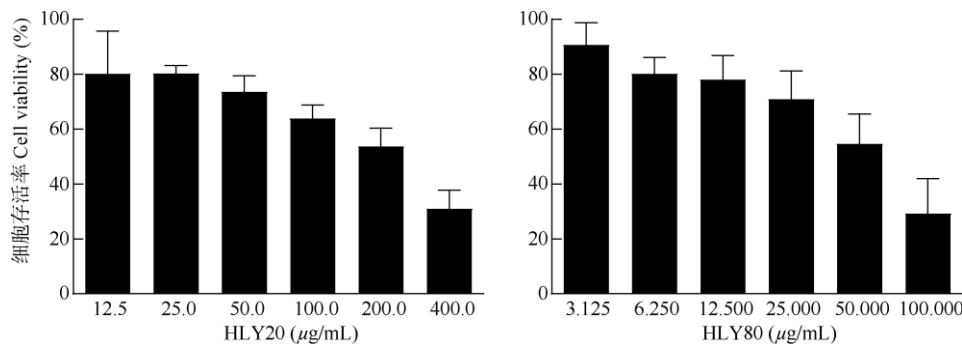


图 2 HLY20 和 HLY80 对 HacaT 细胞存活的影响

Fig. 2 Effects of HLY20 and HLY80 on HacaT cell viability

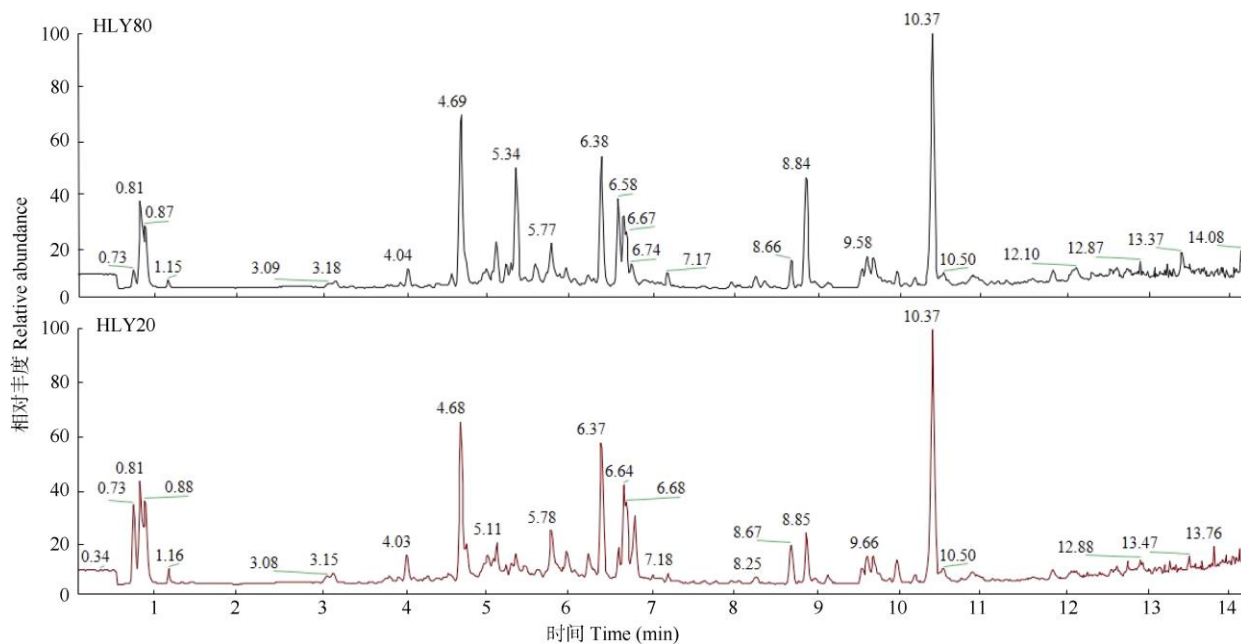


图 3 HLY80 和 HLY20 的总离子流图

Fig. 3 Total ion diagram of HLY80 and HLY20

表 1 部分化合物含量

Table 1 Contents of part compounds

化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量 /% Relative content
芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0.12
槲皮素 Quercetin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.73
山奈酚 Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	0.46
槲皮素-3-β-D-葡萄糖甙 Quercetin-3-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.06
鼠李素 Rhamnetin	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	0.57
泛酸 Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	0.03
7-羟基-2,2-二甲基-2,3-二氢-4H-苯并吡喃-4-酮 7-Hydroxy-2,2-dimethylchroman-4-one	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	1.32
(10E)-10-十七碳烯-8-辛炔酸 (10E)-10-Heptadecen-8-ynoic acid	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	0.04
2-(4-甲氧基苄叉)-1H-茛-1,3(2H)-二酮 2-(4-Methoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione	C ₁₇ H ₁₂ O ₃	0.14
3-(2-氨基乙基)-5-甲氧基-1,3-二甲基-2-吡啶酮 3-(2-Aminoethyl)-5-methoxy-1,3-dimethyl-2-indolone	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	0.09
(E)-十八碳四烯酸 (E)-Parinaric acid	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	0.17
吡啶-3-丙烯酸 Indole-3-acrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	0.62
2,2,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-6-喹啉基-2-糠酸酯 2,2,4-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-6-quinoliny 2-furoate	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	0.13
阿扑吗啡 Apomorphine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	0.12
三羟基丁基苯酚 Trihydroxybutyrophenone	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	0.62
6-[4-(3,4-二甲氧基苯基)-六氢呋喃[3,4-c]呋喃-1-基]-4-甲氧基-2H-1,3-苯并二氧唑	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	0.28
6-[4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-hexahydrofuro[3,4-c]furan-1-yl]-4-methoxy-2H-1,3-benzodioxole		
3-(2-氨基乙基)-5-甲氧基-1,3-二甲基-2-吡啶酮 3-(2-Aminoethyl)-5-methoxy-1,3-dimethyl-2-indolone	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	0.09
肉桂酸甲酯 Methyl cinnamate	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	0.08
3,11,17-三氧雄甾烷-5α-碳腈 3,11,17-Trioxoandrostane-5α-carbonitrile	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	0.16
3-(3-羟基苯基)-2-丙炔酸 3-(3-Hydroxyphenyl)-2-propynoic acid	C ₉ H ₆ O ₃	0.28

高的有 6-[4-(3,4-二甲氧基苯基)-六氢呋喃[3,4-c]呋喃-1-基]-4-甲氧基-2H-1,3-苯并二氧唑、3-(2-氨基乙基)-5-甲氧基-1,3-二甲基-2-吡啶酮等；6 月 HLY20 以三羟基丁基苯酚、6-[4-(3,4-二甲氧基苯基)-六氢呋喃[3,4-c]呋喃-1-基]-4-甲氧基-2H-1,3-苯并二氧唑等含量较高；9 月 HLY20 以吡啶-3-丙烯酸、2,2,4-三甲基-1,2,3,4-四氢-6-喹啉基-2-糠酸酯等含量较高；12 月 HLY20 以肉桂酸甲酯、3,11,17-三氧雄甾烷-5α-碳腈等含量较高(图 4)。有 50 个化合物含量在不同浓度和不同月份乙醇提取物存在差异(图 4)，包括脱镁叶绿酸 A、(10E)-10-十七碳烯-8-辛炔酸、3-3-羟基苯基-2-丙炔酸、槲皮素等，其中 47 个化合物在 8 组样品中含量具有增高趋势。在不同气候条件下含量均较稳定的化合物可能是构成植物结构的重要物质，或是植物进化中用于适应外界环境以维持自身生存的成分。47 个化合物中就有类黄酮槲皮素，槲皮素广泛存在于植物中^[18]，参与 ROS 应激^[19]、干旱胁迫^[20]等逆境修复过程。可见稳定表达的化合物与植物的生长发育密不可分。

对 4 个月份的黄兰叶乙醇提取物进行差异性比较(图 5)，20% 乙醇提取的 4 组提取物共有 24 个化合物含量发生变化，与 3 月相比，9 和 12 月共有

16 个化合物含量下降，33 个化合物含量提高；6 月有 15 个化合物含量下降，49 个化合物含量提高。80% 乙醇提取的 4 组提取物中有 13 个化合物含量发生变化，与 3 月相比，9 和 12 月共有 21 个化合物含量下降，14 个化合物含量提高；6 月有 22 个化合物含量下降，18 个化合物含量提高。20J 中的槲皮素含量比 20M 的高；而 20D 中的鼠李素含量比 20M 的高；80D 中鼠李素含量比 80M 的高。比较不同浓度乙醇提取物的化合物含量差异(图 6)可见，20% 乙醇提取物的化合物含量比 80% 乙醇提取物的低，变化趋势也与聚类热图结果相似。

3 结论和讨论

本研究采用体外评价模型和仪器分析方法分别对超声提取的黄兰叶乙醇提取物进行抗氧化、细胞增殖和化学成分的研究。抗氧化评价结果显示黄兰叶的 2 种乙醇提取物 HLY20 和 HLY80 均表现出抗氧化的潜能，但 20% 和 80% 乙醇提取物的抗氧化能力不尽相同，且 HLY20、HLY80 的抗氧化能力与阳性对照相比都较弱。L-抗坏血酸和 Trolox 作为常用的抗氧化剂，常用于食品工业中，也常规用作抗氧

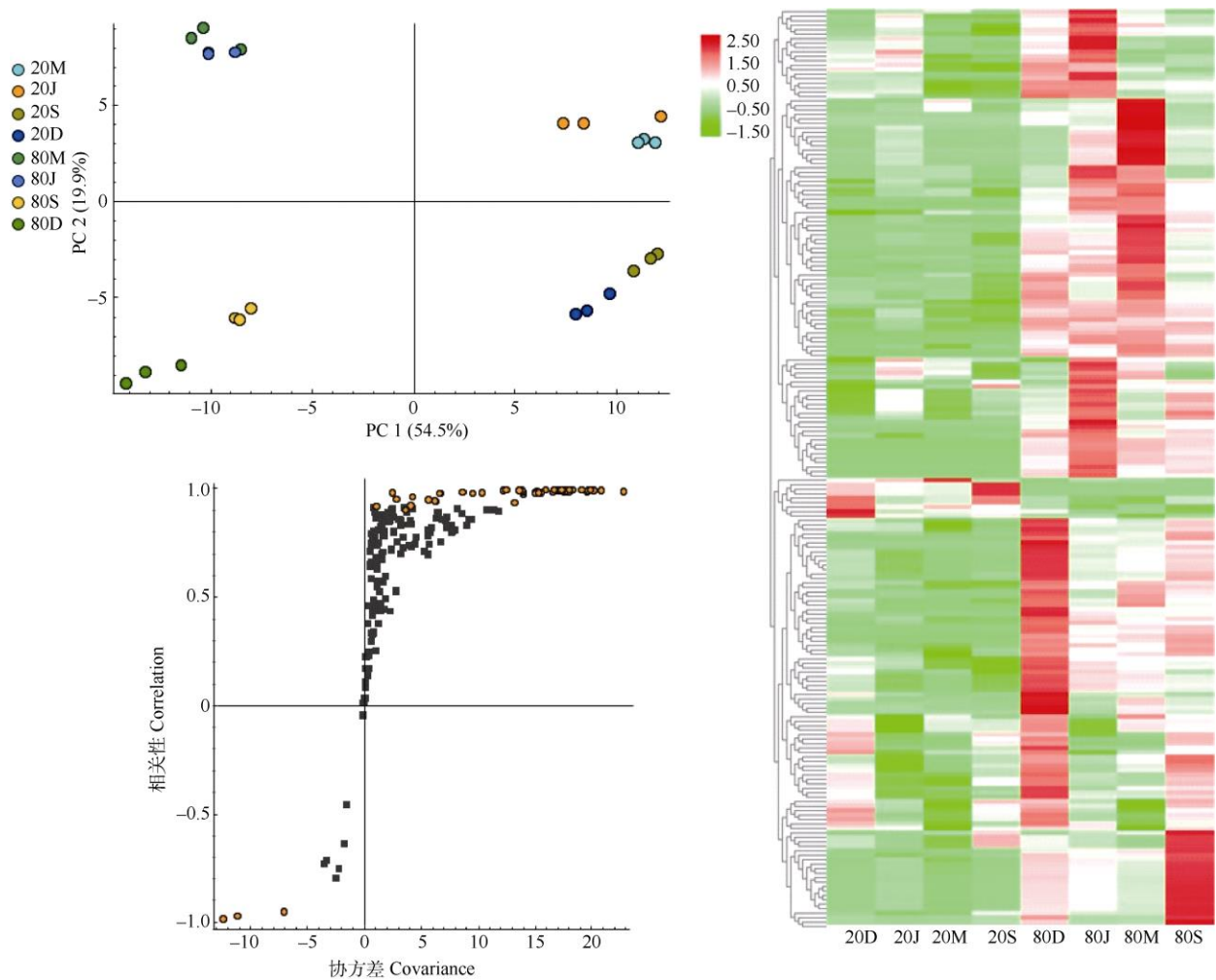


图 4 黄兰叶乙醇提取物的主成分分析(左上)、偏最小二乘判别分析(左下)和热图分析(右)。20M: 3 月份 20% 乙醇提取物; 20J: 6 月份 20% 乙醇提取物; 20S: 9 月份 20% 乙醇提取物; 20D: 12 月份 20% 乙醇提取物; 80M: 3 月份 80% 乙醇提取物; 80J: 6 月份 80% 乙醇提取物; 80S: 9 月份 80% 乙醇提取物; 80D: 12 月份 80% 乙醇提取物。

Fig. 4 Principal component analysis diagram (top left), partial least squares discriminant analysis (bottom left) and heatmap analysis diagram (right) of ethanol extracts of *Michelia champaca* leaves. 20M: 20% Ethanol extract in March; 20J: 20% Ethanol extract in June; 20S: 20% Ethanol extract in September; 20D: 20% Ethanol extract in December; 80M: 80% Ethanol extract in March; 80J: 80% Ethanol extract in June; 80S: 80% Ethanol extract in September; 80D: 80% Ethanol extract in December.

化评价试验阳性对照的试剂^[21]。黄兰叶乙醇提取物的抗氧化能力较阳性对照弱的原因有多种,一种可能与提取工艺有关,导致抗氧化物质提取不充分或损失。本文使用的超声波提取方法不涉及加温,虽然对部分抗氧化成分可能具有保护作用,但不能保证这部分物质能完全提取出来,且超声过程机械会产热,具有强抗氧化的物质一般较不稳定,对光、pH、温度等都很敏感,提取和储存环节的降解行为也有可能造成测量值偏少的情况。林震^[22]等对蛤蒻(*Piper sarmentosum*)叶水提取物的抗氧化热稳定性研究表明,随着温度的提升,总黄酮含量呈先降后升,

而多糖和总酚含量则先升后降,温度过高抗氧化成分会遭破坏;牛先前等^[23]分析了胡椒木(*Zanthoxylum piperitum*)叶片精油的抗氧化能力,精油中还还原与抗氧化物质的萃取效果在 50 °C 时并不好,说明了温度的影响。此外,还可能与提取物组分的复杂性有关。由于 HLY20 和 HLY80 均为粗提取物,化学物质丰富,化学成分的功能各不相同,成分之间的复杂作用或者成分掩盖等也可能影响 DPPH· 自由基的清除和铁离子还原。通过优化提取方法或对提

取物的抗氧化成分进行适度富集有望提升黄兰叶抗氧化功能。细胞实验表明, 当 HLY20 超过 $200 \mu\text{g/mL}$,

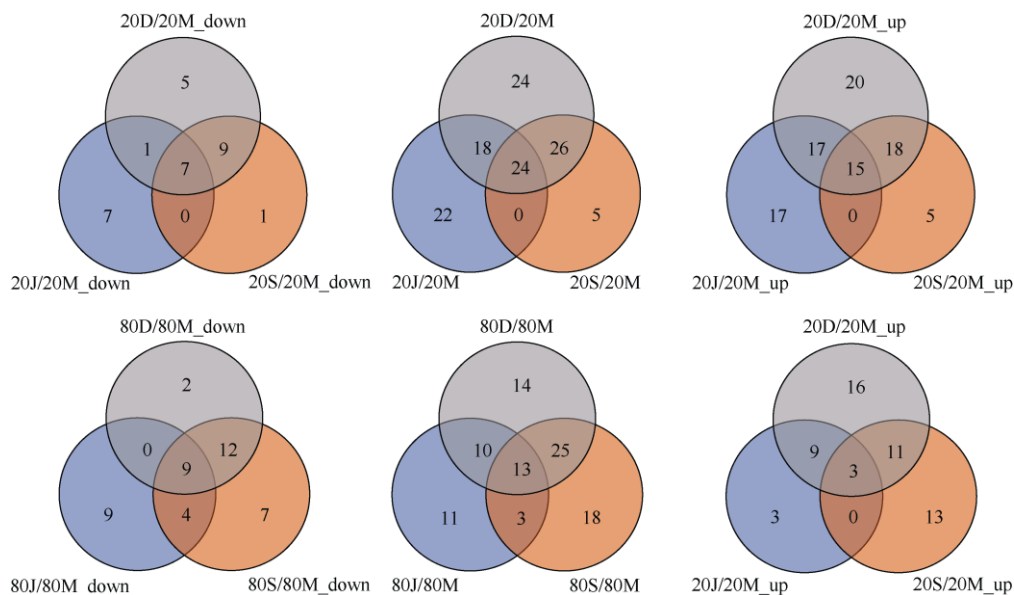


图 5 不同月份黄兰叶乙醇提取物化合物的差异性比较

Fig. 5 Differential analysis of compounds in ethanol extracts of *Michelia champaca* leaves collected in different months

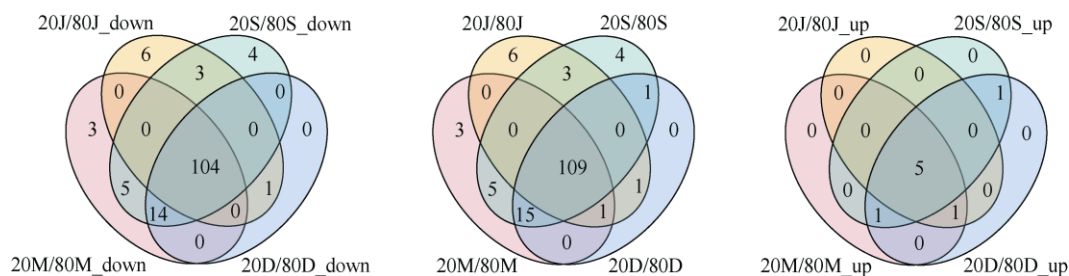


图 6 黄兰叶不同浓度乙醇提取物化合物的差异性比较

Fig. 6 Differential analysis of compounds in extract of *Michelia champaca* leaves by 20% and 80% ethanol

HLY80 超过 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, 对 HacaT 细胞会产生细胞毒性。由于此处的 2 种提取物均属于未进行细分的粗提取物, 其复杂成分中的生物碱等物质可能会对细胞的增殖造成不良影响, 因此可在适当范围内可用于进一步的细胞活性评价, 或进一步细分后用于细胞相关评价模型。UPLC-MS 结果分析提示黄兰叶乙醇提取物中含有丰富的化学成分, 涵盖黄酮、生物碱、脂肪酸、醇等多种类型, 预示黄兰叶的乙醇提取物可能会具有多种生物活性功能, 日后可通过分部提取和分析分离得到更多有用的信息。

黄酮类化合物广泛存在于高等植物中, 木兰科属于双子叶植物纲, 是一种较古老的植物^[24]。黄酮类化合物具有抗氧化^[25]、抗衰老^[26]、抗炎^[27]等多种生物活性。芦丁为常见的黄酮物质之一, 能减轻氧

化应激反应带来的影响, 可改善脑损伤大鼠的神经功能^[28]; 而槲皮素、山奈酚等都有在抗氧化方面活性的报道。DPPH·自由基清除和 FRAP 法实验均证明黄兰叶乙醇提取物具有抗氧化活性, 可能与其所含的黄酮类化合物相关。另外, 通过分析 2019 年 3、6、9、12 月用 20% 和 80% 乙醇提取的黄兰叶提取物化合物的差异, 表明春夏和秋冬季的化合物含量发生一定的规律性变化, 即春夏季和秋冬季的化合物含量分别相近, 说明一年当中可有 2 次采收时机, 可根据实际目的选择在上半年或下半年采收, 如不想影响黄兰开花, 可选择在 9 月采收, 若需花叶一起采时可选择 6 月, 这对生产实践有一定的指导意义。综上所述, 黄兰叶具有抗氧化活性潜能, 作为一种绿色资源, 具有较好的开发潜力。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 30(1) [M]. Beijing: Science Press, 1996: 157.
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第30卷第1分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 157.
- [2] SUJARWO W, KEIM A P. Ethnobotanical study of traditional building materials from the island of Bali, Indonesia [J]. Econ Bot, 2017, 71(3): 224–240. doi: 10.1007/s12231-017-9385-z.
- [3] LIU S L, KAO C L, YE H C, et al. A new α -ionone from *Michelia champaca* [J]. Chem Nat Compd, 2020, 56: 389–391. doi:10.1007/s10600-020-03043-w.
- [4] DEVATH C P, THALLA A K, KATTE S Y. Green synthesis of iron nanoparticles using different leaf extracts for treatment of domestic waste water [J]. J Clean Prod, 2016, 139: 1425–1435. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.09.019.
- [5] ANANTHI T, CHITRA M. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Michelia champaca* (L.) flowers [J]. Amer J Adv Drug Deliv, 2013, 1(5): 734–742.
- [6] TAPRIAL S. A review on phytochemical and pharmacological properties of *Michelia champaca* Linn. family: Magnoliaceae [J]. Int J Pharm, 2015, 2(9): 430–436. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.2(9).430-36.
- [7] HOSAMANI K M, HIREMATH V B, KERI R S. Renewable energy sources from *Michelia champaca* and *Garcinia indica* seed oils: A rich source of oil [J]. Biom Bioenerg, 2009, 33(2): 267–270. doi: 10.1016/j.biombioe.2008.05.010.
- [8] SRIVASTAVA R C, SINGH R K, COMMUNITY A, et al. Indigenous biodiversity of *Apatani* plateau: Learning on biocultural knowledge of *Apatani* tribe of *Arunachal Pradesh* for sustainable livelihoods [J]. Ind J Trad Know, 2010, 9(3): 432–442.
- [9] BHUPATHYRAAJ M, KUMAR M S. Effect of *Michelia champaca* Linn. on pylorus ligated rats [J]. J Appl Pharm Sci, 2011, 1(2): 60–64.
- [10] ANANTHI T, KALAISELVI R. FT-IR analysis and *in vitro* anti-inflammatory activity of leaf extract of *Michelia champaca* L. [J]. World J Pharm Res, 2016, 5(6): 1263–1272.
- [11] GUPTA S, MEHLA K, CHAUHAN D, et al. Anti-inflammatory activity of leaves of *Michelia champaca* investigated on acute inflammation induced rats [J]. Lat Am J Pharm, 2011, 30(4): 819–822.
- [12] MANHAS N, DAHIYA P. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical screening of leaf and stem extracts of *Michelia champaca* Linn. [J]. Int Food Res J, 2017, 24(6): 2672–2676.
- [13] DU Y X, ZHANG J W, HU Z H, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of total flavonoids from leaves of *Ilex centrochinensis* S. Y. Hu and its bacteriostatic effect [J]. Chin Trad Pat Med, 2019, 41(9): 2200–2203.
杜银香, 张建伟, 胡泽华, 等. 华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2200–2203.
- [14] XIANG S, CHEN Z M, ZHANG X H, et al. Extraction of total flavonoids from the leaves of *Euscaphis konishli* Hayata [J]. Wuyi Sci J, 2018, 34(1): 118–122. doi: 10.15914/j.cnki.wywx.2018.34.17.
向双, 陈泽明, 张晓华, 等. 圆齿野鸦椿叶片总黄酮提取工艺的研究 [J]. 武夷科学, 2018, 34(1): 118–122. doi: 10.15914/j.cnki.wywx.2018.34.17.
- [15] YANG D. Chemical constituents of strawberry cv. Falandi fruit and starfruit and their bioactivities [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2015: 81–83.
杨丹. 草莓和杨桃果实的化学成分及其生物活性研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2015: 81–83.
- [16] XU X Y, XIE H H, HAO J, et al. Eudesmane sesquiterpene glucosides from lychee seed and their cytotoxic activity [J]. Food Chem, 2010, 123(4): 1123–1126. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.073.
- [17] MO C L. The proliferation and apoptosis effect of erianin on HacaT cells and the study of dendritic mesoporous silica nanosphere on skin delivery [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 35–37.
莫灿龙. 毛兰素对角质细胞增殖和凋亡的影响及树状介孔硅透皮给药系统的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 35–37.
- [18] LI C, HU Q, ZHANG Y X, et al. Research progress on pharmacological activity of quercetin [J]. Hubei J Trad Chin Med, 2018, 40(6): 63–66.
李聪, 胡强, 张燕翔, 等. 槲皮素的药理学活性研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(6): 63–66.
- [19] PARVIN K, HASANUZZAMAN M, BHUYAN M H M B, et al. Quercetin mediated salt Tolerance in tomato through the enhancement of plant antioxidant defense and glyoxalase systems [J]. Plants, 2019, 8(8): 247. doi: 10.3390/plants8080247.
- [20] DIAS M C, PINTO D C G A, FIGUEIREDO C, et al. Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery [J]. Phytochemistry, 2021, 185: 112695. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112695.
- [21] JIANG L H, LIU H F, HAO G F, et al. Research progress on antioxidant ability of astaxanthin [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(10): 350–354. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.057.
江利华, 柳慧芳, 郝光飞, 等. 虾青素抗氧化能力研究进展 [J]. 食

- 品工业科技, 2019, 40(10): 350–354. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.057.
- [22] LIN Z, WANG J X, CHEN Q Y, et al. Thermal stability of antioxidant property in aqueous extract of *Piper sarmentosum* Roxb. leaf [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(4): 1134–1140.
- 林震, 王嘉欣, 陈秋莹, 等. 蛤蒻叶水提取物抗氧化活性的热稳定性研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(4): 1134–1140.
- [23] NIU X Q, DU L J, LIN X X, et al. Components of essential oils from *Zanthoxylum piperitum* leaves and its capacities of antioxidant, anthelmintic, and bacteriostasis [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2016, 24(1): 93–98. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.013.
- 牛先前, 杜丽君, 林秀香, 等. 胡椒木叶片精油成分分析及其抗氧化、驱虫、抗菌活性 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24(1): 93–98. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.013.
- [24] LIU Y H, XIA N H, YANG H Q. The origin, evolution and phyto-geography of Magnoliaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 1995, 3(4): 1–12.
- 刘玉壶, 夏念和, 杨惠秋. 木兰科(Magnoliaceae)的起源、进化和地理分布 [J]. *热带亚热带植物学报*, 1995, 3(4): 1–12.
- [25] TAN L H, ZHANG D, WANG G, et al. Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical origins [J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 80: 123–130. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.035.
- [26] XUE Y L, AHIKO T, MIYAKAWA T, et al. Isolation and *Caenorhabditis elegans* lifespan assay of flavonoids from onion [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(11): 5927–5934. doi: 10.1021/jf104798n.
- [27] CHO S Y, KIM H W, LEE M K, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities in relation to the flavonoids composition of pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(10): E986. doi: 10.3390/antiox9100986.
- [28] HAN Y W, WANG C C, LI X M. Protective effect of rutin on early brain injury in mice with subarachnoid hemorrhage by anti-oxidation and anti-apoptosis [J]. *Drugs Clin*, 2020, 35(3): 421–425. doi: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.006.
- 韩雨薇, 王晨辰, 李晓明. 芦丁通过抗氧化抗凋亡对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的保护作用 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(3): 421–425. doi: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.006.