

花椒叶的化学组成、叶提取物体外抗氧化活性及其对黑腹果蝇抗氧化酶活性的影响

孙晨倩, 王正齐, 姚 美, 张华峰^①

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室
西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062)

摘要:以采自陕西西安的花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)品种‘大红袍’(‘Dahongpao’)叶片为研究材料,对花椒叶中营养成分和活性成分的含量及其水提物和醇提物的体外抗氧化活性进行了分析,并研究了花椒叶醇提物对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster* Meigen)体内超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的影响。结果表明:花椒叶总蛋白质含量为204.727 g·kg⁻¹,蛋白质的主要组分为醇溶蛋白、谷蛋白、清蛋白和球蛋白;氨基酸总含量达到245.941 g·kg⁻¹,包含16种氨基酸,氨基酸的E/T值、CS平均值和AAS平均值分别为46.57%、148.86%和254.24%;粗纤维、粗脂肪、灰分、水分和可溶性多糖的含量分别为5.69%、2.07%、6.67%、9.13%和8.50 g·kg⁻¹;醇提物中总多酚和类黄酮的含量分别为552.71和133.63 g·kg⁻¹。花椒叶水提物和醇提物对ABTS⁺和DPPH·均具有一定的清除能力;其中,0.08 mg·mL⁻¹醇提物对ABTS⁺的清除率(99.75%)与阳性对照V_c(99.78%)接近,0.08 mg·mL⁻¹水提物对ABTS⁺的清除率则略低于V_c;0.10 mg·mL⁻¹醇提物和水提物对DPPH·的清除率分别为82.27%和81.34%,略低于V_c。花椒叶醇提物和水提物的质量浓度与自由基清除率有明显的量效关系,其中,醇提物对自由基的清除能力较强,其对ABTS⁺和DPPH·的IC₅₀值分别为0.028 2和0.030 1 mg·mL⁻¹。在黑腹果蝇培养基中添加0.1和0.3 mg·mL⁻¹花椒叶醇提物,可使雌性和雄性黑腹果蝇的SOD活性以及雌性黑腹果蝇的GSH-Px活性显著或极显著提高,但对雌性黑腹果蝇的GSH-Px活性无显著影响。研究结果显示:花椒叶蛋白质含量高且品质较好、氨基酸组成均衡,达到优质植物蛋白资源的标准;花椒叶醇提物和水提物均具有一定的抗氧化活性,可能与其多酚和类黄酮含量较高有关。

关键词:花椒叶;营养成分;活性成分;抗氧化活性;抗氧化酶;黑腹果蝇

中图分类号: S573*.9; TS207.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)04-0038-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.04.05

Chemical composition of *Zanthoxylum bungeanum* leaf, and *in vitro* antioxidant activity of leaf extracts and its effect on antioxidant enzyme activity in *Drosophila melanogaster* SUN Chenqian, WANG Zhengqi, YAO Mei, ZHANG Huafeng^① (Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resources Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(4): 38-44

Abstract: Taking leaf of cultivar ‘Dahongpao’ of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. collected from Xi’an of Shaanxi as research material, contents of nutrient components and active components, and *in vitro* antioxidant activity of its aqueous extracts and ethanol extracts were analyzed, and effects of ethanol extracts from *Z. bungeanum* leaf on *in vivo* superoxide dismutase (SOD) and glutathione-peroxidase (GSH-Px) activities in *Drosophila melanogaster* Meigen were researched. The results show that total

收稿日期: 2015-03-31

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(GK201503002); 陕西省科技合作计划项目(2014SJ-01); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2015JM3101); 国家农业部农产品加工重点实验室开放课题项目(2015010)

作者简介: 孙晨倩(1991—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,主要从事粮食、油脂与植物蛋白质工程方面的研究。

^①通信作者 E-mail: isaacsau@sohu.com

protein content in *Z. bungeanum* leaf is $204.727 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and main components in protein are gliadin, glutenin, albumin and globulin. Total content of amino acids reaches $245.941 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ with 16 kinds of amino acids. E/T value, average values of CS and AAS of amino acids are 46.57%, 148.86% and 254.24%, respectively. Contents of crude fiber, crude fat, ash, moisture and soluble sugar are 5.69%, 2.07%, 6.67%, 9.13% and $8.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. Contents of total polyphenol and flavonoids in ethanol extracts are 552.71 and $133.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. Both aqueous extracts and ethanol extracts from *Z. bungeanum* leaf have a certain scavenging ability to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and DPPH^{\cdot} , in which, scavenging rate of $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ethanol extracts to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (99.75%) is close to that of positive control V_c (99.78%), and that of $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ aqueous extracts to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ is slightly lower than that of V_c . Scavenging rate of $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ethanol extracts and aqueous extracts is 82.27% and 81.34%, respectively, which is slightly lower than that of V_c . Mass concentrations of ethanol extracts and aqueous extracts from *Z. bungeanum* leaf have obvious dose-effect relations to scavenging rate of free radicals, in which, scavenging ability of ethanol extracts to free radicals is stronger, IC_{50} value of ethanol extracts to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and DPPH^{\cdot} is 0.028 2 and $0.030 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Adding 0.1 and $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ethanol extracts from *Z. bungeanum* leaf in culture medium for *D. melanogaster* can significantly or obviously significantly enhance SOD activity in female and male of *D. melanogaster* and GSH-Px activity in male of *D. melanogaster*, but has no significant effect on GSH-Px activity in female of *D. melanogaster*. It is suggested that content of protein in *Z. bungeanum* leaf is high, quality of protein is better, and composition of amino acids is balance, meaning that *Z. bungeanum* leaf reaches the standard for high quality vegetable protein resources. Ethanol extracts and aqueous extracts from *Z. bungeanum* leaf have a certain antioxidant activity, which may be related to higher contents of polyphenol and flavonoids.

Key words: *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. leaf; nutrient components; active components; antioxidant activity; antioxidant enzyme; *Drosophila melanogaster* Meigen

芸香科 (Rutaceae) 植物花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) 是重要的经济树种, 在中国的种植面积约有 $2.1 \times 10^6 \text{ hm}^2$ [1]。花椒果皮是中国的传统香料, 也是花椒最重要的深加工资源, 在食品工业中具有重要用途; 花椒叶可作为调味品和椒茶, 在陕西和贵州等省份人们还将其作为新型蔬菜食用, 具有驱风、发汗、抑菌和杀虫等功效 [1-2]。为了明确花椒叶的生物活性, 范菁华等 [1] 分析了花椒叶总黄酮的体外抗氧化活性; 作者所在课题组对花椒叶中水溶性多糖含量进行了测定并摸索出定量分析方法 [2]。但作为新型蔬菜资源, 目前对花椒叶中蛋白质、氨基酸、脂肪和膳食纤维等营养成分的分析及花椒叶生物活性的研究尚处于起步阶段, 这不仅影响了花椒叶资源的合理开发应用, 也不利于花椒叶的食用安全性评估。

作者以产自陕西西安的花椒品种‘大红袍’ (‘Dahongpao’) 叶片为研究材料, 系统测定了花椒叶中营养成分和活性成分的含量, 并采用 ABTS [2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐] 和 DPPH (1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼) 方法分析了花椒叶水提物和醇提物的体外抗氧化活性; 在此基础上, 研究花椒叶醇提物对黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*

Meigen) 体内超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性的影响, 以期全面了解花椒叶的化学组成和生物活性, 为这一新食品资源的合理开发应用提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

供试花椒品种‘大红袍’叶片于 2014 年 4 月采自陕西省西安市。随机选取 5 株样树, 分别采摘当年生枝条顶端的叶片约 200 g; 用自来水和蒸馏水依次漂洗样叶, 置于阴凉通风处干燥后粉碎并过 80 目筛, 密封保存。酶学实验选用 8 h 内羽化未交配的野生型纯种黑腹果蝇。

主要试剂: ABTS、DPPH、半乳糖 (纯度大于 99%)、 V_c (纯度大于或等于 99%)、考马斯亮蓝 G-250 和 Folin-Ciocalteu's 试剂 (美国 Sigma 公司); 琼脂 [北京索莱宝有限公司 (产地日本)]; A001-1 SOD 试剂盒和 A005 GSH-Px 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 牛血清白蛋白 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 山柰酚标准品 (批号 520-18-3) 和没食子酸

标准品(批号149-91-7)的纯度均不低于98%(芜湖贰尔塔医药科技公司);溴甲酚绿-甲基红混合指示液由 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴甲酚绿乙醇溶液与 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲基红乙醇溶液以体积比3:1配制而成;盐酸为优级纯;其余试剂为分析纯。

主要仪器:L-8900全自动氨基酸分析仪(日本HITACHI公司);KJELTEC 2300全自动凯氏定氮仪(瑞典FOSS公司);TU-1810型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);LGJ-18C型真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);SPX智能型生化培养箱(宁波江南仪器厂);JPCQ0328型全数字式超声波清洗机(武汉嘉鹏电子有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 叶片水提物和醇提物的制备 参照文献[3]制备叶片水提物。取适量花椒叶样品粉末,按照料液比1:40(W:V)加入蒸馏水,于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60 W条件下用超声波辅助提取30 min;然后于 $1\ 673\text{ g}$ 离心10 min,上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤,冻干后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存,供试。

参照文献[4]制备叶片醇提物。取适量花椒叶样品粉末,按照料液比1:50(W:V)加入体积分数50%乙醇,置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中浸泡2 h,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60 W条件下用超声波辅助提取20 min;然后于 $1\ 673\text{ g}$ 离心10 min,上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 有机系滤膜过滤,冻干后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存,供试。

1.2.2 营养成分及活性成分含量的测定 采用GB 5009.5—2010方法测定花椒叶中总蛋白质含量;参照文献[5]的方法分离清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白,然后参照文献[6]的方法测定各种蛋白质组分的含量;采用GB/T 5009.10—2003中的酸、碱洗涤法测定粗纤维含量;采用GB/T 5009.6—2003中的索氏抽提法测定粗脂肪含量;采用GB/T 5009.3—2003中的直接称重法测定水分含量;采用GB/T 5009.4—2003中的灼烧称重法测定灰分含量;采用苯酚-硫酸法^[2]测定花椒叶中的可溶性多糖含量。参照文献[5]的方法测定氨基酸含量(色氨酸未检测);参照文献[7]的方法计算氨基酸的化学评分(CS);参照文献[8]的方法计算必需氨基酸与总氨基酸含量的比值(E/T);参照文献[9]的方法计算氨基酸评分(AAS)。以上成分均重复测定3次。

采用分光光度法测定类黄酮含量:用体积分数50%乙醇配制质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的山柰酚标

准品溶液;并在波长190~400 nm范围内对山柰酚标准品溶液和花椒叶醇提物溶液进行扫描,最终确定以229 nm作为测定波长;用体积分数50%乙醇将山柰酚标准品溶液稀释成质量浓度(x)为2.0、4.0、8.0、12.0、16.0和 $20.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,在波长229 nm下测定其吸光度(y)并绘制标准曲线,所得回归方程为 $y=0.051x-0.0014$ ($R^2=0.9973$);用乙醇将花椒叶醇提物稀释至适当浓度,在波长229 nm下测定其吸光度,并根据标准曲线计算花椒叶醇提物中的类黄酮含量。重复测定3次。

采用Folin-Ciocalteu比色法测定总多酚含量:用体积分数50%乙醇配制质量浓度(x)依次为15.0、30.0、60.0、90.0、120.0和 $150.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的没食子酸标准品溶液;各取0.5 mL,分别依次加入蒸馏水5 mL、Folin-Ciocalteu's试剂0.4 mL,摇匀后静置5 min,再分别加入质量体积分数10% Na_2CO_3 溶液0.8 mL,用体积分数50%乙醇定容至10 mL,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应2 h;在波长765 nm下测定吸光度(y),并绘制标准曲线,所得回归方程为 $y=0.002x+0.0095$ ($R^2=0.9974$)。采用体积分数50%乙醇将花椒叶醇提物稀释至适当浓度,按照没食子酸标准曲线的测定方法在波长765 nm下测定吸光度,并根据没食子酸标准曲线计算总多酚含量。重复测定3次。

1.2.3 体外抗氧化活性的测定 分别采用ABTS⁺和DPPH·自由基清除法^[10]测定花椒叶水提物和醇提物的体外抗氧化活性;以 V_c 作为阳性对照,配制质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ V_c 母液,稀释至与提取物待测溶液相同的梯度浓度。采用数学方法建立提取物质量浓度与自由基清除率之间量效关系的拟合方程;并参考文献[11]计算半效剂量(IC_{50})。实验设2次重复。

1.2.4 醇提物对黑腹果蝇SOD和GSH-Px活性的影响 将花椒叶醇提物配制成空白组、低剂量组和高剂量组,质量浓度分别为0.0、0.1和 $0.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将黑腹果蝇随机分为3组,分别对应为空白组、低剂量组和高剂量组,每组80只,雌雄各半,2次重复。

低剂量组和高剂量组的黑腹果蝇先在基础培养基(基础培养基中玉米粉、红糖、琼脂、丙酸、干酵母粉和水的质量分数分别为10.0%、13.5%、1.5%、0.5%、1.0%和73.5%)中培养3 d,再转入分别添加了质量浓度0.1和 $0.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 花椒叶醇提物的基础培养基中培养23 d;空白组的黑腹果蝇则在基础培养基中培养26 d,用同体积蒸馏水代替花椒叶醇提

物。培养期间每隔3 d更换1次培养基。

培养期满后将所有黑腹果蝇置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻30 min。将各处理冷冻的黑腹果蝇分别移入匀浆器,加入预冷的生理盐水,在冰浴条件下匀浆,制成质量体积分数2%黑腹果蝇匀浆液;经941 g离心15 min后取上清液,分别按照SOD和GSH-Px试剂盒说明书采用羟胺法和5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)法测定上清液中SOD和GSH-Px的总活性。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,以蛋白质含量(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $y=0.41x-0.0652$ ($R^2=0.9922$)。根据酶总活性和蛋白质含量分别计算SOD和GSH-Px活性。实验设2次重复。

1.3 数据的统计分析

采用DPS v7.05软件对实验数据进行统计分析,并检测样本间差异显著性(差异显著: $P<0.05$;差异极显著: $P<0.01$)。

2 结果和分析

2.1 花椒叶中营养成分和活性成分的含量

2.1.1 营养成分和活性成分含量 花椒叶中蛋白质较丰富,总蛋白质含量为 $204.727\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,占花椒叶总干质量20%以上;蛋白质的主要组分为醇溶蛋白($31.838\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),谷蛋白($13.264\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和清蛋白($13.123\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)含量居中,球蛋白含量较低($3.517\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。花椒叶中粗纤维、粗脂肪、灰分和水分的含量分别为5.69%、2.07%、6.67%和9.13%。花椒叶中可溶性多糖含量为 $8.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;其醇提物中总多酚和类黄酮含量分别为552.71和 $133.63\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.1.2 氨基酸组成及含量分析 花椒叶中氨基酸组成及其含量见表1,氨基酸的化学评分(CS)和氨基酸评分(AAS)见表2。

由表1可以看出:花椒叶中氨基酸总含量达到 $245.941\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,从中共检出16种氨基酸(脯氨酸未检出)。除色氨酸未检出外,其他的人体必需氨基酸全部检出,其中赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸含量较高,必需氨基酸与总氨基酸含量的比值(E/T)达到46.57%。此外,花椒叶中的鲜味氨基酸(包括谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、精氨酸和丙氨酸)也很丰富,说明花椒叶的鲜美程度较高。

由表2可知:花椒叶中氨基酸的CS平均值为

表1 花椒叶的氨基酸组成及其含量

Table 1 Composition and content of amino acids in leaf of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

氨基酸 Amino acids	含量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Content
赖氨酸 Lys	22.233
甲硫氨酸 Met	15.187
苯丙氨酸 Phe	20.293
缬氨酸 Val	13.827
亮氨酸 Leu	18.727
异亮氨酸 Ile	17.640
苏氨酸 Thr	6.627
组氨酸 His	24.460
精氨酸 Arg	28.507
丝氨酸 Ser	7.280
天冬氨酸 Asp	5.973
谷氨酸 Glu	8.253
甘氨酸 Gly	11.880
丙氨酸 Ala	12.700
半胱氨酸 Cys	12.987
酪氨酸 Tyr	19.367
必需氨基酸 Essential amino acids	114.534
半必需氨基酸 Semi-essential amino acids	52.967
非必需氨基酸 Non-essential amino acids	78.440
总氨基酸 Total amino acids	245.941

表2 花椒叶中氨基酸的化学评分(CS)和氨基酸评分(AAS)

Table 2 Chemical score (CS) and amino acid score (AAS) of amino acids in leaf of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

氨基酸 Amino acids	CS/%	AAS/%
异亮氨酸 Ile	159.56	307.73
亮氨酸 Leu	106.36	138.60
赖氨酸 Lys	155.14	187.24
甲硫氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	241.43	550.47
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	208.30	307.49
苏氨酸 Thr	68.87	95.21
缬氨酸 Val	102.33	192.97
平均值 Average	148.86	254.24

148.86%;花椒叶蛋白质的限制氨基酸为苏氨酸,其CS值为68.87%。除苏氨酸外,花椒叶蛋白质中人体必需氨基酸的AAS值均超过100%,氨基酸的AAS平均值为254.24%。

2.2 花椒叶的抗氧化活性

2.2.1 对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 和 DPPH^{\cdot} 的清除率 花椒叶提取物对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 和 DPPH^{\cdot} 的清除率见图1。由图1可见:花椒叶醇提物和水提物对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 均有清除作用,且随提取物质量浓度的提高($0.00\sim 0.08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 清除率不断增高,说明花椒叶醇提物和水提物对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除能力呈现明显的剂量依赖特征。当

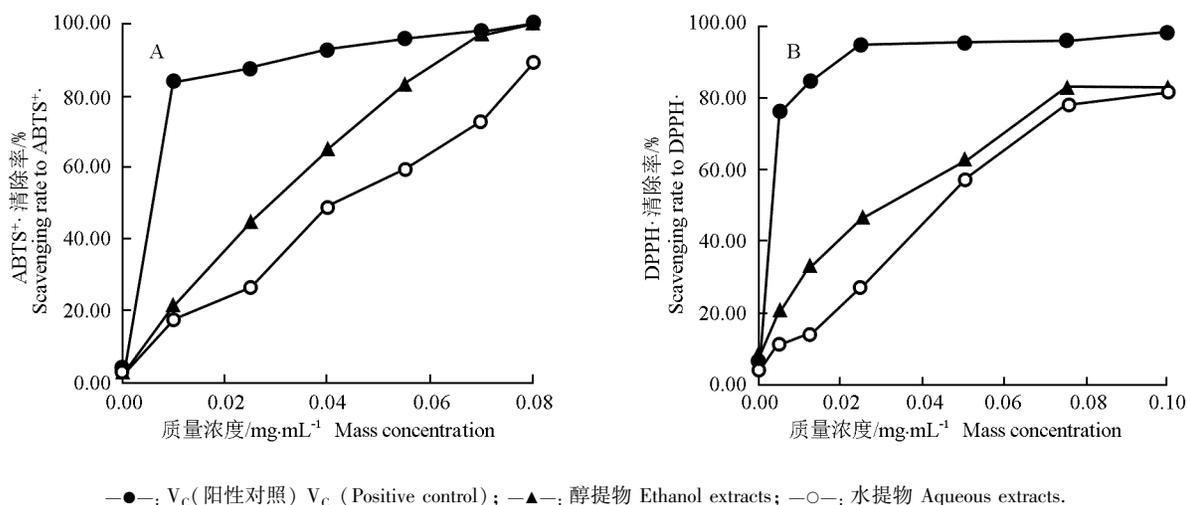


图1 花椒叶提取物对 $ABTS^+$ (A) 和 $DPPH\cdot$ (B) 的清除率
Fig. 1 Scavenging rates to $ABTS^+$ (A) and $DPPH\cdot$ (B) of extracts from leaf of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.

提取物质量浓度为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,花椒叶醇提取物对 $ABTS^+$ 的清除率高达 99.75%,与阳性对照 V_C 对 $ABTS^+$ 的清除率 (99.78%) 接近;而水提取物对 $ABTS^+$ 的清除率则略低于 V_C 。

由图1还可以看出:花椒叶醇提取物和水提取物对 $DPPH\cdot$ 均有清除作用;在质量浓度 $0.00 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,花椒叶醇提取物和水提取物质量浓度与 $DPPH\cdot$ 清除率之间呈明显的剂量依赖关系。当提取物质量浓度为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,花椒叶醇提取物和水提取物的 $DPPH\cdot$ 清除率较为接近,分别为 82.27% 和 81.34%,略低于 V_C 。

采用数学方法建立提取物质量浓度与自由基清除率之间量效关系的拟合方程,并计算半效剂量 (IC_{50}),结果见表3。花椒叶醇提取物和水提取物的质量浓度与 $ABTS^+$ 和 $DPPH\cdot$ 清除率之间均呈现良好的量效关系, R^2 为 $0.9868 \sim 0.9991$ 。花椒叶醇提取物和水提取物对 $ABTS^+$ 和 $DPPH\cdot$ 的 IC_{50} 值均明显高于 V_C ,说

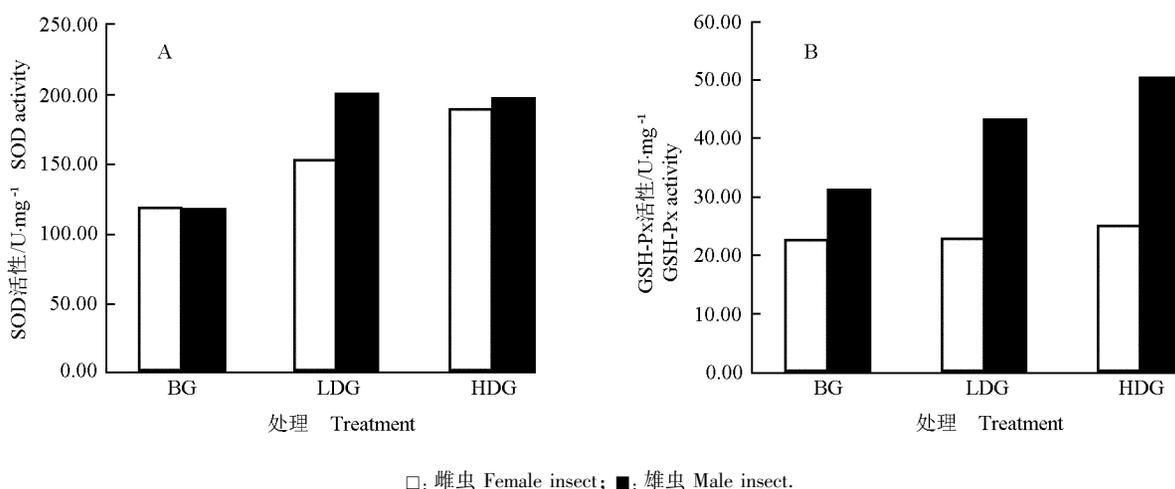
明花椒叶提取物的体外抗氧化能力低于 V_C ;花椒叶醇提取物对 $ABTS^+$ 和 $DPPH\cdot$ 的 IC_{50} 值均低于水提取物,说明花椒叶醇提取物的抗氧化能力高于其水提取物。

2.2.2 对黑腹果蝇 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 根据上述实验结果,为评价花椒叶的体内抗氧化活性,进一步分析花椒叶醇提取物对黑腹果蝇 SOD 和 GSH-Px 活性的影响,结果见图2。由图2可以看出:用添加花椒叶醇提取物的培养基饲养的雌性和雄性黑腹果蝇体内的 SOD 活性均高于空白组(花椒叶醇提取物质量浓度 $0.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。其中,低剂量组(花椒叶醇提取物质量浓度 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的雌性黑腹果蝇的 SOD 活性极显著低于高剂量组(花椒叶醇提取物质量浓度 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($P < 0.01$),但低、高剂量组的雌性黑腹果蝇的 SOD 活性均显著 ($P < 0.05$) 或极显著高于空白组;而高剂量组的雄性黑腹果蝇的 SOD 活性略低于低剂量组,差异不显著 ($P > 0.05$),但低、高剂量组的雄性黑腹果蝇的 SOD 活性均显著高于空白组。

表3 花椒叶提取物质量浓度与 $ABTS^+$ 和 $DPPH\cdot$ 清除率的拟合方程及半效剂量 (IC_{50})¹⁾
Table 3 Fitting equation of mass concentration of extracts from leaf of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. with scavenging rate to $ABTS^+$ and $DPPH\cdot$ and half effect dose (IC_{50})¹⁾

提取物 Extracts	与 $ABTS^+$ 清除率的拟合方程 Fitting equation with $ABTS^+$ scavenging rate		与 $DPPH\cdot$ 清除率的拟合方程 Fitting equation with $DPPH\cdot$ scavenging rate		$IC_{50}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	方程 Equation	R^2	方程 Equation	R^2	S1	S2
	V_C (阳性对照 Positive control)	$y = 17.832 \ln(x) + 155.82$	0.849 1	$y = 15.303 \ln(x) + 143.21$	0.908 1	0.002 6
醇提取物 Ethanol extracts	$y = -9.414.3x^2 + 2.001.9x + 1.075.7$	0.999 1	$y = -8.243.8x^2 + 1.540.8x + 11.063$	0.987 0	0.028 2	0.030 1
水提取物 Aqueous extracts	$y = 329.32x^2 + 1.005.4x + 4.250.8$	0.990 4	$y = -5.290.8x^2 + 1.351.8x + 1.693.2$	0.986 8	0.044 8	0.043 0

¹⁾ y : 清除率 Scavenging rate; x : 提取物质量浓度 Mass concentration of extracts. S1: 对 $ABTS^+$ 的半效剂量 Half effect dose to $ABTS^+$; S2: 对 $DPPH\cdot$ 的半效剂量 Half effect dose to $DPPH\cdot$.



BG: 空白组($0.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Blank group ($0.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); LDG: 低剂量组($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Low dose group ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); HDG: 高剂量组($0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) High dose group ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

图2 花椒叶醇提取物对黑腹果蝇雌虫和雄虫 SOD (A) 和 GSH-Px (B) 活性的影响
Fig. 2 Effect of ethanol extracts from leaf of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. on activities of SOD (A) and GSH-Px (B) in female and male insects of *Drosophila melanogaster* Meigen

由图2还可以看出:高剂量组的雄性黑腹果蝇的GSH-Px活性最高,低剂量组次之,空白组最低,且低剂量组和高剂量组的雄性黑腹果蝇的GSH-Px活性均显著高于空白组;低剂量组和高剂量组的雌性黑腹果蝇的GSH-Px活性虽然略高于空白组,但差异不显著。

3 讨论和结论

上述研究结果表明:花椒叶中含有丰富的营养成分。花椒叶的总蛋白质含量高达 $204.727 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,明显高于新型蔬菜红薯 [*Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.] 叶的总蛋白质含量 ($4.3 \sim 36.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[12];花椒叶蛋白质的E/T值为46.57%,高于WHO推荐的优质蛋白质资源标准(36%);除色氨酸未做检测外,花椒叶中含有全部的人体必需氨基酸;花椒叶中氨基酸的AAS平均值为254.24%,符合WHO规定的氨基酸模式要求^[13];花椒叶中人体必需氨基酸和半必需氨基酸的含量分别为 114.534 和 $52.967 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,均明显高于木本蔬菜植物香椿 [*Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.] 叶(分别为 85.1 和 $15.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[14];花椒叶中粗脂肪含量(2.07%)低于红薯叶中的粗脂肪含量(3.68%)^[15],符合人们的健康营养需求;粗纤维具有防治便秘和降血脂等功效,灰分则反映了矿物质等无

机营养成分的含量,花椒叶中粗纤维和灰分的含量分别为5.69%和6.67%,低于红薯叶中粗纤维和灰分的含量(分别为11.71%和11.03%)^[15]。综合分析结果表明:花椒叶所含的蛋白质品质较好、氨基酸种类齐全且组成合理,在不考虑其他因素的情况下可以作为优良的植物蛋白质来源。

李谷才等^[16]的研究结果表明花椒果皮多糖具有较强的羟基自由基清除能力;齐素芬等^[2]认为花椒叶粗多糖也具有一定的抗氧化活性;李君珂等^[17]的研究结果显示,花椒叶多酚提取物可以有效降低白鲢咸鱼的脂肪氧化水平,使之易于形成较佳的风味、色泽和口感;范菁华等^[1]认为花椒叶类黄酮提取物对羟基自由基等具有较强的清除能力。本研究结果表明,花椒叶中可溶性多糖含量为 $8.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、醇提取物中总多酚和类黄酮的含量分别为 552.71 和 $133.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,这些活性成分均为花椒叶的抗氧化活性成分。

花椒叶水提取物和醇提取物均具有一定的自由基清除能力,且提取物的质量浓度与自由基清除率之间呈明显的量效关系,其中醇提取物对自由基的清除能力较强。考虑到体外实验的局限性^[18],采用国际通用的模式生物黑腹果蝇进一步研究花椒叶醇提取物的体内抗氧化活性,并以与机体氧化应激密切相关的抗氧化酶(antioxidant enzyme)^[19] SOD和GSH-Px活性为指

标,结果显示花椒叶醇提物能够提高黑腹果蝇的SOD和GSH-Px活性。花椒叶醇提物中含约55%总多酚和13%类黄酮,而多酚和类黄酮通常具有良好的抗氧化活性^[10,17,20]。据此推断,花椒叶醇提物的抗氧化活性很可能与其中含有较丰富的多酚和类黄酮有关。多酚与类黄酮是重要的植物活性成分,除了具有较强的抗氧化活性外,多酚还具有防治癌症、心血管疾病、糖尿病和骨质疏松症等药理活性^[21],类黄酮还具有抗菌、抗炎和抗肿瘤等生物活性^[19],因而,对花椒叶多酚和类黄酮的生理功能亟需进一步研究。

参考文献:

- [1] 范菁华,徐怀德,李钰金,等. 超声波辅助提取花椒叶总黄酮及其体外抗氧化性研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6): 22-28.
- [2] 齐素芬,张华峰,姚美,等. 苯酚-硫酸法测定花椒叶多糖含量[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(4): 40-46.
- [3] YANG X A, YU W, OU Z P, et al. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. fruit[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64: 167-173.
- [4] CAO J, XIA X, DAI X, et al. Flavonoids profiles, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition activities of extract from *Dryothyrum boryanum* (Willd.) Ching [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 55: 121-128.
- [5] 牛丽丽,张华峰,杨晓华,等. 4种小檗科植物叶片的蛋白质及氨基酸组成分析[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(4): 105-107.
- [6] SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ E, RUBIO-WILHELMI M del M, RÍOS J J, et al. Ammonia production and assimilation: its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168: 816-823.
- [7] MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, TORRES A, FRIAS J, et al. Semolina supplementation with processed lupin and pigeon pea flours improve protein quality of pasta [J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43: 617-622.
- [8] WANG X S, TANG C H, YANG X Q, et al. Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins[J]. Food Chemistry, 2008, 107: 11-18.
- [9] RODRÍGUEZ GALDÓN B, RÍOS MESAB D, RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ E M, et al. Amino acid content in traditional potato cultivars from the Canary Islands[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010, 23: 148-153.
- [10] ZHANG H F, ZHANG X, YANG X H, et al. Microwave assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 50: 857-865.
- [11] WU P, MA G, LI N, et al. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 194-202.
- [12] WALTER W M, Jr., PURCELL A E, McCOLLUM G K. Laboratory preparation of a protein-xanthophyll concentrate from sweet potato leaves [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26: 1222-1226.
- [13] De OLIVEIRA SOUSA A G, FERNANDES D C, ALVES A M, et al. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut [J]. Food Research International, 2011, 44: 2319-2325.
- [14] 葛多云,邹盛勤. 香椿叶中氨基酸和营养元素分析[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(6): 23-24.
- [15] SUN H, MU T, XI L, et al. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods [J]. Food Chemistry, 2014, 156: 380-389.
- [16] 李谷才,袁立华,张儒,等. 花椒水溶性多糖的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 258-260.
- [17] 李君珂,刘森轩,刘世欣,等. 花椒叶多酚提取物对白鲢咸鱼脂肪氧化及脂肪酸组成的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 109-113.
- [18] VRILAS-MORTIMER A, GOMEZ R, DOWSE H, et al. A survey of the protective effects of some commercially available antioxidant supplements in genetically and chemically induced models of oxidative stress in *Drosophila melanogaster* [J]. Experimental Gerontology, 2012, 47: 712-722.
- [19] ORR W C, SOHAL R S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [J]. Science, 1994, 263: 1128-1130.
- [20] 张华峰,王瑛,黄宏文. 黄酮类化合物生物合成途径的进化及其在淫羊藿中的研究展望[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1745-1751.
- [21] FANG Z, BHANDARI B. Encapsulation of polyphenols: a review [J]. Trends in Food Science and Technology, 2010, 21: 510-523.

(责任编辑:张明霞)