

文章编号:1673-1689(2006)04-0081-04

乌饭树树叶中黄酮类色素的抗氧化活性

王立¹, 姚惠源¹, 陶冠军², 秦 昉²

(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036;2. 江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036)

摘 要: 对乌饭树树叶中提取出的色素进行了分离纯化,分离出了 4 种黄酮类物质。并且对这 4 种物质清除活性氧自由基的能力进行了研究,发现乌饭树提取物都具有很强的清除自由基能力,清除能力最强的槲皮素和 6 号提取物的 IC_{50} 达到了 $5.9 \mu\text{g/mL}$ 左右。

关键词: 乌饭树;黄酮;分离;纯化;自由基;清除

中图分类号:TS 207

文献标识码: A

Scavenging $[O_2^- \cdot]$ and $[\cdot OH]$ of extracts from the Leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

WANG Li¹, YAO Hui-yuan¹, TAO Guan-jun², QIN Fang²

(1. School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;2. Testing and Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this article, four flavones from the leaves of *Vaccinium Bracteatum* Thunb were identified and purified. Their functions of scavenging $[O_2^-]$ and $[OH]$ were also discussed. It was found that all the extracts have low IC_{50} . Quercetin and the 6th extract have the lowest IC_{50} of about $5.9 \mu\text{g/mL}$.

Key words: *Vaccinium bracteatum* Thunb; flavone; identification; purification; freeradicle; scavenge

乌饭树属(又称为越桔属)植物属于杜鹃花科。该属全世界有约 450 种,我国约有 91 种。我国民间有采食乌饭浆果的习惯,有些地方有制造果酱和酿酒,但是没有形成规模。国外对于乌饭树树果的研究报道也有,但不是很多,主要研究是关于乌饭树树果的生理功能,如抗衰老、抗氧化、抗癌防癌、抗菌等等^[1-8]。

从乌饭树树叶中分离出很多种化学成分,包括黄酮类物质、维生素、糖、果胶、有机酸、环烯醚萜类和萜类化合物。紫黑浆果中含多种多酚化合物,如花色素苷和一些甙元、桂皮酸、苯甲酸衍生物、黄烷-

3-醇、黄酮醇糖甙等^[9]。并且有报道已经从中分离出了一种黄酮类物质——槲皮素^[10]。

黄酮类化合物一直是人们所关注的抗氧化剂和自由基清除剂,众多的研究表明,黄酮类化合物具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗突变、抗衰老、抗肿瘤、抗菌等等^[12-15]。其中最主要的是黄酮的抗氧化活性,主要表现在减少自由基的产生和清除自由基两个方面。

作者对乌饭树树叶中提取出的黄酮类色素进行了分离纯化,首次从中分离出了 4 种黄酮类物质,并且对这些物质清除活性氧自由基的能力进行

了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与设备

乌饭树树叶黄酮单体:实验室自制;鲁米诺:FLUKA 公司产品;0.05 mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲液(PB),1 mmol/L 鲁米诺(L),0.1 mmol/L 维生素 C 溶液,33.3 mmol/L 过氧化氢溶液(H_2O_2),1 mmol/L 邻菲罗啉,1 mmol/L 硫酸铜缓冲液,0.05 mol/L pH 9.0 的硼酸-硼砂盐缓冲液(BB),0.05 mol/L pH 10.2 碳酸-盐缓冲液(CB-L),1 mmol/L 邻苯三酚水溶液(P),均为分析纯;槲皮素:贵州大学生生化中试基地提供;芦丁:上海生化试剂一厂产品。Waters 2690 型高效液相色谱仪,LichrospherC-18 色谱柱:美国 Waters 公司产品;生物化学发光测定仪:上海上立检测仪器厂产品;微型混合器:上海彭氏实业有限公司产品;微量移液器:上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分离纯化 乌饭树树叶→体积分数 95%乙醇提取液→石油醚萃取脱脂→水相用氯仿、正丁醇萃取→正丁醇萃取部分浓缩至无醇味→上 AB-8 大孔吸附树脂柱初步纯化→水洗除杂质→体积分数 95%乙醇洗脱→上聚酰胺柱粗分→不同体积分数的乙醇梯度洗脱→各组分聚酰胺柱细分→HW40 柱乙醇梯度洗脱→得到纯物质 3#~6#。

1.2.2 鉴定 盐酸-锌粉试验:取试液 1 mL,加入少量锌粉,摇晃,滴加少量浓盐酸,加热 3~5 min;铅盐沉淀试验:取试液 2 mL,滴加少量乙酸铅试剂;三氯化铝试验:取少量试液滴于滤纸上,喷质量分数 1%三氯化铝溶液,然后于紫外灯下观察;氨熏试验:取少许样品滴于滤纸上,氨气熏,在可见光和紫外灯下观察;HPLC 图谱鉴定:观察样品的 HPLC 图谱^[16-19]。

1.2.3 超氧阴离子自由基 $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ 的清除实验 配制一定浓度的乌饭树树叶黄酮单体甲醇溶液,并用 0.05 mol/L pH 7.8 并含有 0.1 mmol/L 的 EDTA 磷酸盐缓冲液稀释成不同的浓度,发光系统采用邻苯三酚-鲁米诺体系。配比如下:空白试剂 10 μL ;样品 10 μL ;邻苯三酚 20 μL ;0.05 mmol/L CB-L;970 μL 。

精确移取样品和邻苯三酚加入无色透明的硬质玻璃管中,置于发光测定仪中并使之进入测定位置,准确加入 CB-L,启动发光装置,立即使用 R 程序测量 1 min 内每 6 s 的发光积分强度 $\text{CP}_{6\text{s}}$,同时

测定甲醇及各种不同稀释浓度的甲醇溶液作为空白的发光值,用下式计算测试样品的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%)=(A_0-A_s)/A_0\times 100\% \quad (1)$$

A_0 为空白发光值, A_s 为测试样品发光值^[20-22]。

以样品浓度与抑制率作图,根据拟合方程求出抑制率为 50% 时所需样品的浓度,即半抑制浓度 IC_{50} 。

1.2.4 羟基自由基 $[\cdot\text{OH}]$ 的清除实验 测定体系采用邻菲罗啉发光体系。测定操作配比如下:样品液 $V\ \mu\text{L}$;0.1 mmol/L VC 20 μL ;1 mmol/L CuSO_4 50 μL ;1 mmol/L 邻菲罗啉 50 μL ;缓冲液 BB 830 μL ;33.3 mmol/L H_2O_2 50 μL 。 V 为按照需要加入样品液体积。

依次将样品和各种试剂加入到试管中,最后加入 H_2O_2 ,启动发光反应,放入发光测定仪中并使之进入测定位置,立即使用 R 程序测量 1 min 内每 6 s 的发光积分强度 $\text{CP}_{6\text{s}}$,以第六个 6 s 的发光强度 $\text{CP}_{6\text{s}}$ 为标准进行计算,同时以不同体积的甲醇替代样品作为空白对照,计算抑制率(计算公式同式(1))^[23-25]。

以样品浓度与抑制率作图,根据拟合方程求出抑制率为 50% 时所需样品的浓度,即半抑制浓度 IC_{50} 。

2 结果与讨论

2.1 纯化鉴定

纯化鉴定见表 1 和图 1。

表 1 黄酮类化合物定性分析结果

Tab. 1 Qualitative analysis of the extracts

反应类型	现象	结果
盐酸-锌粉试验	4 种物质都变成红色并且静置后有红色沉淀	为黄酮、二氢黄酮或二氢黄酮醇类化合物
铅盐沉淀试验	4 种物质都有明显的红色沉淀	为黄酮类化合物,有邻二酚羟基或兼有 3-OH、4-酮基或 5-OH、4-酮基黄酮
三氯化铝试验	4 种物质都生成黄色	为查耳酮、黄酮醇或黄酮类化合物
氨熏试验	4 种物质都生成黄色	为黄酮类化合物

由表 1 可见,4 种物质均为黄酮类化合物。

HPLC 分析条件:检测器:WATERS 996;分析柱:Lichrospher C-18 2.1X250 mm;流动相:甲醇-水-体积分数 1%乙酸梯度洗脱;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL 。(以时间/min 和相对强度/%作图)

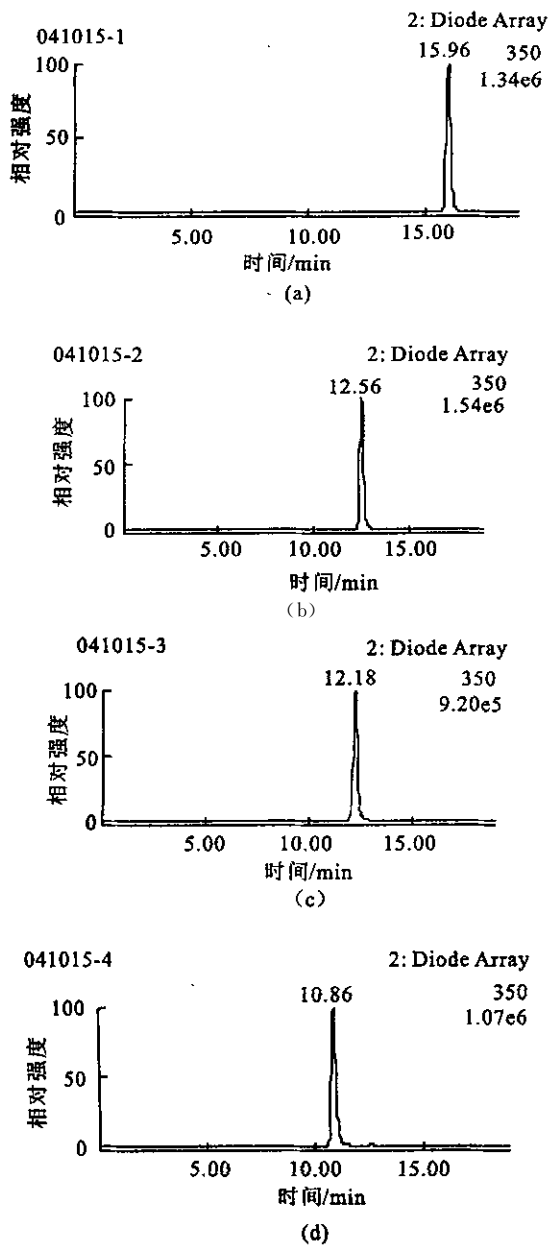


图 1 3#、4#、5#和 6#的 HPLC 图谱
Fig. 1 The HPLC spectra of extracts (Coded 3#, 4#, 5# and 6#)

从图 1 中的 4 张液相图谱可以初步看出,这 4 种物质均为纯物质。

2.2 乌饭树树叶提取物对超氧阴离子自由基 $[O_2^{\cdot-}]$ 清除的影响

超氧阴离子自由基是基态氧接受一个电子产生的第一个氧自由基,是其它氧自由基的前身,最主要的是可以经过一系列的生成其它的氧自由基,因此对于超氧阴离子自由基的清除具有特别重要的意义^[11]。

邻苯三酚-鲁米诺发光体系常用于超氧阴离子自由基清除的研究,它具有专一性强、灵敏度高的优点。在碱性条件下,邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基 $[O_2^{\cdot-}]$, $[O_2^{\cdot-}]$ 激发鲁米诺使之处

于激发态,当鲁米诺分子退激时,发出化学冷光,在一定的浓度范围内,发光强度与 $[O_2^{\cdot-}]$ 的数量呈一定的比例关系,可以采用生物化学发光仪检测发光强度,进而考察样品对 $[O_2^{\cdot-}]$ 的清除能力。

从图 2 可以看出从乌饭树树叶中提取出的物质对超氧阴离子 $[O_2^{\cdot-}]$ 都具有一定的清除能力,但是清除能力具有差异,同时也可以看出,乌饭树树叶粗提物也具有相当强的清除能力。提取物中最强的是槲皮素和 6# 物质,计算其 IC_{50} 发现达到 $5.48\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $5.91\text{ }\mu\text{g/mL}$,最差的是 3#,其 IC_{50} 为 $17.44\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。具体的强弱顺序为:槲皮素 $\approx$ 6# 测试样品 $>$ 4# 测试样品 $>$ 5# 测试样品 $>$ 3# 测试样品 $>$ 芦丁 $>$ 粗提物。

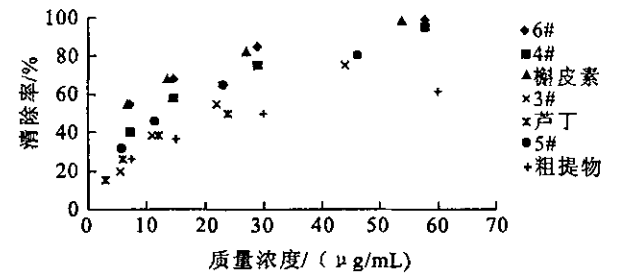


图 2 不同测试样品对超氧阴离子 $[O_2^{\cdot-}]$ 的清除效果
Fig. 2 The superoxide anion scavenging capacity of the extracts

2.3 乌饭树树叶提取物对羟基自由基 $[\cdot OH]$ 清除的影响

羟基自由基 $[\cdot OH]$ 是最活泼的自由基,也是已知自由基中氧化能力最强的自由基,反应能力极强,对生物机体的危害极大,几乎可以与任何大分子物质(如蛋白质、核酸、脂质)等发生作用,导致机体受损和基因突变,引起机体衰老和癌变^[26-27]。

邻菲罗啉- $CuSO_4$ - $VC-H_2O_2$ 发光体系常用于羟基自由基 $[\cdot OH]$ 的清除研究,羟基自由基 $[\cdot OH]$ 攻击发光剂邻菲罗啉,使之发光,其发光强度在一定的时间范围内与 $[\cdot OH]$ 的量呈一定的比例关系。

从图 3 可以看出从乌饭树树叶中提取出的物质对羟基自由基 $[\cdot OH]$ 都具有一定的清除能力,但是各个提取成分之间清除能力具有一定的差异,同时也可以看出,乌饭树树叶粗提物也具有一定的清除能力。提取物中最强的是槲皮素和 6# 物质,计算得到其 IC_{50} 达到 $5.63\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $5.99\text{ }\mu\text{g/mL}$,最差的是 3#,其 IC_{50} 为 $22.45\text{ }\mu\text{g/mL}$ 具体的强弱顺序为:槲皮素 $\approx$ 6# 测试样品 $>$ 4# 测试样品 $>$ 5# 测试样品 $>$ 3# 测试样品 $>$ 芦丁 $>$ 粗提物。

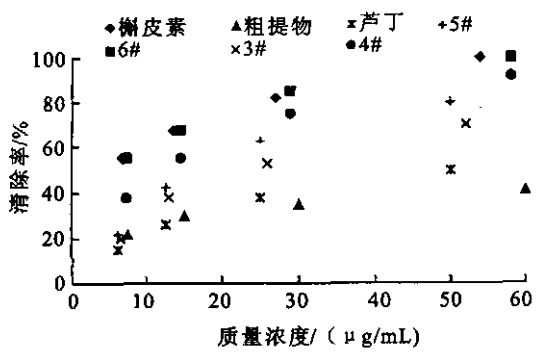


图 3 不同测试样品对羟基自由基[·OH]的清除效果
Fig. 3 The hydroxyl radical-scavenging capacity of the extracts

3 结 语

乌饭树树叶具有一定的生理功能,但是目前利用不是很多,主要原因是其中的成分不够明确。作者从乌饭树树叶分离出了 4 种黄酮类物质,并且发现这些物质具有很强的清除自由基的能力,相信这将有助于乌饭树的进一步开发利用。

参考文献:

[1] James A. Joseph, Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach or strawberry dietary supplementation[J]. **The Journal of Neuroscience**, 1999,19(18):8114—8121.

[2] Connor A M. Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays [J]. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 2002,127 (2):238—244.

[3] Connor A M. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold—temperature storage[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2002,50(4):893—898.

[4] Pinhero R, Paliyath G. Antioxidant and calmodulin-inhibitory activities of phenolic components in fruit wines and its biotechnological implications[J]. **Food Biotechnology**, 2001,15(3):179—192.

[5] Anon. The benefits of blueberries[J]. **Food Engineering International**,1998,23 (2):17.

[6] Howell A B. Cranberry juice and adhesion of antibiotic-resistant uropathogens[J]. **Journal of the American Medical Association**, 2002, 287(23): 3082—3083.

[7] Moon J W. Genotypic difference in the effect of temperature on CO₂ assimilation and water use efficiency in blueberry[J]. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, 1987,112(1):170—173.

[8] Weiss E I. Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2002,42(3):285—292.

[9] 柳云溪. 黑果越桔的研究进展[J]. 国外医药·植物药分册,1998,13(1):13—17.

[10] 王立,姚惠源. 乌饭树树叶中黄酮类色素提取及分离纯化[J]. 食品与发酵工业,2004,10:120—125.

[11] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,2002.

[12] 刘莉华,宛晓春,李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(3):265—270.

[13] 裴凌鹏,惠伯棣,金宗濂,等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学,2004,(2):203—207.

[14] 覃仁辉,张梦军,吴世容,等. 银杏叶中黄酮类化合物的提取及其医药学应用[J]. 长沙大学学报,2004,18(2):37—42.

[15] 刘凤云. 沙棘总黄酮的药理研究概况[J]. 中药材,2004,27(2):145—147.

[16] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京:科学出版社,1977.

[17] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:科学技术出版社,1997.

[18] K. R. 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术[M]. 张宝琛,唐崇实译. 北京:科学出版社,1990.

[19] 高锦明. 植物化学[M]. 北京:科学出版社,2003.

[20] Wang Hong, Gao Guo-hua. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins[J]. **J Agric Food Chem**, 1997,45:304—309.

[21] Frankel E N, Bosanek C A. Commercial grape juices inhibit in the vitro oxidation of human low-density lipoproteins[J]. **J Agric Food Chem**, 1998,46(3):834—838.

[22] 许申鸿,杭湖. 邻苯三酚-碳酸盐缓冲液化学发光体系的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(5):488—491.

蛋白质肽,并进行活性探讨,充分利用软骨多糖和蛋白质资源。

表 2 硫酸软骨素粗品和纯品的氨基酸分析
Tab. 2 Individual AA contents of crude and purified ChS

非必需氨基酸名称	质量分数/(g/Kg)		必需氨基酸名称	质量分数/(g/Kg)	
	粗品	纯品		粗品	纯品
天冬氨酸(Asp)	11.89	1.68	缬氨酸(Val)	2.63	0.68
谷氨酸(Glu)	20.66	2.94	蛋氨酸(Met)	0.42	0.22
丝氨酸(Ser)	6.61	3.64	苯丙氨酸(Phe)	1.92	1.90
组氨酸(His)	2.80	0.66	亮氨酸(Leu)	3.57	1.50
甘氨酸(Gly)	34.14	2.16	异亮氨酸(Ile)	1.68	1.02
精氨酸(Arg)	20.02	0.50	赖氨酸(Lys)	8.19	0.17
胱氨酸(Cys—Cys)	0.99	0.13	苏氨酸(Thr)	2.60	1.11
酪氨酸(Tyr)	0.86	0.10	丙氨酸(Ala)	9.90	1.28
脯氨酸(Pro)	9.39	3.00	羟脯氨酸 9.98	—	—
总非必需氨基酸量	127.24	16.09	总必需氨基酸量	21.01	6.60
氨基酸总量	148.25	22.69			

参考文献：

[1] 李鑫,姚开,贾冬英,等. 硫酸软骨素的提取和纯化分离技术[J]. 天然产物研究与开发,2004 , 116(16):597—600.

[2] 李南. 硫酸软骨素的开发及生产工艺控制[J]. 上海水产大学学报,1998,7(1):38—43.

[3] 姜艳,林海,左永生. 混凝法在硫酸软骨素废水后处理中的应用[J]. 工业安全与环保,2003,19(11):11—12.

[4] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺-mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate[J]. *Journal of Biochemistry*, 125,(2): 297—304.

[5] 张惟杰. 糖复合生化技术(第 2 版)[M]. 浙江:浙江大学出版社,1999:21.

[6] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床,1998,18(6):68—71.

[7] 徐靖,杨秀岑. 邻苯三酚—鲁米诺发光体系测定 SOD 活性[J]. 鄱阳医学院学报, 1999,18(2):68—70.

[8] 奚俊,张有森. 对硫酸软骨素传统提取方法的改进[J]. 生物学杂志,2000,17(6):33—34.

[9] 华子义. 硫酸软骨素生产新工艺[J]. 上海大学学报(自然科学版),2001,7(4):334—336.

[10] 马淑涛,张天民,李南,等. 不同工艺硫酸软骨素的理化性质和生物活性[J]. 中国医药工业杂志,1993,8:348—352.

[11] Takuo Nakano,Kayo Nakano. Extraction of glycosaminoglycan peptide from bovine nasal cartilage with 0. 1M sodium acetate [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, (46): 772—778.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 84 页)

[23] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟基自由基的建立[J]. 基础医学与临床,1998,18(6):68—71.

[24] 陈季武,胡天喜. 测定·OH 产生与清除的化学发光体系[J]. 生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136—140.

[25] Heinonen I M, Meyer A S. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation[J]. *J Agric Food Chem*, 1998,46(10):4107—4112.

[26] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,2002.

[27] 周坤福. 分子生物学与中药开发[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.

(责任编辑:朱 明)