

文章编号:1673-1689(2010)06-0842-05

## 银杏黄酮抑制脂质氧化的研究

张 静<sup>1,2</sup>, 张晓鸣<sup>\*1,2</sup>, 佟建明<sup>1,2,3</sup>, 夏书芹<sup>1,2</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院; 3. 动物营养学国家重点实验室, 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘 要:** 为明确银杏黄酮的有效活性形态, 为银杏黄酮作为天然抗氧化剂提供实验依据, 本研究将苷元型和糖苷型银杏黄酮分别添加到大豆油和鼠脑组织匀浆中, 考察它们对高温下大豆油氧化的抑制效果和对由  $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$  诱导产生的丙二醛(MDA)的抑制效果。结果表明, 苷元型和糖苷型的黄酮均能有效地抑制脂质氧化, 且在相同浓度下苷元型比糖苷型银杏黄酮有更强的抑制脂质氧化的能力( $p<0.05$ ); 作为天然的抗氧化剂, 苷元型银杏黄酮有更好的抗氧化效果。

**关键词:** 银杏黄酮; 油脂; 抗氧化

**中图分类号:** TS 202.3

**文献标识码:** A

## Inhibiting Effect of Ginkgo Flavonoid on Lipid Peroxidation

ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-ming<sup>\*1,2</sup>, TONG Jian-ming<sup>1,2,3</sup>, XIA Shu-qin<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, CAAS, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Lipid peroxidation inhibiting activity of two types of Ginkgo flavonoid (i. e. aglycone and glycoside) was evaluated in this study. With the addition of the aglycone and the glycoside flavonoid into the soybean oil and the mice brain homogenate, peroxide value and the maleic dialdehyde (MDA) quantity were determined, respectively. Results showed that both the aglycone and glycoside flavonoids had efficiently inhibition effect on the lipid peroxidation, and aglycone exhibited stronger inhibiting activity ( $p<0.05$ ). The aglycone is a more useful form of the Ginkgo flavonoid as the antioxidant additive.

**Key words:** ginkgo flavonoid, lipid, antioxidative activity

黄酮类化合物(flavonoids)是自然界尤其是植物界分布较广泛的一大类天然酚类化合物。具有广泛的药理作用, 其中包括扩张血管、降低血压、抗

衰老、抗肿瘤等<sup>[1-3]</sup>。银杏黄酮(Ginkgo flavonoid)是从中草药银杏叶中提取分离的有效成分, 且大多以糖苷形式存在, 其苷元主要有 3 种: 槲皮素, 山奈

收稿日期: 2009-10-19

基金项目: 国家“十一五”科技攻关计划项目(2006BAD12B05)。

作者简介: 张静(1976—), 女, 山东泰安人, 博士研究生。Email: jingjing1997@ hotmail.com

\* 通信作者: 张晓鸣(1965—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品化学, 风味化学方面的研究。Email: xmzhang@jiangnan.edu.cn

酚和异鼠李素,其结构如图 1 所示<sup>[4]</sup>。

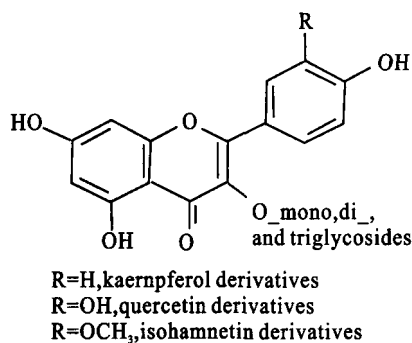


图 1 主要银杏黄酮结构

Fig. 1 Structure of the ginkgo flavonoid

油脂在空气中易被氧化,在氧化过程中产生的氢过氧化物,对油脂质量造成很大影响。天然抗氧化剂是未来油脂和食品行业的一大趋势,除了植物油脂中普遍存在的生育酚之外,黄酮类作为新型的油脂抗氧化剂已越来越被注意。油脂的自动氧化是一个自由基链反应<sup>[5]</sup>,银杏黄酮可以通过清除自由基,达到抗氧化的效果<sup>[6]</sup>。在生理体系中,脂质过氧化会产生一定数量的次级代谢物,如丙二醛(MDA)等,并且 MDA 被研究发现是引起细胞膜结构破坏和细胞损伤的重要物质<sup>[7]</sup>。脂质氧化产生的脂质过氧化物的积累能破坏生物膜的功能,促进衰老及动脉粥样化。

研究用高纯度银杏黄酮分别在大豆植物油和鼠脑匀浆两种体系进行了银杏黄酮抗脂质氧化的研究,比较了黄酮苷及黄酮苷元两种形态的黄酮的抗氧化活性的差异,以便进一步明确银杏黄酮抗氧化作用的活性形态,对其作为天然抗氧化剂的开发提供了实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

糖苷型银杏叶黄酮提取物:黄酮质量分数 55%,作者所在实验室自制;苷元型银杏叶黄酮提取物:由糖苷型银杏叶提取物盐酸水解后分离制得,黄酮质量分数 58%;大豆油:由东海粮油有限公司提供;SD 大鼠:购于上海斯莱克生物有限公司;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT):化学纯;三氯甲烷,冰乙酸,乙醚,无水乙醇均为分析纯且购于上海国药集团化学试剂有限公司;KI 溶液,硫代硫酸钠溶液,KOH 溶液,1% 的淀粉指示剂溶液均按国标配制。

DHG-9140A 型电热式恒温箱:上海精宏实验设备有限公司生产;超级恒温水浴锅:常州市华普

达教学仪器有限公司生产。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 银杏黄酮对大豆油脂过氧化值的影响** 在 100 mL 三角瓶中称取新鲜大豆油 60.0 g,准确称取不同形态银杏叶提取物(黄酮质量分别是豆油质量的 0.01%, 0.02%),BHT(豆油质量的 0.02%)加入到油中,充分摇匀。每组设 3 个重复,同时做空白对照样。然后置于 70 °C 的恒温箱中保存,保持空气流通,加速氧化,定期取样测定过氧化值。大豆油的过氧化值(POV 值)的测定参照 GB5009.44-2003 的方法。

**1.2.2 银杏黄酮对鼠脑组织匀浆中脂质氧化的影响** 鼠脑匀浆液中的过氧化反应由 FeCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 试剂诱导产生<sup>[8]</sup>。将新鲜鼠脑组织称重后按 1:9(m:m)加入冰生理盐水匀浆后,于 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液冷藏备用。用 1%(m:m)的脑匀浆液 2 mL 分别加入 0.5 mmol/L 的 FeCl<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液各 0.5 mL 及不同浓度的银杏叶提取物溶液(黄酮质量浓度为 0~80 μg/mL) 1 mL。混匀后于 37 °C 水浴中保温 1 h,取出后分别加入 TBS-TAC 溶液 1 mL,于 100 °C 水浴中煮沸 30 min,取出后 6 000 r/min 离心 10 min,535 nm 处测吸光值<sup>[6]</sup>。脂质氧化抑制率用以下公式计算:

$$\text{抑制率}\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

其中 A<sub>0</sub> 表示对照(不加黄酮或 BHT)的吸光值, A<sub>1</sub> 表示有黄酮时溶液的吸光值, A<sub>2</sub> 表示不加脑匀浆液的吸光值。

**1.2.3 银杏黄酮的高效液相色谱分析条件** 银杏黄酮苷与苷元的高效液相色谱条件与文献<sup>[9]</sup>方法一致。0.05%(m:m)磷酸溶液为流动相 A,体积分数 100% 甲醇溶液为流动相 B,梯度洗脱。0~20 min, 体积分数 10~80% B(V:V), 20~25 min, 体积分数 80% B(V:V), 25~26 min, 体积分数 80~10% B(V:V)。采用 PDA 检测器,检测波长为 280 nm。

### 1.3 统计分析

实验结果以(x±S)形式表示,采用 t 检验进行显著性检验,SPSS 统计软件进行统计比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄酮苷与苷元的鉴定

黄酮苷与苷元分别采用液相色谱仪进行分析。黄酮苷的色谱图如图 2 所示。

由图谱可以看出,黄酮苷出峰时间在 10 min 之前,而前期的研究表明<sup>[7]</sup>苷元的出峰时间相对较

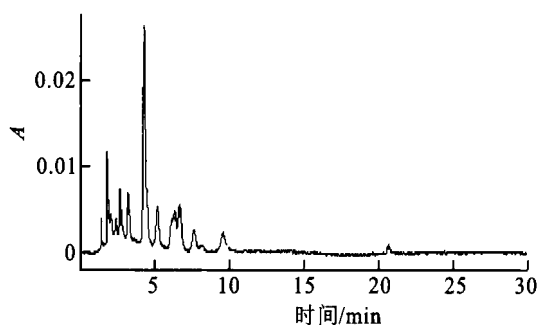


图 2 黄酮苷的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC of the flavonoid glycoside

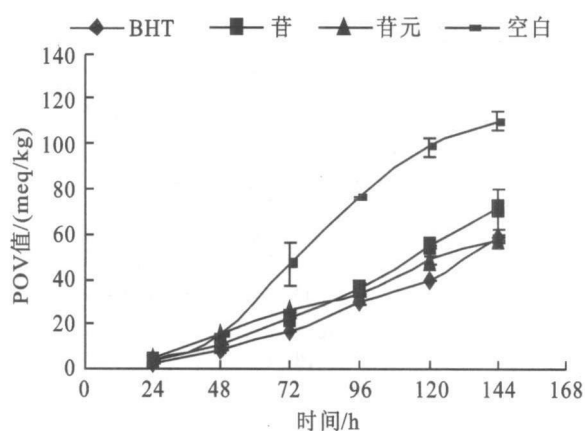
晚,一般在 10 min 之后,其出峰时间与标准品槲皮素(出峰时间 12.775 min),山奈酚(出峰时间 14.739 min),异鼠李素(出峰时间 15.079 min)相一致。这与文献报导银杏叶提取物中黄酮主要以糖苷形式存在<sup>[10-11]</sup>,而在水解后糖苷键断裂变为苷元<sup>[12-13]</sup>相一致。

## 2.2 不同形态的银杏黄酮对大豆油脂过氧化值的影响

油脂的自动氧化是自由基链反应<sup>[6]</sup>,银杏黄酮具有清除自由基的能力,因此可以抑制油脂的氧化。添加不同形态的银杏黄酮与 BHT 后的大豆油的氧化的 POV-时间曲线如图 3 所示,其氧化速度先慢后快,存在明显的诱导期,添加银杏黄酮与 BHT 后能显著延长油脂的氧化诱导期。且糖苷型与苷元型银杏黄酮对豆油均有抗氧化作用,但其强弱有差异,在 72 h 后,与空白组相比,银杏黄酮与 BHT 均能显著降低油脂的过氧化值( $p < 0.05$ )。在最初的 80 h 左右,同浓度的糖苷型银杏黄酮的抗氧化作用比苷元型银杏黄酮的抗氧化作用强,但差异不显著( $p > 0.05$ )。在 80 h 以后,同浓度的苷元型银杏黄酮对大豆油的抗氧化作用比糖苷型银杏黄酮的抗氧化作用强,且其抗氧化作用随时间的延长越接近同浓度的 BHT 的抗氧化能力。在 120 h 后,苷元型黄酮与糖苷型黄酮相比,能显著降低油脂过氧化值( $p < 0.05$ )。

## 2.3 不同银杏黄酮的添加量对大豆油脂抗氧化作用的过氧化值的影响

不同银杏黄酮添加量对大豆油抗氧化作用的 POV-时间曲线如图 4 所示,糖苷型和苷元型银杏黄酮对大豆油的抗氧化作用均随浓度增大而增强,且随添加量的增大,时间的延长,添加量大的油样的过氧化值与添加量的小的油样的过氧化值的差值增大。在大于 120 h 后,不同添加量的同种黄酮间具有明显差异( $p < 0.05$ ),但在添加质量分数分别为 0.01% 与 0.02% 时,糖苷型和苷元型银杏黄酮对延长诱导期的影响变化不明显(72 h 时间内,  $p >$

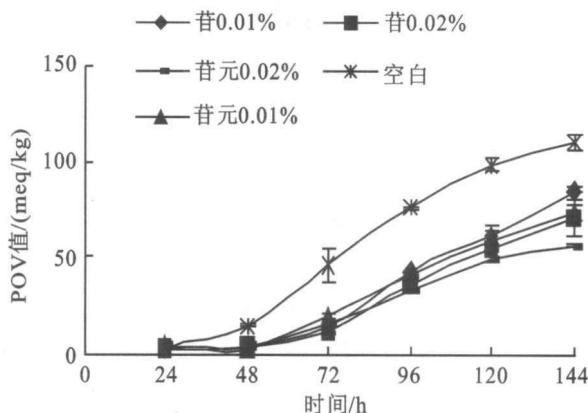


银杏黄酮及 BHT 的添加量为 0.02%

图 3 银杏黄酮苷,苷元及 BHT 对大豆油过氧化值的影响

Fig. 3 Effect of the flavonoid and the BHT on the soybean oil peroxidation

0.05)。



银杏黄酮添加量分别为 0.01% 和 0.02%

图 4 不同银杏黄酮添加量对大豆油过氧化值的影响

Fig. 4 Effect of the flavonoid on the oil peroxidation with different dosage

## 2.4 银杏黄酮对鼠脑组织匀浆中脂质的过氧化抑制作用

银杏黄酮对鼠脑组织匀浆中由  $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$  诱导的脂质过氧化的抑制效果如图 5 所示,银杏黄酮糖苷型和苷元型均呈现较好的脂质过氧化抑制作用(与 BHT 相比,  $p < 0.05$ ),且苷元型的抑制效果比糖苷型黄酮好(与糖苷型相比,  $p < 0.05$ )。在质量浓度接近  $80 \mu\text{g/mL}$  时,苷元型黄酮的脂质过氧化抑制率与同浓度的 BHT 相近。银杏黄酮抑制过氧化的作用可能是因为黄酮能清除  $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$  体系产生的  $\text{OH}\cdot$  自由基从而达到抑制油脂氧化的效果,另一方面也可能是由于黄酮作为多酚类化合物,其酚羟基能接受电子与脂质氧化过程中产生的自由基结合,阻止油脂氧化。

## 2.4 银杏黄酮抑制油脂氧化的机理的探讨

油脂在光、热等外界因素的激发下,脂肪酸基团双键上的 C 易失去氢离子而形成脂自由基  $\text{R}\cdot$ ,

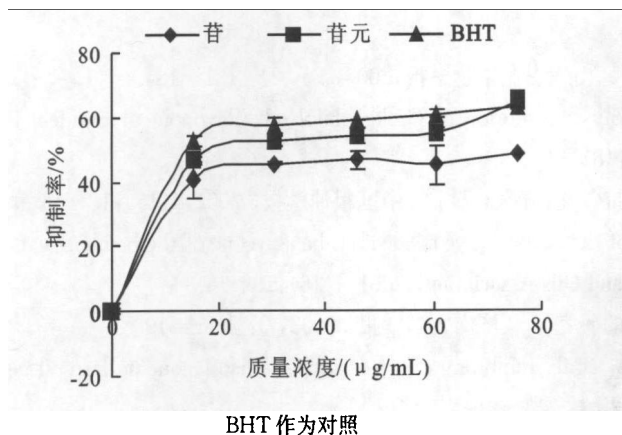


图 5 银杏黄酮苷及苷元对鼠脑匀浆液中脂质过氧化的抑制率

Fig. 5 Inhibiting effect of the flavonoid on the rat brain homogenate

R·不稳定易与氧发生反应,生成脂过氧自由基 ROO·, ROO·自由基能从烯键上夺取一个氢,生成氢过氧化物 ROOH,从而分解成短链的有机物。抗氧化剂能与 R·和 ROO·自由基发生反应从而抑制油脂的自动氧化<sup>[14]</sup>。

酚类化合物结构中的羟基的数目,位置是影响酚类化合物作用的关键因素。酚羟基数目越多,可提供的用以与活性自由基结合的氢原子越多,抗氧

化能力越强。根据研究指出<sup>[15-16]</sup>,黄酮在碳 3', 4' 位的羟基活性最强,而 3 位或 5 位的羟基也是主要的活性基团,并且 3 位羟基比 5 位羟基活性更强<sup>[17]</sup>。从银杏黄酮的结构可以看出,糖苷型黄酮与苷元型黄酮相比在于在 3 位碳上结合了糖基。这使得糖苷型黄酮与苷元型黄酮相比,活性部位减少,并且,由于糖基的形成,增大了黄酮与自由基结合的空间位阻,降低了其活性,因此在抑制脂质氧化时,糖苷型黄酮比苷元型黄酮活性低。

### 3 结 语

银杏黄酮对大豆油自动氧化及在鼠脑组织匀浆中由 FeCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导产生的脂质氧化具有很好的抑制作用,由于糖苷型黄酮与苷元型黄酮结构的差异,同浓度的苷元型银杏黄酮的抑制作用比糖苷型强银杏黄酮的效果好。银杏黄酮对脂质氧化具有抑制作用,且提出了苷元型银杏黄酮比糖苷型银杏黄酮具有更强的活性,为银杏黄酮作为天然抗氧化剂的开发等充分合理的利用提供了实验依据。

### 参考文献(References):

- [1] SU Xiao-yu, WANG Zhen-yu, LIU Jia-ren. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds[J]. **Food Chemistry**, 2009, 117: 681-686.
- [2] 王立,姚惠源,陶冠军. 乌饭树叶中黄酮类色素的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2003, 2:12-15.  
WANG Li, YAO Hui-yuan, TAO Guan-jun, et al. Scavenging [O<sub>2</sub>-·] and [·OH] of extracts from the leaves of *Vaccinium bracteatum* thunb. [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25 (4):81-87. (in Chinese)
- [3] 王德强, 王晓玲. 银杏细胞的悬浮培养研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(3):27-34.  
WANG De-qiang, WANG Xiao-ling. Callus suspension culture of ginkgo biloba L[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24 (3):27-34. (in Chinese)
- [4] XU Ming-cheng, Shi Zuo-qing, Shi Rong-fu, et al. Synthesis of the adsorbent based on macroporous copolymer MA DVB beads and its application in purification for the extracts from Ginkgo biloba leaves[J]. **Reactive & Functional Polymers**, 2000, 43:297-30.
- [5] 毕艳兰主编 油脂化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:60-63.
- [6] 尤新. 食品抗氧化剂与人体健康[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2):1-7.  
YOU Xin. Food anti-oxidants and their influence to human health[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog**, 2006, 25 (2):1-7. (in Chinese)
- [7] Wang Hua, Gao Xiang-dong, Zhou Gao-chao, et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Chorospodias axillaris* fruit[J]. **Food Chemistry**, 2008, 106: 888-895.
- [8] Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 1998, 46: 3952-3957.
- [9] ZHANG Jing, YUE Lin, Hayat K. Purification of flavonoid from Ginkgo biloba extract by zinc complexation method and its effect on antioxidant activity[J]. **Separation and Purification Technology**, 2010, 71: 273-278.
- [10] YANG Yi-ling, SU Ya-wen, NG Ming-chong, et al. Extract of ginkgo biloba EGb761 facilitates extinction of conditioned fear measured by fear-potentiated startle[J]. **Neuropsychopharmacology**, 2007, 32: 332-342.
- [11] F V DeFeudis, K Drieu. Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications[J].

- Current Drug Targets**, 2000, 1, 25—58.
- [12] 杨雪鸥, 郁建平, 何照范. 酸法水解银杏黄酮的工艺条件[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25 (2): 181—184.  
YANG Xue-ou, YU Jiang-ping, HE Zhao-Fan. Acid hydrolysis condition of Ginkgo biloba L. flavonoid glycosides[J]. **Journal of Mountain Agriculture and Biolog**, 2006, 25 (2): 181—184.
- [13] 沈建福, 张 英, 徐维娅. 竹叶黄酮糖苷的水解及其苷元的抗氧化性能研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 4(16): 13—16.  
SHEN Fu-jian, ZHANG Ying, XU Wei-ya. The research of the flavone glycoside and the aglycone of the bamboo leaf on the antioxidant activity[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2001, 4(16): 13—16.
- [14] 宋永生, 张炳文, 郝征红. 大豆异黄酮对油脂氧化抑制作用的研究[J]. 济南大学学报, 2002, 3: 218—219.  
SONG Yong-sheng, ZHANG Bing-wen, HAO Zheng-hong, et al. Inhibiting effect of soybean isoflavone on lard oil peroxidation [J]. **Journal of JINAN University (Science)**, 2002, 3: 218—219.
- [15] Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng IF. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (Flavonol), 5, 7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3', 4'-Dihydroxyflavone[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2005, 53: 29—53.
- [16] Binbuga N, Henry WP, Schultz TP. Binding of hydroxychromones with  $Al^{3+}$  in methanol [J]. **Polyhedron**, 2007, 26: 6—10.
- [17] Cornard JP, Merlin JC, Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with  $Al(III)$  [J]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2002, 92: 19—27.

(责任编辑: 杨萌)

## 《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为 CSCD 核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊,A4(大 16K)开本,160 页,全年 6 期,每册定价 15.00 元,邮发代号:28—79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部