

一种亚麻籽甾醇的结构鉴定及抗氧化活性研究

李高阳, 单 杨

(湖南省农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125)

摘 要: 采用硅胶柱层析分离, 通过化学和波谱分析方法鉴定化合物的结构。选择亚油酸过氧化体系、邻菲罗啉化学发光体系、邻苯三酚体系, 对化合物进行了抗氧化活性实验。结果表明: 单体是一种首次发现的甾醇类化合物, 该化合物结构是: 24-乙基-胆甾烷-3-氧- β -D-葡萄糖苷, 具有较强的抗亚油酸氧化能力, 但清除羟基自由基和超氧阴离子自由基能力弱。

关键词: 亚麻籽; 甾醇; 鉴定; 抗氧化

Structure Identification and Antioxidation Activity of A Kind of Phytosterol from Flaxseed

LI Gao-yang, SHAN Yang

(Institute of Hunan Agricultural Product Processing, Changsha 410125, China)

Abstract: The compound A was isolated through silica gel column chromatography, its structure was elucidated through physicochemical and spectral analysis, and its activity of monomer was studied by lipid peroxidation of linoleic acid, chemical irritant light reaction. The results showed that the monomer is a new phytosterol, its structure is characterized as 24-ethyl-cholestane-3- β -D-glucopyranoside with strong ability of inhibiting linoleic acid peroxidation, and its capacities of scavenging $\cdot\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$ are weak.

Key words flaxseed; phytosterol; identification; antioxidation

中图分类号: TS222.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0073-04

亚麻籽(flaxseed)是亚麻科植物亚麻(*Linum Usitatissimum* L.)的种子, 现已成为世界十大油料作物之一。我国主产地在内蒙、宁夏、新疆等, 亚麻籽年产量处于世界第四位, 达到42万吨。近二十年以来, 亚麻籽日益受到医药界的重视, 研究发现它含有必需脂肪酸(ω -3脂肪酸和 ω -6脂肪酸)。笔者检测的宁夏产亚麻籽中亚麻酸含量达到49.05%, 而且发现它是目前含量最高的已知植物之一^[1-2]。另外, 亚麻胶、木脂素和酚类化合物对心血管疾病和抗癌疗效也引起人们的浓厚兴趣^[3-5]。

我们在进行亚麻籽木脂素的分离过程中发现一种物质, 经过结构鉴定为甾醇类化合物, 国内外未见对亚麻籽中甾醇的相关报道。而且甾醇化合物也具有生理活性, 已有关于甾醇在抗肿瘤、心血管疾病、抗菌等方面的相关功效报道^[6], 可见甾醇对亚麻籽的生理功能特征一定也有相应的贡献。本研究对下一步相关研究的进行和进一步提高对亚麻籽功能特性的认识具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 材料与试剂

亚麻籽 宁夏银川福德生物食品工程有限公司。

亚油酸、硫酸亚铁、硫氰酸铵、硫酸铜、硫代巴比妥酸(TBA)、鲁米诺、邻菲罗啉、邻苯三酚、碳酸钠、碳酸氢钠、石油醚(沸程60~90℃)、氯仿、甲醇、乙酸乙酯等均为分析纯。

1.1.2 仪器

AB104-N电子天平 托利多-梅特勒(上海)有限公司; CS501型超级恒温水浴 上海浦东跃升科学仪器厂; SXJQ-1型数显直流无级调速搅拌器 郑州长城科工贸有限公司; UV-2102 PCS型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; SHG-C型生物化学发光测定仪 上海上立检测仪器厂; ZFA-1型旋转蒸发仪 上海玻璃仪器二厂; 柱层析硅胶(100~200目) 青岛海洋化工厂; 高效薄层层析硅胶板(GF254) 烟台市黄务硅胶开发试验厂; Bruker Avance 500型核磁共振仪(TMS为内标)。

1.2 提取与分离

收稿日期: 2007-06-04

作者简介: 李高阳(1971-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向农产品深加工。

5kg 亚麻籽粉碎后用 7 倍体积工业酒精回流提取三次, 每次 5h, 减压浓缩成膏状物(160g)。水悬浮后先用正己烷脱脂, 然后使用氯仿萃取, 得到氯仿萃取物(36g)。氯仿萃取物经硅胶柱层析(60cm × 3cm), 用石油醚和乙酸乙酯梯度洗脱四次, 分离纯化得到化合物 A。

1.3 核磁共振法

将化合物 A 溶解于 DMSO-d₆。利用 Bruker (400MHz) 核磁共振仪, 测定氢谱(¹H-NMR), 全去偶碳谱(¹³C-NMR), 不失真极化转移增强谱(DEPT-NMR), 二维谱(HMQC-NMR)。以四甲基硅烷作为内标物。

1.4 抗氧化实验测定方法

1.4.1 对亚油酸氧化抑制能力的检测

采用硫氰酸铁法(ferric thiocyanate method, FTC)。参照 Osawa T. [7] 和 Kikuzaki H. [8] 的方法, 并根据任顺成 [9] 提出的方法加以改进。

在 25ml 具塞试管中分别加入 3ml 2.5% 亚油酸、9.0ml 40mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0), 1.5ml 无水乙醇、1.5ml 水、0.5ml 样液, 反应液用混匀器混合均匀, 37℃ 恒温箱中避光恒温培养。

每隔一定时间, 在 25ml 具塞试管中分别加入 0.1ml 反应混合液、9.7ml 75% 乙醇、0.1ml 30% 硫氰酸胺, 最后加入 0.1ml 20mmol/L 硫酸亚铁溶液, 准确反应 3min 后, 以蒸馏水为空白, VC 和 BHT 为阳性对照, 在 500nm 测定吸光度。吸光度增大, 表明抑制亚油酸氧化能力减弱。

1.4.2 对羟基自由基·OH 清除能力

测定方法采用邻菲罗啉化学发光体系 [9-10]。在比色管中依次分别加入 50μl 样液、20μl 0.1mol/L VC、50μl 1mmol/L CuSO₄、50μl 1mmol/L 邻菲罗啉、830μl BB 缓冲溶液, 最后加入 50μl 33.3mmol/L H₂O₂, 启动发光反应, 放入发光仪中, 使之进入测定位。立即用 R 程序连续测定每 6s 的发光积分强度, 并以第 6 个 6s 的发光强度 CP_{6s} 为标准进行计算, 同时, 以不同体积的

水代替样品测定 CP_{6s} 作为空白的发光强度。抑制率的计算按下式进行:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{CP_{6s \text{ blank}} - CP_{6s \text{ sample}}}{CP_{6s \text{ blank}}} \times 100$$

以样品浓度对抑制率作图, 根据拟合方程求出抑制率为 50% 时所需样品的浓度, 即为半抑制浓度 IC₅₀。

1.4.3 对超氧阴离子自由基 O₂⁻ 清除能力实验

采用三酚自氧化法 [9]。

取 0.05mol/L pH8.2 Tris-HCl 缓冲液 4.5ml 于试管中, 置 25℃ 水浴中预热 20min, 加入 1ml 样液、20μl 45mmol/L 邻苯三酚, 立即混匀, 以蒸馏水为调零, 在 300nm 处每隔 30s 测定一次吸光度, 空白组以 1ml 蒸馏水代替样液。超氧阴离子自氧化抑制率计算如下式:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{300 \text{ blank}} - A_{300 \text{ sample}}}{A_{300 \text{ blank}}} \times 100$$

式中, A_{300 blank} = ΔA_{blank} / Δt, 即空白样在 300nm 处随时间的吸光度变化值; A_{300 sample} = ΔA_{sample} / Δt, 即样液在 300nm 处随时间的吸光度变化值。

2 结果与分析

2.1 化合物 A 的结构鉴定

化合物 A 为白色絮状结晶(乙酸乙酯)。紫外扫描化合物 A 只在 205nm 有强吸收, 与醋酐-硫酸反应, 最终出现绿色, 显示为甾体类物质。¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz): δ 5.32(1H, s), 4.86(1H, d, J=4.7), 4.83(1H, t, J=1.6), 4.22(1H, d, J=7.7 Hz, H-1'), 0.99(3H, s, CH₃), 0.89(3H, d, CH₃)。从¹H-NMR 可见, 该化合物含有一个双键氢、一个糖的端基质子和 5 个 CH₃, 初步判断为甾体类化合物。

化合物中伯、仲、叔、季四种类型的碳原子在¹³C-NMR 上都有信号, 而在 DEPT 谱中季碳没有信号, 仲

表 1 化合物 A 碳的化学位移值及归属
Table 1 ¹³C-NMR chemical shift assignments of compound A

碳	化合物 A δ (× 10 ⁶)	DEPT	碳	化合物 A δ (× 10 ⁶)	DEPT	碳	化合物 A δ (× 10 ⁶)	DEPT
C-1	36.8	CH ₂	C-13	41.8	CH	C-25	28.7	CH
C-2	31.3	CH ₂	C-14	56.2	CH	C-26	19.0	CH ₃
C-3	76.6	CH	C-15	23.8	CH ₂	C-27	18.9	CH ₃
C-4	39.2	CH ₂	C-16	29.6	CH ₂	C-28	22.6	CH ₂
C-5	140.4	C	C-17	55.5	CH	C-29	11.7	CH ₃
C-6	121.1	CH	C-18	11.6	C	C-1'	100.8	CH
C-7	33.3	CH ₂	C-19	19.6	CH ₃	C-2'	73.4	CH
C-8	31.4	CH	C-20	35.5	CH	C-3'	77.0	CH
C-9	49.6	CH	C-21	18.6	CH ₃	C-4'	70.1	CH
C-10	36.2	C	C-22	25.5	CH ₂	C-5'	76.7	CH
C-11	20.6	CH ₂	C-23	27.7	CH ₂	C-6'	61.1	CH ₂
C-12	38.3	CH ₂	C-24	45.1	CH			

碳的信号为负,伯碳和叔碳的信号为正。DEPT 谱可进一步从正信号中将伯碳的信号扣除仅留下叔碳信号,这样就能确定全去偶谱上所有碳信号,从而可准确确定化合物的精细结构^[11-12]。

从¹³C-NMR 可见,该化合物含有一个葡萄糖,连接在3-位。从谱图可知, δ 值大于101,只在 δ 140.421和121.109出现两个碳信号,说明没有羰基碳,只有一个双键,其中一个从DEPT 谱图上可确定是季碳。另外,共有5个甲基,除糖外还有29个碳,表明该化合物为甾体类化合物,¹³C-NMR 数据见表1。

综合以上数据并与类似物文献[6]对照,确定该化合物A为24-乙基-胆甾烷-3-氧- β -D-葡萄糖苷,结构式见图1。

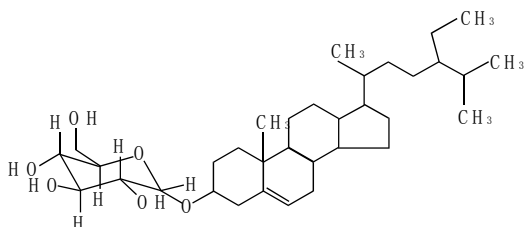


图1 化合物A的结构式
Fig.1 Structure of compound A

2.2 化合物A的抗亚油酸氧化能力

硫氰酸铁法是利用亚油酸自动氧化,使体系中的 Fe^{2+} 转化为 Fe^{3+} ,用硫氰酸铵做显色剂,反应体系在500nm处有最大吸收,通过检测吸收值,可以考察抗氧化剂的抗氧化效果。

化合物A与VC和BHT抗亚油酸氧化能力的比较见图2、从图2中可以看出化合物A具有较强的抗亚油酸氧化的能力。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的化合物A样液的抗氧化能力比同浓度的抗氧化剂VC强,但比同浓度BHT的效果弱。

2.3 化合物A淬灭超氧阴离子自由基能力

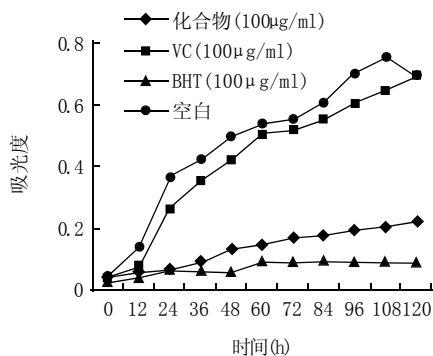


图2 不同抗氧化剂抗亚油酸氧化能力的比较(500nm)
Fig.2 Effects of antioxidants on linoleic acid oxidation measured as absorption of ferric thiocyanate at 500nm

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,因此对于它的去除具有特别重要的意义^[13-14]。在生物体内,约有2%~5%的氧会产生超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$,它的毒性是肌体发生氧中毒的主要原因。

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 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力。化合物A样液清除超氧阴离子半抑制率 IC_{50} 为26.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,芦丁 IC_{50} 为10.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、VC IC_{50} 为14.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,可见化合物A清除超氧阴离子能力较弱,低于芦丁和VC的淬灭能力,这可能与分子结构式胆甾烷母核上中没有羟基有关。

2.4 化合物A淬灭羟基自由基能力

羟基自由基是氧三电子还原产物,是氧化能力很强的自由基,在活性氧中其化学性质最活泼,反应性极强,寿命很短,是自由基中已知的最强的氧化剂,对生物肌体的危害性极大。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^[9,13]。化合物A清除羟基自由基的半抑制率 IC_{50} 为20.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,芦丁 IC_{50} 为8.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,化合物A清除羟基自由基的能力比芦丁弱。

3 结论

利用核磁共振技术对从亚麻籽分离纯化的化合物A进行结构鉴定,确认化合物A为一种胆甾烷醇类化合物,该化合物结构是24-乙基-胆甾烷-3-氧- β -D-葡萄糖苷。

化合物A具有较强的抗亚油酸氧化能力,比同浓度的抗氧化剂VC强,但比同浓度BHT的效果弱。化合物A清除羟基自由基和超氧阴离子自由基能力弱,清除羟基自由基的半抑制率 IC_{50} 为20.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,清除超氧阴离子的半抑制率 IC_{50} 为26.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

参考文献:

- [1] 李高阳, 丁霄霖. 亚麻籽油中脂肪酸成分的GC-MS分析[J]. 食品与机械, 2005, 21(5): 30-32.
- [2] 周立新, 黄凤洪. α -亚麻酸和 γ -亚麻酸[J]. 西部粮油科技, 2000(6): 46-48.
- [3] CHEN Z Y, RATNAYAKE W M N, CUNNANE S C. Oxidative stability of flaxseed lipids during baking[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1994, 71(6): 629-632.
- [4] DABROSIN C, CHEN Jian-min, WANG Lin-da, et al. Flaxseed inhib-

Study on Antioxidant Activity and Constituents of *Radix Paeonia veitchii*

HUANG Hai-lan, WANG Guo-ming, XU Bo

(Department of Chemistry, Normal College, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: The crude extract, fractions and subfractions derived from RPV were evaluated for the DPPH radical scavenging ability, the inhibition ability of bleaching β -carotene and the reducing power. The EAF (ethyl acetate-soluble fraction) and EAF6 (a subfraction derived from EAF) were the most valuable fraction and subfraction, respectively. Furthermore, bioactivity-guided chromatographic fractionation revealed that four pure compounds greatly contributed to the antioxidant activities. Qualitative and quantitative analyses of the major antioxidant constituents in the extract were systematically conducted by NMR, Mass spectra and RP-HPLC. The results demonstrated that gallic acid, (+)catechin, galloyl-paeoniflorin and galloyl-oxypaeoniflorin were the major antioxidative constituents in RPV. These compounds showed stronger activity than the BHT in four tested concentration levels. The results from this study indicate that RPV extract as well as isolated compounds are promising antioxidants which can be used as food additives.

Key words *radix Paeonia veitchii*; antioxidant activity; antioxidative constituents; structure determination; quantification

赤芍抗氧化活性及其成分研究

黄海兰, 王国明, 徐 波

(青岛大学师范学院化学系, 山东 青岛 266071)

摘 要: 利用 DPPH 法、 β -胡萝卜素法和还原力法评估赤芍提取物的抗氧化活性。结果显示乙酸乙酯提取物具有最高的抗氧化活性。利用硅胶, RP-18 和 Sephadex LH-20 对其进行活性追踪分离, 得到四种纯的抗氧化活性成分。利用 1D、2DNMR 和 ESI-MS 对其结构进行鉴定。结果显示为没食子酸、儿茶精、没食子酸芍药甙和没食子酸氧化芍药甙。其抗氧化活性均大于同浓度的人工合成抗氧化剂 BHT。实验证明赤芍及其提取物是一种高效价廉的天然抗氧化剂, 可用作食品添加剂。

关键词: 赤芍; 抗氧化活性; 抗氧化成分; 结构测定; 定量

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0076-07

收稿日期: 2007-06-10

作者简介: 黄海兰(1963-), 女, 教授, 主要从事天然产物化学研究。

- its metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts[J]. Cancer Letter, 2002, 185: 31-37.
- [5] BHATTY R S. Further compositional analyses of flax: mucilage, trypsin inhibitors and hydrocyanic acid[J]. Journal of American Oil Chemistry Society, 1993, 70(9): 899-904.
- [6] 高锦明, 廖蓉芬, 高黎明, 等. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] OSAWA T, NAMIKI M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves[J]. Agricultural Biology Chemistry, 1981, 45(3): 735-739.
- [8] KIKUZAKI H, NAKATANI N. Antioxidant effects of some ginger constituents[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(6): 1407-1410.
- [9] 任顺成. 玉米须黄酮类的分离、纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [10] HEINONEN I M, MEYER A S, FRANKEL E N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46(10): 4107-4112.
- [11] 谭仁祥. 植物成分分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 201-271.
- [12] 白小红, 李晓妮. 药物成分分析[M]. 北京: 医科大学出版社, 2001: 71-157.
- [13] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 24-107.
- [14] 王成莲, 刘莉. 比色法测定抗坏血酸体系产生的 $\cdot\text{OH}$ [J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6): 473-475.