

乌饭树树叶中黄酮类色素清除活性氧 自由基的研究

王立¹, 唐小舟², 姚惠源¹, 沈萍¹, 陶冠军³, 秦芳³

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学设计学院, 江苏 无锡 214000;
3. 江南大学测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘要: 本文对乌饭树树叶中提取出的色素进行了分离纯化, 分离出了四种黄酮类物质。并且对这四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^h提取物的IC₅₀达到了5.9μg/ml左右。

关键词: 乌饭树; 黄酮; 分离纯化; 自由基; 清除

Scavenging O₂^{•-} and •OH of Extracts from the Leaves of Vaccinium Bracteatum Thunb

WANG Li¹, TANG Xiao-zhou², YAO Hui-yuan¹, SHEN Ping¹, TAO Guan-jun³, QIN Fang³

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. School of Design, Southern Yangtze University, Wuxi 214000, China

3. Test Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this article we identified and purified four flavones from the leaves of Vaccinium Bracteatum Thunb. We also studied the functions scavenging O₂^{•-} and •OH of the flavones. We found that all the extracts have low IC₅₀. Quercetin while the 6^h extract has had the lowest IC₅₀. It was around 5.9μg/ml.

收稿日期: 2004-11-26

作者简介: 王立(1978-), 男, 博士, 研究方向为功能性色素。

- | | |
|---|--|
| <p>[2] 任顺成, 等. 大米陈化过程中谷蛋白与大米质构特性的变化[J]. 中国粮油学报, 2002, (17): 42-46.</p> <p>[3] Consuelo M perez, et al. Amylopectin-staling of cooked noneaxymilled rice and starch gels[J]. Cereal Chem, 1993, 70 (5): 567-571.</p> <p>[4] Mua JP, et al. Relationships between functional attributes and molecular structures of amylase and amylopectin fractions from corn starch[J]. Agric Food Chem, 1997, (45): 3848-3854.</p> <p>[5] 鲁战会. 生物发酵米粉的淀粉改性及凝胶机理的研究[D]. 中国农业大学博士学位论文, 2002.</p> <p>[6] 李桂琴, 等. 蛋白酶水解牛乳蛋白的研究[J]. 中国乳品工业, 2003, 31: 11-13.</p> <p>[7] 汪钊, 等. 淀粉酶在大米粉浆液化过程的作用研究[J]. 中国粮油学报, 1998, 13: 25-27.</p> <p>[8] 丁文平, 等. 普鲁兰酶和β-淀粉酶对大米支链淀粉回生影响的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18: 13-16.</p> | <p>[9] 朱乐敏, 等. 香蕉葡萄糖浆的制备[J]. 食品科技, 2005, (1): 19-20.</p> <p>[10] 林家永, 等. 葡萄糖氧化酶和脂肪酶改善面粉质量的作用[J]. 粮油食品科技, 1999, (7): 3-5.</p> <p>[11] 李里特. 食品物性学[M]. 中国农业出版社, 1998.</p> <p>[12] 中华人民共和国国家标准, 食品中蛋白质的测定方法[S]. GB/T14771-93, 1993.</p> <p>[13] Hardeep Singh Gujral, et al. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase[J]. European Food Research and Technology, 2002, 215: 419-424.</p> <p>[14] TKomiya, et al. Changes in crystallinity and gelatinization phenomena of potato starch by acid treatment[J]. Starch, 1986, 38(1): 9-13.</p> <p>[15] 赵学华, 等. 蛋白质与淀粉的相互作用对陈化大米质构特性的影响[J]. 郑州粮食学院学报, 1998, 19(3): 23-29.</p> <p>[16] 邱发明, 等. 米谷蛋白与淀粉组分在大米陈化过程中的变化[J]. 中国粮油学报, 1998, 13(10): 12-15.</p> |
|---|--|

Key words: Vaccinium Bracteatum Thunb; flavone; identification; purification; freeradicle; scavenge
中图分类号: Q964.88 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2005)12-0098-05

乌饭树(*Vaccinium Bracteatum* Thunb)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,有些地方用于制造果酱和酿酒,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],相对而言,国外对于乌饭树树叶的研究几乎为空白。

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]。

氧对于许多生命过程是不可缺少的,它参与新陈代谢、线粒体的呼吸、氧化磷酸化和产生ATP等等。但是氧在参与生命活动的同时又产生氧自由基,引起细胞的损伤,即使在正常的氧环境中,也存在着氧的损伤效应。在生理条件下,大约有1%~4%的氧转变为超氧阴离子自由基 $O_2\cdot$ 和过氧化氢 H_2O_2 ,这两种物质如果没有及时的去除,则可以继续反应产生毒性更大的羟基自由基 $\cdot OH$ ^[11]。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。

本文对乌饭树树叶中提取出的黄酮类色素进行了分离纯化,首次从中分离出了四种黄酮类物质,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, Switzerland 0.05mol/L pH7.8磷酸盐缓冲液(PB) 含有0.1mmol/L的EDTA,蒸馏水配制;1mmol/L鲁米诺(L)用微量的0.1mol/L碳酸钠溶解后,蒸馏水配制;0.1mmol/L维生素C溶液(VC) 0.05mol/L pH6.2的磷酸盐缓冲液配制 33.3mmol/L过氧化氢溶液(H_2O_2) 0.05mol/L pH6.2的磷酸盐缓冲液配制;1mmol/L邻菲罗啉 水浴加热,重蒸水配制;1mmol/L硫酸铜缓冲液 蒸馏水配制;0.05mol/L pH9.0的硼酸硼砂盐缓冲液(BB) 蒸馏水配制;0.05mol/L pH10.2碳酸盐缓冲液(CB-L) 含有0.1mmol/L的EDTA,蒸馏水配制,现配现用;1mmol/L邻苯三酚水

溶液(P) 用微量1mmol/L的HCl溶解,含有0.1mmol/L的EDTA;槲皮素 贵州大学生化中试基地;芦丁 上海生化试剂一厂;其余试剂为分析纯。

Waters 2690型高效液相色谱仪 美国Waters公司;LichrospherC-18色谱柱(4.6×250mm) 美国Waters公司;生物化学发光测定仪 上海上立检测仪器厂;微型混合器 上海彭氏实业有限公司;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→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→95%乙醇洗脱→上聚酰胺柱粗分→不同浓度的乙醇梯度洗脱→各组分聚酰胺柱细分→HW40柱乙醇梯度洗脱→得到纯物质3#、4#、5#、6#。

1.2.2 鉴定^[16~19]

盐酸—锌粉试验:取试液1ml,加入少量锌粉,摇晃,滴加少量浓盐酸,加热3~5min。

铅盐沉淀试验:取试液2ml,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。

1.2.3 超氧阴离子自由基 $O_2\cdot$ 的清除实验^[20~22]

配制一定浓度的乌饭树树叶黄酮单体甲醇溶液,并用0.05mol/L pH7.8并含有0.1mmol/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,测定操作按照表1进行。

表1 超氧阴离子自由基 $O_2\cdot$ 测定各试剂加入体积
Table 1 Content of different materials of superoxide anion determination

试剂	空白	样品	邻苯三酚	0.05mmol/L CB-L
体积(μl)	10	10	20	970

按照表1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1min内每6s的发光积分强度 CP_{6s} ,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:

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

A_0 为空白发光值, A_s 为测试样品发光值

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 $\cdot OH$ 的清除实验^[23~25]

测定体系采用邻菲罗啉发光体系。测定操作按照表 2 进行。

表 2 羟基自由基 $\cdot OH$ 测定各试剂加入体积

Table 2 Content of different materials of $\cdot OH$ determination

试剂	样品液	0.1mmol/L V C	1mmol/L CuSO ₄	1mmol/L 邻菲罗啉	缓冲液 B B	33.3mmol/L H ₂ O ₂
体积(μl)	V	20	50	50	830	50

注: V 为按照需要加入样品液体积。

按照表 2 依次将样品和各种试剂加入到试管中, 最后加入 H₂O₂, 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 1min 内每 6s 的发光积分强度 CP_{6s}, 以第六个 6s 的发光强度 CP_{6s} 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, 计算抑制率(计算公式同式(1))。

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

表 3 黄酮类化合物定性分析结果

Table 3 Qualitative analysis of the extracts

反应类型	现象	结果
盐酸—锌粉试验	四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	四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-羟基或 5-OH、4-羟基黄酮
三氯化铝试验	四种物质都生成黄色	为查耳酮、黄酮醇或黄酮类化合物
氨熏试验	四种物质都生成黄色	为黄酮类化合物

从表 3 可以看出, 这四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 2.1 × 250mm; 流动相: 甲醇-水-1%乙酸梯度洗脱; 柱温: 30℃; 流速: 0.3ml/min; 进样量: 10μl。(以时间和相对强度作图)

从图 1 中的四张液相色谱图可以初步看出, 这四种物质均为纯物质。

2.2 乌饭树叶提取物对超氧阴离子自由基 O₂⁻ 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

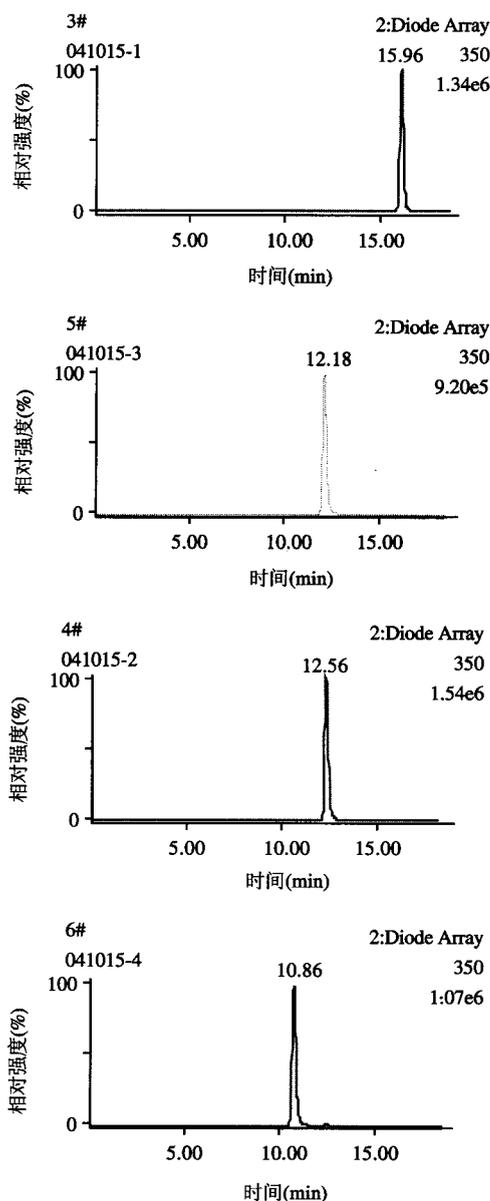


图 1 3#、4#、5# 和 6# 的 HPLC 图谱

Fig. 1 The HPLC spectra of extracts (Coded 3#, 4#, 5# and 6#)

是可以经过一系列的反应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 O₂⁻, O₂⁻ 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 O₂⁻ 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 O₂⁻ 的清除能力。

图 2 是邻苯三酚——鲁米诺发光体系的动力学曲线(测试物为甲醇, 即空白), 从中可以发现在 1min 内,

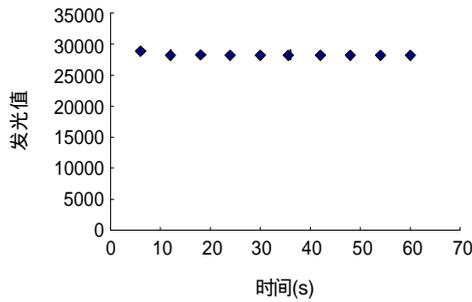


图2 邻苯三酚——鲁米诺发光体系的动力学曲线

Fig.2 The dynamic curve of chemiluminescence produced by pyrogallol-lumino

每6s的发光强度 CP_{6s} 有较长的稳定期,取第6个6s的发光强度作为测定值。

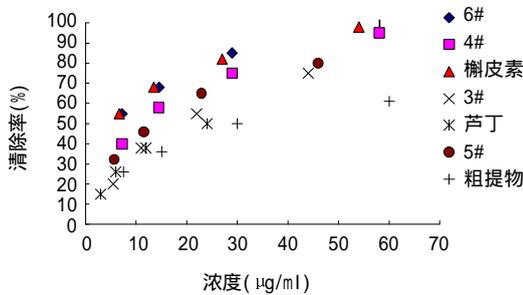


图3 不同测试样品对超氧阴离子 $O_2^- \cdot$ 的清除效果

Fig.3 The superoxide anion scavenging capacity of extracts

表4 不同测试样品清除超氧阴离子 $O_2^- \cdot$ 的 IC_{50}

Table 4 The IC_{50} of superoxide anion scavenging capacity of extracts

物质	槲皮素	芦丁	3#	4#	5#	6#	粗提物
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	5.48	24.28	17.44	10.73	12.74	5.91	31.43

从图3和表4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,其 IC_{50} 达到 $5.48\mu\text{g/ml}$ 和 $5.91\mu\text{g/ml}$ 最差的是3#,其 IC_{50} 为 $17.44\mu\text{g/ml}$ 。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。

2.3 乌饭树树叶提取物对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 清除的影响

羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 是氧三电子还原产物,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-CuSO₄-VC-H₂O₂发光体系常用于羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除研究,羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 攻击发光剂邻

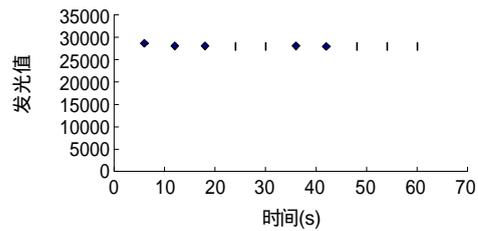


图4 邻菲罗啉-CuSO₄-VC-H₂O₂发光体系的动力学曲线

Fig.4 The dynamic curve of chemiluminescence produced by the system of phenanthroline-CuSO₄-VC-H₂O₂

菲罗啉,使之发光,其发光强度在一定的时间范围内与 $\cdot\text{OH}$ 的量呈一定的比例关系。

图4是邻菲罗啉-CuSO₄-VC-H₂O₂发光体系的动力学曲线(测试物为甲醇,即空白),从中可以发现在1min内,每6s的发光强度 CP_{6s} 有较长的稳定期。

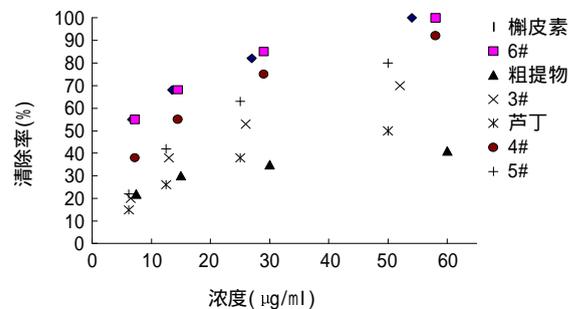


图5 不同测试样品对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果

Fig.5 The hydroxyl radical-scavenging capacity of extracts

表5 不同测试样品清除羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 的 IC_{50}

Table 5 The IC_{50} of extracts for the hydroxyl radical-scavenging capacity

物质	槲皮素	芦丁	3#	4#	5#	6#	粗提物
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	5.63	50.59	22.45	11.58	16.61	5.99	158.70

从图5和表5可以看出从乌饭树树叶中提取出的物质对羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 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,其 IC_{50} 达到 $5.63\mu\text{g/ml}$ 和 $5.99\mu\text{g/ml}$ 最差的是3#,其 IC_{50} 为 $22.45\mu\text{g/ml}$ 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。

3 结论

乌饭树是一种丰富的天然资源,又具有众多生理功能,这在很多的医药书籍和杂志中都有报道,但是目前利用不是很多,主要原因是不知道其中明确的成分。本文从乌饭树树叶分离出了四种黄酮类物质,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 AM. 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 AM. 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 RG, Paliyath G. Antioxidant and calcium-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 AB. Cranberry juice and adhesion of antibiotic-resistant uropathogens[J]. *Journal of the American Medical Association*, 2002, 287(23): 3082-3083.
- [7] Moon JW. 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 EI. 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, 1-3(8): 13-15.
- [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. 163-164.
- [17] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1997. 112-113.
- [18] K R 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 42-59.
- [19] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003, 167, 175-180.
- [20] Wang Hong, Gao Guohua. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 304-309.
- [21] Frankel EN, Bosanek CA. Commercial grape juices inhibit in 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.
- [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 IM, Meyer AS. 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. 24-107.
- [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. 131-148.



日本推出低酒精度茶饮料

近日, 日本麒麟啤酒公司推出了一款无色、无糖、不含碳酸的风味酒精饮料。这种饮料使用大麦酒(即清酒)、糙米及绿茶做原料。原料中的茶成分使该产品脱颖而出。这是该公司在酒饮料的成分及味道上寻求细分市场而研制出的一种新型饮料。

除了别具一格的茶味道, 该产品还具有明显的大麦味道, 这种味道来自于与伏特加结合的大麦清酒。醉人茶饮料还有一个非常新潮的包装, 它是一个带有“肋骨”的简单塑料瓶, 但是缩短的瓶颈使其拥有了更高贵、更独特的外形。