

金钱草清除自由基活性及其成分研究

黄海兰, 徐波, 段春生
(青岛大学师范学院化学系 山东 青岛 266071)

摘要: 用2:1的甲醇:氯仿超声提取金钱草成分,并用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次进行萃取,利用DPPH法、邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法和AP-TEMED法进行清除自由基活性实验,同时与合成抗氧化剂BHT进行对照。结果显示乙酸乙酯提取物(EAF)具有最高的清除自由基活性,大于人工合成抗氧化剂BHT。利用硅胶,RP-18和Sephadex LH-20对其进行活性追踪分离,得到3种纯的清除自由基活性成分。利用1D、2DNMR和ESI-MS对其结构进行鉴定。结果显示为槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖甙和山奈酚-3-O-葡萄糖甙。活性大小顺序为槲皮素>槲皮素-3-O-葡萄糖甙>山奈酚-3-O-葡萄糖甙>EAF>BHT。含酚羟基化合物的清除自由基活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目。

关键词: 天然抗氧化剂;金钱草;清除自由基活性;活性成分

Free Radical Scavenging Activities and Principal s of *Lysimachia christinae* Hance

HUANG Hai-lan, XU Bo, DUAN Chun-Sheng
(Department of Chemistry, Teacher's College, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: *Lysimachia christinae* Hance (LCH) was extracted with methanol:chloroform (2:1) in a ultrasonicator, and the extraction was then partitioned with petroleum ether, EtOAc and BuOH successively. Free radical scavenging activity (FRSA) of the extractions was evaluated by using DPPH radical scavenging assay, the 1,10-phenanthroline- Fe^{2+} oxidative and the AP-TEMED assays, and compared with that of BHT. The EAF (ethyl acetate-soluble fraction) exhibited the highest FRSA, which was greater than that of BHT. Furthermore, bioactivity-guided chromatographic fractionation was conducted by repeated column chromatography over a silica gel, RP-18, and Sephadex LH-20 to obtain three pure anti radical compounds. Their structures were determined by interpretation of the 1D and 2D NMR, as well as mass spectral data. The result demonstrated that quercetin, quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, and kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside were the major anti radical constituents in LCH.

收稿日期:2006-08-16

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

- enzyme inactivation in tomato puree[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 226-270.
- [2] 潘见, 张文成, 陈从贵, 等. 饮料超高压杀菌实用性工艺及设备探讨[J]. 农业工程学报, 2000, 16(1): 125-128.
- [3] Gomes M R A, Ledward D A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenol oxidases[J]. Food Chemistry, 1996, 56(1): 1-5.
- [4] Anese M, Nicolini M C, Dall'Aglio G, et al. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities[J]. J Food Biochemistry, 1995, 18: 285-293.
- [5] Hendrickx M, Ludi Khuyze L, van den Broeck I, et al. Effects of high pressure on enzymes related to food quality[J]. Trends in Food Science and Technology, 1998, (9): 197-203.
- [6] 阮征, 曾庆孝, 彭志英. 高静压对食品中酶的影响[J]. 食品工业, 1997, (5): 47-48.
- [7] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压处理对多酚氧化酶活性的影响[J]. 高压物理学报, 2004, 18(2): 144-148.
- [8] 刘成梅, 刘伟, Roger Ruan, 等. 瞬时高压作用对 *E. coli* 存活率的影响[J]. 食品科学, 2005, (2): 87-90.
- [9] 程建军. 苹果梨中多酚氧化酶酶反应动力学和反应进程的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 69-71.
- [10] Tsong T Y, Astuni A R D. Absorption and conversion of electrical field energy by membrane bound ATPases[J]. Bioelectrochemistry Bioenergy, 1986, 15: 457-476.
- [11] 程建军, 马莺, 杨咏丽, 等. 苹果梨中多酚氧化酶酶学特性的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 261-26.
- [12] 周理红, 许梓荣. 酶的失活机理及稳定化技术[J]. 浙江畜牧兽医, 2004, (6): 7-8.

The FRSA of the compounds decreased in the following order: quercetin > quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside > kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside > EAF > BHT. The FRSA of phenolic compounds is correlated to their chemical structures. In general, the FRSA of phenolics depends mainly on the number of hydrogen-donating hydroxyl groups on the aromatic ring of the phenolic molecules.

Key words: natural antioxidant; *Lysimachia christinae* Hance; free radical scavenging activity; anti radical constituent
中图分类号: R151.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)10-0183-06

所有需氧生物的生理过程均会产生自由基,它是维持正常生命活动所必需。生物体内有多种自由基清除途径,自由基的产生与清除处于动态平衡之中,一旦平衡被破坏,就会危害机体,发生疾病。现代病理学研究表明,自由基与许多疾病有关,如动脉粥样硬化、肝病、糖尿病、机体老化、癌症等。适当补充抗氧化剂,可以改善这一状况。除此之外,食用油脂和含脂食品的酸败(脂质过氧化)也是由自由基所引发,它不仅使油脂本身易受破坏而丧失营养,更重要的是其氧化产物和中间物会伤害生物膜、酶、维生素、蛋白质及活细胞功能,其中一些是公认的致癌物。添加抗氧化剂已成为储存食品的有效手段,它能够延缓甚至阻止油脂的自动氧化,可以防止食品因氧化而使营养破坏、褪色等。因此,抗氧化剂广泛用于食品工业,需求量逐年增加。由于合成抗氧化剂如BHA、BHT、TBHQ等的毒性问题^[1],许多国家已禁止使用或限量使用。因此,研究开发广谱、高效、安全的天然抗氧化剂,成为当今食品添加剂研究领域的热点之一^[2~4]。

金钱草为报春花科(Primulaceae)珍珠菜属(*Lysimachia*)植物过路黄(*Lysimachia christinae* Hance)的新鲜或干燥全草,味淡性微寒,有清热、利胆、排石、利尿、解毒的功能。近年来有关金钱草在临床和药理方面有许多报道,其化学成分已有报道,含有酚性成分、黄酮类、甙类、鞣质、挥发油等成分^[5]。但目前对其清除自由基活性及成分研究尚未见报道。本文利用硅胶,RP-18和Sephadex LH-20对金钱草进行活性追踪分离,详细研究其提取物清除DPPH自由基、羟自由基及过氧自由基的能力,利用1D、2DNMR和ESI-MS对活性成分进行结构鉴定,并对其清除自由基机理进行探讨。有望得到一种具有保健功能的新型清除自由基天然食品添加剂。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

金钱草,2006年3月购于青岛宏仁堂大药房。

40 烘干,粉碎并过40目筛。

二苯代苦味酰基自由基(DPPH) Sigma公司;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、对氨基苯磺酸、 α -萘胺、过硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷、盐酸羟胺、硫酸亚铁铵、

邻二氮菲、四甲基乙二胺等均为国产分析纯试剂。柱层析硅胶(100~200目;200~300目) 青岛化学试剂厂;GF254硅胶板(厚度:0.2~0.25mm) 青岛海洋化工分厂;RP-18(40~75 μ m) Fuji Silysia化学有限公司;Sephadex LH-20(18~110 μ m) Pharmacia公司。

Bruker Avance 500 MHz FT-NMR核磁共振光谱仪;VG Autospet-3000质谱仪;RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;ZF-2型三用紫外仪 上海市安亭电子仪器厂;722型可见光栅分光光度计 上海分析仪器总厂;电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;KS-250D超声波清洗仪 宁波科生仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 提取分离

称取干燥金钱草粉末1kg,室温下用1:2的氯仿:甲醇,超声提取,过滤,滤渣同上重复提取两次,合并滤液,减压旋转蒸发溶剂,得粗提物(MCE)。

将所得粗提物分散于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种溶剂萃取三次。合并萃取液,置于圆底烧瓶中,旋转蒸发去除溶剂,分别得石油醚萃取物(PEF)、乙酸乙酯萃取物(EAF)、正丁醇萃取物(BF)、水残留物(WF)。

采用活性追踪分离法,将活性最强萃取物进行硅胶柱层析分离(200~300目),用V(氯仿):V(甲醇)=99:1~0:100进行梯度洗脱,洗脱液进行薄层层析(TCL)检测,合并相同组分溶液。旋转蒸发去除溶剂。将活性最强组分利用硅胶,RP-18和Sephadex LH-20进行反复柱层析分离以及制备TCL分离,最终得到纯的强活性化合物。

1.2.2 清除自由基活性测定

1.2.2.1 清除DPPH自由基活性测定(DPPH法)^[6]

按文献[6]方法稍加修改。取金钱草提取液2.00ml及 1×10^{-4} mol/L DPPH溶液2.00ml加入同一具塞试管中摇匀,在室温下密闭静置30min,用纯溶剂作参比,于517nm波长下测定吸光度。平行三次,根据下列公式计算每种提取液对DPPH自由基的清除率:

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

式中, A_2 为加提取液后DPPH溶液的吸光度; A_0 为提取液的吸光度; A_1 为未加提取液时DPPH溶液的吸

光度。

1.2.2.2 清除羟自由基活性测定(邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法)^[7]

参考文献[7]方法稍加改进。依次向50ml比色管中加入2mmol/L邻二氮菲溶液10.00ml、150mmol/L PBS (pH7.4)溶液5ml、2mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液10.00ml、一定量的金钱草提取液、3% H_2O_2 1.00ml,以蒸馏水补充体积至25.00ml。每加一次试剂均需立即混匀。反应液37℃保温60min后,于536nm波长下测定吸光度A。平行三次,根据下列公式计算提取液对羟自由基的清除率:

$$\text{清除率}\% = [(A_2 - A_1)/(A_0 - A_1)] \times 100$$

式中, A_2 为加提取液及 H_2O_2 后混合液的吸光度; A_0 为未加提取液及 H_2O_2 溶液的吸光度; A_1 为未加提取液,只加 H_2O_2 溶液的吸光度。

1.2.2.3 清除过氧自由基活性测定(AP-TEMED法)^[8]

取24ml 1mol/L HCl、18.3g Tris、0.4ml 四甲基乙二胺(TEMED)定容于50ml容量瓶中,配成试剂A;称取0.13g过硫酸铵(AP),用二次水定容于50ml容量瓶中,配成试剂B。取0.50ml试剂A,2.00ml试剂B,反应1min后,弃去反应液1.50ml,向试管中加入0.50ml金钱草提取液,混匀,以相同体积的甲醇为对照。再向试管中加入20mmol/L盐酸羟胺0.20ml,在25℃混合反应20min后,加入7mg/ml对氨基苯磺酸1.00ml和2mg/ml-萘胺1.00ml,25℃混合反应25min,以二次水为空白测 A_{530} 。平行三次。根据下列公式计算提取液对过氧自由基的清除率:

$$\text{清除率}\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$$

式中, A_0 为对照的吸光度值; A 为加提取液的吸光度值。

1.2.3 清除自由基活性成分的鉴定

利用1D、2DNMR和ESI-MS鉴定清除自由基活性成分的结构。 ^1H NMR测定,共振频率500MHz; ^{13}C NMR测定,共振频率125MHz,溶剂 CD_3OD 。ESI-MS主要鉴定其分子离子峰。

2 结果与分析

2.1 金钱草提取物清除自由基活性

2.2.1 清除DPPH自由基的能力

DPPH·在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其结构中含有3个苯环,1个氮原子上有1个孤对电子,呈紫色,在517nm有强吸收。有自由基清除剂存在时,DPPH·的单电子被配对而使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小,而且这种颜色变浅的程度与配对电子数是成化学剂量关系的,因此可用于检测自由基的清除情况。不同浓度的金钱草提取物清除DPPH自由基

表1 金钱草提取物清除DPPH自由基的能力

Table 1 DPPH radical-scavenging activities of extractions from *Lysimachia christinae* Hance

提取物	清除率	
	10($\mu\text{g}/\text{ml}$)	50($\mu\text{g}/\text{ml}$)
粗提物(MCE)	16.31 \pm 0.33	53.28 \pm 0.49
石油醚萃取物(PEF)	3.72 \pm 0.28	5.18 \pm 0.24
乙酸乙酯萃取物(EAF)	28.13 \pm 0.20	81.59 \pm 0.46
正丁醇萃取物(BF)	6.72 \pm 0.48	32.35 \pm 0.87
水相残留物(WF)	9.25 \pm 0.44	48.54 \pm 0.35
C ₁	37.37 \pm 0.21	81.90 \pm 0.51
C ₂	72.37 \pm 0.18	91.17 \pm 0.32
C ₃	91.99 \pm 0.23	94.61 \pm 0.51
BHT	25.64 \pm 0.46	65.60 \pm 0.22

注:表中数据为:平均值 \pm 标准偏差(n=3)。

能力见表1。

从表1所列数据可以看出,金钱草的粗提物(MCE)对DPPH自由基有良好的清除作用,在50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时,清除能力为53.28%,清除能力与浓度成量效关系。4个萃取物中,除了PEF外,其它均具有一定的清除作用,其中EAF最强,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时,清除能力已达到81.59%,明显高于同浓度的人工合成抗氧化剂BHT,清除能力也与浓度成量效关系。说明金钱草中的中等极性的组分清除DPPH自由基能力较强。各相活性大小顺序,依次为EAF > BHT > MCE > WF > BF > PEF。

为进一步得到金钱草的清除自由基活性成分,采用活性追踪分离法,利用硅胶,RP-18和Sephadex LH-20,将EAF反复进行活性测定—筛选—柱层析分离以及制备TCL分离,最终得到强活性的纯化合物C₁、C₂和C₃。表1也显示了C₁、C₂和C₃清除DPPH自由基的能力。可以看出,三种化合物对DPPH自由基均具有明显较强的清除能力。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时,清除能力依次为81.90%,91.17%和94.61%,均比EAF和合成抗氧化剂BHT强。其中C₃最强,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时,清除能力已达到91.99%。三种化合物活性大小顺序为化合物3 > 化合物2 > 化合物1。

2.2.2 清除羟自由基的能力

羟自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强,危害最大的一种自由基,它可以与生物体内的多种分子作用,造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤,使细胞坏死或突变。羟自由基清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标。邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法,利用Fenton反应体系产生羟自由基($\cdot\text{OH}$),邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后,其536nm最大吸收峰消失,抗氧化剂由于具有清除羟自由基的作用,可用吸光度的变化反映提取液对羟自由基的清除能力。金钱草各提取物清除羟自由基能力如表2所示。

表2 金钱草提取物清除羟自由基能力

Table 2 Hydroxyl radical-scavenging activities of extractions from *Lysimachia christinae* Hance

提取物	清除率	
	10($\mu\text{g/ml}$)	50($\mu\text{g/ml}$)
粗提物(MCE)	12.80 \pm 0.42	49.83 \pm 0.52
石油醚萃取物(PEF)	1.72 \pm 0.28	2.18 \pm 0.24
乙酸乙酯萃取物(EAF)	22.75 \pm 0.98	73.48 \pm 0.49
正丁醇萃取物(BF)	1.96 \pm 0.36	17.89 \pm 0.76
水相残留物(WF)	4.25 \pm 0.45	28.54 \pm 0.15
C ₁	24.27 \pm 0.31	78.76 \pm 0.61
C ₂	42.38 \pm 0.18	89.17 \pm 0.33
C ₃	69.88 \pm 0.23	93.13 \pm 0.89
BHT	18.64 \pm 0.46	55.60 \pm 0.22

注：表中数据为：平均值 \pm 标准偏差 ($n=3$)。

从表2所列数据可以看出，金钱草的粗提物(MCE)对羟自由基有较强的清除作用，在50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时，清除能力为49.83%且其清除能力与浓度成量效关系。4个萃取物中，EAF清除能力最强，50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时，清除能力已达到73.48%，明显高于同浓度的人工合成抗氧化剂BHT且其清除能力也与浓度成量效关系。同样金钱草中清除羟自由基能力较强的也是中等极性的组分。各相清除羟自由基能力大小与清除DPPH自由基能力有着同样顺序。

从表2还可以看出，三种化合物C₁、C₂和C₃对羟自由基同样均具有明显较强的清除能力。50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时，清除能力依次为78.76%、89.17%和93.13%，均比EAF和合成抗氧化剂BHT强。三种化合物清除羟自由基能力与清除DPPH自由基能力大小顺序相同。

2.1.3 清除过氧自由基的能力

过氧自由基虽然不能直接诱导生物和食品体系中的脂类氧化，但它会在金属离子的催化下发生Fenton反应产生具有高活性的羟自由基。因此，常用样品对过氧自由基的清除能力来反映抗氧化活性。AP-TEMED体系产生过氧自由基，将四甲基乙二胺氧化成亚硝酸根，与对氨基苯磺酸与-萘胺反应后生成淡紫色染料。抗氧化剂由于具有清除过氧自由基的能力，加入后，吸光度减小，并且抗氧化能力越强，吸光度减小的越大。

利用AP-TEMED方法分别测定金钱草各提取物及合成抗氧化剂BHT的清除羟自由基的能力结果如表3所示。

可以看出，金钱草粗提物(MCE)对过氧自由基有一定的清除作用。4个萃取物中，EAF最高，高于同浓度的人工合成抗氧化剂BHT。各相清除过氧自由基能力大小与上述清除DPPH自由基能力顺序有所不同。各相活性大小顺序，依次为EAF > MCE > BF > BHT > WF > PEF。三种化合物C₁、C₂和C₃对过氧自由基均具有较强的清除能力。50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时，清除能力依次为46.90%、51.67%和67.22%，均比EAF和合成抗氧化

表3 金钱草提取物清除过氧自由基能力

Table 3 Superoxide radical-scavenging activities of extractions from *Lysimachia christinae* Hance

提取物	清除率	
	10($\mu\text{g/ml}$)	50($\mu\text{g/ml}$)
粗提物(MCE)	10.28 \pm 0.23	32.20 \pm 0.03
石油醚萃取物(PEF)	3.98 \pm 0.18	4.68 \pm 0.22
乙酸乙酯萃取物(EAF)	23.83 \pm 0.14	38.05 \pm 0.74
正丁醇萃取物(BF)	18.92 \pm 0.05	23.41 \pm 0.76
水相残留物(WF)	5.25 \pm 0.44	18.54 \pm 0.35
C ₁	27.37 \pm 0.21	46.90 \pm 0.81
C ₂	32.37 \pm 0.18	51.67 \pm 0.62
C ₃	43.79 \pm 0.06	67.22 \pm 0.23
BHT	7.15 \pm 0.04	21.35 \pm 0.92

注：表中数据为：平均值 \pm 标准偏差 ($n=3$)。

剂BHT强。三种化合物活性大小顺序同样为化合物3 > 化合物2 > 化合物1。

与前两种方法比较，金钱草各提取物对过氧自由基的清除作用，在实验浓度下，均比清除DPPH和羟自由基能力偏低，不同的实验条件及测试方法得到的自由基清除率不同，可能是由于自由基种类及反应机理的差异所造成的。

根据以上三种自由基检测方法结果证明，三种化合物C₁、C₂和C₃对自由基的清除作用非常明显，说明化合物C₁、C₂和C₃为金钱草中的主要清除自由基活性成分。

2.2 清除自由基活性成分的结构鉴定

化合物C₁、C₂和C₃的1D、2DNMR和ESI-MS数据如下：

化合物C₁：ESI-MS(m/z)：准分子离子峰471 [M+Na]⁺和487 [M+K]⁺，表明分子量为448。¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz, $\times 10^{-6}$)：8.04 (2H, dd, $J=8.9$, 2.0Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, dd, $J=8.9$, 2.0Hz, H-3', 5'), 6.39 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.24 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-1''), 3.72 (1H, dd, $J=11.9$, 2.2Hz, H-6''a), 3.59 (1H, dd, $J=11.9$, 2.2Hz, H-6''b), 3.48-3.34 (3H, m, H-2'', 3'', 4''), 3.23 (1H, m, H-5''); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz, $\times 10^{-6}$)：179.50 (C-4), 166.00 (C-7), 163.01 (C-5), 161.54 (C-4'), 159.12 (C-2), 158.48 (C-9), 135.43 (C-3), 132.28 (C-6'), 132.28 (C-2'), 122.78 (C-1'), 116.10 (C-3'), 116.10 (C-5'), 105.72 (C-10), 104.05 (C-1''), 99.93 (C-6), 94.79 (C-8), 78.38 (C-5''), 77.99 (C-3''), 75.71 (C-2''), 71.31 (C-4''), 62.59 (C-6'')。该化合物氢谱和碳谱数据与文献^[9]中的山奈酚-3- α -葡萄糖甙数据基本一致，故鉴定化合物C₁为山奈酚-3- α -葡萄糖甙。

化合物C₂：ESI-MS(m/z)：准分子离子峰487 [M+Na]⁺；主要碎片峰302 [M-glucopyranoside]⁺和274 [M-glucopyranoside-CO]⁺，表明分子量为464。¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz, $\times 10^{-6}$)：7.71 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J=8.5$, 2.0Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.39 (1H,

d, δ 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, δ 2.0 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, δ 7.6 Hz, H-1'), 3.72 (1H, dd, δ 11.9, 2.2 Hz, H-6'a), 3.59 (1H, dd, δ 11.9, 5.3 Hz, H-6'b), 3.48-3.34 (3H, m, H-2'', 3'', 4''), 3.24 (1H, m, H-5''); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz, $\times 10^{-6}$): 179.46 (C-4), 165.95 (C-7), 162.95 (C-5), 159.04 (C-2), 158.42 (C-9), 149.82 (C-4'), 145.87 (C-3'), 135.59 (C-3), 123.20 (C-6'), 123.04 (C-1'), 117.57 (C-2'), 116.02 (C-5'), 105.66 (C-10), 104.28 (C-1''), 99.89 (C-6), 94.74 (C-8), 78.32 (C-5''), 78.06 (C-3''), 75.69 (C-2''), 71.17 (C-4''), 62.51 (C-6''). 该化合物氢谱和碳谱数据与文献[10]中的槲皮素-3-O-葡萄糖苷数据基本一致, 故鉴定化合物 C_2 为槲皮素-3-O-葡萄糖苷。比较化合物 1 和 2 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据可以看出, 除了化合物 2 在 C-3' 上多了一个羟基外, 两者结构非常类似。

化合物 C_3 : ESI-MS (m/z): 准分子离子峰 325 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 表明分子量为 302。 ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz, $\times 10^{-6}$): 7.69 (1H, d, δ 2.0 Hz, H-2'), 7.56 (1H, dd, δ 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, δ 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, δ 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, δ 2.0 Hz, H-6)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz, $\times 10^{-6}$): 178.30 (C-4), 166.40 (C-7), 163.90 (C-5), 160.00 (C-2), 160.10 (C-9), 149.60 (C-4'), 146.20 (C-3'), 136.00 (C-3), 122.40 (C-6'), 123.00 (C-1'), 117.20 (C-2'), 116.20 (C-5'), 105.50 (C-10), 98.30 (C-6), 94.50 (C-8)。该化合物氢谱和碳谱数据与文献[11]中的槲皮素数据基本一致, 故鉴定化合物 C_3 为槲皮素。比较化合物 2 和 3 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 谱数据可以看出, 除了化合物 2 在 C-3 上多了一个葡萄糖苷外, 两者结构非常类似。

化合物 C_1 、 C_2 和 C_3 的化学结构如图 1 所示。

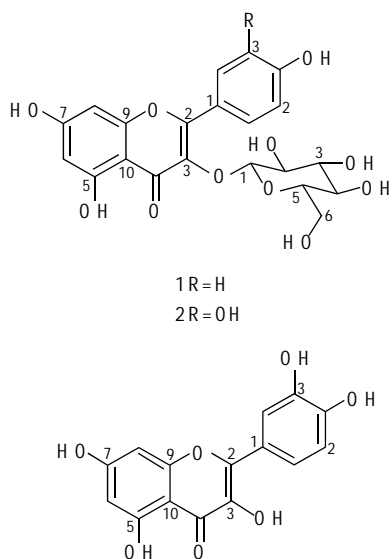


图 1 化合物 C_1 、 C_2 和 C_3 的化学结构

Fig.1 The chemical structures of compounds 1-3

2.3 清除自由基机理探讨

由 2.2 得知, 金钱草的主要清除自由基活性成分为槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷和山奈酚-3-O-葡萄糖苷。这三种化合物均为含酚羟基化合物, 易失去 $\text{H}\cdot$, 即将 $\text{H}\cdot$ 提供给 $\text{ROO}\cdot$ 或 $\text{R}\cdot$ 等活性自由基, 生成相对稳定的自由基 $\text{A}\cdot$, 即: $\text{ROO}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}\cdot$; $\text{R}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{RH} + \text{A}\cdot$ 从而延长了氧化的诱导期, 终止了氧化链式反应的传播, 起到了抗氧化剂的作用。

含酚羟基化合物的抗氧化活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目和位置[12]。槲皮素的清除自由基能力明显优于槲皮素-3-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-葡萄糖苷和 BHT。从结构上(图 1)看, 槲皮素的结构中存在 5 个酚羟基, 提供氢后形成的自由基具有共振半醌式结构, 这种共振半醌式结构除了能使电子自旋密度分布比较均匀外, 还可同时形成大的共轭键, 进一步降低了自由基结构中的电子云密度, 稳定性强。BHT 只有一个酚羟基, 与脂类化合物自由基反应后生成的自由基上的未成对电子可以在苯环上离域分布, 此自由基结构比较稳定, 但是与槲皮素在消除脂类化合物的自由基后形成的自由基相比, 由于不形成大的共轭键效应, 也不能形成分子内氢键, 所以 BHT 所形成的自由基结构没有槲皮素自由基结构稳定。此外, 槲皮素-3-O-葡萄糖苷的结构中存在 4 个酚羟基, 而山奈酚-3-O-葡萄糖苷的结构中存在 3 个酚羟基, 所以清除自由基能力前者大于后者, 且均低于槲皮素。

3 结论

金钱草的乙酸乙酯提取物(EAF)对三种不同种类的自由基均表现出明显的清除作用, 清除能力大于人工合成抗氧化剂 BHT。活性追踪分离及 1D、2DNMR 和 ESI-MS 结构鉴定证明: 金钱草清除自由基主要成分为槲皮素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷和山奈酚-3-O-葡萄糖苷。清除自由基活性大小顺序为槲皮素 > 槲皮素-3-O-葡萄糖苷 > 山奈酚-3-O-葡萄糖苷 > EAF > BHT。含酚羟基化合物的清除自由基活性与其结构密切相关。活性大小主要取决于酚羟基的数目。

金钱草作为传统的中草药, 安全性高, 分布及应用相当广泛。其提取物具有很强的清除自由基作用。可作为一种具有保健功能的新型清除自由基天然食品添加剂使用, 具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] Gordon M H. Dietary antioxidants in disease prevention[J]. Nat Prod Rep, 1996, 13(4): 265-273.
- [2] 凌关庭. 食品抗氧化剂及其进展(三)[J]. 粮食与油脂, 2000, (8): 45-48.
- [3] 黄海兰, 徐波, 李增新, 等. 崂山蘑菇抗氧化成分提取及其活性研究

内蒙古阿拉善双峰驼驼乳 IgG 的分离纯化及其热稳定性研究

吉日木图, 张和平, 赵电波

(教育部乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古农业大学食品科学与工程学院,
内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要: 本文采用硫酸铵沉淀法两次沉淀乳清蛋白, 并结合离子交换层析法, 从双峰驼初乳中分离纯化驼乳 IgG。再用 SDS-PAGE 鉴定其纯度, 测定其分子量。然后用分离纯化的驼乳 IgG 免疫家兔, 制备效价至少为 1:32 的兔抗驼 IgG 抗血清。内蒙古阿拉善双峰驼驼乳分别于 65、75、85 和 100 °C 加热 30min, 用 SDS-PAGE 检测驼乳中 IgG 的变性程度。同时采用单向免疫扩散法测定驼乳中 IgG 的活性。结果表明, 于 75 °C 加热 30min, 驼乳 IgG 的活性丧失 68.9%, 而参考值的牛乳 IgG 活性则完全丧失。因此, 驼乳 IgG 的热稳定性比牛乳 IgG 的热稳定性高。

关键词: 双峰驼乳; IgG; 热稳定性

Studies on the Separation and Purification of IgG in Alaxa Bactrian Camel Milk and Its Heat Stability

JIRI Mutu, ZHANG He-ping, ZHAO Dian-bo

(Key Lab of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering,
Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The camel milk IgG was separated and purified by using saturated ammonium sulphate combined with anion exchange resin such as DEAE-Sephacel. The purity and molecular weight of IgG was determined by SDS-PAGE. The specific rabbit anti-camel IgG antiserum was prepared by injection of camel IgG into different sites of rabbits. Camel skim milk samples were heated at 65, 75, 85, 100 °C for 30min, respectively. Presence and identification of IgG were monitored using SDS-PAGE technique and the change of IgG activity was measured by RID method. The whole activity of IgG in reference values of cow milk was lost at 75 °C / 30min versus 68.9% in loss activity of camel milk IgG. Therefore, the heat stability of camel milk IgG was higher than cow milk IgG.

Key words: bactrian camel milk; IgG; heat stability

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0188-05

收稿日期: 2006-08-20

作者简介: 吉日木图(1965-), 男, 副教授, 研究方向为食品科学。

- [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 61-66.
- [4] 黄海兰, 赵祖亮, 王斌贵. 磷钼络合物法与 β -胡萝卜素-亚油酸法测定海藻脂类成分抗氧化活性的比较[J]. 中国油脂, 2005, 30(3): 32-35.
- [5] 刘隽, 邹国林. 金钱草的研究进展[J]. 唐山师范学院学报, 2002, 24(2): 8-10.
- [6] 张尊听, 杨伯伦, 刘谦光, 等. 野葛根异黄酮成分的超声萃取及抗氧化作用[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 31-33.
- [7] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [8] 肖华山, 何文锡, 何文庆, 等. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 180-183.
- [9] Beate B, Peter W. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 2788-2798.
- [10] Wang Y B, Zhao J F, Li G P, et al. Studies on the chemical constituents of *Knoxia corymbosa*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39: 439-441.
- [11] 于德泉, 杨俊山. 分析化学手册(第七分册)(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 901.
- [12] Cai Y, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer[J]. Life Sci, 2004, 74: 2157-2184.