

橄榄叶黄酮类抗氧化物质的结构分析研究

刘玉红^{1,2} 林庆生³ 孔慧清^{1,2} 张晨² 李雄^{1,2} 卢秋雁^{1,2} 刘美玲²

1(广东省微生物研究所,广州,510070) 2(广东天辰生物技术有限公司,广州,510070)

3(华南理工大学轻工与食品学院,广州,510640)

摘要 通过超声强化提取法提取橄榄叶黄酮,采用聚酰胺柱层析和制备薄层层析对橄榄叶黄酮提取液进行分离纯化,通过抗氧化活性比较,筛选抗氧化活性最好的样品 C3,运用高效液相色谱法(HPLC)、紫外光谱法(UV)、红外光谱法(IR)、液质联用法(LC-MS)、核磁共振法(¹HNMR, ¹³CNMR),对样品 C3 进行结构分析,确定为木犀草素。

关键词 橄榄叶,黄酮,抗氧化,分离纯化,结构分析

近年来国际上对黄酮类化合物的研究开发十分活跃,相继开发出多种药品和保健品,在食品、医药、生化、日化等很多领域被广泛应用。黄酮类化合物作为天然的抗氧化剂,对人体具有防癌、延缓衰老、增强心血管功能、增强免疫力、调解内分泌系统、护肝、抗炎、抗过敏、抑菌、抗病毒等重要的生理保健功效^[1,2],因此对橄榄叶黄酮类化合物的研究具有重要意义。

从文献资料^[3~5]可知,国内外的研究者从多个领域、多种角度对黄酮类化合物进行了广泛的研究工作。但是对橄榄叶黄酮类化合物的研究报道很少,国内目前还没有对橄榄叶黄酮类化合物的研究。

本研究选择超声强化提取法提取橄榄叶黄酮,通过聚酰胺柱层析和制备薄层层析对橄榄叶黄酮提取液进行分离纯化,通过抗氧化活性比较,筛选抗氧化活性最好的样品,并运用几种谱图分析方法对样品进行了结构分析。

1 实验材料与仪器

1.1 原料

橄榄叶,肇庆橄榄种植基地提供

1.2 试剂

乙醇(AR),石油醚(AR),Na₂SO₃(CP),Al(NO₃)₃(CP),NaOH(CP),硫氰酸胺(CP),氯化亚铁(CP),NaH₂PO₄(CP),Na₂HPO₄(CP),亚油酸(CP)。聚酰胺(100~200目),硅胶 G60 型,氘代氯仿(CDCl₃),无水乙醇(AR),KBr(AR),双蒸水,乙腈(色谱纯),BHT,BHA,芦丁标准品。

1.3 仪器

LD5-10 型离心分离机,青海农牧机械厂;KQ-100DB 型超声波处理机,昆山市超声仪器有限公司;RE-52A 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Z(φ2.0cm×50cm)型层析柱,上海精科实业有限公司;BF-200B 型数显恒流泵,上海沪西分析仪器厂;DBS-100 型自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂;BMH 型冷冻干燥机,博力行仪器有限公司;DIONEX 型高效液相色谱仪,Dionex 公司;PDA-100 型紫外检测器,Dionex 公司;Unico-UV2102PC 型紫外-可见分光光度计,上海 Unico 公司;Bruker VECTOR33 型红外光谱仪,德国 Bruker 公司;Hewlett Packard 1100 LC-MSD 型液相色谱-质谱联用仪,美国惠普公司;Bruker AVANCE 400 Digital NMR 型核磁共振仪,德国 Bruker 公司。

2 实验方法

2.1 橄榄叶黄酮的提取

称取橄榄叶粉末 100 g,以 10:1 的液固(mL:g)比加入乙醇,用超声波处理 30 min,然后将提取液离心分离,真空浓缩后,用石油醚萃取 2 次,再用乙醇定容至 200 mL。

2.2 橄榄叶黄酮的分离纯化

聚酰胺柱层析分离样品:取 100 mL 提取液,以 1 mL/min 的流速通过聚酰胺柱,进行动态吸附后,再用体积分数 50%乙醇洗脱液 800 mL 洗脱,洗脱液流速 1 mL/min,收集洗脱液。

制备型薄层层析纯化样品:将收集的洗脱液带状点样在薄层层析板上,选择的展开剂为 V(乙酸乙酯):V(丁酮):V(甲醇):V(水)=60:10:20:10,展距为 18 cm。样品经薄层层析分离纯化后,进行显色分析得到 C1、C2、C3 三个样品,再将得到的 3 个样品

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2006-06-06,改回日期:2006-08-09

溶液冷冻干燥。

2.3 样品的抗氧化活性比较

用亚油酸系统法^[6]测定经上述方法分离纯化得到的 C1、C2、C3 三个样品和 BHA、BHT 的抗氧化活性,筛选出活性最强的样品。

2.4 高效液相色谱(HPLC)仪分析

把样品 C3 用无水乙醇溶解,用 HPLC 鉴定样品 C3 的纯度。色谱实验条件:色谱柱为 C_{18} 色谱柱($\phi 3.9 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$,粒径 $4 \mu\text{m}$),流动相为水:乙腈(体积比为 80:20),流速为 0.8 mL/min ,进样量为 $20 \mu\text{L}$,检测波长为 254 nm ,柱温为室温,分析时间为 30 min 。

2.5 紫外光谱仪(UV)分析

将样品 C3 用无水乙醇溶解,以无水乙醇作空白,使用 1 cm 比色皿,在 Unico-UV2102PC 型紫外光谱仪上从 $200 \sim 500 \text{ nm}$ 扫描,得到样品 C3 的紫外光谱图。

2.6 红外光谱仪(IR)分析

将样品 C3 用 KBr 压片,在 Bruker VECTOR33 型红外光谱仪上作红外光谱扫描,得到样品 C3 的红外光谱图。

2.7 液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)分析

把样品 C3 用 Hewlett Packard 1100 LC-MSD 型液相色谱-质谱联用仪进行分析,得到样品 C3 的液相色谱图和质谱图。

色谱实验条件:色谱柱为 ODS 色谱柱($\phi 4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$,粒径 $5 \mu\text{m}$),流动相为水:乙腈体积比 = 80:20,流速为 0.8 mL/min ,进样量为 $20 \mu\text{L}$,检测波长为 254 nm ,柱温为室温,分析时间为 30 min 。

质谱实验条件:采用 API-ESI 接口,电喷雾电离,作负离子模式电离,以较低电压离子化样品,同时作短时间扫描。

2.8 核磁共振仪(NMR)分析

将样品 C3 用 CDCl_3 溶解,室温条件下,在 Bruker AVANCE 400 Digital NMR 型核磁共振仪上做样品的氢谱。取样品 C3 直接在 Bruker AVANCE 400 Digital NMR 型核磁共振仪上做样品的碳谱。

3 实验结果与讨论

3.1 样品的抗氧化活性比较

从图 1 可以看出,样品 C3 的抗氧化活性明显高于样品 C1 和 C2,也高于 BHT 和 BHA。所以选 C3 作为鉴定结构的样品。

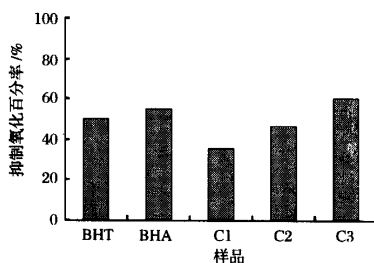


图1 样品的抗氧化活性比较

3.2 高效液相色谱(HPLC)谱图分析

图2是样品 C3 的 HPLC 谱图。从图2可以看出,样品 C3 的纯度很高,只有一个很小的溶剂峰和样品峰,保留时间是 10 min 。

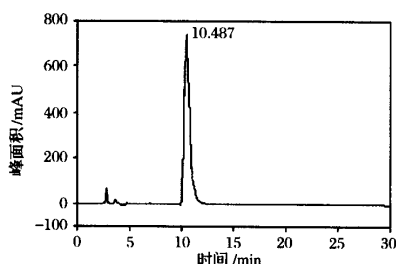


图2 样品 C3 的 HPLC 谱图

3.3 紫外光谱(UV)谱图分析

图3为样品 C3 的 UV 谱图。可以看出,样品 C3 在 $320 \sim 370 \text{ nm}$ 波长范围内有强吸收峰,为带I,在 $250 \sim 270 \text{ nm}$ 波长范围内有中等强度的吸收峰,为带II,2个最大吸收峰分别为 254 nm 和 347 nm 。参考文献[7],样品 C3 的紫外光谱图与黄酮类化合物的紫外光谱图相似,因此将样品 C3 初定为黄酮类化合物。

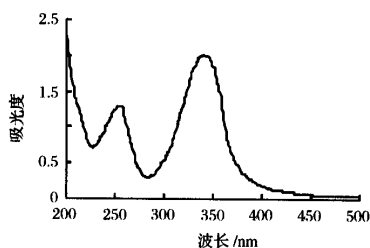


图3 样品 C3 的 UV 谱图

3.4 红外光谱(IR)谱图分析

图4为样品 C3 的 IR 谱图。可以看出: 3417 cm^{-1} 有一宽峰,为 OH 的伸缩振动(缔合羟基的纯峰), 2944 cm^{-1} 附近有三联峰,为苯环 CH 的伸缩振动, 1614 cm^{-1} 峰为苯环的骨架 $\text{C}=\text{C}$ 变形振动, 1384 cm^{-1} 峰为 CH_2 的面内弯曲振动, 1111 cm^{-1} 峰

为 C—O—C 的伸缩振动^[8]。通过红外光谱进一步证实,样品 C3 具有苯环碳骨架,含有羟基 OH、C=C 双键和醚键 C—O—C,为黄酮类化合物。

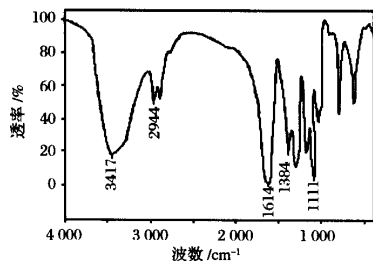


图4 样品 C3 的 IR 谱图

3.5 液相色谱-质谱联用(LC-MS)谱图分析

图5为样品 C3 的 LC 谱图。从图5可知,样品 C3 经分离得到一个峰,按峰的保留时间作质谱扫描,得到一个质谱信号。

图6为样品 C3 的 MS 谱图。图6中给出了样品 C3 的一些碎片离子峰:91.3(19%)、134.1(30%)、152.5(13%)、286.0(100%)。初步判断其相对分子质量为286.0。参照文献[9],样品 C3 的碎片离子峰与黄酮类化合物的典型碎片离子峰一致,以此判定样品 C3 为黄酮类化合物。

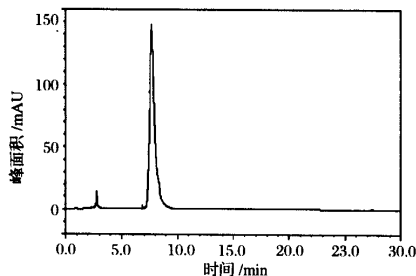


图5 样品 C3 的 LC 谱图

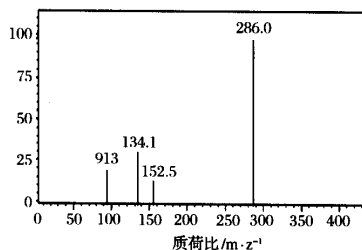


图6 样品 C3 的 MS 谱图

3.6 核磁共振(NMR)谱图分析

图7为样品 C3 的¹H-NMR 谱图。在¹H-NMR 谱图中, $\delta_{\text{H}}=6.20$ 为黄酮类化合物 A 环上 H-6 的位

移, $\delta_{\text{H}}=6.38$ 为黄酮类化合物 A 环上 H-8 的位移, $\delta_{\text{H}}=6.53$ 为黄酮类化合物 C 环上 H-3 的位移, $\delta_{\text{H}}=7.01$ 为黄酮类化合物 B 环上 H-5' 的位移, $\delta_{\text{H}}=7.22$ 为黄酮类化合物 B 环上 H-2' 的位移, $\delta_{\text{H}}=7.39$ 为黄酮类化合物 B 环上 H-6' 的位移^[7]。参照文献[10],样品 C3 的¹H-NMR 化学位移数据与木犀草素的¹H-NMR 化学位移数据一致,如表1所示,而且样品 C3 的¹H-NMR 谱图与木犀草素的¹H-NMR 谱图相似。

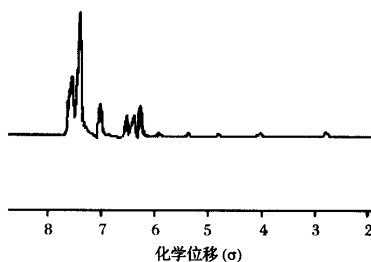


图7 样品 C3 的¹H-NMR 谱图

表1 样品 C3 的¹H-NMR 谱的化学位移归属

| H 位移 | δ | | H 位移 | δ | |
|------|----------|------|------|----------|------|
| | 实验数据 | 文献数据 | | 实验数据 | 文献数据 |
| H-3 | 6.53 | 6.49 | H-2' | 7.22 | 7.27 |
| H-6 | 6.20 | 6.18 | H-5' | 7.01 | 6.92 |
| H-8 | 6.38 | 6.36 | H-6' | 7.39 | 7.48 |

图8为样品 C3 的¹³C-NMR 谱图。在¹³C-NMR 谱图中,出现了15个碳的信号,说明分子中含有15个不同化学环境的碳原子,而且 $\delta_{\text{C}}=183.1$ 为黄酮类化合物中央三碳核 C=O 的信号特征, $\delta_{\text{C}}=163.2$ 为黄酮类化合物中央三碳核 C-2 的信号特征, $\delta_{\text{C}}=104.8$ 为黄酮类化合物中央三碳核 C-3 的信号特征^[7]。参照文献[10],样品 C3 的¹³C-NMR 化学位移数据与木犀草素的¹³C-NMR 化学位移数据一致,如表2所示。

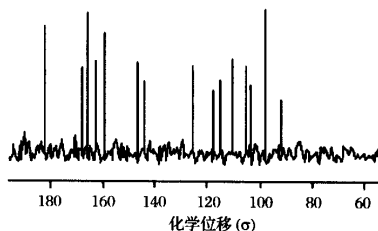


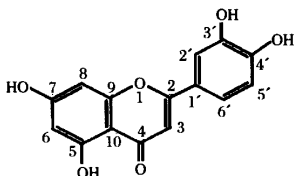
图8 样品 C3 的¹³C-NMR 谱图

表 2 样品 C3 的 ^{13}C -NMR 谱的化学位移归属

| C 位 | δ | | C 位 | δ | |
|-----|----------|-------|-----|----------|-------|
| | 实验数据 | 文献数据 | | 实验数据 | 文献数据 |
| 2 | 163.2 | 164.5 | 10 | 105.1 | 104.2 |
| 3 | 104.8 | 103.3 | 1' | 118.4 | 119.3 |
| 4 | 183.1 | 182.2 | 2' | 112.0 | 113.8 |
| 5 | 158.5 | 157.9 | 3' | 145.7 | 146.2 |
| 6 | 99.7 | 99.2 | 4' | 149.6 | 150.1 |
| 7 | 165.9 | 164.7 | 5' | 115.3 | 116.4 |
| 8 | 92.3 | 94.2 | 6' | 123.5 | 122.1 |
| 9 | 161.4 | 162.1 | | | |

3.7 分子结构式的确定

综合以上 HPLC、UV、IR、LC-MS、NMR 的谱图分析结果,判定样品 C3 为木犀草素,其分子结构式为:



4 结 论

通过抗氧化活性的筛选试验表明,橄榄叶黄酮中样品 C3 的抗氧化活性最好,优于抗氧化剂 BHA 和 BHT,采用几种不同的结构分析方法对样品 C3 进行综合分析,确定了橄榄叶黄酮的主要成分为木犀草

素,它是一种抗氧化活性较好的天然抗氧化剂,可以替代市场上销售的部分合成抗氧化剂,具有广阔的开发和应用前景。

参 考 文 献

- 1 Gianfranco Di Renzo. Ginkgo biloba and the central nervous system[J]. Fitoterapia, 2000, 71: 843~847
- 2 Martien van Dongen, Erik van Rossum, Alphons Kessels, et al. Ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: a randomized clinical trial[J]. Journal of Clinical Epidemiology. 2003, 56: 367~376
- 3 Jeffrey B Harborne, Christine A Williams. Review: Advances in flavonoid research since 1992[J]. Phytochemistry. 2000, 55: 481~504
- 4 Harborne, Jeffrey B, Williams Christine A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. Phytochemistry, 2000, 55 (6): 481~504
- 5 凌庭庭. 有“第七营养素”之称的多酚类物质[J]. 中国食品添加剂, 2000(1): 28~37
- 6 Osawa T, Namiki M A. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(3): 735~739
- 7 姚新生, 吴立军, 吴继洲. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004
- 8 邓芹英, 刘 岚, 邓慧敏. 波谱分析教程[M]. 北京: 科学出版社, 2003
- 9 丛蒲珠, 苏克曼. 分析化学手册第九分册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1989
- 10 于德泉, 杨峻山, 谢晶曦. 分析化学手册第五分册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1989

Study on the Analysing Structure of Flavonoids Antioxidants from Olive Leave

Liu Yuhong^{1,2} Lin Qingsheng³ Kong Huiqing^{1,2}
Zhang Chen² Li Xiong^{1,2} Lu Qiuyan^{1,2} Liu Meiling²

1(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

2(Guangdong TianChen Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510070, China)

3(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

ABSTRACT The flavonoids of olive leaves was extracted by ultrasonic enhanced extraction, then separated and purified with polyamide column chromatography and PTLC. Sample C3 was selected by screen the antioxidative activity and its structure was elucidated by UV, IR, LC-MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, and was identified as Luteolin.

Key words olive leave, flavonoids, anti-oxidation separated and purified, structure elucidated