

## 叶黄素的体外抗氧化功能

廖萍泰<sup>1</sup> 惠伯棣<sup>2</sup> 裴凌鹏<sup>2</sup> 孙志国<sup>2</sup> 张 帅<sup>2</sup>

1(兰州大学公共卫生学院,兰州,730000)

2(北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,北京,100083)

**摘要** 应用反相高压液相色谱(RP-HPLC)从万寿菊的花中制备叶黄素的反式(E-)、顺式(Z-)异构体及其酯类3个组分。然后,应用微弱发光检测技术测定和比较各组分在体外淬灭单线态氧的能力。结果表明,反式和顺式叶黄素及其酯类均有体外淬灭单线态氧的能力,同时,还可观察到顺式异构体的“延迟发光”现象,说明反式异构体与顺式异构体可能有不同的淬灭单线态氧的机理。

**关键词** 叶黄素酯,叶黄素异构,淬灭单线态氧

叶黄素(lutein)1831年首次由Heinrich Wilhelm和Ferdinand Wackenroder从胡萝卜根中提取出来。它是一种含羟基的类胡萝卜素,习惯称为叶黄素或黄体素,半系统命名为3,3'-二羟基- $\beta$ , $\alpha$ -胡萝卜素,分子式为 $C_{40}H_{56}O_2$ ,分子质量为568.88,其分子结构见图1。已经证明,叶黄素对人视网膜以及黄斑有保护作用、可降低白内障的发病危险、防止紫外线对皮肤的损伤、调节人体免疫功能等。

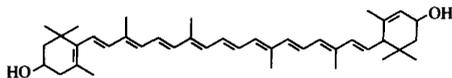


图1 全反式叶黄素分子的结构

目前尚无叶黄素人工合成产品在市场上出现。所有叶黄素均来自与天然资源——万寿菊的花中获得。万寿菊(*Tagetes erecta* L.)属菊科(Compositae)万寿菊属(*Tateges* L.)的植物。万寿菊花含有丰富的类胡萝卜素化合物,主要为叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -胡萝卜素和大量的叶黄素酯。实际上,叶黄素在万寿菊花中主要以酯的形式存在。

单线态氧是一种活性氧自由基。自由基是能独立存在的含有一个或一个以上不配对电子的原子或原子团。由于未成对电子具有成对的趋势,故自由基显示出较活泼的化学性质<sup>[1]</sup>。早在1930年,Mulliken等就通过分子轨道的计算预言了单线态氧的存在。至1963年,Khan和Kasa确立了用 $NaClO$ 和 $H_2O_2$ 产生单线态氧的反应。从此,对单线态氧的研究得以迅速发展<sup>[2]</sup>。微弱发光检测技术的发展使得在体外直接检测单线态氧变得更为简单。单线态氧淬灭剂可使光子计数降低而被检出。因此,微弱发光

检测技术成为研究体外淬灭单线态氧的基础技术之一。

本项研究应用反相 $C_{18}$ 高压液相色谱分离和纯化叶黄素酯、反式、顺式叶黄素单体3个组分,随后用化学发光检测技术比较了它们在体外淬灭单线态氧的能力。这一研究的结果对以万寿菊花为原料发展富含叶黄素的功能性食品和药品具有明显的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

万寿菊干花颗粒取自山东诸城外贸集团。萃取和化学发光实验所用试剂均为分析纯试剂,由北京化工厂生产。高压液相色谱(HPLC)分析用试剂乙酸乙酯和乙腈均为色谱纯试剂(Fisher)。

### 1.2 仪 器

用于组分分离、纯化和鉴定的HPLC为Waters 600E系统,配备二极管阵列检测器PDA-996;用于光子计数的微弱发光测量仪为BPCL-4型,由中国科学院生物物理研究所设计并制造;用于组分含量测定的紫外-可见分光光度计为SHIMADZU Multispec-1501型。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 叶黄素酯和单体顺、反式异构体的制备

取一定量的万寿菊干花颗粒于研钵中,加入2~4倍(g:mL)的正己烷研磨4~6遍,收集、合并上清液。上清液中含有大量的叶黄素酯。使用真空旋转干燥仪,在45℃、-0.08 MPa、60~90 r/min条件下浓缩萃取液至原体积的1/4。将浓缩物置于三角瓶中,加入等量质量分数10%的 $KOH-CH_3CH_2OH$ 溶液,搅拌过夜(>12 h),进行酯的皂化(见图2)<sup>[3]</sup>。皂化完全后,用乙醚和质量分数2%的 $NaCl$ 水溶液

第一作者:硕士研究生(惠伯棣博士为通讯作者)。

收稿日期:2005-12-14, 改回日期:2005-03-04

在分液漏斗中将皂化产物萃取到乙醚相中,得到叶黄素单体混合物。

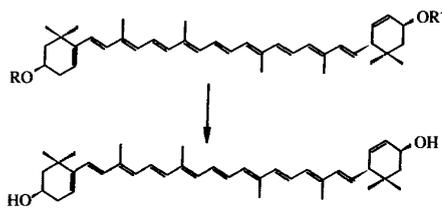


图2 叶黄素酯的皂化

收集叶黄素酯、叶黄素反式及顺式异构体组分。收集后的组分避光、氮气吹干,用甲醇溶解后,在分光光度计上进行浓度测定。样品中叶黄素类化合物(包括酯和单体的顺、反式异构体)的浓度可根据下式计算得到:

$$x = (A \times y) / (A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100)$$

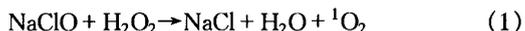
式中:  $x$ ——样品中所含的叶黄素类化合物数量(g),  $y$ ——样品溶液的体积(mL),  $A$ ——样品的光密度值。

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = 吸光系数,为在 1 cm 光程长的比色杯中 10 g/L 浓度溶质的理论吸收值。在此,采用值为 2 200。

调整叶黄素双酯、反式及顺式单体的浓度,分别配成不同浓度的溶液。每个组分计有 4 种不同浓度的溶液,0.1、0.01、0.001 及 0.000 1 mg/mL。

### 1.3.2 体外淬灭单线态氧功能的比较

用次氯酸钠氧化过氧化氢可产生单线态氧[见反应式(1)]。该反应所产生的光子可以被微弱发光分析仪计数。当淬灭剂存在时,该反应所释放的光子数量下降<sup>[4]</sup>。该反应在本项研究中被用来检验和比较不同组分淬灭单线态氧的能力。



根据报道,在该反应所释放的光子进行计数时,可以使用 634、705 及 1 268 nm 等滤光片<sup>[3]</sup>。在本项研究中,首先比较了 400、425、440、460、490、535、555、575、620、640 及 705 nm 滤光片的光子计数值,以选择最佳灵敏度的滤光片。由于在本项研究中所使用的光子计数器(BPCL-4 型)在 700 nm 以上的计数灵敏度明显衰减,所以,进行比较的最长波长滤光片为 705 nm。

在进行测量时,首先用<sup>14</sup>C 源校正仪器至 30 000 光子计数值。样品的测量条件为:采集间隔 1 s,收集时间 100 s。在测量样品时,在测量杯中顺次加入 2

mL 次氯酸钠溶液、1 mL 甲醇、0.2 mL 样品溶液,混合后将测量杯放入测量池中,开始测量。在开始光子计数程序后 10 s 时注入 0.6 mL 体积分数 30% 双氧水启动反应。完成计数后,保存数据。空白对照样品为甲醇。

由于该反应的稳定性不易控制,为确保试验结果的准确性,每个样品重复测量 6 次,取平均值计算结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 叶黄素酯的制备和单体顺、反式异构体鉴定

万寿菊干花颗粒正己烷萃取液及皂化后产物在 HPLC 上分离时的色谱行为见图 3。图 3 显示,皂化前的萃取液在 20 min 后有一组峰。它们是叶黄素酯,在皂化后的样品中不再出现。皂化后的样品 9.91 min 有一主峰出现,且主峰后有一组小峰,其中保留时间在 10.91 min 的峰为主要组分。图 4 显示了保留时间在 9.91 和 10.91 min 的 2 个组分的紫外-可见吸收光谱。根据其光谱特征(如最大吸收峰波长为 446 nm),保留时间在 9.91 min 的组分被鉴定为叶黄素全反式异构体。保留时间在 10.91 min 组分的最大吸收峰波长为 444 nm,并且在 328 nm 处具有顺式异构体的特征峰。根据上述 2 个组分的光谱特征和色谱行为,它们分别被鉴定为叶黄素的全反式异构体和不同顺式异构体的混合物。

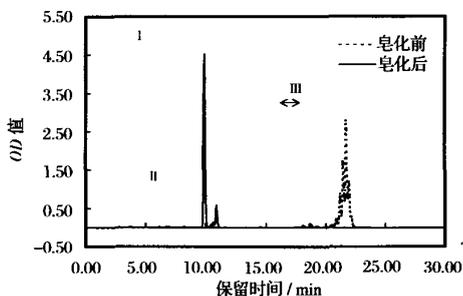


图3 万寿菊干花颗粒萃取物皂化前后高压液相色谱图比较

色谱条件:色谱柱为 Diamonsil<sup>TM</sup> (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  25 cm);流动相 A 为乙腈-水(9:1),流动相 B 为乙酸乙酯;线性梯度:B 在 25 min 内由 0 至 100%;流速为 1 mL/min;波长范围为 250~550 nm;检测波长为 450 nm;进样量为 25  $\mu\text{L}$ 。峰 I 为反式叶黄素;峰 II 为顺式叶黄素;组分 III(多个峰)为叶黄素酯。

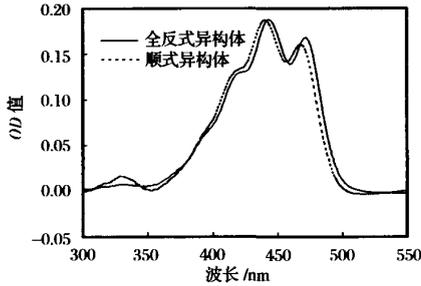


图4 反式和顺式叶黄素电子吸收光谱图比较

### 2.2 淬灭单线态氧功能的比较

图5显示了不同滤光片对  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  反应体系光子计数值的影响。从图5可以看出,在本项研究中使用的仪器上,应用 640 nm 的滤光片可以使光子计数达到最灵敏的程度。

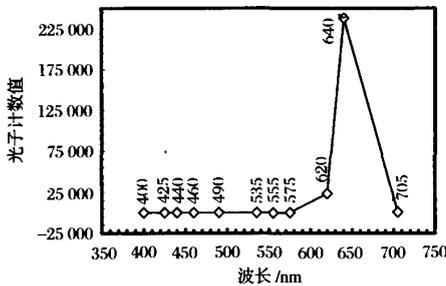


图5 不同滤光片对  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  反应体系光子计数值的影响

图6、图7与图8分别显示了叶黄素酯及反式、顺式异构体在  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  体系中淬灭单线态氧时的光子计数。图6~图8表明,3个组分在一定浓度

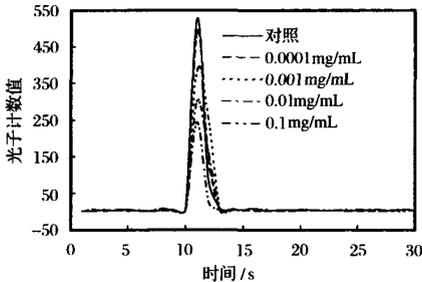


图6 叶黄素酯在  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  体系中淬灭单线态氧时的光子计数

以上均有降低体系光子计数值的作用。换言之,它们均有淬灭体系中单线态氧的能力。已有报到,叶黄素酯在人体内可转化为叶黄素单体,在细胞水平完成一系列抗氧化行为,保护细胞的正常代谢<sup>[5]</sup>。本项研究的结果表明,叶黄素酯在离体条件下本身亦具有淬

灭单线态氧的能力。

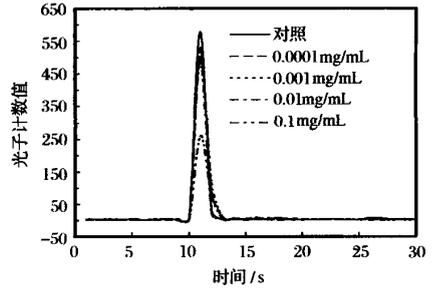


图7 反式叶黄素在  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  体系中淬灭单线态氧时的光子计数

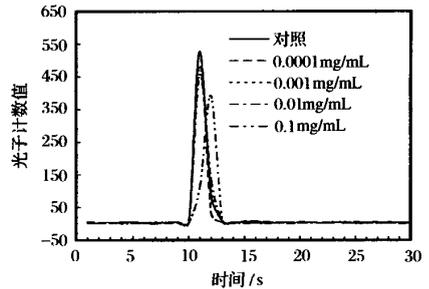


图8 顺式叶黄素在  $\text{NaClO-H}_2\text{O}_2$  体系中淬灭单线态氧时的光子计数

图9为淬灭剂种类和量的变化对最高光子计数的影响。图9表明,随着体系中各组分浓度增加,各组分的最高光子计数值也增加,其淬灭单线态氧的能力也增加。三者淬灭单线态氧的最小作用剂量分别为,叶黄素酯 0.000 1~0.001 mg/mL,反式叶黄素 0.001~0.01 mg/mL,顺式叶黄素 0.000 1~0.001 mg/mL。同时,当叶黄素酯及反式、顺式叶黄素的浓度超过 0.01、0.1、0.01 mg/mL 时,三者均显示出显著的淬灭单线态氧的能力。

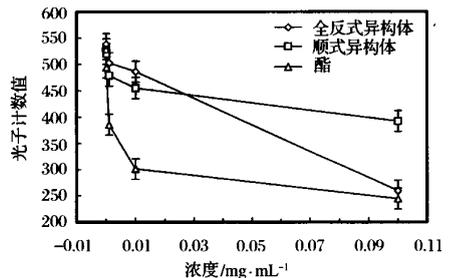


图9 淬灭剂种类和量的变化对最高光子计数的影响

在试验中还发现,当顺式叶黄素的浓度超过 0.01 mg/mL 时,它还具有延迟体系光子计数达到最大值的作用(见图10)。这表明顺式异构体与反式异

构体在淬灭单线态氧的机理方面存在着不同之处。在类胡萝卜素立体化学中,几何异构是最令人感兴趣的问题之一。分子结构上异构变化对叶黄素淬灭自由基功能的影响是今后需要进一步探讨的重要方向之一。

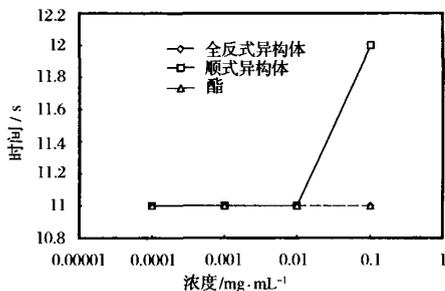


图 10 淬灭剂种类和量的变化对最高光子计数出现时间的影响

### 3 结论

叶黄素酯、反式叶黄素和顺式叶黄素 3 个组分

均具有淬灭单线态氧的能力。同时,顺式叶黄素还表现出至迟单线态氧生成的作用。因此,在发展抗氧化功能的功能性食品和药品时,显然,酯可用,而单体中反式、顺式异构体存在反应机理上的区别。建议混合使用,并对机理做进一步的研究。

### 参 考 文 献

- 1 陈 瓊,周 玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.7
- 2 Kanofsky J R. Singlet oxygen production by lactoperoxidase [J]. J Biol Chem, 1983, 258(10): 5 991~5 993
- 3 Young A, Britton G. Carotenoids In Photosynthesis[M]. London:Chapman and Hall Press, 1993.409~452
- 4 庞战军,周 玫,陈 瓊. 自由基医学研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.35~41
- 5 赵文恩,韩雅珊,Hirota S. 类胡萝卜素对 $\cdot$ 体系生成的淬灭作用[J]. 生物物理学报, 1997,13(1):138~142

## Study on the Singlet-oxygen Quenching of Lutein from Marigold Flower *in vitro*

Liao Pingtai<sup>1</sup> Hui Bodi<sup>2</sup> Pei Lingpeng<sup>2</sup> Sun Zhiguo<sup>2</sup> Zhang Shuai<sup>2</sup>

1(Faculty of Public Health, Lanzhou Medical University, Lanzhou, 730000,China)

2(Bio-active Substance and Functional Food Laboratory, College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing, 100083,China)

**ABSTRACT** Three fractions, all *E*- and *Z*- isomers of lutein and their esters were prepared by reversed phase HPLC from the flower of marigold. Examination and comparison of the singlet-oxygen quenching ability by those fractions were undertaken and analyzed by ultra weak luminescence. It was observed that all of three fractions, esters, all *E*- and *Z*- isomers, could extinguish singlet-oxygen *in vitro*. Additionally, 'Time delay' effect of *Z*-isomers was observed. This observation suggested that *Z*-isomers quenched singlet-oxygen with a different mechanism from all *E*-isomer. Application of those fractions in functional food and pharmaceutical products with anti-oxidation function might be considered based on those observations.

**Key words** lutein ester, lutein isomer, singlet-oxygen quenching

### 日本对茶叶设限

2006年5月,日本将实施新的食品卫生法,其中对茶叶农残限制将有如下变化:设限农药残留由83种增加到约144种;设限以外的农药残留全部按“一律标准”即限量为0.01mg/kg;采用“干茶法”进行检测;设限外农残超标将被视为违法。日本对设限外农药采用“一律标准”将极大增加我出口茶叶农药被检出的几率,以违禁被追究的可能性极大,这将严重影响到我国的茶叶出口。

面对这一新的形势,我国应提早采取应对措施,对茶树病虫害实施高效、低毒、低残留的化学防治;强化茶叶原料的农残检测,把好进货关;启动信息沟通机制,检验检疫部门及时向茶叶行业提供相关信息,并发挥技术优势帮助企业化解出口风险。