

⑥ 409-415

葡萄籽中多酚类物质对氧自由基清除作用的 ESR 研究

0629.9

高军涛, Huiru Tang**, 侯京武, 李美芬, 忻文娟, 赵保路*

(中国科学院生物物理研究所, 100101)

摘 要 用 ESR 自旋捕集技术研究了从葡萄籽分离的单体、二聚体和三聚体等多酚类物质对羟基自由基和超氧阴离子的清除作用, 并与化学发光法的测定结果进行了比较, 得到了较一致的结果, 证明葡萄籽中多酚类物质对氧自由基的确有较好的清除作用, 这很可能是喝少量葡萄酒有利于身体健康的原因。

关键词 氧自由基, 多酚类物质, 化学发光, ESR

葡萄籽 葡萄多酚

1 前言

葡萄酒中含有被称为 proanthocyanidins (葡萄多酚) 的植物多元酚类物质及其衍生物^[1], 这类物质不仅使葡萄酒具有了特有的口感、香味及颜色, 而且对饮用者的健康有着良好促进作用^[2]; 它们可以有效清除有害氧自由基, 抑制红细胞膜和低密度脂蛋白的脂质过氧化, 促进内皮细胞松弛因子 NO 的形成, 防止血小板凝聚, 防止心脑血管病。在文献中我们发现, 这种多元酚类在葡萄籽中的含量要比葡萄酒、红酒及其他物质中的含量要高^[3], 而且葡萄多酚对氧自由基的清除能力要远远高于维生素 E (反应速率常数 K_i $10^{-7}/10^{-8}$ vs. 10^{-6} M)^[4], 因此我们选择葡萄籽作为研究对象, 对其中的有效成分进行提取和分离, 共得到 31 个组份, 采用化学发光法和 ESR 自旋捕集技术, 对有关组份的抗氧化性和清除自由基的能力进行分析, 然后对两种结果进行了比较, 发现两种方法所得结果呈一致趋势, 但 ESR 方法所得结果更加具有特异性, 各组间的差异更加显著。

2 材料和方法

2.1 材料

DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide) 购自 Sigma 公司, 使用前用活性炭提纯, 提

收稿日期 1999-04-13 收修改稿日期 1999-05-27

* 通讯联系人 ** Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7NA, the United Kingdom

高军涛, 男, 1977 年出生, 在读研究生

纯后无杂质 ESR 信号. Lumino(5-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydrophthalazin-1, 4-dion)、Sephadex LH-20 为 Fluka 公司产品. 丙酮(Me_2CO)、乙酸乙酯(EtOAc)等其它试剂均为国产分析纯.

2.2 样品制备

2.2.1 粗提样品

参考文献[5], 取葡萄籽 200g, 用机械粉碎法粉碎, 以破坏籽粒中的植物细胞壁用 $\text{Me}_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}(1:1, \text{v/v})$ 600mL 浸提三次, 依次用抽滤瓶过滤, 除去浸提时的残渣, 保留滤液. 用旋转蒸发器蒸馏除去滤液中的 Me_2CO , 剩下水溶性物质. 对水溶性物质用 400mL 石油醚进行萃取, 收集下层褐色液体物质, 弃去上层乳黄色的大分子、脂类物质. 重复萃取三次. 对水相的褐色液体进行旋转蒸发, 除去其中的石油醚.

对水相用 EtOAc 进行萃取, 分别收集上、下两层液体, 上层为乙酸乙酯相, 下层为水相. 用 $\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}(2:3, \text{v/v})$ 进行新一轮的萃取, 步骤同上, 重复两次. 分别收集水相和乙酸乙酯相液体. 用旋转蒸发器除去乙酸乙酯, 再将两相分别进行冷冻干燥后, 得到黄褐色粉状颗粒物质. 其中, 酯相物质 1.2g, 水相物质 21.1g.

2.2.2 分离与纯化

参考文献[6], 将酯相和水相物质分别用最少量的 95% 乙醇溶解, 在 Sephadex LH20 层析柱($4 \times 60\text{cm}$, 填料高度 45cm)上样并进行连续洗脱, 洗脱液为 95% 乙醇. 用蠕动泵保持洗脱速度的恒定(2.5mL/min), 用自动部分收集器收集洗脱下来的液体. 对试管中的洗脱液分别用 Beckman 紫外-可见分光光度计进行检测后, 分离出不同的组份, 共收集到 31 种组份(酯相物质中 17 种、水相物质中 14 种组份). 蒸去其中的有机溶剂, 冷冻干燥后在低温避光条件下保存.

2.3 TLC 实验^[7]

$30 \times 100\text{mm}$ 硅胶板由青岛海洋化工厂出品, 用碘熏显色. 所用展开剂为: 苯: 丙酮: 乙酸(3:7.5:1), 或乙酸乙酯: 正己烷(7:3), 或甲苯: 丙酮: 甲酸(3:3:1)^[8]. 测试分离出的不同组份的 R_f 值, 明确分离纯度和组份的结构.

2.4 化学发光法(CL)测定氧自由基清除率

由 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基, 在 NDD-1 发光测试仪(北京第二光学仪器厂)上进行检测.

由 $\text{NaOH}(1\text{mol/L})10\mu\text{L}$ 和邻苯三酚(0.05mol/L) $10\mu\text{L}$ 混合, 在碱性条件下产生 O_2^- 自由基. 在 NDD-1 发光测试仪(北京第二光学仪器厂)上进行检测.

将不同浓度的分离组份加入上述二体系, 通过测量发光值的大小, 计算不同分离组份对 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的清除率.

2.5 ESR 实验测定氧自由基清除率

ESR 技术是研究自由基和抗氧化剂最直接最有效的方法. 为了检测和辨认短寿命自由基, 需将一不饱和的抗磁性物质——自由基捕集剂, 加入反应体系, 捕捉瞬时自由基, 从而可以得到能用 ESR 波谱仪在常温下检测到的寿命较长的自由基.

在 Bruker ER200 D-SRC 型 ESR 波谱仪上进行测定时, 条件如下: X 波段, 微波功率 20mW, 调制 100kHz, 调幅 0.1mT, 扫宽 20mT, 中心磁场 324.5mT, 室温下检测.

利用 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基, 用 DMPO 捕集 $\cdot\text{OH}$ 自由基: $\text{H}_2\text{O}_2(3\%)10\mu\text{L}$, $\text{Fe-SO}_4(0.4\text{mmol/L})10\mu\text{L}$, DMPO(0.1mol/L) $10\mu\text{L}$, 样品或蒸馏水 $10\mu\text{L}$, 迅速混匀, 吸入石

英毛细管中,描记 1min 时的 ESR 波谱.

利用光照核黄素(10mmol/L)/EDTA(20mmol/L)产生 O_2^- 自由基,DMPO 捕集产生的 O_2^- 自由基,光照 1min 后,描记 ESR 波谱.

3 结果

从葡萄籽提取的单体、二聚体和三聚体的多酚类物质的结构如图 1 所示^[9].分析其结构可知,这些多酚类物质从结构上看,由于在苯环上含有若干个羟基,与从茶叶中提取的茶多酚类物质极其相似,同属于所谓的“单宁”类物质,故对氧自由基可有一定的清除作用、一定的抗氧化性和有关的生物活性.因此我们采用化学发光法和 ESR 技术来研究各个组份的抗氧化性和对自由基的清除作用.

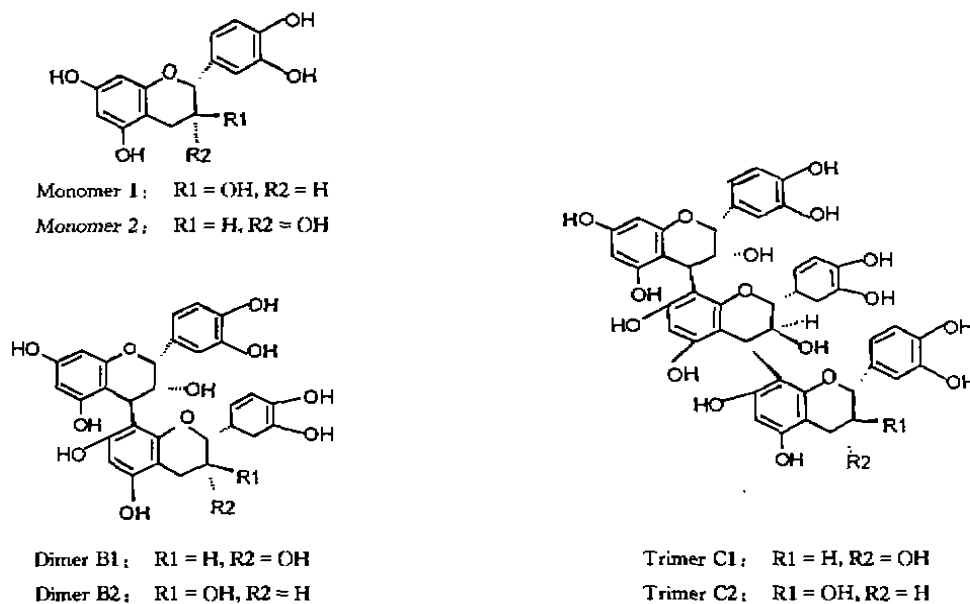


图 1 从葡萄籽提取的单体、二聚体和三聚体的多酚类物质的结构

Fig. 1 The monomers, dimers and trimers of polyphenols extracted from grape seeds

3.1 葡萄籽多酚类物质对羟基自由基的清除作用

图 2(a)为由 Fenton 反应产生的羟基自由基的 ESR 波谱.它是由 4 条谱线组成高度比为 1:2:2:1 的典型图谱($g = 2.0045$, $a_N = a_H = 1.49\text{mT}$).加或不加葡萄籽多酚类物质对波谱信号的超精细分裂常数和 g 值没有影响,仅随着多酚类物质浓度的增加,其 ESR 信号强度递减.故用波谱信号第二峰的峰对峰高度 $h(\text{mm})$ 表示 ESR 信号的相对强度.在 Fenton 反应体系中,加入不同浓度的葡萄籽多酚类物质组份 8 对该体系产生的羟基自由基进行了清除,清除后的 ESR 波谱如图 2(b)、(c)、(d)所示.由图可以看出,加入不同浓度的葡萄籽多酚类物质后,ESR 信号强度明显减小,而且具有明显的剂量依赖效应.利用该图可以得出,各组份清除羟基自由基时,它们清除 50% 氧自由基的浓度,即 IC_{50} 值,见表 1 所示.

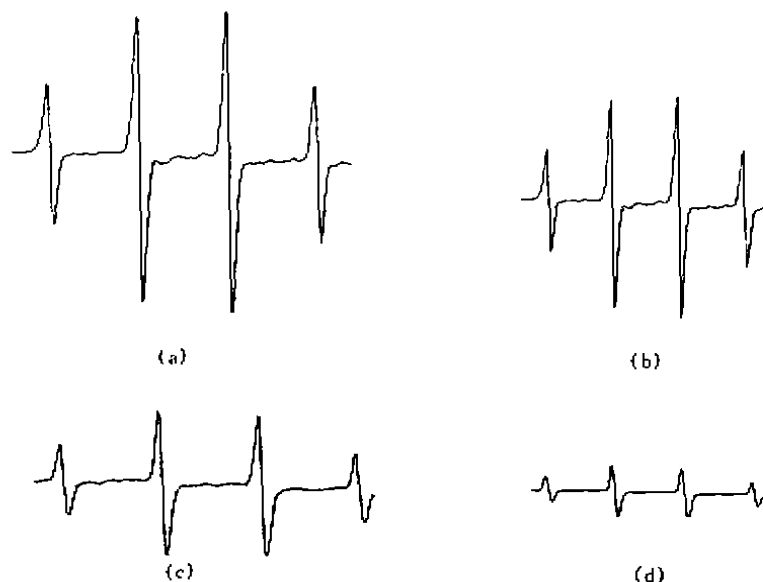


图2 用DMPO(0.1mol/L)捕集的Fenton反应体系(Fe^{2+} (0.4mmol/L) + H_2O_2 (0.05mol/L))产生的羟基自由基的ESR波谱;(a)体系中不加葡萄籽多酚类物质;(b)体系中加入组份8的0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(c)4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(d)20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对该体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Fig.2 (a)ESR spectrum of hydroxyl radical spin adduct of DMPO produced by a solution of 0.1mol/L DMPO,0.05mol/L hydroxyl peroxygen and 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Fe^{2+} as for ferronsammonim sulfate in water;(b)Conditions were the same as those for (a), except that fraction 8 of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(c)fraction 8 of 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(d)fraction 8 of 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was present

表1 葡萄籽的几种组份的 R_f 值与 IC_{50} 值

Tab.1 The value of R_f and IC_{50} of some fractions extracted from grape seeds

Fraction	Structure	R_f	IC_{50} for $\cdot\text{OH}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		IC_{50} for O_2^- (mg/mL)	
			ESR	Chemiluminescence	ESR	Chemiluminescence
Fr2	Monomer	0.67	0.28	0.30	0.48	0.40
Fr8	Dimer	0.46	0.30	0.30	0.35	0.30
Fr12	Trimer	0.27	0.25	0.18	0.10	0.15
Fr15	Monomer	0.62	0.24	0.20	0.7	0.8
Fr22	Dimer	0.48	0.15	0.15	0.5	0.4
Fr29	Trimer	0.35	0.62	0.50	1.1	1.2

利用依赖鲁米诺的化学发光技术,我们测试了葡萄籽多酚类物质对Fenton反应体系产生羟基自由基的抑制作用.对于某一组份,一组典型的抑制曲线如图3所示.

我们发现,在组份8的浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其对自由基的清除率几乎为0.随着组份浓度的升高,其清除率也是逐渐升高的.在组份的浓度大于20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对自由基的清除率几乎达到100%.由该图可近似得到组份8的 IC_{50} 值为0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.用这种方法计算出的葡萄籽多酚类物质清除羟基自由基的 IC_{50} 值见表1所示.由表1的 IC_{50} 值可以看出,单体、二聚体、三聚体清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的效率是各不相同的.

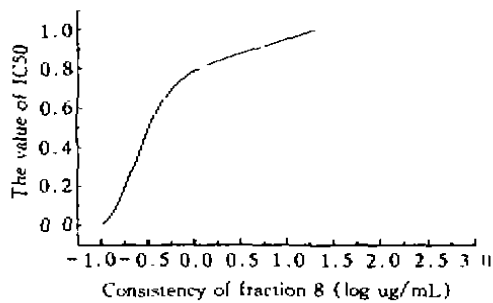


图 3 多酚类物质中组份 8 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率随浓度变化的曲线

Fig. 3 The curve of scavenging effect of polyphenols Fraction 8 changed with consistency ($\log \mu\text{g/mL}$)

3.2 葡萄籽多酚类物质对 O_2^- 的清除作用

图 4(a) 为用 DMPO 捕集光照核黄素/EDTA 体系产生的 O_2^- 的 ESR 波谱. 它是由 12 条谱线组成的典型图谱 ($a_N = 1.42\text{mT}$, $a_H^{\beta} = 1.12\text{mT}$, $a_H^{\gamma} = 0.13\text{mT}$). 加或不加葡萄籽多酚类物质对波谱信号的超精细分裂常数没有影响, 仅信号强度不同. 与图 4(a) ESR 波谱相比较, 加入不同浓度的组份 12 后, 图 4(b)、(c)、(d) 的波谱峰高显著降低, 随着样品浓度的增加, 清除 O_2^- 的效果也越来越明显. 在样品浓度为 $300\mu\text{g/mL}$ 时, 已将产生的 O_2^- 自由基 80% 清除 (见图 4(d)). 用该技术测试的葡萄籽不同组份对 O_2^- 清除的 IC_{50} 如表 1 所示.

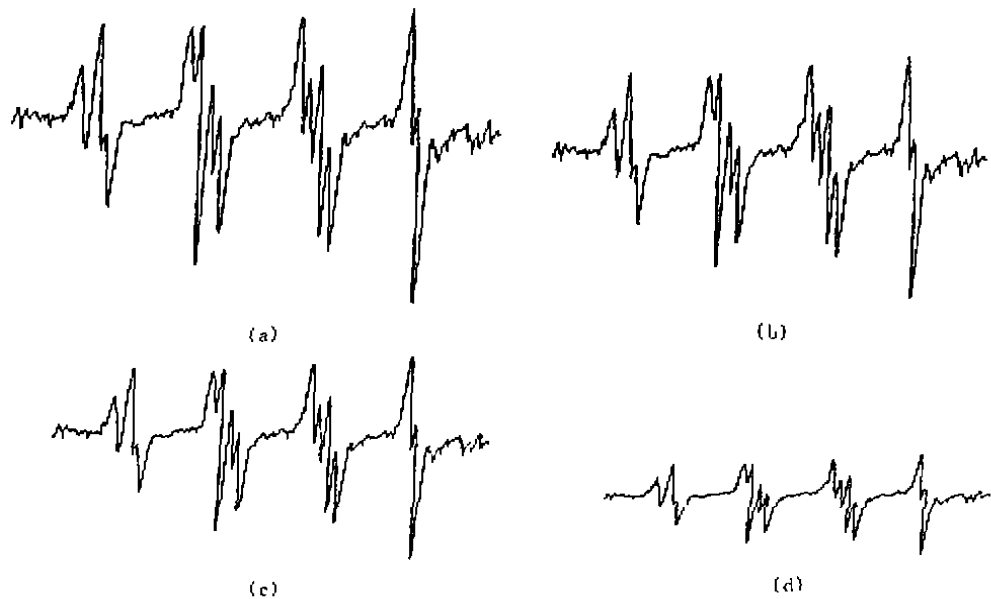


图 4 (a) 用 DMPO (0.1mol/L) 捕集的光照核黄素 (0.01mol/L)/EDTA (0.02mol/L) 体系产生的 O_2^- 自由基的 ESR 特征波谱; 体系中加入 (b) 葡萄籽多酚类物质 (组份 12) $10\mu\text{g/mL}$; (c) $100\mu\text{g/mL}$; (d) $300\mu\text{g/mL}$ 对该体系产生的 O_2^- 自由基的清除作用

Fig. 4 (a) ESR spectrum of superoxide radical spin adduct of DMPO produced by a solution of 0.1mol/L DMPO, lactoflavin (0.01mol/L)/EDTA (0.02mol/L) system; (b) Conditions were the same as those for (a), except that the polyphenols fraction of $10\mu\text{g/mL}$; (c) $100\mu\text{g/mL}$; (d) $300\mu\text{g/mL}$ was present

利用依赖鲁米诺的化学发光技术, 测试了葡萄籽多酚类物质对邻苯三酚自氧化产生的 O_2^- 的清除作用. 对于某一组份, 一组典型的清除曲线如图 5 所示. 由该图计算出的不

同葡萄籽多酚类物质对 O_2^- 清除的 IC_{50} 如表 1 所示, 随着样品浓度的增加, 清除 O_2^- 的效果也越来越明显。

4 讨论

近年来对流行病调查发现, 在西方发达国家心脑血管病的发病率和死亡率都是最高的, 这主要是他们食用高脂肪食物和生活方式所致^[10]。在我国一些城市和地区, 随着生活水平的提高, 心脑血管病的发病率和死亡率也呈明显升高的趋势。然而, 在发达的法国的一些地区, 心脑血管病的发病率和死亡率明显低于法国其他地区和其他发达国家, 而且发现他们饮食中的脂肪含量也不低, 这使人们大惑不解, 被称为“法国异常”。近来研究发现法国这些地区居民经常喝红葡萄酒, 为什么喝红葡萄酒可以防止心脑血管病呢? 不少研究者对此进行了大量实验, 结果发现, 红葡萄酒中含有大量多元酚类物质, 它们可以有效清除有害氧自由基, 抑制红细胞膜和低密度脂蛋白的脂质过氧化, 促进内皮细胞松弛因子 NO 的形成, 防止血小板凝聚, 防止心脑血管病^[11]。这些都是和 NO 对细胞和组织的损伤和保护直接相关的。

本工作的结果表明, 葡萄籽中的多酚类物质对活性氧自由基 $\cdot OH$ 和 O_2^- 均有较好的清除作用, 这两种自由基在引起脂质过氧化、形成动脉粥样硬化和引起脑血管病方面都起着很重要的作用, 这很可能是喝少量葡萄酒有助于预防心脑血管疾病的主要原因。

由 ESR 技术和化学发光法所得结果的比较来看, 前者的特异性更强、灵敏度更高, 用 ESR 技术, 我们甚至可以深入到样品分子结构的内部, 来分析样品对 $\cdot OH$ 和 O_2^- 的清除机理, 从而得到有关组份清除作用的更多信息^[12]。在表 1 中, 组份 Fr2、Fr8、Fr12 的 IC_{50} 值由大到小, 而 Fr29 清除 $\cdot OH$ 自由基的 IC_{50} 值却较大, 这是为什么呢? 我们推测, 由 TLC 实验得知, Fr29 的主要成分是三聚体, 而三聚体有许多同分异构体, 空间构象不同, 可能会导致其清除 $\cdot OH$ 自由基的能力不同^[13]。

致谢 感谢本研究所张志义老师无偿提供蒸发仪等仪器, 黄有国老师提供冷冻干燥设备, 感谢 ESR 仪器组呼俊改等老师和本研究组李海涛、周广印、李雯、卫涛涛等的帮助。本工作的一部分由国家基金项目资助, 部分得到中国科学院王宽诚基金资助, 在此一并表示感谢!

参 考 文 献

- 1 Teresa Escribano-halón, Yolanda Gutiérrez-Fernández, et al. Characterization of Procyanidins of Vitis vinifera Variety Tinta del Pais Grape Seeds. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 1794 - 1799
- 2 Jorge M, Ricardo Da Silva, Jacques Rigaud, et al. Procyanidin Dimers and Trimers from Grape Seeds phytochemistry.

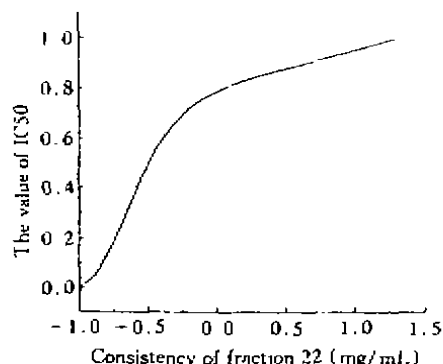


图 5 葡萄籽多酚类物质中组份 22 对 O_2^- 自由基的清除率随浓度变化的曲线

Fig. 5 The curve of scavenging effect of polyphenols Fraction 22 changed with consistency (log mg/mL)

- 1991, 30(4): 1259 - 1264
- 3 Herbert Kolodziej. Procyanidins from Medicinal Birch: Bonding Patterns and Sequence of Units in Triflavonoids of Mixed Stereochemistry. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3487 - 3492
 - 4 Makoto Saito, Hiroshi Hosoyama, et al. L Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 1460 - 1464
 - 5 Tibor Fuleki, Jorge M, Ricardo da Silva. Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1156 - 1160
 - 6 Ricard W Hemingway, Foo L Y, Porter L J. Linkage Isomerism in Trimeric and Polymeric 2, 3-cis-Procyanidins. *J C S Perkin I*, 1982, 1209 - 1216
 - 7 Thompson R S, Jacques D, et al. Proanthocyanidins Part I Introduction; the Isolation, Structure and Distribution in Nature of Plant Procyanidins. *J C S Perkin I*, 1972, 1387 - 1400
 - 8 Foo L Y, Lu Y, McNabb W C, et al. Proanthocyanidins from lotus pedunculatus. *Phytochemistry*, 1997, 45(8): 1689 - 1696
 - 9 Corinne Prieur, Jacques Rigaud, et al. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 781 - 784
 - 10 Anthony C Fletcher, Lawrence J Porter, et al. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J C S Perkin I*, 1998, 1628 - 1637
 - 11 Zhao Baolu, Shen Jiangang, et al. Scavenging effect of chinonin on NO and oxygen free radicals and its protective effect on the myocardium from the injury of ischemia-reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1315: 131 - 137
 - 12 杨法军, 赵保路, 忻文娟. *生物物理学报*, 1991, 7(4): 530 - 534
 - 13 Guo Q, Zhao B L, Hou J W, Xin W J. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Bichim Biophys Acta*, 1999, 1427: 13 - 23

ESR STUDY OF THE OXYGEN FREE RADICALS SCAVENGING EFFECT OF POLYPHENOLS FROM GRAPE SEEDS

*Gao Juntao, Huiru Tang** , Hou Jingwu, Li Meifen, Xin Wenjuan and Zhao Baolu**

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

(** Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7NA, the United Kingdom)

Abstract

The scavenging effect of polyphenols extracted from grape seeds such as monomers, dimers and trimers on superoxide and hydroxyl radicals is studied with the ESR spin trapping method. The results are comparable with those obtained from chemiluminescence method. It has been proved that polyphenols extracted from grape seeds have a strong scavenging effect on Oxygen free radicals. Probably this is the reason why drinking some grape wine every day is good for one's health.

Key words Oxygen free radical, Polyphenols, Chemiluminescence, ESR

* Correspondence author