

红皮云杉原花青素的配合性质及配合物的抗氧化活性研究

王萍¹, 郑洪亮¹, 腾飞¹, 郑影¹, 王振宇^{1,2,*}

(1.东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040;

2.哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:研究了二次纯化后的红皮云杉球果原花青素与金属离子(Fe^{2+} 、 Zn^{2+})螯合、与蛋白质大分子(牛血清蛋白)络合反应的条件。考察了原花青素浓度、温度和pH对配合反应的影响,优化了反应条件,并进一步通过体外抗氧化实验考察了配合体的性质。结果表明,优化后原花青素与 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 螯合率分别为 $89.12\% \pm 1.06\%$ 、 $88.31\% \pm 0.87\%$,与牛血清蛋白络合率为 $91.78\% \pm 1.25\%$ 。原花青素经过配合后其生物活性有一定的增强,且不同配合物的生物活性增强程度不同,但均具有较强的ABTS $^{\cdot+}$ 、DPPH $^{\cdot}$ 的清除能力和还原力,其浓度在一定范围内与清除能力呈量效关系。

关键词:红皮云杉,原花青素,配合物,抗氧化活性

Coordination characteristics of proanthocyanidins from *Picea koraiensis* Nakai's cones and the antioxidant activity of the coordination compound

WANG Ping¹, ZHENG Hong-liang¹, TENG Fei¹, ZHENG Ying¹, WANG Zhen-yu^{1,2,*}

(1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2.College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, China)

Abstract: The coordination of second purified proanthocyanidins with Fe^{2+} , Zn^{2+} and bovine serum albumin was studied. The effect of proanthocyanidins concentration, temperature and pH on coordination characteristics was investigated and the coordination conditions were optimized. The antioxidant activity of the coordination compound was evaluated. Results showed that the rate of proanthocyanidins coordinated with Fe^{2+} , Zn^{2+} and bovine serum albumin was $89.12\% \pm 1.06\%$, $88.31\% \pm 0.87\%$ and $91.78\% \pm 1.25\%$ respectively under the optimized conditions. The physiological activity of proanthocyanidins increased after coordinated. The activity of scavenging free radicals and reducing power were enhanced. A dose-response relation between concentrations and antioxidant activity was found, for which a good development prospects was expected.

Key words: *Picea koraiensis* Nakai; proanthocyanidins; coordinated complexes; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)08-0276-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.054

近年来,随着人们对环境、生命健康水平等认知程度的不断提高,人们对天然产物提取物的应用和开发提出了更高的要求。尤其是植物原花青素,因其在植物界分布广泛,生理功能多样,来源丰富,已经成为当前研究热点。据报道,其抗氧化能力是 V_c 的50倍、 V_e 的20倍,是迄今为止发现的最好的天然抗氧化剂之一^[1]。原花青素的独特化学结构赋予其一系列独特化学性质,使之具有抗肿瘤、抗氧化、抗动脉硬化、防治冠心病与中风等心脑血管疾病以及抗菌等多种生理功能^[2-3],已应用在包括食品、医药等许多

领域。

目前对原花青素的研究已经成为热点,但是对于原花青素与金属离子的螯合反应和与蛋白质、多糖、生物碱等生物大分子的络合反应的研究却很少,而在这些反应在现实中却真实存在的。目前国内在该方面的研究还很匮乏。根据中药配位化学原理,中药有机成分与微量元素结合后往往会提高其生物活性或产生新的生物活性。近来研究表明槲皮素与 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 等金属离子形成配合物后生物活性和药理作用明显增强^[4-7],这对天然产物的开发利用开辟了新的思路。

红皮云杉(*Picea koraiensis* Nakai)是松科云杉属常绿乔木,分布于东北小兴安岭,吉林山区海拔1400~1800m地带。本实验以红皮云杉球果原花青素的二级纯化物为原料,探究其对金属离子的螯合性能及对

收稿日期: 2013-09-02 * 通讯联系人

作者简介: 王萍(1964-),女,教授,研究方向:功能性植物资源的开发与利用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170510)。

蛋白质生物大分子的络合反应能力,并对络合产物进行分离制备;同时采用抗氧化实验来评价复合反应后配合物的抗氧化能力,旨在为天然产物的开发提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

红皮云杉球果 黑龙江省苇河林业局,采集时间为2011年9月份,将球果鳞片(去掉中间木质轴)低温干燥后粉碎过80目筛后-20℃密封冷冻,备用; DPPH (2,2-二苯基-1-苦基肼)、Trolox (6-羟基-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-羧酸)、邻二氮菲 Sigma公司;儿茶素(色谱级) 购自上海源叶公司;FRAP试剂盒、ABTS试剂盒 上海碧云天试剂公司;本乙醇、蒸馏水、氯化亚铁、邻二氮菲、无水乙醇、氯化锌、氯化钙、香草醛、浓盐酸、95%乙醇、浓硫酸、30%过氧化氢、甲醇 国产分析纯。

RT-6000型酶标仪 深圳雷社生命科技股份有限公司;HHS型电热恒温水浴锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;XW-80A型旋涡混合器 江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司;GZX-9240ME型数显鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;FA2004型上海电子天平 上海天平仪器厂;SHB-3型循环水多用真空泵 郑州杜甫仪器厂;TDL-5型台式离心机 上海科兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 儿茶素标准曲线的建立 采用香草醛-硫酸法^[8]。配制儿茶素标准溶液0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18、0.21、0.24、0.27、0.30mg/mL。精确移取1.0mL分别置于10mL试管中,加入2.5mL,4%香草醛-甲醇溶液和2.5mL的30%浓硫酸甲醇溶液,30℃水浴闭光静置15min。以甲醇代替显色剂为空白对照,500nm波长下测定其吸光值,平行测样三次,取平均值。以标准溶液浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,建立标准曲线并拟合回归方程。

1.2.2 红皮云杉原花青素二次纯化物与金属离子的螯合反应 红皮云杉球果原花青素经过大孔树脂D4020的一次纯化,条件为:乙醇洗脱浓度为58%,上样浓度为2.4mg/mL,径高比为1:26,洗脱流速为2.5mL/min;NKA-9大孔树脂二次纯化,条件为:上样浓度:3.0mg/mL;洗脱剂:60%乙醇;径高比:1:25;洗脱剂pH:7,经过两次纯化后纯度为73.12%±1.25%,备用。

1.2.2.1 红皮云杉原花青素二次纯化物与Fe²⁺的螯合能力测定^[9] 准确量取1.0mL不同浓度红皮云杉原花青素二次纯化物于10mL比色管中,分别加入2.0mL 2mmol/L的FeSO₄溶液,混合均匀后于37℃水浴中保持30min,之后加入0.1%邻二氮菲溶液0.5mL,混合均匀后于37℃水浴中温育10min,之后8000r/min离心10min,取上清液于510nm波长处测定吸光度值A₁;以等体积蒸馏水代替红皮云杉原花青素二次纯化物,其余方法相同测定吸光度值A₀;以等体积蒸馏水代替邻二氮菲溶液,测定吸光度值A₂,以扣除样品本身的干扰。1% EDTA螯合剂作为阳性对照,测定方法同

上。按照下式计算螯合率,螯合率表示加样后Fe²⁺的减少量占总Fe²⁺的百分比:

$$S(\%)=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100$$

式中:S:螯合率,%;A₁:混合物吸光度值;A₂:上述体系中邻二氮菲用等体积蒸馏水代替测定吸光度值;A₀:上述体系中云杉样品用等体积蒸馏水代替测定吸光度值。

1.2.2.2 红皮云杉原花青素二次纯化物与Zn²⁺螯合能力测定 准确量取0.5mL不同浓度的红皮云杉原花青素二级纯化物于10mL比色管中,分别加入2.0mL 0.015mmol/L的ZnCl₂溶液,混合均匀后于37℃水浴中保持30min,之后4000r/min离心5min,取上清液1mL,利用香草醛-硫酸法测定上清液中原花青素浓度,按下式计算出螯合率:

$$S(\%)=[M_0-M_1]/M_0\times 100$$

式中:S:螯合率,%;M₀:反应前样品中原花青素的质量,mg;M₁:反应后上清液中原花青素的质量,mg。

1.2.3 红皮云杉原花青素二次纯化物与金属离子(Fe²⁺、Zn²⁺)螯合单因素实验

1.2.3.1 原花青素浓度对螯合能力的影响 按照实验方法中定金属离子的量,螯合温度为40℃,pH为5,分别以3、4、5、6、7、8、9、10mg/mL的原花青素溶液反应,根据Fe²⁺/Zn²⁺螯合能力测定方法,计算各单因素对螯合率的影响,并绘制螯合曲线。

1.2.3.2 螯合温度对螯合能力的影响 按照实验方法中金属离子的量,原花青素浓度8mg/mL,pH为5,分别以螯合温度20、30、40、50、60、70、80℃反应,根据Fe²⁺/Zn²⁺螯合能力测定方法,计算各单因素对螯合率的影响,并绘制螯合曲线。

1.2.3.3 pH对螯合能力的影响 按照实验方法中金属离子的量,原花青素浓度8mg/mL,螯合温度为40℃,分别以pH2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0反应,根据Fe²⁺/Zn²⁺螯合能力测定方法,计算各单因素对螯合率的影响,并绘制螯合曲线。

1.2.4 红皮云杉原花青素二级纯化物与牛血清蛋白的络合反应

1.2.4.1 红皮云杉原花青素二级纯化物与牛血清蛋白络合能力测定 称取牛血清蛋白,配制成浓度约1mg/mL的溶液。将原花青素二级纯化物配制成不同浓度(1~8mg/mL),将0.8mL原花青素溶液分别添加到3.5mL牛血清蛋白溶液中,定容至5mL。混合液在35℃中水浴30min,使之形成多酚-蛋白质络合物。然后于8000r/min离心10min,取离心上清液1mL,用香草醛-硫酸法测定上清液中原花青素的量,参照Zn²⁺螯合计算公式得出络合率。

1.2.5 红皮云杉原花青素二级纯化物与牛血清蛋白络合的单因素实验

1.2.5.1 原花青素浓度对络合能力的影响 按照与牛血清蛋白络合反应测定方法,螯合温度为40℃,pH为5,分别以原花青素浓度1、2、3、4、5、6、7、8mg/mL反应,计算各单因素对络合率的影响,并绘制络合曲线。

1.2.5.2 螯合温度对螯合能力的影响 按照与牛血清蛋白络合反应测定方法,原花青素浓度为3mg/mL, pH为5, 分别以螯合温度20、30、40、50、60、70、80℃反应, 计算各单因素对络合率的影响, 并绘制络合曲线。

1.2.5.3 pH对螯合能力的影响 按照与牛血清蛋白络合反应测定方法,原花青素浓度为3mg/mL, 螯合温度为40℃, 分别以pH2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0反应, 计算各单因素对络合率的影响, 并绘制络合曲线。

1.2.6 功能评价——原花青素复合体的抗氧化能力

1.2.6.1 原花青素复合体的制备 根据单因素中原花青素二级纯化物螯合率曲线图和络合率曲线图, 在最佳复合条件下, 制备原花青素螯合液和原花青素络合液, 分别用5% NaOH乙醇溶液调节pH, 水浴回流搅拌, 产生沉淀物, 静置冷却后过滤, 8000r/min离心10min分离, 沉淀用无水乙醇洗涤3次, 得到粗品, 40℃干燥, 用于抗氧化实验。

1.2.6.2 清除DPPH·作用 分别将原花青素复合体溶液配制成浓度分别为10、20、30、40、50、60、70、80μg/mL的溶液。在10.0mL比色管中加入2.0mL样品溶液, 之后加入2.0mL 1×10^{-3} mol/L DPPH·溶液(用95%乙醇配制), 摇匀反应30min后于517nm处测定吸光值, 以2.0mL无水乙醇与2.0mL样品液作参比, 测定吸光值A, 同时以乙醇溶液为参比测定DPPH·空白溶液吸光度值A₀, 用Trolox作阳性对照, 同时做平行实验^[10]。清除率计算公式如下:

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

以清除率对样品浓度进行回归处理, 计算出配合物的半数抑制浓度(IC₅₀)数值。

1.2.6.3 总抗氧化能力的测定(FRAP法)标准曲线的准备及总抗氧化能力的测定方法见参考文献^[11]。

1.2.6.4 清除ABTS·自由基作用 样品的测定方法见参考文献^[12]。计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100$$

其中: A₁为加测定溶液后ABTS·的吸光值; A₂为测定溶液在734nm波长下的吸光值; A₃为未加测定溶液时ABTS·的吸光值。

2 结果与分析

2.1 儿茶素标准曲线的建立

儿茶素标准曲线见图1。儿茶素的标准曲线方程

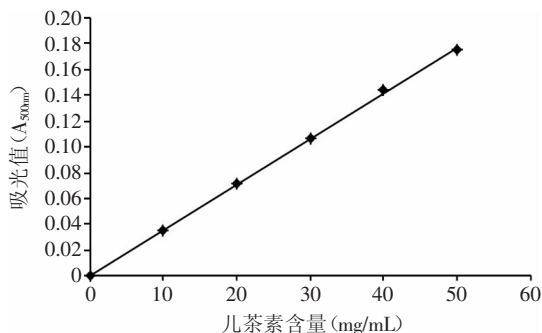


图1 儿茶素标准曲线

Fig.1 Catechin standard curve

为: $y = 2.1658x + 0.0178, R^2 = 0.9995$ 。

2.2 红皮云杉原花青素二次纯化物与Fe²⁺的螯合实验

2.2.1 原花青素浓度对螯合能力的影响 由图2可知, 随着原花青素反应浓度的增大, 参与反应的原花青素逐渐增多, 螯合率也随之增大^[13], 当原花青素的浓度增大到8mg/mL时, 溶液中的金属离子Fe²⁺完全参加反应, 增大原花青素浓度, 螯合率基本稳定, 故与Fe²⁺螯合的最适原花青素浓度为8mg/mL。

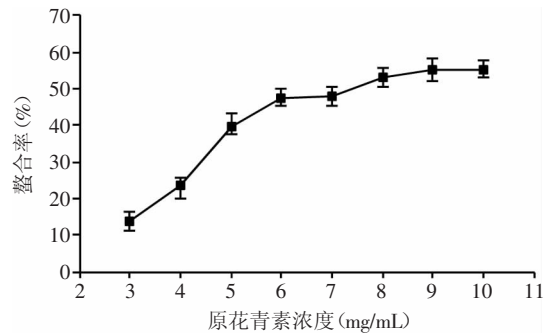


图2 原花青素浓度对原花青素与Fe²⁺螯合的影响

Fig.2 Effect of quality ratio on coordination of proanthocyanidins on Fe²⁺

2.2.2 温度对螯合能力的影响 由图3可知, 随着反应温度的增加, 20~30℃时, 螯合率呈上升趋势, 温度的增大明显促进螯合反应; 当温度超过30℃时, 随着温度上升, 螯合率与温度呈负相关关系, 直到80℃时降至5.64%, 可能是由于随着温度的升高, 原花青素的降解加速, 进而导致反应中参与螯合反应的原花青素减少^[14]。故选择30℃为螯合温度。

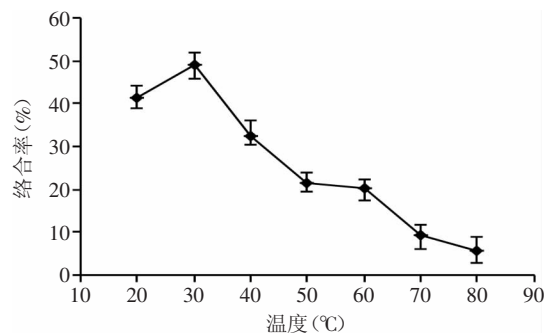


图3 温度对原花青素与Fe²⁺螯合的影响

Fig.3 Effect of temperature on coordination of proanthocyanidins on Fe²⁺

2.2.3 pH对螯合能力的影响 由图4可知, 随着反应体系的pH的变化, 在pH为2~6时, 螯合率呈上升趋势, pH的增大明显促进了螯合反应; 当pH超过6时, 随着pH上升(碱性增强), 螯合率明显下降, 因此, 原花青素与Fe²⁺的螯合反应进行的最适体系pH为6。

综合以上实验结果, 在原花青素浓度为8mg/mL, 温度为30℃, pH为6时做验证实验, 得到螯合率为89.12%±1.06%。

2.3 红皮云杉原花青素二次纯化物与Zn²⁺的螯合实验

2.3.1 原花青素浓度对螯合能力的影响 由图5可

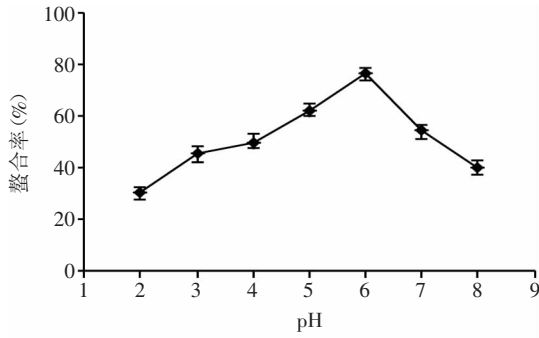


图4 pH对原花青素和Fe²⁺整合的影响

Fig.4 Effect of pH on coordination of proanthocyanidins on Fe²⁺

知,随着反应体系中原花青素浓度增大,在原花青素的浓度在1~5mg/mL时,整合率基本不变,这是因为此时Zn²⁺是过量的,体系中固定可反应比例的原花青素全部参与整合反应;当原花青素浓度超过5mg/mL时,整合率逐渐下降,这是因为体系中的Zn²⁺不足,原花青素过剩。从节省原料角度出发,原花青素与Zn²⁺整合反应的最佳浓度为5mg/mL。

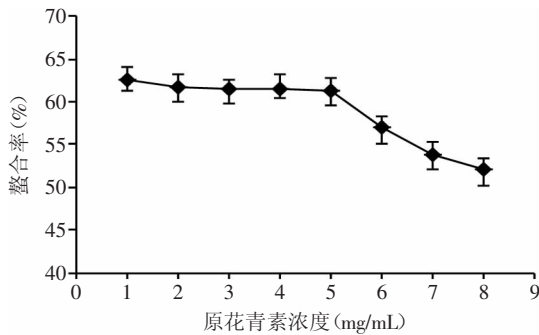


图5 原花青素浓度对原花青素与Zn²⁺整合的影响

Fig.5 Effect of quality ratio on coordination of proanthocyanidins on Zn²⁺

2.3.2 温度对整合能力的影响 由图6可知,随着反应温度的增加,整合率在20~40℃时,温度升高,反应速率加快,整合率逐渐增大;当温度超过40℃后,整合率开始下降,可能是由于温度较高,原花青素开始降解,进而导致反应中参与整合的原花青素逐渐减少^[15],当温度超过70℃后,整合率下降速率增大,溶液中原花青素被大量破坏,此时整合率降至最低30.38%,

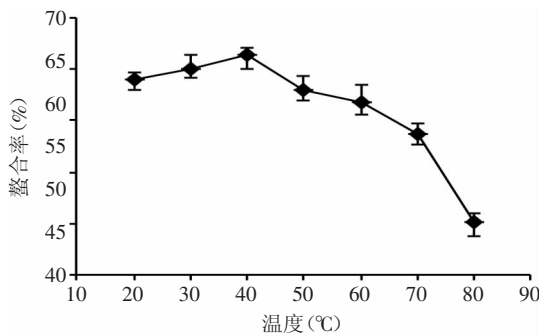


图6 温度对原花青素与Zn²⁺整合的影响

Fig.6 Effect of temperature on coordination of proanthocyanidins on Zn²⁺

故整合温度为40℃。

2.3.3 pH对整合能力的影响 由图7可知,随着反应体系的pH的变化,在pH为2~3时,整合率变化不大;当pH=4时,整合率达到了最大61.34%;当pH超过4时,随着pH上升,整合率明显下降。因此原花青素与Zn²⁺的整合反应进行的最适体系pH为4。

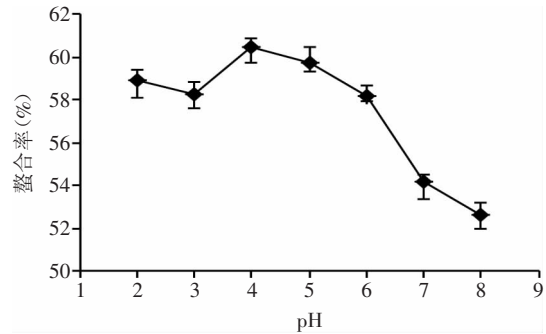


图7 pH对原花青素与Zn²⁺整合的影响

Fig.7 Effect of pH on coordination of proanthocyanidins on Zn²⁺

综合以上实验结果,在原花青素浓度为5mg/mL,温度为40℃,pH为4时做验证实验,得到整合率为88.31%±0.87%。

2.4 红皮云杉原花青素二次纯化物与牛血清蛋白的络合实验

2.4.1 原花青素浓度对络合能力的影响 由图8可知,原花青素的浓度在1~3mg/mL范围内,随着反应体系中原花青素浓度增大,体系中固定可反应比例的原花青素全部参与络合反应,络合率基本不变;当原花青素浓度超过3mg/mL时,体系中的牛血清蛋白不足,原花青素剩余,则络合率逐渐下降。从节省原料角度出发,原花青素与牛血清蛋白络合反应的最佳浓度为3mg/mL。

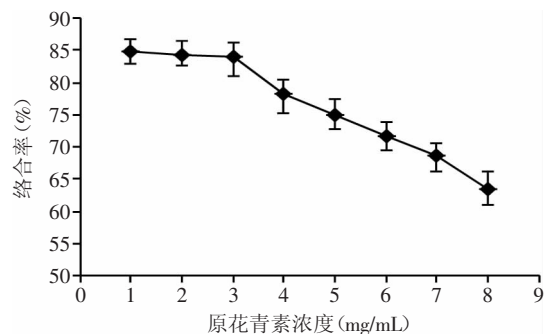


图8 原花青素浓度对原花青素与牛血清蛋白的络合影响

Fig.8 Effect of quality ratio on coordination of proanthocyanidins on Bovine serum albumin

2.4.2 温度对络合能力的影响 由图9可知,随着体系温度的上升,络合率呈现出先上升后下降的趋势。在20~30℃下,温度对络合率的影响情况相同,在此温度下,络合率相近。当温度达到40℃时,络合率达到最大值,说明牛血清蛋白在该温度下稳定性较好,能很好的与原花青素进行络合反应^[16]。随着温度继续上升,络合率呈下降趋势,是由于在高温下牛血清

蛋白逐渐发生变性,原花青素的结构发生不利变化^[7],导致络合作用受到影响,说明高温不利于原花青素和牛血清蛋白络合反应的进行。因此,原花青素与牛血清蛋白络合温度为40℃。

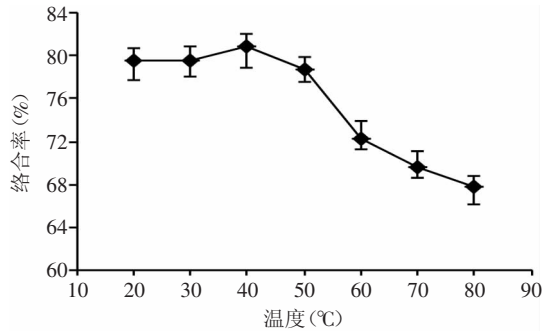


图9 温度对原花青素与牛血清蛋白络合的影响

Fig.9 Effect of temperature on coordination of proanthocyanidins on Bovine serum albumin

2.4.3 pH对络合能力的影响 由图10可知,随着反应体系的pH的变化,在pH为2~6时,络合率呈上升状态;当pH=6时,络合率达到了最大值85.61%;当pH超过6时,随着pH上升(碱性增强),络合率明显下降,因此,原花青素与牛血清蛋白的络合反应进行的最适体系pH为6。

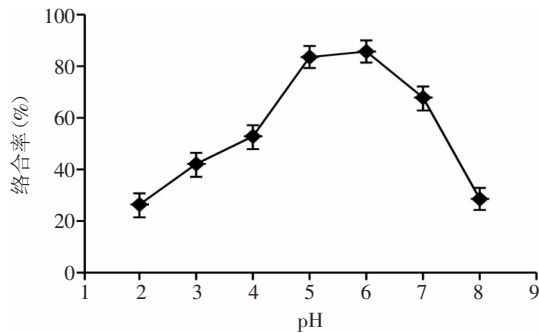


图10 pH对原花青素与牛血清蛋白的络合影响

Fig.10 Effect of pH on coordination of proanthocyanidins on Bovine serum albumin

综合以上实验结果,原花青素浓度为3mg/mL,温度为40℃,pH为6时做验证实验,得到络合率为(91.78±1.25)%。

2.5 红皮云杉原花青素配合物体外抗氧化活性研究

2.5.1 红皮云杉原花青素配合物清除ABTS⁺自由基

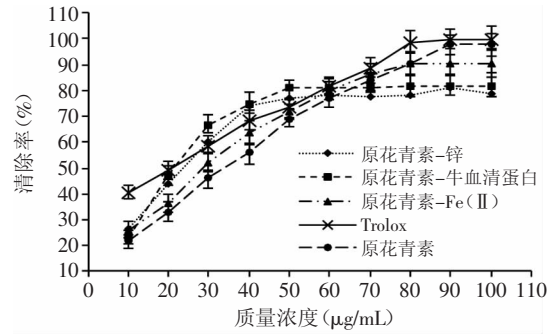


图11 红皮云杉原花青素及其配合物、Trolox对ABTS⁺自由基清除作用

Fig.11 ABTS radical scavenging activity of proanthocyanidins, coordinated complexes and Trolox

能力的测定 由图11可知,红皮云杉原花青素及其配合物、Trolox对ABTS⁺自由基均有清除作用,在实验设定的受试物浓度范围内,随着样品浓度的增加,对ABTS⁺自由基清除的能力逐渐增强。

由结果分析表1可知,各线性模拟方程的关系系数 $R^2 > 0.93$,说明浓度对清除率的线性关系很好;由 IC_{50} 值可知,样品对ABTS⁺自由基清除能力顺序为: Trolox>原花青素-牛血清蛋白>原花青素-锌>原花青素-铁(II)>原花青素。说明原花青素经配合后其清除ABTS⁺自由基的能力有一定的增强。

2.5.2 红皮云杉原花青素配合物清除DPPH自由基能力的测定 由图12可知,红皮云杉原花青素及其配合物、Trolox对DPPH自由基均有清除作用,在实验设定的受试物浓度范围内,随着样品浓度的增加,对DPPH自由基清除的能力逐渐增强。

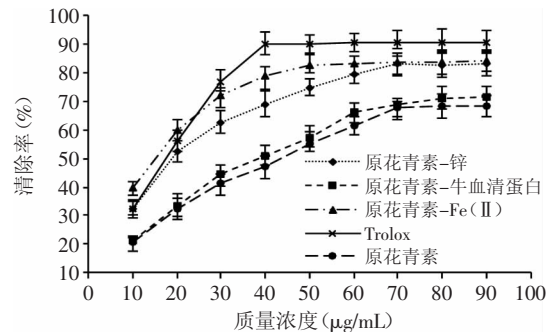


图12 红皮云杉原花青素及其配合物、Trolox对DPPH自由基清除作用

Fig.12 DPPH radical scavenging activity of proanthocyanidins, Coordinated complexes and Trolox

表1 抗氧化结果分析

Table 1 Analysis of antioxidant results

样品	线性模拟方程	R^2	IC_{50} (μ g/mL)
原花青素-铁(II)	$Y = -0.0093X^2 + 1.7656X - 2.4463$	0.9961	28.26 ± 0.78
原花青素-锌	$Y = -0.0125X^2 + 1.883X + 12.4127$	0.9460	23.71 ± 0.34
原花青素-牛血清蛋白	$Y = -0.0144X^2 + 2.1015X + 9.6478$	0.9304	22.73 ± 0.12
原花青素	$Y = -0.0061X^2 + 1.5471X + 5.5963$	0.9968	32.94 ± 0.65
Trolox	$Y = -0.0041X^2 + 1.1559X + 28.0784$	0.9899	20.45 ± 1.08

注:其中Y:清除率(%),X:质量浓度(μ g/mL);表2、表3同。

表2 抗氧化结果分析
Table 2 Analysis of antioxidant results

样品	线性模拟方程	R ²	IC ₅₀ (μg/mL)
原花青素-铁(II)	Y=-0.0126X ² +1.723X+27.991	0.9486	17.47±0.18
原花青素-锌	Y=-0.0109X ² +1.662X+20.076	0.9784	20.85±0.32
原花青素-牛血清蛋白	Y=-0.0044X ² +1.108X+8.0193	0.9762	37.35±0.49
原花青素	Y=-0.0068X ² +1.295X+8.3474	0.9943	41.04±1.12
Trolox	Y=-0.0187X ² +2.480X+13.945	0.9328	16.62±0.98

表3 抗氧化结果分析
Table 3 Analysis of antioxidant results

样品	线性模拟方程	R ²	EC ₅₀ (μg/mL)
原花青素-铁(II)	Y=-0.0076X ² +0.723X+23.454	0.9976	32.29±0.58
原花青素-锌	Y=-0.0116X ² +0.962X+22.724	0.9917	35.18±1.03
原花青素-牛血清蛋白	Y=-0.0058X ² +2.014X+10.163	0.9935	37.31±0.74
原花青素	Y=-0.0128X ² +1.397X+9.3686	0.9949	42.94±0.61
Trolox	Y=-0.0099X ² +1.564X+11.847	0.9959	38.02±0.84

由结果分析表2可知:线性模拟方程的关系系数R²>0.93,说明浓度对清除率的线性关系较好;由IC₅₀值可知,样品对DPPH自由基清除能力顺序为:Trolox>原花青素-铁(II)>原花青素-锌>原花青素-牛血清蛋白>原花青素。说明原花青素经配合后,其清除DPPH自由基的能力有不同程度的增强。

2.5.3 红皮云杉原花青素配合物总还原能力的测定

由图13可知,三种原花青素配合物均有一定的还原能力,且随着质量浓度的增加还原能力增加。由表3可知,相关系数R²较大,均大于0.99,说明Trolox、原花青素-锌、原花青素-铁(II)、原花青素、原花青素-牛血清蛋白的还原能力与浓度之间呈现出显著的相关性。由半效浓度值(EC₅₀值)可知,原花青素与金属离子配合后,还原能力增强;与牛血清蛋白配合后,还原能力稍有增强。

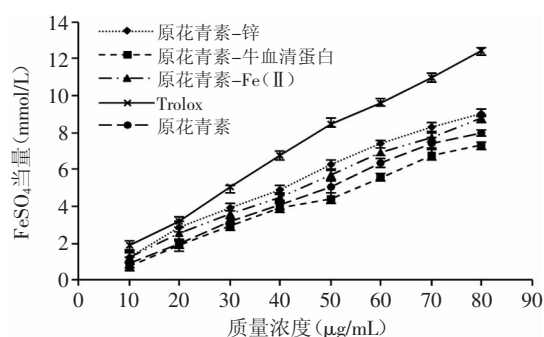


图13 红皮云杉原花青素及其配合物、Trolox总还原能力

Fig.13 Reducing power of proanthocyanidins, coordinated complexes and Trolox

3 讨论

原花青素是一种良好的氧游离基清除剂和脂质过氧化抑制剂。可有效清除超氧阴离子自由基和羟自由基^[18-20],也参与磷脂、花生四烯酸的新陈代谢和蛋白质磷酸化,保护脂质不发生过氧化损伤^[21]。有研究表明,化合物结构具有较高的超离域度、完整的

大P键共轭体系、强配位氧原子与合适的空间构型、可作为金属离子的好螯合配体,大部分金属离子最外层都有空轨道,可以形成稳定的配合物^[22]。李方等^[23]合成了槲皮素锌、铜和铁配合物,称金属离子与有机活性配体协同作用可提高其抗氧化活性的能力。原花青素为强有力的金属螯合剂^[24],可螯合金属离子,将原花青素类化合物与人体必需金属元素形成配合物,并发挥其抗活性氧自由基的协同增效作用是较为全新的研究领域^[25],而本实验证实了金属离子、牛血清蛋白与红皮云杉球果原花青素配位后抗氧化性增强,而这一研究对天然药物的开发利用开辟了新的途径。

4 结论

原花青素与Fe²⁺螯合的最佳条件为:原花青素浓度为8mg/mL,温度为30℃,pH为6,在该条件下得到螯合率为89.12%±1.06%。原花青素与Zn²⁺螯合的最佳条件:原花青素浓度为5mg/mL,温度为40℃,pH为4,在该条件下得到的螯合率为88.31%±0.87%。原花青素与牛血清蛋白络合的最佳条件:原花青素浓度为3mg/mL,温度为40℃,pH为6。在该最佳条件下得到的络合率为91.78%±1.25%。原花青素与Fe²⁺、Zn²⁺、牛血清蛋白的配合体,清除ABTS⁺·、DPPH·的能力和还原力较原花青素均有一定程度的增强,其中金属离子配合物增强效果较明显。

参考文献

- [1] Ariga Toshiaki. Radical Scavenging Action and its Mode in Procyanidins B-1 and B-3 from Azuki Beans to Peroxyl Radicals [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(10): 2499-25041.
- [2] 耿中华. 植物多酚的研究进展[J]. 食品与生物, 2008, 114(5):4.
- [3] 邵丽丽, 刘志杰. 原花青素的研究[J]. 黑龙江信息科技, 2011(4):35.
- [4] Santos Buelga C, Scalbert A. Review: Proanthocyanidins and

tannin like Compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health[J]. Science Food Agriculture, 2000, 80(7):1094-1117.

- [5] 罗湘云. 天然抗氧化剂碧萝芷研究进展[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(6):403-405.
- [4] 孙传范. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4):146-152.
- [6] Botelho FV, Alvarez-Leite JI, Lemos VS, et al. Physicochemical study of floranol, its copper(II) and iron(III) complexes, and their inhibitory effect on LDL oxidation[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007, 101(6):935-943.
- [7] Mira L, Fernandez MT, Santos M, et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007, 101(6):935-943.
- [8] 王卫东, 李超, 凌莉. 葡萄籽原花青素的提取与分离[J]. 中国食品添加剂, 2010(3):84-89.
- [9] 张博文, 张肃, 雷浪伟, 等. 太空搭载对短双歧杆菌A04体外抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(8):261-266.
- [10] 王丽. 几种黄酮类化合物清除DPPH自由基微量模型的建立[D]. 开封: 河南大学, 2009.
- [11] 栾德仕, 王玉洁, 王萍. pH、温度对笃斯越橘花色苷粗提物抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2013(8):142-146, 149.
- [12] Jaouad Bouayed, Lucien Hoffmann, Torsten Bohn. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bio accessibility and potential uptake[J]. Food Chemistry, 2011, 128:14-21.
- [13] 罗云. 槲皮万寿菊素-铁(III)配合物的合成与性质[J]. 光谱实验室, 2010, 27(6):2512-2515.

- [14] 汪志慧, 孙智达, 谢笔钧. 莲房原花青素的稳定性及热降解动力学研究[J]. 食品科学, 2011(7):77-82.
- [15] 王新伟. 山葡萄种质资源原花青素动态含量变化及提取、降解研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [16] 黄慧华. 多酚-蛋白质络合反应的影响因素研究[J]. 食品科学, 2003, 24(4):22-25.
- [17] 沈洁, 王家俊, 刘幸幸, 等. 原花青素/醋酸纤维素可降解包装薄膜的结构与抗氧化性能[J]. 浙江理工大学学报, 2011(6):865-870.
- [18] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin rich extract from pine (pinus maritima) bark, pycnogenol[J]. Free Radical Biol Medicine, 1999(27):704-724.
- [19] Larrauri J A, Ruperez P, Calixto F S. Antioxidant activity of wine pomace[J]. American Journal Enology and Viticulture, 1996, 47(4):369-372.
- [20] Sánchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related phenolic constituents[J]. Food Research International, 1999, (32):407-412.
- [21] 陈永芬, 申琳, 鱼泳泳, 等. 低聚原花青素方剂对小鼠肝脏、血清中相关抗氧化酶活性及MDA、活性氧含量的影响[J]. 食品科学, 2004(S1):164-167.
- [22] 蒋柳云, 刘玉明. 槲皮素铝配合物的合成、生物活性及其量子化学计算[J]. 国际网上化学学报, 2004, 4(12):87.
- [23] 李方. 黄酮类有机金属配合物及其生物构效和协同作用的研究[D]. 成都: 四川大学, 2005.
- [24] 张妍, 吴秀香. 原花青素研究进展[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6):112-113.
- [25] 刷红梅, 曲梓怡, 王召令, 等. 原花青素的抗氧化作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007(16):3155-3157.

(上接第275页)

- of fresh-cut mushrooms[J]. postharvest biology and technology, 2009, 56(3):216-222.
- [5] Caminiti I M, Palgan I, Noci F, et al. The effect of pulsed electric fields (PEF) in combination with high intensity light pulses (HILP) on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010(12):118-123.
- [6] Hierro E, Manzano S, Ordóñez J A, et al. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135:125-130.
- [7] 程玉来, 温晓旭. 杂粮煎饼最佳配方的研究[J]. 食品工业, 2011, (7):25-27.
- [8] 高瑀琬, 王允祥, 江汉湖. 超高压杀菌条件的响应面法优化研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10):1544-1549.
- [9] 吴华勇, 黄贛辉, 顾振宇, 等. 响应曲面法优化竹叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11):196-200.
- [10] 赵晨. 脉冲强光杀菌技术对氨基酸饮料杀菌作用的研究

- [J]. 福建轻纺, 2012(4):32-36.
- [11] Nicorescu I, Nguyen B, Moreau-Ferret M, et al. Pulsed light inactivation of *Bacillus subtilis* vegetative cells in suspensions and spices[J]. Food Control, 2012, 31:151-157.
- [12] Wuytack E.Y, Phuong L D T, Aertsen A, et al. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments[J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(1):31-37.
- [13] 张佰清, 姜树才, 刘佳. 脉冲强光处理对金黄色葡萄球菌杀菌效果的影响[J]. 食品科技, 2009, 34(1):91-93.
- [14] 江天宝, 曹玉兰, 陆燕. 脉冲强光对烤鳗的杀菌效果及感官品质的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 22(12):200-204.
- [15] 陈仙明, 吕维敏, 杨笑鹤, 等. 脉冲强光对透析用水的杀菌实验研究[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(3):210-212.
- [16] Oms-Oliu G, Aguiló-Aguayo I, Martín-Belloso O, et al. Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of freshcut mushrooms[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 56(3):216-222.