

高义霞,呼丽萍,袁毅君. 花牛苹果幼果多酚单体酚降血压成分的筛选[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):232-236.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.043

花牛苹果幼果多酚单体酚降血压成分的筛选

高义霞^{1,2}, 呼丽萍^{1,2}, 袁毅君¹

(1. 天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃天水 741001; 2. 甘肃省大樱桃工程技术研究中心, 甘肃天水 741001)

摘要:为了充分利用农业废弃物苹果疏果,以花牛苹果疏果为材料,通过微波辅助提取苹果多酚,利用大孔树脂 NKA-9 对提取的粗多酚进行分离,再通过 Sephadex LH-20 进一步纯化分离精制,得到 5 种单体酚,分别为绿原酸、表儿茶素、根皮苷类、儿茶素、槲皮素;利用分光光度法测定各单体酚对血管紧张素酶的抑制效果。结果表明,槲皮素、根皮苷、儿茶素、表儿茶素具有明显的抑制 ACE 的作用,与阳性药物相比较,槲皮素和根皮苷的效果明显优于卡托普利,表儿茶素和儿茶素的效果与卡托普利相当。

关键词:苹果多酚;降血压;ACE 酶抑制;绿原酸;表儿茶素;根皮苷;儿茶素;槲皮素

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0232-04

我国是世界苹果产业规模最大的国家,2014 年我国苹果栽培面积和年产量分别达到 226.67 万 hm^2 和 3 800 万 t,疏果量达 285 万 $\text{t}^{[1]}$;以甘肃省为例,苹果栽培面积和年产量分别达到 32 万 hm^2 和 320 万 t,疏果量约为 24 万 t。而幼果中的多酚含量为成熟果实的 10 倍,约占幼果的 1%~2%,是苹果多酚丰富的来源,开发价值很高^[2]。据专家预测,多酚的需求量将会以每年 40% 的速度增长。目前,茶多酚制品已形成相当的市场规模,相关研究发现,苹果多酚的许多生理功能比茶多酚要高 100 倍以上^[3],因此,开发苹果多酚制品具有广阔的销售市场。目前,绝大多数的苹果疏落果被丢弃,极少量以沼气或者饲喂家禽等方式消化,既污染了自然环境,也产生大量的农业垃圾,造成极大的资源浪费^[4]。相关报道表明,苹果多酚混合物具有抑制血管紧张素转化酶(ACE)的活性,具体作用机制不清楚。高血压是威胁人类健康的“头号杀手”,2010 年,我国高血压患者达 2 亿人,且每年以 1 千万人的速度增长,因此,如何有效预防高血压成为人们共同面临的挑战^[5]。Tom 等研究发现,血压升高与 ACE 活性有着密切的联系,抑制 ACE 活性可降压^[6],如人工合成的降压药卡托普利正是利用这一治疗机制,但副作用明显,因此,人们试图

寻找天然的 ACE 抑制剂来开发天然降压药或具有降压保健功能的药食重组产品。目前,国内关于茶多酚对 ACE 活性的降压机制研究较为成熟,但关于苹果多酚抑制 ACE 活性的研究却鲜有报道。本研究将苹果多酚中单体酚作为指标成分,建立一种快速、简便、灵敏、准确、重复性好的检验方法,旨在为苹果多酚降血压活性指标的质量控制和血管紧张素抑制剂的药物研制提供试验依据。对苹果多酚的开发和利用不仅可以减少大量废弃苹果幼果资源浪费,而且可以变废为宝,减少环境污染,构建和谐文明社会,具有深远的现实意义和社会意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

花牛苹果疏除幼果,采自甘肃省天水市麦积区中滩镇九龙山苹果基地,采集时间为 2016 年 6 月 5 日,处理前保存于 0℃ 冷库中。福林酚试剂(Folin-Ciocalteu),上海润顺化工有限公司;没食子酸标准品($\geq 99\%$),阿拉丁试剂;果胶酶($>500 \text{ AJDU/mg}$),Sigma 公司;异抗坏血酸,湖南世纪华星生物工程有限公司;无水乙醇,国产分析纯。

KQ-500 型超声波清洗器,昆山市超声仪器公司;紫外-可见分光光度计(UV-2450),日本岛津生产;九阳料理机(JYL-C022),九阳集团;TGL-20M 型高速台式冷冻离心机,湖南湘仪公司生产。

1.2 苹果多酚的提取

取花牛苹果幼果,切块后,按 10 g : 1 mL 的比

收稿日期:2019-04-28

基金项目:甘肃省自然科学基金(编号:1610RJZE141)。

作者简介:高义霞(1982—),女,甘肃白银人,硕士,副教授,主要从事资源植物的开发利用研究。E-mail:egaoxy@126.com。

例(苹果样品:异抗坏血酸)加入 10% 异抗坏血酸水溶液作为护色剂,破碎后,精确称取样品 10.000 g,加入 1.7 mg 果胶酶于 50 ℃ 酶解 2 h,按照料液比 1 g : 10 mL 加入 50% (体积分数,下同)乙醇,380 W 下微波提取 2 min,提取次数 2 次,提取液抽滤,收集滤液,定容备用^[7]。

1.3 标准曲线的制作及多酚含量的测定

多酚含量的测定采用 Folin - Ciocalteu 法^[8]。取 0.1 g 没食子酸标准品,用 100 mL 50 % 乙醇溶液溶解,摇匀后,分别取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 标准液,加入 3 mL 稀释 3 倍的 Folin - Ciocalteu 试剂,摇匀,反应 2 min 后加入 2 mL 7.5 % 碳酸钠溶液,用蒸馏水定容至 25 mL,摇匀,30 ℃ 保温 30 min,740 nm 处测定 D 值。标准曲线方程: $y = 0.0887x + 0.0055$, $r^2 = 0.9993$,式中: x 为吸光度, y 为没食子酸质量浓度($\mu\text{g/mL}$)。苹果多酚含量的测定按同法操作。计算多酚含量的公式:多酚得率 $= C \times V \times N / m \times 100\%$,式中: C 为测量液总酚质量浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为粗提液体积(mL); N 为稀释倍数; m 为样品质量(g)。

1.4 苹果多酚的纯化

采用大孔树脂柱 NKA - 9,以丙酮为溶剂,柱层析初步分离苹果粗多酚。根据其苹果多酚动态吸附、解吸附柱层析试验,每 5 mL 收集 1 次,氮吹浓缩后,通过理化性质进行鉴别。利用 Sephadex LH - 20 进一步纯化分离精制,得到分离物质,与标准品

对比,经高效液相色谱(HPLC)比对确定为 5 种单体酚^[9-11]。

1.5 单体酚降血压活性研究

以对 ACE 的抑制能力为靶标,以降压药物卡托普利(ACE 抑制剂)为阳性对照,体外研究苹果多酚各单体的降血压活性,筛选出活性明显的成分。基本方法为在模拟人体生理条件下,利用 ACE 催化水解马尿酸组氨酰亮氨酸生成马尿酸,当加入 ACE 抑制剂时,催化水解反应被抑制,生成的马尿酸含量减少。马尿酸在存在喹啉的条件下与苯磺酰氯反应生成黄色化合物,在乙醇溶液中最大吸收波长为 470 nm,故可比色定量,根据马尿酸吸收值的大小来衡量 ACE 的抑制活性^[12]。

2 结果与分析

2.1 苹果多酚的分离鉴定

利用大孔树脂柱 NKA - 9,分离得到 4 组成分,分别为 FA、FB、FC、FD。组分 FA 通过 Sephadex LH - 20 分离(重复操作 2 次),分离洗脱曲线见图 1 - a,得到 1 个组分 FA1(480.2 mg)。组分 FC 通过 Sephadex LH - 20 分离(重复操作 4 次),分离洗脱曲线见图 1 - b。通过大孔树脂及 Sephadex LH - 20 分离(重复操作 3 次),最终得到 4 个组分 FC1(182.0 mg)、FC2(273.6 mg)、FC3(123.6 mg)、FC4(1 079.0 mg)。由于组分 FB、FD 均为分离到的非有效的酚类物质,故弃去。

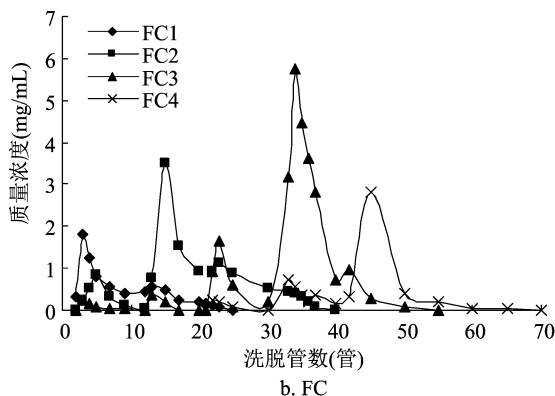
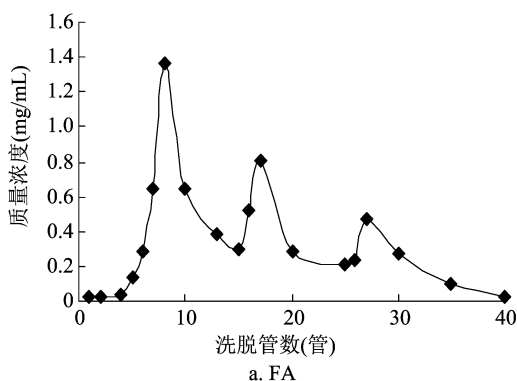


图1 SephadexLH-20 树脂的动态洗脱

图 2、图 3 为经过 Sephadex LH - 20 进一步分离纯化所得到的高纯度产物色谱,图 3 为同等色谱条件下 5 种标准品混合溶液的 HPLC 结果。将图 2 与图 3 相对照,可知经大孔树脂初步分离,所得到的高纯度单一产物 FA1 可能是绿原酸,FC1 可能是表儿茶素,FC2 可能是根皮苷类,FC3 可能是儿茶素,FC4

可能是槲皮素。

2.2 苹果单体酚对 ACE 的抑制作用

以上述步骤分离的 5 种单体酚为研究对象,利用其对 ACE 的抑制作用,模拟人体生理条件,测定各单体酚对 ACE 的抑制作用,以其评价其降血压活性。

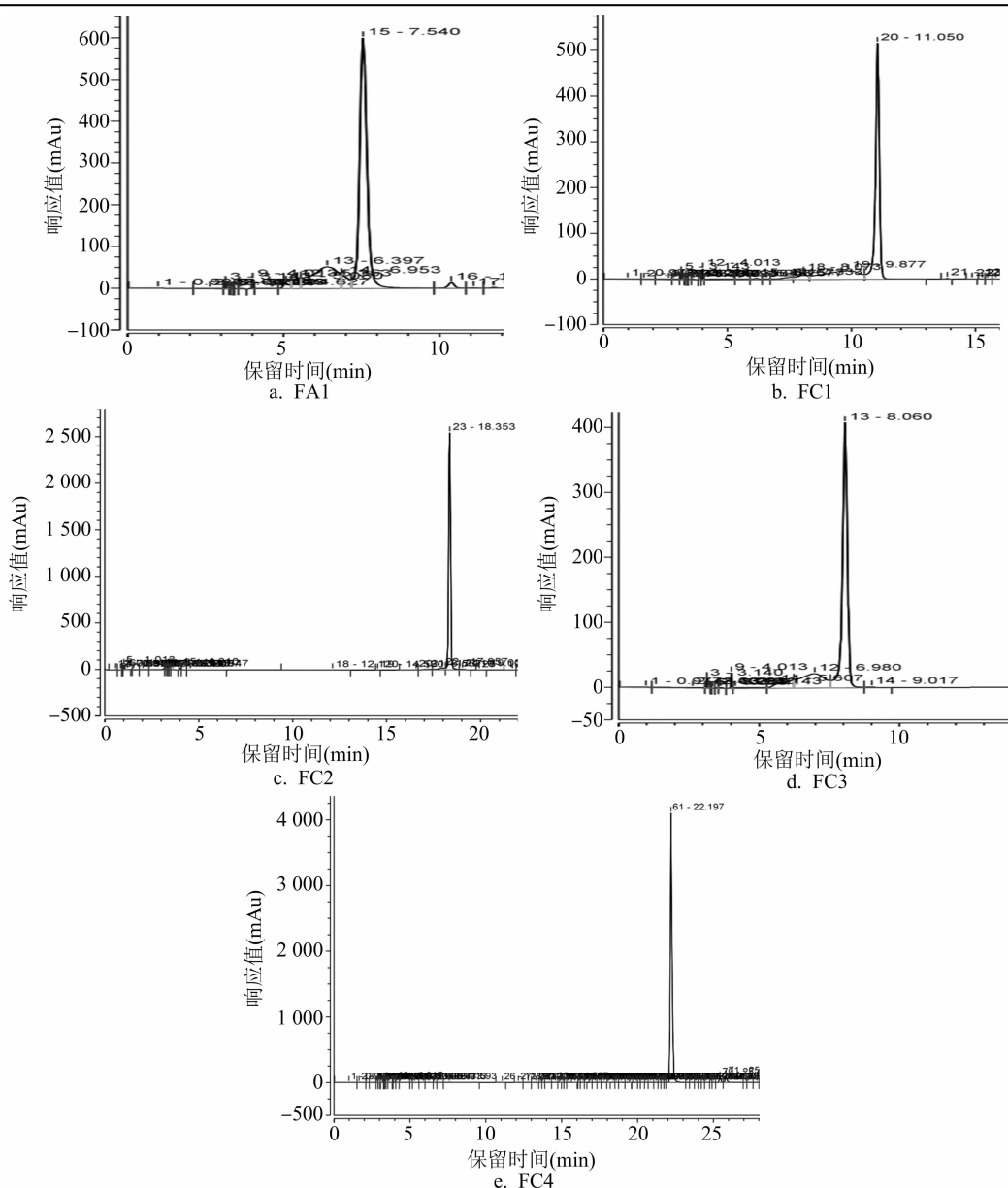


图2 Sephadex LH-20 树脂分离纯化产物的 HPLC 结果

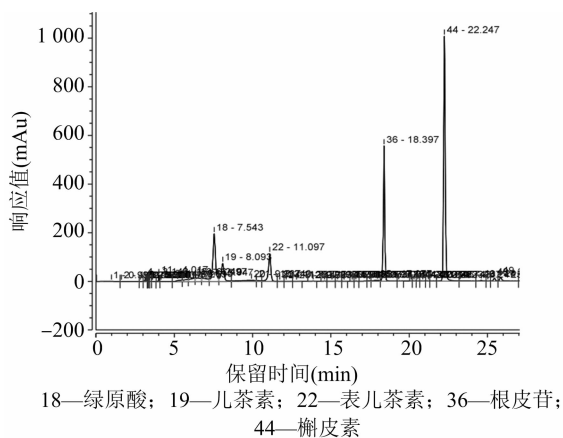


图3 标准物质的 HPLC 结果

2.2.1 马尿酸标准曲线 参照文献[13]的测定方法,称取适量马尿酸标准品,分别配成含量为 0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.16 mg/mL 的马尿酸水溶液,向各管中加入 0.6 mL 喹啉,混匀后再加入 0.2 mL 苯磺酰氯,立即盖紧比色管塞,手动强烈振荡 25~30 次,在 $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下避光放置 30 min。加入 3.7 mL 95% (体积分数) 乙醇,混匀,继续避光放置 30 min。用 10 mm 比色杯取中间浓度管扫描,确定最大吸收波长为 470 nm,以试剂空白(0 号管)为参比,在 470 nm 处测量各管的吸光度。最后以吸光度为纵坐标、马尿酸含量为横坐标,绘制马尿酸含量与混合溶液吸光度的标准曲

线,详见图 4。

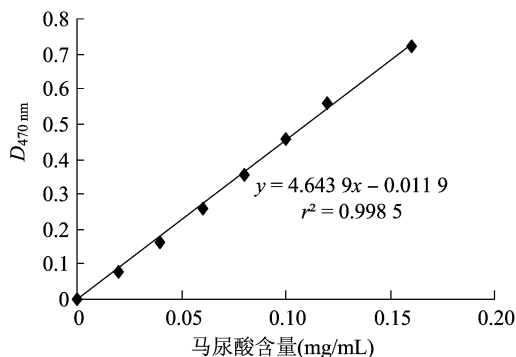


图4 马尿酸含量与混合溶液吸光度的标准曲线

2.2.2 卡托普利对 ACE 抑制作用 为了确立 ACE 的活性测定体系,进行不同浓度卡托普利对 ACE 抑制活性的测定。从图 5 可以看出,随卡托普利质量浓度不断增大,其对 ACE 的抑制作用不断增强,当卡托普利质量浓度增至 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,卡托普利对 ACE 的抑制作用不再明显增加,说明其趋于饱和,利用 SPSS 16.0 计算得出卡托普利对 ACE 的 IC_{50} 为 67.49 $\mu\text{g/mL}$ 。

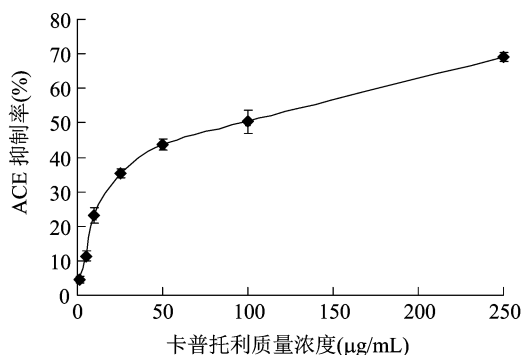


图5 卡托普利对 ACE 的抑制作用

2.2.3 不同抑制剂对 ACE 活性的抑制效果 根据上述方法,对每一种试剂在不同浓度下进行测定,研究不同浓度下各成分对兔肺 ACE 活性的影响,结果见图 6。计算得绿原酸、根皮苷、儿茶素、槲皮素、表儿茶素 IC_{50} 分别为 138.43、38.23、68.28、28.33、62.09 $\mu\text{g/mL}$,表明槲皮素、根皮苷、儿茶素、表儿茶素具有明显的抑制 ACE 的作用,与阳性药物相比较,槲皮素和根皮苷的效果明显优于卡托普利,表儿茶素和儿茶素的效果与卡托普利相当。

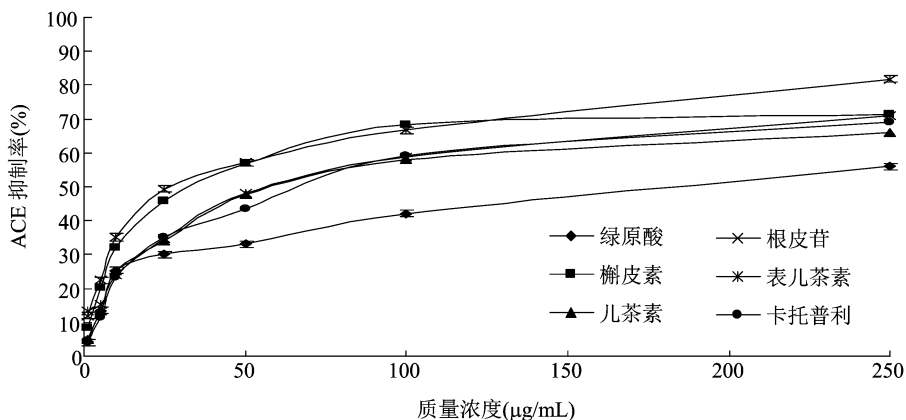


图6 不同抑制剂对 ACE 活性的抑制效果

3 结论

以花牛苹果疏果为材料,通过微波辅助提取苹果多酚,利用大孔树脂 NKA-9 对提取的粗多酚进行分离,再通过 Sephadex LH-20 进一步纯化分离精制,得到 5 种单体酚,分别为绿原酸、表儿茶素、根皮苷类、儿茶素、槲皮素。利用分光光度法测定各单体酚对血管紧张素酶的抑制效果,结果表明,槲皮素、根皮苷、儿茶素、表儿茶素具有明显的抑制 ACE 的作用,与阳性药物相比较,槲皮素和根皮苷的效果明显优于卡托普利,表儿茶素和儿茶素的效果与卡托普利相当。

参考文献:

- [1] 苏梅. 我国苹果产业发展存在的问题及对策[J]. 现代农业科技, 2013(2): 306.
- [2] 王国红, 王瑾, 马明, 等. 苹果疏果制备苹果多酚的方法: 102499377A[P]. 2012-06-20.
- [3] 郭玉蓉, 孙立军, 孟永宏, 等. 从苹果幼果中连续提取总多酚、绿原酸和根皮苷的方法: 102697895B[P]. 2012-06-11.
- [4] 李建新, 王育红, 潘治利, 等. 苹果多酚的提取技术和应用研究[J]. 农产品加工, 2007(12): 62-65.
- [5] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167-170.
- [6] Tom B, Dendorfer A, Danser A. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact[J]. The International

刘 飞,严 奇,胡 俊,等. 加拿大杨树皮总类脂提取工艺的筛选与优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):236-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.044

加拿大杨树皮总类脂提取工艺的筛选与优化

刘 飞¹, 严 奇¹, 胡 俊¹, 赵友谊¹, 王 鸣¹, 李冬玲², 佟海英², 王奇志¹

(1. 江苏省中国科学院植物研究所/江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 江苏省中国科学院植物研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要:采用浸渍法、渗漉法、回流法、超声法、索氏法提取方法对杨树皮总类脂的提取工艺进行研究,通过比较不同提取方法的总类脂得率、操作难度,选择渗漉法作为杨树皮总类脂的最佳提取方法。以杨树皮总类脂得率为指标,设计 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验,考察浸渍时间、粉碎程度、液料比、流速对渗漉法提取得率的影响,优化渗漉提取工艺。渗漉法的最佳提取条件如下:杨树皮粗粉过筛孔径为 $(335 \pm 13) \mu\text{m}$,浸渍时间为 3 d,液料比为 12 mL : 1 g,流速为 3 mL/min。研究得出的提取工艺简单有效,是杨树皮总类脂的最佳提取工艺。

关键词:加拿大杨;杨树皮类脂;提取工艺;正交试验法

中图分类号: S132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0236-04

杨树系杨柳科杨属植物的统称,全球约有 100 余种,生长于亚洲、欧洲及北美洲。我国杨树资源丰富、种类繁多,约有 62 种,广泛分布于全国各地^[1]。加杨,亦称加拿大杨,为大乔木,是美洲黑杨与欧洲黑杨的杂交种,除西藏自治区、云南省、广东省等地区外,其他省份均有种植。加杨树干通直挺拔,树皮粗厚,因其生长速度快、适应性强、繁殖能力强,是造林、绿化的优良树种之一;其材质轻软,纹理直,易干燥加工,也被应用于建筑材料行业,具有一定的经济价值^[1]。

杨树皮类脂是一种从杨树皮中提取得到的橙黄色脂溶性物质,能够止痒消肿、促进溃疡愈合、减少皮肤损伤;能够抑制大肠杆菌,治疗家畜腹泻;外

用于禽畜,能够杀螨止痒^[2]。杨树皮类脂不仅含有动物体内不可缺少的、构成生物膜的重要结构成分,如磷脂、糖脂、固醇等,还含有多种常量和微量元素、维生素 E、18 种氨基酸及不饱和脂肪酸、甾醇等天然生物学活性成分^[3]。不饱和甾醇是合成维生素 D 和各种激素的原料组分,具有降血脂、预防心血管疾病等功效^[4-5],能够诱导口腔鳞状细胞癌、宫颈癌等癌细胞凋亡^[6-7]。维生素 E 可作为催化剂参与物质代谢,能够保护生殖系统,提高动物的受精率和产蛋率^[2,8]。脂肪酸可用于生产肥皂、洗发乳等日化产品,特别是其中的亚油酸,不仅是机体代谢的必需脂肪酸^[9],其钙盐还可作为功能性饲料添加剂;锌盐可用于治疗皮肤性疾病;镁盐可用于生产各类药品、保健品;钠盐、钾盐可作为食品防腐剂,同时兼备营养保健功能^[10]。由于杨树皮类脂独有的天然生物学活性,并在畜牧、医药等领域具有一定的经济价值和应用前景,因此,开发高效、环保、精准、简洁的从木材加工副产物杨树皮中提取的类脂类成分具有重要意义,可为杨树皮资源的进

收稿日期:2019-05-07

基金项目:江苏省科技计划社会发展-面上项目(编号:BE2016753)。

作者简介:刘 飞(1985—),男,山东临沂人,博士,助理研究员,主要从事有机合成研究。E-mail:liufei@163.com。

通信作者:王奇志,博士,研究员,主要从事天然产物化学研究。

E-mail:wangqizhi@cnbg.com。

Journal of Biochemistry and Cell Biology,2003,35(6):792-801.

[7] 高义霞,陶超楠,周向军,等. 微波辅助提取花牛苹果幼果多酚的工艺优化[J]. 食品工业科技,2017,38(14):209-215,222.

[8] 李颖畅,吕艳芳,励建荣. Folin-Ciocalteu 法测定不同品种蓝莓叶中多酚含量[J]. 中国食品学报,2014,14(1):273-278.

[9] 刘京鑫,何云华. 不同型号大孔树脂对苹果多酚物质的吸附特性[J]. 应用化工,2014,43(7):1208-1210,1213.

[10] 王育红,朱维军,潘治利,等. NKA-9 大孔树脂对苹果多酚的

动态吸附工艺优化[J]. 农业机械学报,2009,40(8):119-123.

[11] 艾志录,王育红,王海,等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究[J]. 农业工程学报,2007,23(8):245-248.

[12] 陈永福,张和平. 体外测定血管紧张素转化酶抑制活性中 4 种酶失活的方法[J]. 中国乳品工业,2013,41(4):7-9,31.

[13] 中华人民共和国卫生部. 尿中马尿酸的分光光度测定方法:WS/T 52—1996 [S].