

文章编号:1001-6880(2016)12-1919-06

# 茶蜂花粉抗氧化活性与成分

邵丽丽,徐德平\*

江南大学食品学院,无锡 214122

**摘要:**本实验研究了茶蜂花粉的抗氧化活性和功效成分。茶蜂花粉 85%乙醇回流提取,经过石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物以及萃余物 4 个部分,用 D-半乳糖诱导衰老小鼠模型检测茶蜂花粉不同组分的抗氧化活性,采用多种色谱方法分离具有抗氧化活性的成分,利用核磁共振方法鉴定各单体的化学结构。结果表明:茶蜂花粉乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物具有明显的抗氧化作用,乙酸乙酯萃取物经 MCI 柱层析,得到 30%、50%、70% 三个乙醇洗脱组分,其中 30% 乙醇洗脱组分具有显著抗氧化活性,从该洗脱部分得到三个单体化合物,经鉴定为:槲皮素、山奈素-3-O-芸香糖苷、山奈酚-3-O-(2",3",4"-O-三对羟基桂皮酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷,推测茶蜂花粉具有抗氧化活性的成分主要为黄酮类化合物。

**关键词:**茶蜂花粉;抗氧化;黄酮;结构鉴定

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.012

## Antioxidant Activity and Composition of Camellia Been Pollen

SHAO Li-li , XU De-ping\*

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** This experiment was aimed to study the antioxidant activity and functional components of camellia bee pollen. Camellia bee pollen was powdered and extracted by 85% ethanol under reflux and then was extracted by petroleum ether, ethyl acetate and n-butyl alcohol. D-Galactose induced aging mice model was used to detect the antioxidant activity of different components of camellia bee pollen. Various chromatographic methods were employed to separate the ingredients with antioxidant activity. Nuclear magnetic resonance (NMR) was applied to identify the chemical structure of the monomers. The results showed that the camellia been pollen ethanol extracts and ethyl acetate extracts had obvious antioxidant effect. Ethyl acetate extracts by MCI column chromatography was isolated into 30%, 50%, 70% ethanol elution contents. 30% Ethanol elution had obvious antioxidant activity. Three monomer compounds were separated and identified from the elution part: quercetin, kaempferide-3-O-rutinoside and kaempferol-3-O-(2",3",4"-O-hydroxyl cinnamon acyl)-β-D-glucopyranoside. Therefore, flavonoids were the main functional components in camellia bee pollen for the antioxidant activity.

**Key words:** camellia bee pollen; antioxidant activity; flavonoids; structural identification

茶蜂花粉(Camellia been pollen)是工蜂采集的掺入少量蜜蜂分泌物和茶花蜜的花粉团,是蜂花粉的一种,蜂花粉种类齐全、成分搭配比例十分理想,在国际上被称为“完全营养品”、“微型应用库”,它不但含有人体通常必需的蛋白质、脂肪、碳水化合物,还含有对人体生理功能具有特殊功效的微量元素、维生素等生物活性物质,具有抗癌、降低胆固醇和增强免疫力等作用<sup>[1-4]</sup>。黄酮类化合物被认为是蜂花粉抗氧化作用的重要物质基础<sup>[5]</sup>,与其他花粉

相比,茶蜂花粉中黄酮类物质含量较高<sup>[6]</sup>,但茶蜂花粉中黄酮的组成还不清楚,因此无法对茶蜂花粉抗氧化作用的机理深入研究。

本研究发现茶蜂花粉具有很好的抗氧化活性,利用多种色谱方法分离,从中筛选出三种主要抗氧化活性成分,为茶蜂花粉抗氧化活性的构效关系的研究奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

茶蜂花粉购于浙江余姚蜂场;昆明小鼠(60 只,雌雄各半,6 周龄,20~25 g)上海斯莱克实验动物

有限公司; D-半乳糖, 美国 Sigma 公司; 丙二醛 (MDA) 测试盒, 南京建成生物工程研究所; 超氧化物歧化酶 (SOD), 上海艾莱萨生物科技有限公司; GF254 硅胶板, 山东烟台芝罘化工厂; MCI 柱, 日本三菱化学公司产品; ODS-A 柱、ODS-AQ 柱, 日本东曹株式会社产品; 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

DFY-600 摆摆式高速中药粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; RAT-100D 双层玻璃萃取罐, 无锡申科仪器有限公司; MP-201 型无油隔膜真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; R-1002 型旋转仪, 上海申顺生物科技有限公司; ZF-90 型暗箱式紫外透射仪, 上海顾村电光仪器厂; WFJ 2000 型可见分光光度计, 优尼柯(上海)仪器有限公司; CR3i 高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; 核磁共振仪 Avance 500 MHz, Bruker 公司。

## 2 实验方法

### 2.1 茶蜂花粉不同萃取物的制备

将茶蜂花粉粉碎过 40 目筛, 称取 10 kg 加入 100 L 萃取罐中, 以料液比 1:10 (g: mL) 加入体积分数 85% 乙醇溶液, 35 °C 回流提取 3 h, 过滤出清液, 将滤渣再按上述方法重复提取 2 次, 合并清液减压浓缩, 除去全部酒精及部分水分得到浓缩物。浓缩物按 1:1 加入去离子水, 超声至悬浊状, 依次用等量的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别减压浓缩成浸膏, 得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物以及萃余物, 冷藏备用。

### 2.2 各萃取物对 D-半乳糖诱导衰老模型小鼠的抗氧化活性

#### 2.2.1 D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立

昆明小鼠适应性饲养一周后, 随机分成 7 组, 每组 10 只, 雌雄小鼠各 5 只。正常对照组和衰老模型组小鼠灌胃等体积生理盐水; 实验组分别灌胃乙醇提取物及四种萃取物各 500 mg/(kg · d)。灌胃的同时衰老模型组和实验组每日皮下注射 D-半乳糖 150 mg/(kg · d)<sup>[7,8]</sup>, 建立小鼠亚急性衰老模型, 连续 6 周<sup>[9,10]</sup>。正常对照组每日皮下注射等体积生理盐水。

#### 2.2.2 样本制备和生化指标测定

末次给药 24 h 后, 眼球取血, 收集血液, 小鼠脱臼处死, 摘取肝脏, 肝脏用滤纸吸干残血。肝脏低温研磨制成 10% 的组织匀浆, 3500 rpm, 4 °C 条件下离心 10 min, 取上清液, -20 °C 保存。采用比色法测定

肝组织的丙二醛 (MDA) 含量<sup>[11]</sup>, 采用酶联免疫法测血清的超氧化物岐化酶 (SOD) 活力<sup>[12,13]</sup>, 按试剂盒说明书操作。

### 2.3 乙酸乙酯萃取物的分离

将具有抗氧化活性的乙酸乙酯萃取物取出解冻, 100 目筛过滤, 过 MCI 柱 (6 cm × 100 cm), 依次用体积分数 30%、50%、70% 三个乙醇溶剂梯度洗脱, 流速 20 mL/min, 洗脱液用 250 mL 锥形瓶收集, TLC 法跟踪检测洗脱液, 将  $R_f$  值和显色反应一致的洗脱液合并, 减压旋转蒸发除去乙醇和部分水分, 得到浓缩液 30%、50%、70% 三个乙醇洗脱组分。于-20 °C 保存备用。

#### 2.3.1 乙酸乙酯萃取物分离得到的三个组分的抗氧化活性

按 2.2 方法操作, 分别检测 30%、50%、70% 三个乙醇洗脱组分的抗氧化活性。其中实验组分别灌胃 30% 乙醇提取物、50% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物各 500 mg/(kg · d)。

#### 2.3.2 具有抗氧化活性组分的分离

将 MCI 柱分离后具有抗氧化活性的组分过 ODS 柱 (3 × 100 cm), 用乙醇溶剂梯度洗脱, 流速 9 mL/min, 洗脱液用 15 mL/管自动收集器收集, TLC 法跟踪检测洗脱液, 将  $R_f$  值和显色反应一致的洗脱液合并减压浓缩得到三个不同的细分部分。将各细分部分分别反复上 ODS-AQ (3 cm × 100 cm)、ODS-A (3 cm × 100 cm) 等色谱柱, 直至得到 3 个纯化合物: 1、2、3。

### 2.4 结构鉴定

以二甲基亚砜 (DMSO) 为溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标物, 将得到的化合物经氢谱 ( $^1\text{H}$  NMR) 和碳谱 ( $^{13}\text{C}$  NMR) 等光谱数据分析, 确定其结构。

### 2.5 统计分析

实验结果利用 Excel、SPSS 19.0 等统计分析软件处理。计量方式为平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ); 用单因素方差分析法衡量各组间数据差异, 方差具有齐次性时, 选择 LSD 法, 方差不具齐次性时, 则采用 Dunnett's 法检验, 差异明显水平为  $P < 0.05$ , 显著水平为  $P < 0.01$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 茶蜂花粉不同萃取物的抗氧化活性的检测结果

从茶蜂花粉中得到的乙醇提取物、石油醚萃取

物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、萃余物 5 个部分

对血清 SOD 活性和肝组织 MDA 水平影响如表 1 所示。

表 1 茶蜂花粉各萃取物对 D-半乳糖诱导衰老小鼠抗氧化活性影响( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The antioxidant activity of each extract from camellia bee pollen on D-galactose induced aging mice model ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	血清 SOD Serum SOD (U/mL)	肝 MDA Liver MDA (nmol/mg)
正常对照组 Control	167.03 ± 22.64 * *	2.02 ± 0.29 * *
衰老模型组 Model	121.70 ± 31.50	2.87 ± 0.69
乙醇提取物 Ethanol extract	144.94 ± 12.75 *	2.31 ± 0.22 *
石油醚组 Petroleum ether extract	102.19 ± 10.77	2.92 ± 0.21
乙酸乙酯组 Ethyl acetate extract	150.83 ± 24.26 * *	2.16 ± 0.57 * *
正丁醇组 n-Butyl alcohol extract	106.84 ± 13.63	2.95 ± 0.28
萃余物组 Remaining extract	105.31 ± 11.54	2.83 ± 0.57

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

从表 1 的数据可以看出:模型组小鼠的血清 SOD 活性( $P < 0.01$ )极显著低于正常组,肝脏 MDA 含量极显著( $P < 0.01$ )高于正常组,说明长期皮下注射 D-半乳糖造成了小鼠抗氧化功能的显著下降,即造模成功<sup>[7,8]</sup>。

与模型组相比,乙醇提取物、乙酸乙酯组小鼠的血清 SOD 活性显著升高,差异显著( $P < 0.05$ )。石油醚组、正丁醇组和萃余物组均无显著( $P > 0.05$ )变化。在小鼠肝组织 MDA 含量方面,与模型组相比,乙醇提取物、乙酸乙酯组小鼠的肝脏 MDA 含量显著( $P < 0.05$ )减少。石油醚组、正丁醇组和萃余

物组小鼠的肝脏 MDA 含量与模型组相比均无显著( $P > 0.05$ )变化。结果表明茶蜂花粉乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物具有显著的抗氧化活性,茶蜂花粉石油醚萃取物、正丁醇萃取物和萃余物抗氧化活性不明显。

### 3.2 30%、50%、70% 三个乙醇洗脱组分的抗氧化活性的检测结果

对乙酸乙酯萃取物经 MCI 柱进一步分离得到 30%、50%、70% 三个乙醇洗脱组分,这 3 个组分对血清 SOD 活性和肝组织 MDA 水平影响如表 2 所示。

表 2 30%、50%、70% 乙醇洗脱组分对 D-半乳糖诱导衰老小鼠抗氧化力影响( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The antioxidant activity of 30%, 50%, 70% ethanol eluents on D-galactose induced aging mice model ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	血清 SOD Serum SOD (U/mL)	肝 MDA Liver MDA (nmol/mg)
正常对照组 Control	178.35 ± 15.18 * *	2.51 ± 0.55 * *
衰老模型组 Aging model	122.69 ± 9.19	3.52 ± 0.91
30% 乙醇洗脱组 30% Ethanol eluent	166.57 ± 18.74 * *	2.86 ± 0.64 *
50% 乙醇洗脱组 50% Ethanol eluent	133.83 ± 14.32	3.47 ± 0.30
70% 乙醇洗脱组 70% Ethanol eluent	122.29 ± 14.67	3.36 ± 0.56

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

从表 2 的数据可以看出:在小鼠血清 SOD 活性方面,与模型组相比,30% 乙醇洗脱组小鼠的血清 SOD 活性显著升高,差异极显著( $P < 0.01$ )。50% 乙醇洗脱组和 70% 乙醇洗脱组小鼠的血清 SOD 活性与模型组相比均无显著( $P > 0.05$ )变化。在小鼠肝组织 MDA 含量方面,与模型组相比,30% 乙醇洗

脱组小鼠的肝脏 MDA 含量显著( $P < 0.05$ )减少。50% 乙醇洗脱组和 70% 乙醇洗脱组小鼠的肝脏 MDA 含量与模型组相比均无显著( $P > 0.05$ )变化。

分析得抗氧化活性物质主要集中在 30% 乙醇洗脱组分中,所以对 30% 乙醇洗脱组分进行进一步分离。

### 3.3 茶蜂花粉抗氧化活性成分的分离结果

30%乙醇洗脱组分经过ODS-AQ、ODS-A等色谱柱,TLC跟踪检测,茴香醛-硫酸显色,分别得到三个单体化合物:化合物**1**、**2**、**3**。

### 3.4 茶蜂花粉抗氧化活性成分的结构鉴定

以二甲亚砜为溶剂(DMSO),四甲基硅烷(TMS)为内标物,将三个化合物经氢谱(<sup>1</sup>H NMR)和碳谱(<sup>13</sup>C NMR)等光谱数据分析,确定其结构。

**化合物1:**淡黄色粉状物,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,难溶于水。

从<sup>1</sup>H NMR(DMSO, 500 MHz)可见δ8.06(2H,d,J=6.8 Hz),δ8.01(2H,d,J=7.2 Hz),δ7.54(2H,d,J=6.8 Hz),δ7.37(2H,d,J=5.2 Hz),δ6.95(2H,d,J=6.8 Hz),δ6.88(2H,d,J=6.8 Hz),δ6.81(2H,d,J=6.4 Hz),δ6.79(2H,d,J=6.4 Hz)共有16个H信号,从峰形上可见该化合物含有4个AA(BB(偶合系统,表明化合物有4个对取代苯环结构。出现在较低场区的信号δ3.19~4.31是糖上质子信号。

在<sup>13</sup>C NMR(DMSO, 125 MHz)中,δ177.5为羰基信号C,δ166.3,δ165.9,δ164.6应为三个羰基碳,从化学位移来看,三个羰基应为单环或双键相连,δ130.9,δ130.8,δ130.3,δ130.2,δ115.9,δ115.8,δ115.4,δ115.2共有8个碳信号,表明化合物有4个

对取代苯环结构,与其氢谱一致。δ101.1,δ77.8,δ76.3,δ74.2,δ70.2,δ60.9分别为糖上的碳信号,其余碳信号包含一个山奈酚的碳信号<sup>[14]</sup>,参照相关文献可得母环为山奈酚-3-O-葡萄糖苷。

与文献<sup>[15]</sup>相比较,可判断该化合物为山奈酚-3-O-(2",3",4"-三对羟基桂皮酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷,该化合物在茶蜂花粉中首次分离到。

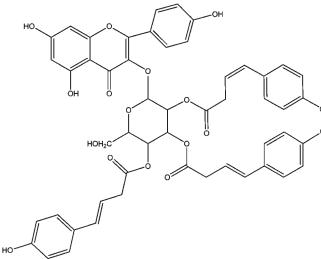


图1 化合物1的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compound 1

**化合物2:**浅黄色粉末,难溶于冷水,可溶于热水、甲醇、乙醇、吡啶。将化合物的碳谱、氢谱的数据与芦丁相比较<sup>[16]</sup>,结合山奈素的结构及相关文献<sup>[17]</sup>,可判断该化合物为山奈素-3-O-芸香糖苷。

**化合物3:**淡黄色粉末,能溶于冷乙醇,易溶于热乙醇,可溶于甲醇、乙酸乙酯等,不溶于水,碱性水溶液呈黄色。其<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR的数据与槲皮素相一致<sup>[18]</sup>,可推断该化合物为槲皮素。

表3 化合物1的<sup>13</sup>C NMR数据

Table 3 <sup>13</sup>C NMR data of compound 1

位置 Position	化学位移 $\delta_c$		位置 Position	化学位移 $\delta_c$	
山奈酚 Kaempferol	2	155.9	桂皮酰基 2Cinnamonyl 2	1	165.9
	3	132.9		2	113.7
	4	177.5		3	144.7
	5	160.2		4	125.2
	6	98.8		5,9	130.3
	7	161.2		6,8	115.4
	8	93.8		7	157.6
	9	148.6	桂皮酰基 3Cinnamonyl 3	1	164.6
	10	103.8		2	113.7
	1	120.9		3	144.7
2',6'	130.9			4	125.0
3',5'	115.9			5,9	130.2
4'	160.1			6,8	115.2

位置 Position		化学位移 $\delta_c$	位置 Position	化学位移 $\delta_c$
桂皮酰基 1 Cinnamonyl 1	1	166.3		7
	2	114.4	葡萄糖 Glucose	1
	3	145.1		2
	4	127.6		3
	5,9	130.8		4
	6,8	115.8		5
	7	159.9		6

## 4 讨论与结论

本研究得出茶蜂花粉 85% 乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物具有很好的抗氧化活性。从乙酸乙酯萃取物中得到三个化合物并鉴定为:山奈素-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山奈酚-3-O-(2",3",4"-O-三对羟基桂皮酰基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,该化合物在茶蜂花粉中首次报道。在分离过程中发现山奈酚-3-O-(2",3",4"-O-三对羟基桂皮酰基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷的含量明显比山奈素-3-O-芸香苷及槲皮素的含量多得多,推测该化合物应为茶蜂花粉的抗氧化活性主要成分。

韩慧英<sup>[15]</sup>从油菜蜂花粉中分离到山奈酚-3-O-(3"-O-对羟基桂皮酰基)- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖苷,具有很强的活性,并认为对羟基桂皮酰基是活性增强的基团。本研究得到的山奈酚-3-O-(2",3",4"-O-三对羟基桂皮酰基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷含有三个对羟基桂皮酰基,其抗氧化活性比芦丁和槲皮素的抗氧化活性更强,可以推测茶蜂花粉的抗氧化活性主要是山奈酚-3-O-(2",3",4"-O-三对羟基桂皮酰基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷所起的作用。

## 参考文献

- Kim SB, Jo YH, Liu Q, et al. Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content. *Molecules*, 2015, 20: 19764-19774.
- Feás X, Vázqueztato MP, Estevinho L, et al. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 2011, 17: 8359-8377.
- Mejías E, Montenegro G. The antioxidant activity of Chilean Honey and bee pollen produced in the Llaima Volcano's Zones. *J Food Quality*, 2012, 35: 315-322.
- Zhao JX(赵剑喜), Bu LN(卜令娜), Liu YW(刘晔玮), et al. Antioxidant activity of rape bee pollen. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 959-962.
- Zhang Y(张英), WU XQ(吴晓琴), Ding XX(丁霄霖). Study on the relationship between the structure of flavonoids and their scavenging capacity on active oxygen radicals by means of chemiluminescence. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10: 26-33.
- Chen ND(陈南迪), Fang MY(方妙玉), Wu XH(吴锡鸿), et al. Study on the correlation between total flavonoids and anti-oxidation in bee pollens. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 34(1): 70-73.
- Yoo DY, Kim W, Kim IH, et al. Combination effects of sodium butyrate and pyridoxine treatment on cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of d-galactose-induced aging model mice. *Neurochem Res*, 2012, 37(1): 223-231.
- Hu W, Jing P, Wang L, et al. The positive effects of ginsenoside rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a d-galactose-induced aged rat model. *Bmc Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 1-8.
- Parameshwaran M, Irwin MH, Steliou K, et al. D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation Res*, 2010, 13: 729-735.
- Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in d-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev*, 1999, 108: 239-251.
- Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by d-galactose. *Biogerontology*, 2003, 4(1): 15-18.
- Li ZM(李哲明), He JN(何嘉娜), Liu Q(刘琼), et al. The antioxidant effect of polyphenols of Anji white tea on d-galactose induced aging model mice. *J Guiyang Coll of Tradit Chin Med*(贵阳中医学院学报), 2016, 38(2): 21-24.
- Lei L, Ou L, Yu X. The antioxidant effect of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. shoot in d-galactose induced mice aging model and *in vitro*. *J Chin Med Assoc*, 2016, 79: 205-211.

(下转第 1988 页)