

荞麦光敏素的提取分析与生物活性研究

芦 莎, 李艳琴*, 李彬春

山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006

摘要: 荞麦光敏素(Fagopyrins)是存在于荞麦植株中的一种具有光毒作用的苯丙二萜酮物质, 动物或人食用过多会产生荞麦光敏症(Fagopyrism), 例如: 皮炎, 脱发, 气喘, 昏厥等。同时, 荞麦光敏素还具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等广泛的生物和药理活性, 并可用于光动力治疗。我国作为荞麦生产和消费大国, 对荞麦光敏素的研究鲜有报道。本文根据近年来国外对荞麦光敏素的研究, 在其化学结构、提取、分析及生物活性等方面进行综述, 以期对荞麦光敏素的进一步研究提供参考。

关键词: 荞麦光敏素; 化学结构; 提取; 分析; 生物活性

中图分类号: Q946

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.038

Advance on the Isolation, Analysis and Biological Activity of Fagopyrins

LU Sha, LI Yan-qin*, LI Bin-chun

Institute of Biotechnology of Shanxi University, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Taiyuan 030006, China

Abstract: Fagopyrins was a group of naphthodianthrone found in buckwheat. Because of its phototoxicity, Fagopyrins could cause fagopyrism when overly consumed by humans and animals. Syndromes included skin inflammation, hair loss, asthma and fainting. In the meanwhile, Fagopyrins also had a wide range of biological and pharmacological activities, such as antibacterial, antiviral and antitumor activities, which enable them to be used in photodynamic therapy. As a great country of buckwheat production and consumption, the research on the photosensitive element of buckwheat was however poorly documented. In this paper, such researches were reviewed. The chemical structure, extraction, analysis and bioactivity study of Fagopyrins were discussed, providing reference for further study.

Key words: Fagopyrins; chemical structure; extraction; analysis; biological activities

荞麦是一种药食两用的植物, 其种子含有丰富的抗性淀粉, 食用后血糖生成指数低^[1], 是糖尿病和心脑血管病人的首选食品; 其花、叶和麸皮中含有丰富的类黄酮, 具有很好的抗氧化作用^[2]和适当的葡萄糖苷酶、淀粉酶和脂肪酶的抑制作用^[3-5], 其提取物可以作为预防和治疗高血糖、高血脂和高血压的药物。另外, 由于荞麦在土地贫瘠和荒凉区域均可生长, 这使得荞麦可以种植在欧洲、北美和亚洲的许多地区。在这个物产丰富的时代, 健康食品的消费使得荞麦迅速流行起来, 对荞麦需求量的增加不仅是荞麦种子, 而且还有荞麦嫩叶、芽苗和提取物。在亚洲, 嫩叶和芽苗常被用作蔬菜, 叶子的粉末被用

作添加剂或天然实用色素; 在尼泊尔和不丹一些野生的荞麦被用作牛饲料。然而, 研究者发现荞麦中有一种具有光毒作用的苯丙二萜酮物质, 称为 Fagopyrins, 有人将其译成荞麦碱^[6,7], 还有人认为 Fagopyrins 属于黄酮类化合物^[8]。由于 Fagopyrins 的分子结构与提取自圣约翰草 (*Hypericum perforatum* L.) 的金丝桃素的结构非常相似, 其作用又与光反应有关, 所以, 我们将其译成荞麦光敏素。早在 7 世纪, 就有记载说吃未煮熟的荞麦叶子会引起皮肤瘙痒。在 13 世纪, 也有报道说消耗大量的荞麦叶, 会引起皮炎, 脱发, 气喘和昏厥等症^[9]。Chick 是第一个对其毒性进行实验验证的, 他发现动物吃了很多荞麦饲料后, 当皮肤暴露在阳光下时, 皮肤就会发生严重的皮炎症^[10]。我国作为荞麦生产和消费大国, 非常有必要对荞麦、尤其是植株和芽苗的安全性进行评估, 并对荞麦光敏素的功能活性进行研究, 但

目前国内鲜有报道。

1 荞麦光敏素的化学结构

1943年,荞麦光敏素首次从甜荞(*F. esculentum*)盛开的红色花中被提取出来。证明了荞麦光敏素的存在,但是它的化学结构直到1979年才被表征,而且,研究者发现荞麦光敏素有三个不同的形态,并推测是Fagopyrin, isofagopyrin, and pseudofagopyrin。(类似于金丝桃素的三种结构Hypericin, isohypericin, and pseudohypericin)^[11]。Eguchi通过高效液相色谱法获得了荞麦光敏素的三个峰,并推测荞麦光敏素的衍生物可能是pseudo-, proto- and protopseudo-形式^[12]。又有报道称荞麦光敏素来源于protofagopyrin,并发现在光照条件下protofagopyrin可以转化为荞麦光敏素^[8,13],还有一些研究者认为protofagopyrin没有荧光强度^[1]。尽管protofagopyrin的结构还没有完全证实,但是有大量证据证明他们是存在的。目前有两个关于Fagopyrins和protofagopyrin的理论,第1个是Fagopyrins和protofagopyrin都存在荞麦中,就像金丝桃素和原金丝桃素^[14]。第2是只有protofagopyrin存在于荞麦中,protofagopyrin向Fagopyrins的转化发生在提取过程中^[15]。

2013年,Eva Tavcar Benkovic通过色谱分析,分离出八种荧光物质,这八种荧光物质的紫外可见吸收光谱都在590 nm处有最大吸收且光谱图相似,证明荞麦光敏素并非是一种单一物质,而是由多种化合物组成的一类物质。随后,他们结合荧光、紫外可见光谱、质谱和核磁共振分析并参考大量金丝桃素衍生物的数据,最终提出荞麦光敏素的六种结构:A、B、C、D、E和F(见图1)^[13],其中荞麦光敏素A、B和C结构式不同,但分子式相同;D和E结构式不同,分子式相同。

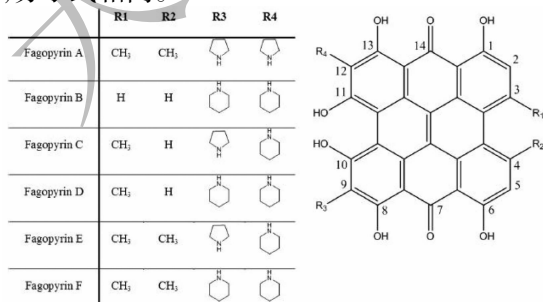


图1 Fagopyrins可能的六种结构

Fig. 1 Six possible structures for Fagopyrins

2 荞麦光敏素的提取

首次报道荞麦光敏素的提取剂是乙醇,然后用醋酸铅沉淀叶绿素,用氧化铅煮沸,产生一种荧光物质,但是并没有进一步研究^[16]。尽管在1943年的报道中已经有荞麦光敏素的提取物,但产物不能很好的溶解,说明产物不是很纯^[17]。1996年, Samel用丙酮/水/乙酸(80:10:10)的混合液作为提取剂,比较成功的将荞麦光敏素分离出来,但不幸的是没有任何溶剂可以将硅胶60的荧光物质洗脱下来^[14]。

近几年,研究者对荞麦光敏素有了更深层次的探究,但是在提取方法上却是各不相同。2005年,有研究证明30%的乙醇可以用来获得高浓度的酚类物质和非常低浓度的荞麦光敏素^[8]。2008年, Ozbolt用80%的四氢呋喃作为提取剂,冷冻干燥后又溶解在甲醇中^[18]。2009年, Eguchi在提取荞麦光敏素之前首先用二氯甲烷浸泡,然后用丙酮/水/乙酸(80:10:10)的混合液作为提取剂^[12]。如果同时分析荞麦光敏素、芦丁和槲皮素,可以用甲醇作为提取剂^[19,20]。除了荞麦光敏素以外,荞麦也含有大量的叶绿素(尤其是荞麦叶),花青素,和其他多酚。因此,黄色,红色,绿色成分在研究中可能会造成很大的误差。为了更好的制备荞麦光敏素,一些研究者就用二氯甲烷去除叶绿素,用50%乙醇去除黄酮物质,然后用丙酮/水(4:1)混合液作为提取剂^[13]。与其他部分相比,荞麦花由于其较高的荞麦光敏素和较低的叶绿素含量,是最理想的提取材料。

为了优化荞麦光敏素的提取,研究者测试了不同提取剂的提取能力,发现提取能力由强到弱的顺序为:二甲基亚砜、二甲基亚砜/甲醇(1:1)、吡啶、丙酮/吡啶(9:1)、丙酮/水(9:1)、二甲基甲酰胺、乙腈/水(2:1)、丙酮/水/乙酸(8:1:1)和甲醇。但是,二甲基亚砜、吡啶和二甲基甲酰胺由于沸点高而难以蒸发,所以选定丙酮/水(9:1)作为提取荞麦光敏素的最好提取剂,同时高温和超声波可以提高提取效率。其中乙醇,四氢呋喃,丙酮,乙腈,EDTA,乙酸乙酯,异丙醇,甲苯和水的提取能力都不能令人满意^[13]。许多作者报道出他们在溶解提取出的荞麦光敏素干物质时有困难,他们认为,荞麦光敏素的高效提取剂不一定也能溶解干燥后的荞麦光敏素,因为植物中其它化合物的存在可能会影响其溶解性,这需要进一步的实验去证明。必须强调的事实是,

尽管进行了许多提取尝试,但是目前并没有一种方法可以有效提取荞麦光敏素的纯物质。

3 荞麦光敏素的分析测定

荞麦光敏素和它的乙酰化衍生物是最先通过硅胶色谱分析出来的^[11]。一种成功分离三种荞麦光敏素的方法,是用硅胶 60 F254 和流动相甲苯/甲酸乙酯/甲酸/吡啶(5:4:1:2)进行分离的^[14,21]。Eguchi 用了相同的方法,但在 302 nm 处,只观察到两个点^[12]。

至于用紫外/可见分光光度法分析荞麦光敏素的含量,几个药典方法被修改后用来分析荞麦光敏素的含量。干荞麦粉样品悬浮在 80% 的四氢呋喃中,一段时间后离心,取上清液在真空中蒸发,然后将干燥的四氢呋喃提取物溶解在甲醇中,最后离心,收集上清。有些作者直接用甲醇作为提取溶剂然后进行离心。取上清液在 590 nm 处测定吸光度,作者

以金丝桃素为标品,来计算荞麦光敏素的含量^[8,12,18,22]。

第一次用高效液相色谱法分析荞麦光敏素时,使用水/甲醇/三氟乙酸/四氢呋喃(3:40:1:1)作为流动相,作者观察到了三个峰^[12]。Katja Stojilkovski 通过改进,发展了一种具有选择性,可重复,灵敏的分析方法,可以同时分析荞麦光敏素,芦丁和槲皮素,用于探究它们三者之间的关系^[20]。Eva Tavcar Benkovic 使用 A (0.1% 三氟乙酸水溶液)和 B (0.1% 三氟乙酸乙腈溶液)作为流动相,采用荧光检测(激发波长为 330 nm,发射波长为 590 nm),将 Fagopyrins 的八个峰完全被分离^[13]。

4 荞麦光敏素在荞麦中的含量

荞麦光敏素在不同材料和不同研究中的含量如表 1 所示。

表 1 Fagopyrins 的含量
Table 1 The content of Fagopyrins

研究者 Researchers	材料部位 Part of material	甜荞麦 Common buckwheat (mg/g)		苦荞麦 tartary buckwheat (mg/g)		金荞麦 cymosum buckwheat (mg/g)	
		Uv-vis	HPLC	Uv-vis	HPLC	Uv-vis	HPLC
Eguchi ^[12]	叶子 leaves	1.19	0.39	1.89	1.06		
	茎 stems		0.04	0.09	0.11		
	花 flowers	1.67	0.64	4.73	1.84		
	荞麦壳 hulls		0.02	0.08	0.04		
	种子(去壳) groats				0.01		
Oz? bolt ^[18]	叶子 leaves	0.4 ~ 0.6					
	茎 stems	0.04 ~ 0.12					
Kreft ^[22]	芽苗 sprouts	0.025 ~ 0.41		1.0 ~ 1.2			
Stojilkovski ^[20]	叶子 leaves	0.322 ~ 2.300			0.512	0.936 ~ 0.947	
	茎 stems					0.282	
	花 flowers					20.80	
	叶和茎 Leaves and stems					1.930	
	花和叶 Flowers and leaves			1.600			
	花叶茎 Flowers, leaves, stems			3.750 ~ 4.840			
	种子 seed				0.068		

整体来说,苦荞所有部位的荞麦光敏素都比甜荞的部位多出至少两倍^[12,20,22]。但是荞麦光敏素的含量也受培育条件的影响,当荞麦芽苗在光照条件下生长时,荞麦光敏素的含量就比在黑暗条件下生

长增加两倍;当荞麦芽苗在发芽器中生长时,荞麦光敏素的含量比在平皿上生长有所增加^[22]。但是荞麦光敏素的含量与荞麦种子浸泡在不同硒浓度溶液中或受不同紫外辐射无关^[18]。类似于金丝桃素,荞

麦光敏素的合成可能会受到氮的影响^[23]。对于荞麦光敏素的两种分析方法,我们发现用紫外/可见分光光度法测的含量比用 HPLC 法测的含量高 2 ~ 2.5 倍。

在日常生活中,人类食用最多的是荞麦种子,因此有研究者研究了苦荞种子在不同加工中荞麦光敏素的变化,研究发现荞麦种子中荞麦光敏素的量在蒸煮后降低了三倍,从最初的 53.70 $\mu\text{g/g}$ 到 17.11 $\mu\text{g/g}$;而烘烤基本不会改变荞麦光敏素的量,所以在面包制作过程中荞麦光敏素的量基本没有变化^[19]。

到目前为止,还没有荞麦光敏素的标准品,由于其与金丝桃素的结构和性质相似,研究人员均以金丝桃素的标准曲线来计算荞麦光敏素的含量。

关于荞麦光敏素最小毒性的剂量目前是不清楚的,荞麦光敏素和金丝桃素都有光毒性且结构类似,所以通常根据金丝桃素的最小毒性剂量来估计。Theurer 用甲醇提取荞麦后,在光照条件下作用于 3T3 成纤维细胞,发现荞麦光敏素的光毒性比金丝桃素低十倍^[21]。

5 荞麦光敏素的生物活性

荞麦光敏素和金丝桃素都表现出光动力活性,在 540 ~ 610 nm 可见光的激活下,可以作为光动力治疗中的光敏剂^[24]。光动力治疗(PDT),是目前一种较新的癌症治疗手段,是指对人体施用可定位肿瘤细胞的光敏物质,如荞麦光敏素,然后以一定波长的光局部照射激活荞麦光敏素,引发一系列的光化学和光生物学反应,导致肿瘤细胞不可逆的光损伤。采用这种方法,对胰腺癌、膀胱癌、淋巴癌、前列腺癌、基底细胞癌、喉癌等有较好疗效^[25]。所以说荞麦光敏素可以用于癌症治疗。

荞麦光敏素是酪氨酸激酶的抑制剂,同时也较小程度的抑制丝氨酸、苏氨酸激酶和胞质蛋白激酶^[14,26]。酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases, PTKs)是一种很重要的酶类,能催化 ATP 的 γ 磷酸基团转移到许多重要蛋白质的酪氨酸残基上,使酪氨酸磷酸化而激活许多重要的信号通路,促进细胞的增值、分化。除了调节正常生理过程之外,PTK 还会在肿瘤患者体内过度表达,促进了肿瘤细胞的增值和分化。实验结果显示,荞麦光敏素对与酪氨酸激酶相关的表皮生长因子受体和胰岛素受体的半抑制浓度分别为 0.093 和 0.079 $\mu\text{g/mL}$ ^[26]。所以说荞麦光敏素是潜在的抗增殖剂,可以抑制增殖性疾

病。

荞麦光敏素的抗菌性在近期也被报道出来,研究显示荞麦光敏素对一些致病性真菌有抑制作用,对白色念珠菌、皮炎外瓶霉菌、犬小芽孢菌的最低抑菌浓度均为 11.7 $\mu\text{g/mL}$,对红色毛癣菌的最低抑菌浓度为 46.9 $\mu\text{g/mL}$,对尖孢镰刀菌没有明显的抑制作用^[27]。

总之,目前,荞麦光敏素的研究也只了解到其粗略信息,并没有一个全面的认识。例如荞麦光敏素的光毒性,只知道荞麦种子、荞麦面粉都是安全的,但如果过量食用荞麦芽苗、荞麦叶或荞麦花,皮肤可能会在阳光的照射下发生红肿、瘙痒等症状。荞麦光敏素已经发现了一百多年,但由于其独特的分子结构影响提取过程,研究者一直没有提取出荞麦光敏素的纯物质,所以一直影响我们研究其未知的特征、生物合成和生物活性。虽然有一些研究报道了荞麦光敏素的特性,但是荞麦光敏素不仅是光毒性物质,而且有潜在的光动力作用,这需要研究者的进一步探索。

参考文献

- 1 Benkovic, E. T, *et al.* Fagopyrins and protofagopyrins: detection, analysis, and potential phototoxicity in buckwheat [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 5715-5724.
- 2 Binchun Li, *et al.* Antioxidant activity of flavonoids from tartary buckwheat bran [J]. *Toxicol Environ Chem*, 2016, 98: 429-438.
- 3 Li YQ (李艳琴), *et al.* Effects of different solvent extracts from buckwheat bran on α -glucosidase activity [A]. *Food Sci (食品科学)*, 2010, 31(17): 10-13.
- 4 Yanqin Li, *et al.* Study on the interaction between 3 flavonoid compounds and α -amylase by fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics [J]. *J Food Sci*, 2009, 74: 199-203.
- 5 Yang P (杨鹏), *et al.* Inhibitory effect of flavonoids and fagopyritols from buckwheat on pancreatic lipase [A]. *Food Sci (食品科学)*, 2015, 36(11): 60-63.
- 6 Guo YX, (郭永霞), *et al.* Advances in the compounds with herbicidal activity from natural products [J]. *Plant Prot (植物保护)*, 2005, 31(6): 11-16.
- 7 Nie W (聂薇), *et al.* Nutritional components and prophylactic values of tartary buckwheat [A]. *Food Sci Technol Cereal Oil (粮油食品科技)*, 2016, 24(1): 40-45.
- 8 Hinneburg I, *et al.* Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb [J]. *J Agric Food Chem*. 2004, 53: 3-7.

- 9 Zhang Z, *et al.* Traditional buckwheat growing and utilization in China[J]. *Ethnobotany of Buckwheat*, 2003; 9-20.
- 10 Chick, H. , *et al.* The photosensitizing action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *J Physiol*, 1941, 100; 212-230.
- 11 Brockmann, H. , *et al.* Zur konstitution des fagopyrins [J]. *Tetrahedron Lett*, 1979, 20; 1575-1578.
- 12 Eguchi K, *et al.* Development of a high-performance liquid chromatography method to determine the fagopyrin content of tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and common buckwheat (*F. esculentum* Moench) [J]. *Plant Production Sci*, 2015, 12; 475-480.
- 13 Tavcar Benkovic E, *et al.* Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat [J]. *Food Chem*, 2014, 143; 432-439.
- 14 Samel ADD, *et al.* The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways [J]. *Planta Med*, 1996, 62; 106-110.
- 15 Brockmann H, *et al.* Protofagopyrin und Fagopyrin, die photodynamisch wirksamen Farbstoffe des Buchweizens (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Justus Liebigs Ann Chem*, 1952, 575; 53-83.
- 16 Blum HF, *et al.* Photodynamic action and diseases caused by light; New York: reinhold publishing [M]. 1941.
- 17 Wender SH, *et al.* The isolation of photosensitizing agents from buckwheat [J]. *J Am Chem Soc*, 1943, 65; 1733-1735.
- 18 Özbolt L, *et al.* Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation [J]. *Food Chemistry*, 2008, 110; 691-696.
- 19 Kocevar Glavac N, *et al.* Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 79; 423-427.
- 20 Stojilkovski K, *et al.* Fagopyrin and flavonoid contents in common, Tartary, and cymosum buckwheat [J]. *J Food Composition and Analysis*, 2013, 32; 126-130.
- 21 Theurer C, *et al.* In vitro phototoxicity of hypericin, fagopyrin rich, and fagopyrin free buckwheat herb extracts [J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1997, 7; 113-115.
- 22 Kreft S, *et al.* The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts [J]. *Acta Pharm*, 2013, 63; 553-600.
- 23 Sytar O, *et al.* Possible ways of fagopyrin biosynthesis and production in buckwheat plants [J]. *Fitoterapia*, 2013, 84; 72-79.
- 24 Ebermann R, *et al.* A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells [J]. *J Photochem Photobiol*, 1996, 36; 95-97.
- 25 Xu HJ (许娇红), *et al.* Effect of curcumin derivatives on activity of protein tyrosine kinase in K562 cells [A]. *Journal of Fujian Medical University (福建医科大学学报)* 2010, 3; 165-167.
- 26 Samel D, *et al.* Isolation and PTK inhibitory activity of fagopyrins from buckwheat. Abstracts of papers and posters 19th LOF-symposium on pharmacognosy and natural products chemistry [J]. *Pharmacy World & Science*, 1994, 16(9); 13-113.
- 27 Sytar O, *et al.* Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54; 3121-3125.

(上接第 190 页)

- 40 Hakim A, *et al.* Crystal structure of an insect antifreeze protein and its implications for ice binding [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288; 12295-12304.
- 41 Davies PL. Ice-binding proteins; a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth [J]. *Trends in Biochem Sci*, 2014, 39; 548-555.
- 42 Sun T, *et al.* An antifreeze protein folds with an interior network of more than 400 semi-clathrate waters [J]. *Science*, 2014, 343; 795-798.
- 43 Li N, *et al.* Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201; 2243-2251.
- 44 Bar DM, *et al.* Ice-binding proteins and their function [J]. *Annu. Rev. Biochem*, 2016, 85; 515-542.
- 45 Knight CA, *et al.* Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8 [J]. *Biophys J*, 1993, 64; 252-259.
- 46 Knight CA, *et al.* Effects of a polymeric, nonequilibrium "antifreeze" upon ice growth from water [J]. *J Crystal Growth*, 1994, 143; 301-310.
- 47 Garnham CP, *et al.* Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging [J]. *Biochem J*, 2010, 411(1); 171-180.
- 48 Basu K, *et al.* Determining the ice-binding planes of antifreeze proteins by fluorescence-based ice plane affinity [J]. *J Vis Exp*, 2014, 83, e51185.
- 49 Shi MH (史明卉), *et al.* Molecular dynamics simulation of melting ice/water interfaces induced by antifreeze proteins [J]. *J Inner Mongolia Univ; Nat Sci (内蒙古大学学报: 自科版)*, 2017, 48; 515-521.