

烟草色素蛋白复合物中多酚类物质对其抗紫外性能的影响

林晓婕¹, 傅红^{1*}, 杨琳², 郑晨晖¹

(1.福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108; 2.福建省海洋环境与渔业资源监测中心, 福州 350003)

摘要: 采用不同的方法获得烟草色素蛋白复合物 (tobacco pigments protein, TPP), 研究其抗紫外性能及机理。分别通过等电点沉降和硫酸铵沉降从烟草中分离得到 TPP, 运用高效液相色谱对其所结合的酚类物质进行了分析检测, 并对其紫外可见图谱扫描, 同时通过日光辐照, 观察其降解速度, 确定其抗紫外辐射活性。结果表明, 多酚类物质如芸香苷、咖啡酸、绿原酸和萹苢萆, 在抗紫外辐射过程中扮演重要角色; pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降的 TPP 的总酚酸含量高, 其中 pH 4.5 沉降的 TPP 的酚类物质含量最高, 抗紫外活性也最强; 另外, 85%硫酸铵沉降获得的 TPP 总酚酸含量低, 抗紫外活性也较弱。在长时间的日光照射试验中, TPP 的抗紫外性能表现稳定。

关键词: 烟草; 色素蛋白复合物; 抗紫外性能; 多酚类物质

中图分类号: TS413

文章编号: 1007-5119 (2011) 02-0057-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2011.02.013

Effect of Phenols in Tobacco Pigments-protein Complex on Anti-uv Function

LIN Xiaojie¹, FU Hong^{1*}, YANG Lin², ZHENG Chenhui¹

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; 2. Monitoring Center of Marine Environment and Fishery Resources, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Anti-Ultraviolet properties and mechanism of pigments protein complex from tobacco leaves were studied. Proteins were precipitated by ammonium sulphate solution of 85% saturation or isoelectric point precipitation from tobacco leaves. The profiles of binding phenolic acids such as chlorogenic acid, rutin, scopoletin and caffeic acid were analyzed by High Performance Liquid Chromatography, the anti-UV function of pigments-protein were determined with UV spectrum after being irradiated by sunshine, and the speed of its degradation under UV was observed. The data showed that the pigments-protein precipitated at pH 4.5, pH 5.0, pH 5.3 contained higher total levels of polyphenols, and pigments-protein at pH 4.5 had the strongest anti-UV function due to the richest content of phenolic acids. Meanwhile, proteins sedimentated by ammonium sulphate solution of 85% saturation from tobacco leaves exhibited low anti-UV activity, containing low total levels of polyphenols. Polyphenols was the major anti-UV substance. Under the long time exposure under UV, pigments-protein performed high stability.

Keywords: tobacco; pigments protein; ultraviolet irradiation; phenolics

天然植物色素蛋白以非共价键的形式结合多种多酚类色素化合物, 植物游离多酚以其优越的紫外吸收、抗衰老、收敛毛孔和美白等功能受到人们的广泛关注, 但对敏感性肌肤具有较强的刺激性, 而多酚-蛋白复合物能使刺激性降低^[1]。近年来, 由于大气臭氧层的破坏, 人们对紫外线防护日益关注。大气臭氧层每减少 1%, 紫外线 B 辐射量将增加 2%, 皮肤癌增加 4%~8%^[2], 而抗紫外物质的研究一直是化妆品界经久不衰的领域。烟草植株中色

素蛋白质含量丰富^[3], 我国烟叶种植面积居世界首位, 因此, 对新鲜烟叶进行植物色素蛋白的提取分离, 并分析其中的多酚结合状态和抗紫外功能研究具有重要的意义。本研究在前期研究的基础上^[3], 从工业化生产角度出发采用等电点沉降法和硫酸铵沉降法分离烟草色素蛋白, 产品喷雾干燥后, 对其中的多酚类化合物进行分析检测, 并进一步推测其抗紫外作用机理。

作者简介: 林晓婕, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品资源开发与利用。E-mail: moon1208@163.com。* 通信作者, E-mail: fuhong7766@gmail.com

收稿日期: 2010-01-24

修回日期: 2010-06-09

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试烤烟品种为 K326。绿原酸、芸香苷、莨菪萜、咖啡酸为标准品 (Sigma 公司); 甲醇、乙腈为 HPLC 专用试剂 (Merck 公司); 二氯甲烷为 HPLC 专用试剂 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 水经 Milli-Q50 (美国 Millipore 公司) 超纯水仪处理, 电阻率不小于 180 kΩ·m; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

B-290 Mini 喷雾干燥机 (美国 BÜCHI 公司); OD1012 型空气压缩机 (美国巨霸 PUMA 基因台湾合正机公司); CR22G II 高速离心机 (日本 HITACHI 公司); LAMBDA35 紫外可见分光光度计 (美国 PE 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 烟草色素蛋白复合物的提取 烟草中的蛋白包括 rubisco [$>50\%(w/w)$] 和 rubisco activase, 各自的等电点分别为 pH 5.9 和 pH 5.1。烟草蛋白在磷酸盐缓冲液 pH 为 4.9~6.2 之间时, 可通过等电点沉降获得^[3-5]。因此选取 pH 4.5 (rubisco 和 rubisco activase) pH 5.0 (rubisco activase) pH 5.3 (rubisco) 3 个值, 沉降烟草蛋白。

烟草经过清洗, 按料液比为 1:4 加入预冷的 0.067 M pH 7.77 的磷酸盐缓冲液, 粉碎后, 在 4 °C 条件下浸提 16 h, 纱布过滤, 离心 (离心条件: 在 10 000 r/min, 4 °C 条件下离心 20 min; 以下离心条件均与此相同), 取上清液, 分别调节 pH 为 4.5、5.0、5.3, 等电点沉降 4 h, 再次离心, 分别获得 pH 4.5 沉降的 TPP (TPP1) pH 5.0 沉降的 TPP (TPP2) pH 5.3 沉降的 TPP (TPP3), 取沉淀复溶于缓冲液, 进行喷雾干燥 (气流压力为 30 mm), 进口温度为 95 °C, 抽气速率为 100%, 泵速率 4%。

提取的上清液, 25%硫酸铵盐溶 4 h 离心, 再 85%硫酸铵盐析 4 h, 再次离心, 得到 85%硫酸铵沉降的 TPP (TPP4), 取沉淀复溶于缓冲液后, 置于

透析袋 (截留分子量为 3 500 Da) 中, 用缓冲液透析至无硫酸铵盐, 然后进行喷雾干燥。

1.3.2 烟草色素蛋白复合物的蛋白含量测定 采用考马斯亮蓝法^[6]。

1.3.3 烟草色素蛋白复合物的多酚类物质的提取和检测 提取烟草色素蛋白复合物中的总酚酸, 称取约 0.1 g 的 TPP 粉末样品, 加入 20 mL 体积分数为 80%的甲醇水溶液, 加热回流 40 min, 冷却, 过滤并定容到 25 mL^[7-8], Folin-Ciocalteus 法测定, 以没食子酸为标样制标准曲线, 总酚含量用没食子酸当量 GAE (gallic acid equivalent) 表示^[9]。

将复溶的烟草色素蛋白溶液置于透析袋 (截留分子量为 3 500 Da) 中, 用缓冲液透析 5~8 次至经 Folin-Ciocalteus 法检测透析液中无多酚, 透析后进行喷雾干燥, 同上述条件提取、测定的酚含量称为结合酚。总酚酸与结合酚的差值即自由酚。

提取烟草色素蛋白复合物中总酚酸, 用 40 μm 的滤膜过滤, 用于 HPLC 分析。高效液相色谱仪: Agilent-1100 配有紫外检测器 (UV); 色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (4.6 × 15 mm); 柱温为 40 °C。流动相为 0.1% 的甲酸 (A) 与乙腈 (B) 的混合溶液。线性梯度程序 0~10 min, 流动相 B 由 10% 上升到 38%; 10~11 min, 流动相 B 由 38% 上升到 95%; 11~16 min, 流动相 B 为 95%; 16~20 min, 流动相 B 由 95% 降至 10%; 20~25 min, 流动相 B 为 10%; 流速为 0.8 mL/min。根据标准品出峰时间及最大吸收波长^[11], 检测波长程序 0~6 min 327 nm 6~7 min 324 nm; 7~8 min, 356 nm; 8~25 min, 345 nm; 进样体积为 10 μL^[7-16]。

1.3.4 烟草色素蛋白复合物的抗紫外活性测定 称取一定量的 TPP 样品, 溶解于缓冲液中, 在 200~1 100 nm 下做光谱扫描, 获取可见-紫外吸收光谱特征图谱。

分别称取一定量的 TPP 样品, 缓冲液定容并稀释为 10 mg/mL, 在 280、320、360 及 400 nm 下, 测定吸光度。同时, 扫描 TPP 的最大吸收波长, 并

在该波长下测定吸光度。同时,另取样品置于普通日光下照射,每隔 0.5 h 进行一次紫外光谱扫描,观察 TPP 在 280、320、360、400 nm 以及最大吸收波长下的吸光度变化^[17]。

2 结果与讨论

2.1 烟草色素蛋白复合物的蛋白质含量

图 1 显示了 pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降和硫酸铵沉降方法获得的烟草色素蛋白复合物蛋白含量,蛋白含量较一般的提取方法获得的植物蛋白含量低。这是由于为了使烟草色素蛋白复合物不产生变性、保持结构稳定以及抗紫外活性,提取过程没有将磷酸盐、半胱氨酸、EDTA 等缓冲液成分去除。85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物蛋白质含量最高,达 28.25%,明显高于等电点沉降法获得的烟草色素蛋白复合物的蛋白质含量。原因可能是等电点沉降法分离的主要是某一等电点的蛋白,同时蛋白质在等电点时仍有一定的溶解度且分离不完全;而 85%饱和度的硫酸铵溶液能使大部分的蛋白都发生沉淀。

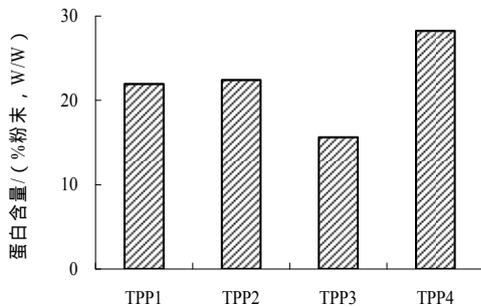


图 1 烟草色素蛋白复合物的蛋白含量

Fig.1 Protein content of tobacco pigments-protein powder
注: TPP1、TPP2、TPP3 分别代表 pH 4.5、5.0、5.3 沉降的烟草色素蛋白复合物; TPP4 代表 85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物。图 2、3 同。

2.2 烟草色素蛋白复合物中多酚类物质

2.2.1 Folin-Ciocalteus法测定烟草色素蛋白复合物的酚酸含量 图2显示了pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3沉降和硫酸铵沉降烟草色素蛋白复合物的酚酸含量及其分布。其中,pH 4.5沉降的TPP总酚含量最高,达31.41 mg/g粉末,略高于pH 5.0沉降的TPP(30.26 mg/g粉末),显著高于pH 5.3沉降以及硫酸铵沉降的

TPP。多酚类物质与蛋白以氢键、共价键、疏水作用等多种方式结合^[2],例如绿原酸等,pH等诸因素均能影响Rubisco与绿原酸等结合^[18]。烟草中多酚类物质易与Rubisco结合,氧化后的醌类聚合物与蛋白质形成不可逆结合。沉淀pH不仅影响了Rubisco的沉淀物的规则性,还影响了多酚与Rubisco结合的程度。在较高pH沉淀条件下,Rubisco缓慢形成有规则晶体,晶体形成过程中多酚与Rubisco结合少;较低pH沉淀条件下,Rubisco与多酚快速形成不规则絮状沉淀物,沉淀物结合多酚化合物明显增加^[18]。同时,pH升高可能会导致蛋白质基团离解所带来的静电斥力增加,从而是多酚酚羟基与蛋白的氢键结合减少^[2]。

植物中的多酚一般只有小部分是自由酚的形式存在的,大部分是与糖、酯、蛋白等结合的形式存在^[9]。图 2 还表明了烟草色素蛋白复合物中的多酚主要为结合酚,其中 85%硫酸铵沉降的 TPP 中多酚都以结合酚形式存在,原因是在透析除盐的过程中,自由酚也被除去。

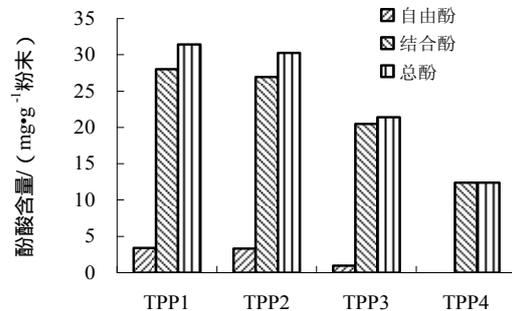


图 2 烟草色素蛋白复合物的酚酸含量及其分布

Fig.2 Phenolic acid content and distribution of tobacco pigments-protein

2.2.2 烟草色素蛋白复合物的多酚类物质

图 3 显示了 pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降和硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物中 4 种多酚的含量。其中,在等电点沉降的烟草色素蛋白复合物均以芸香苷含量最高,pH 4.5 沉降的烟草色素蛋白复合物芸香苷含量高达 2.837 mg/g 粉末;在 85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物中咖啡酸含量较绿原酸、咖啡酸和茛菪萆高。

2.3 烟草色素蛋白复合物的抗紫外活性

2.3.1 烟草色素蛋白复合物的可见-紫外光谱分析

图 4 表明,烟草色素蛋白复合物在 UVA (320~400nm)、UVB (290~320 nm) 和 UVC (200~290 nm) 均有很好的紫外吸收。这是由于烟草色素蛋白复合物中的蛋白和多酚都具有紫外吸收的功能。同时,多种多酚由于其各自的吸收带不同,因此产生了较宽的紫外吸收域。

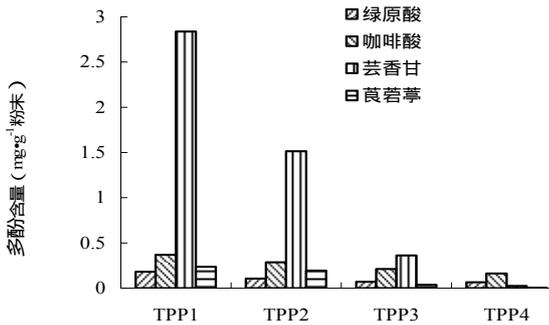


图 3 烟草色素蛋白粉末中多酚类物质组成
Fig.3 Composition of polyphenols of tobacco pigments-protein powder

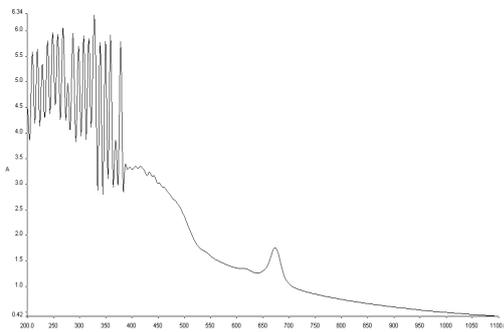


图 4 烟草色素蛋白的可见-紫外图谱
Fig.4 UV-VIS spectrum of tobacco pigments-protein

2.3.2 等电点沉降法和硫酸铵沉降法获得的烟草色素蛋白复合物的可见-紫外光谱分析 从表 1 看出,烟草色素蛋白复合物在紫外区域多具有良好吸收性能,其抗紫外性能除了与蛋白含量有关以外,还与酚酸含量有关。

蛋白质的紫外吸收在 280 nm 达到最大值,多酚吸收带 II 出现在 240~280 nm^[2,19]。因此等电点沉降和硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物在 280 nm 均有较好的紫外吸收。85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物在 280 nm 吸收最低,其蛋白质含量最高,酚酸最低,因此酚酸在 280 nm 紫外吸收中扮演的重要角色不容忽视。黄酮醇类多酚的吸收带 I

表 1 烟草色素蛋白复合物的紫外吸收

TPP	相应波长下的吸光度值				
	λ_{280}	λ_{320}	λ_{360}	λ_{400}	λ_{max}
TPP1	5.98	5.95	5.90	3.30	6.34
TPP2	5.48	5.30	5.10	2.90	6.33
TPP3	4.91	4.52	3.85	2.85	5.70
TPP4	4.45	2.75	2.15	1.40	4.66

注: TPP1、TPP2、TPP3、TPP4 的 λ_{max} 分别为 λ_{324} 、 λ_{324} 、 λ_{260} 、 λ_{250} 下同。

出现在 354~387 nm 处^[2]。因此,等电点沉降的烟草色素蛋白复合物在 320~400 nm 的紫外吸收表现出与芸香苷等黄酮醇类多酚含量呈量效关系,以 pH 4.5 沉降的烟草色素蛋白复合物吸光度值最高。85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物的芸香苷等黄酮醇类多酚含量较低,因此 320~400 nm 吸光度明显下降。故 pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降和硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物具有防 UVC 紫外线的作用,对 UVA 和 UVB 的防护作用略低于 UVC。同时,烟草色素蛋白复合物在整个紫外区域(200~400 nm)均有较好的吸收,具有广谱防晒性能。

2.3.3 烟草色素蛋白复合物的可见-紫外光谱与日照时间关系分析 表 2 看出,在紫外区域(280 nm、320 nm、360 nm、400 nm)及紫外最大吸收波长处,pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降和硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物随日照时间的增加,吸光值均无明显变化,说明烟草色素蛋白复合物在紫外区具有较强的稳定性。

3 小结

多酚作为植物体内的次生产物,除了抗菌作用以外,还因其紫外吸收特性将日光的强紫外辐射转化为危害较少的辐射,因此被称为植物体内的“紫外过滤器”^[2]。pH 4.5、pH 5.0、pH 5.3 沉降的烟草色素蛋白复合物总酚酸含量高,其中 pH 4.5 沉降的烟草色素蛋白复合物的总酚酸含量最高,85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物总酚酸含量低。因此,虽然 pH 4.5 沉降的烟草色素蛋白复合物的蛋白含量较低,但抗紫外活性最强;85%硫酸铵沉降的烟草色素蛋白复合物的蛋白含量最高,抗紫外活性最弱。实验证明,与蛋白含量相比,烟草色素蛋白复合物中酚酸含量对其紫外吸收起主要作用。同时,烟草色素蛋白复合物中的多酚主要为结合酚,

表 2 烟草色素蛋白复合物的紫外吸收稳定性试验

Table 2 Stability of UV absorption of tobacco pigments-protein

TPP	时间/h	相应波长下的吸光度值				
		λ_{280}	λ_{320}	λ_{360}	λ_{400}	λ_{max}
TPP1	0	5.98	5.95	5.90	3.30	6.34
	0.5	5.98	5.95	5.87	3.05	6.19
	1	5.98	5.95	5.87	2.97	6.09
	1.5	5.98	5.95	5.87	2.95	6.09
	2	5.98	5.95	5.87	2.90	6.09
	2.5	5.98	5.95	5.87	2.90	6.09
	3	5.98	5.95	5.87	2.90	6.09
TPP2	0	5.48	5.30	5.10	2.90	6.33
	0.5	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
	1	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
	1.5	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
	2	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
	2.5	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
	3	5.48	5.30	5.00	2.82	6.22
TPP3	0	4.91	4.52	3.85	2.85	5.70
	0.5	4.81	4.35	3.85	2.73	5.58
	1	4.76	4.27	3.85	2.70	5.58
	1.5	4.76	4.27	3.85	2.70	5.58
	2	4.76	4.27	3.85	2.70	5.58
	2.5	4.76	4.27	3.85	2.70	5.58
	3	4.76	4.27	3.85	2.70	5.58
TPP4	0	4.45	2.75	2.15	1.40	4.66
	0.5	3.85	2.73	2.15	1.35	4.66
	1	3.85	2.71	2.15	1.35	4.66
	1.5	3.85	2.70	2.15	1.35	4.66
	2	3.83	2.70	2.15	1.35	4.66
	2.5	3.83	2.69	2.15	1.35	4.66
	3	3.75	2.69	2.15	1.35	4.66

只有少量以自由酚形式存在。烟草色素蛋白复合物中的多酚类物质主要为芸香苷、咖啡酸、绿原酸、茛菪萜等,这与烟草中的多酚类物质构成基本是相同的^[10-11,15,17]。在长时间的日光照射试验中,烟草色素蛋白复合物的抗紫外性能表现稳定,这可能与多酚和蛋白的结合有关。同时,烟草蛋白结合了多种多酚类物质,产生了较宽的紫外吸收域,并且添加剂量少能产生较强的吸收能力。因此,烟草色素蛋白复合物可以开发为广谱防晒的天然紫外吸收剂,起到减少因日晒引起的皮肤黑色素的形成、防止皮肤老化的作用。

参考文献

- [1] 石碧,狄莹.植物多酚[M].北京:科学出版社,2001:134-137.
- [2] 董云发,凌晨.植物化妆品及配方[M].北京:化学工业出版社,2005:11-192.
- [3] FU H, MACHADO P A, HAHM T S, et al. Recovery of nicotine-free proteins from tobacco leaves using phosphate buffer system under controlled conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2009(10): 1016-1025.
- [4] KOMATSU S, MASUDA T, HIRANO H. Rice gibberellin-binding phosphoprotein structurally related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [J]. *FEBS Lett*, 1996, 384(2): 167-171.
- [5] NELSON P E, SURZYCKI S J A. Mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii* exhibiting altered ribulosebisphosphate carboxylase [J]. *Eur. J. Biochem.* 1976, 61(3): 465-474.
- [6] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2002:1-74.
- [7] 张甜,董学畅,吴方评,等.固相萃取-高效液相色谱法测定烟草样品中10种多酚[J].*分析化学研究简报*, 2005, 33(3): 359-362.
- [8] 王岚,方瑞斌,李忠,等.固相萃取-高效液相色谱法测定烟草样品中主要的植物多酚[J].*色谱*, 2001, 19(6): 564-566.
- [9] 徐贵华,胡玉霞,叶兴乾,等.椴柑、温州蜜桔果皮中酚类物质组成及抗氧化能力研究[J].*食品科学*, 2007, 28(11): 171-175.
- [10] JUAN J, CAMACHO C, LORETO L, et al. Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161(7): 879-881.
- [11] TORIKAIU K, UWANO Y, NAKAMORI T, et al. Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43(4): 559-568.
- [12] SCHNABLOVAA R, SYNKOVA H, VICANKOVAC A, et al. Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins over accumulates phenolic compounds during in vitro growth [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(10): 526-534.
- [13] SHARAN M, TAGUCHI G, GONDA K, et al. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures [J]. *Plant Science*, 1998, 132(1): 13-19.
- [14] SOCHA R, JUSZCZAK L, PIETRZYK S, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(2): 568-574.
- [15] LIU Q, CAI W S, SHAO X G. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration [J]. *Talanta*, 2008, 77(2): 679-683.
- [16] WANG H, ZHAO M, YANG B, et al. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(4): 1399-1406.
- [17] 杜宁,高天翔,缪锦来,等.4种南极冰藻中抗紫外辐射活性化合物类菌胞素类氨基酸(MAAs)的初步研究[J].*中国海洋药物杂志*, 2007, 26(4): 5-10.
- [18] 张劲松,高学云,黄镇,等.沉淀pH值对烟草Rubisco结晶的影响[J].*中国烟草科学*, 1997, 18(2): 1-5.
- [19] 张培成.黄酮化学[M].北京:化学工业出版社,2009:227-230.