

文章编号:1001-6880(2014)3-0398-05

几种天然有机多酚酸体外抗脂质过氧化研究

张晓晓, 张硕, 黄晓燕, 李刚, 王振华, 马成俊*

烟台大学生命科学学院, 烟台 264005

摘要:通过天然有机多酚酸对H₂O₂诱导小鼠肝匀浆脂质过氧化和自发脂质过氧化的保护作用的体外实验,比较研究绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、阿魏酸、丹参素、原儿茶醛和3-羟基肉桂酸体外抗氧化能力的强弱,探讨其抗氧化能力产生机理及构效关系。结果表明,7种多酚酸对H₂O₂诱导小鼠肝匀浆脂质过氧化的保护作用强弱依次为迷迭香酸>咖啡酸>原儿茶醛>绿原酸>阿魏酸>丹参素>3-羟基肉桂酸,其最大和最小抑制率相差2.4倍;对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的抑制率大小顺序为迷迭香酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、丹参素、3-羟基肉桂酸,最高和最低抑制率相差近90%。7种天然有机酸抗脂质过氧化作用因化合物结构不同存在显著差异。

关键词:天然有机多酚酸; 脂质过氧化; 抗氧化能力; 构效关系

中图分类号:R931.6

文献标识码:A

Anti-lipoperoxidation of Several Organic Polyphenol Acids *in vitro*

ZHANG Xiao-xiao, ZHANG Shuo, HUANG Xiao-yan, LI Gang, WANG Zhen-hua, MA Cheng-jun*

College of Life Science, Yantai University, Yantai, 264005, China

Abstract: The natural polyphenol acids are reported to possess strong antioxidative activity. In this study, the effects of seven polyphenol acids including rosmarinic acid, caffeic acid, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, ferulic acid, salvianic acid and 3-hydroxycinnamic acid, against lipid peroxidation *in vitro* were investigated. The thiobarbituric acid (TBA) assay was used to evaluate the spontaneous and H₂O₂ induced lipid peroxidation in rat-liver homogenate. The results showed that all seven polyphenol acids possessed strong anti-lipid peroxidation activities. The order of their activities against H₂O₂ induced-lipid peroxidation was rosmarinic acid > caffeic acid > protocatechuic aldehyde > chlorogenic acid > ferulic acid > salvianic acid > 3-hydroxycinnamic acid. The order of their activities against spontaneous lipid peroxidation was rosmarinic acid > protocatechuic aldehyde > chlorogenic acid > caffeic acid > ferulic acid > salvianic acid > 3-hydroxycinnamic acid. The anti-lipid peroxidation of seven kinds of organic acid existed significant differences for their different structure.

Key words: natural organic polyphenolic acids; lipid peroxidation; antioxidant capacity; structure-activity relationship

天然有机多酚酸类化合物广泛存在于植物中,是一类具有多个酚羟基化合物的植物次生代谢产物的总称^[1]。植物多酚类化合物具有很好的抗氧化性能和显著的清除自由基能力,在延缓机体衰老、抗癌、抗艾滋病、抗辐射、预防心血管病等方面表现出很好的药理效应^[2,3]。另外,作为天然的抗氧化剂,天然多酚类化合物在食品、化妆品、电化学等很多领域也被广泛应用^[4]。目前关于植物多酚类物质的

研究大多集中在茶多酚、苹果多酚、葡萄多酚等方面。本实验对来源于中药金银花、丹参和当归的几种多酚化合物绿原酸、咖啡酸、原儿茶醛、丹参素、阿魏酸、迷迭香酸和3-羟基肉桂酸,采用生物组织和化学模拟体系评价其抗脂质过氧化活性,探索多酚类化合物消除自由基的机理以及与结构的关系,为进一步开发和利用富含天然多酚酸的中药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象

绿原酸和3-羟基肉桂酸来源于金银花(*Lonicera*

收稿日期:2013-03-25 接受日期:2013-06-13

基金项目:山东省优秀青年科学家奖励基金项目(2006BS01226); 山东省自然基金项目(ZR2009BM027); 山东省优秀青年科学工作者奖励基金项目(BS2012YY039)

* 通讯作者 E-mail:chengjun-ma@163.com

japonica Thunb.) ; 咖啡酸、原儿茶醛、迷迭香酸、丹参素来源于丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) ; 阿魏酸来源于当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] , 均由

烟台大学生物工程系生物制药教研室分离获得, 纯度均大于 98%。化学结构见图 1。

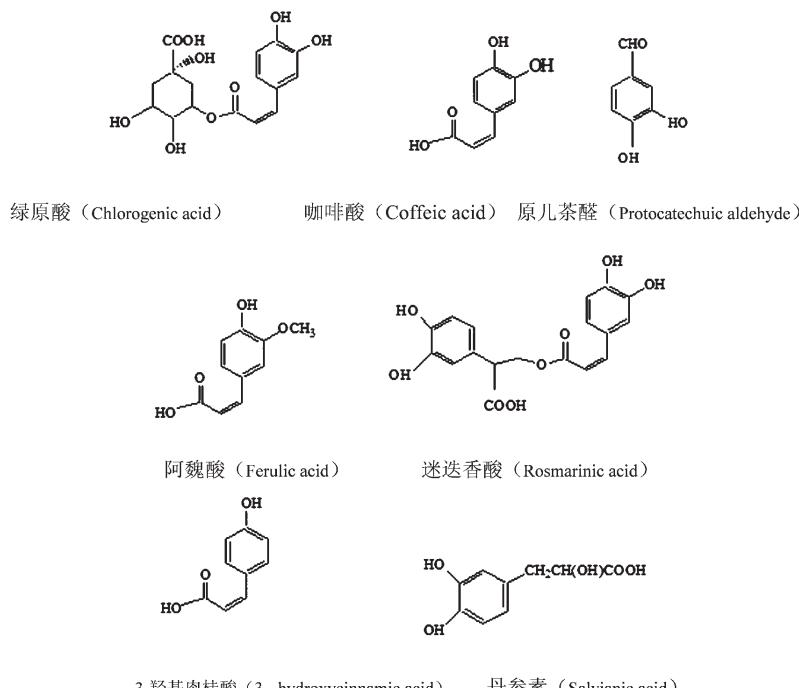


图 1 有机多酚酸化合物结构

Fig. 1 Chemical structures of organic polyphenol acids

1.1.2 主要试剂

无水乙醇、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 H_2O_2 、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、硫酸亚铁均为国产分析纯。氯化钠注射液购于山东齐都药业有限公司。

1.1.3 动物

清洁级昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 雄性, 购自山东绿叶制药有限公司, 许可证号: SYXK(鲁)20030020。

1.1.4 主要仪器

721 型可见分光光度计(上海菁华科学仪器有限公司); HG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 数显电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠肝组织匀浆的制备

小鼠禁食 24 h 后, 颈椎脱臼处死, 迅速解剖取出肝脏, 称重后在冰冷的生理盐水中进行研磨, 制成 1% 的肝组织匀浆液, 于冰箱中备用。

1.2.2 供试样品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、咖啡酸、3-羟基肉桂酸、

原儿茶醛、迷迭香酸、丹参素、阿魏酸适量, 用去离子水溶解制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液。然后用磷酸盐缓冲液 (pH = 7.40) 以 2 倍梯度稀释, 分别制得 100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 放入冰箱中备用。

1.2.3 对小鼠肝组织自发脂质过氧化的影响

脂质过氧化物是由氧自由基引发的多不饱和脂肪酸发生过氧化反应的产物, 此类产物可进一步分解, 产生大量的醛类、醇类和烃类物质。醛类物质中以丙二醛(MDA)最具代表性, 其含量可反映被测体系中脂质过氧化作用的强度。硫代巴比妥酸法测定脂质过氧化物的原理是基于一分子丙二醛可与两分子硫代巴比妥酸发生缩合反应, 在酸性条件下形成在波长 532 nm 处有最大吸收的红色化合物, 其 OD 值的高低可间接表征物质的抗脂质过氧化活性, OD 值越小, 表明物质的抗脂质过氧化能力越强。反之, 则抗脂质过氧化能力越弱^[4]。

取 1.2.1 所述肝组织匀浆液 1.0 mL 和不同浓度 (100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的供试样品溶液 0.2 mL, 以磷酸盐缓冲液代替样品作为对

照组, 置于试管中, 37 ℃恒温水浴 12 h 后, 加入 25% 三氯乙酸溶液 1.0 mL 终止反应, 混匀后再加 0.67% 硫代巴比妥酸 1.0 mL, 沸水浴加热 15 min, 以 5000 rpm 离心 15 min 去除蛋白质沉淀后, 在波长为 532 nm 处测定 OD 值(磷酸盐缓冲液调零)。计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.2.4 对 H₂O₂ 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护作用

取 1.2.1 所述肝组织匀浆液 1.0 mL 和不同浓度(100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6 μg/mL)的供试样品溶液 0.2 mL, 置于试管中, 再加入 0.01 mol/L 的 FeSO₄ 溶液 0.1 mL 和 0.1 mol/L 的 H₂O₂ 溶液 0.1 mL, 模型组以生理盐水替代样品溶液, 对照组以生理盐水替代样品溶液及 FeSO₄ 溶液和 H₂O₂ 溶液, 37 ℃恒温水浴 1 h 后, 加入 25% 三氯乙酸 1.0 mL 终止反应, 再加入 0.67% 的硫代巴比妥酸溶液 1.0 mL, 于沸水浴中显色 15 min, 5000 rpm 离心 15 min, 取上清液, 于波长 532 nm 处测定 OD 值。计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{模型}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{模型}}} \times 100\%$$

1.2.5 还原能力的测定

总还原力的测定也称降低能量, 当该体系中存在抗氧化物时, 可将赤铁(K₃[Fe(CN)₆]₆)还原为黄铁[K₃Fe(CN)₆], 使溶液变为普鲁士蓝, 700 nm 处有最大吸光值。吸光值越大, 表明样品的还原能力越强^[5]。按 1.2.2 方法将样品配制成不同质量浓度的水溶液。各取 2.5 mL 置于试管中, 依次加入 pH 值 6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 mL 和 1.0% 铁氰化钾溶液 2.5 mL, 混合均匀后于 50 ℃水浴中保温 20 min, 冷却后加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL, 振荡混匀。取反应液 5 mL, 加蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% FeCl₃ 0.5 mL, 室温下避光反应 40 min 后于波长 700 nm 处测定 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 结果与分析

2.1.1 对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的影响

试验结果见图 2。由图 2 可知, 7 种有机多酚酸均对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化具有一定的保护作用, 当浓度低于 10 μg/mL 时, 其抑制率随浓度的

变化很大, 其中原儿茶醛、阿魏酸、咖啡酸、丹参素基本呈线性关系, 以后随着浓度的增加, 抑制率增长趋势放缓; 7 种化合物中, 以迷迭香酸的抑制率最高, 在浓度为 1.60 μg/mL 时, 其抑制率已达 39.8%, 当浓度为 12.5 μg/mL 时, 其抑制率为已达 54.5%, 表现出极强的保护作用。阿魏酸、咖啡酸和丹参素作用非常相近, 当样品浓度为 12.0 μg/mL 左右时, 其抑制率分别为 32.1%、24.1% 和 22.3%; 当样品浓度为 50.0 μg/mL 时, 其抑制率分别为 36.1%、38.4% 和 36.3%, 接近各自的最高抑制率水平。比较 7 种有机多酚酸化合物的最大抑制率差异, 以迷迭香酸(58.2%)最高, 原儿茶醛(50.1%)和绿原酸(46.9%)次之, 咖啡酸(39.0%)、阿魏酸(38.8%)和丹参素(36.4%)相近, 3-羟基肉桂酸(32.2%)最小。最高和最低抑制率相差近 90%, 表明 7 种天然有机多酚酸化合物对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的保护作用存在明显的差异。

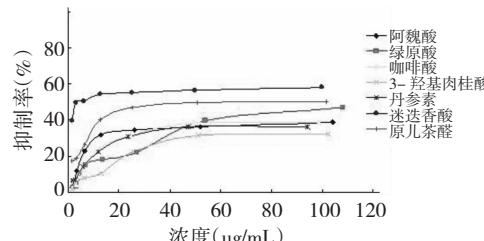


图 2 对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的影响

Fig. 2 Effects of the 7 investigated polyphenol acids on rat-liver spontaneous lipid peroxidation

2.1.2 对 H₂O₂ 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护作用

试验结果见图 3。由图 3 可知, 7 种天然有机多酚酸均对 H₂O₂ 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化具有较好的保护作用。由于化合物结构不同, 保护作用呈现明显的差异, 按照最大抑制率排序, 依次为迷迭香酸(99.0%)>咖啡酸(98.9%)>原儿茶醛(98.3%)>绿原酸(90.0%)>阿魏酸(83.2%)>丹参素(54.3%)>3-羟基肉桂酸(42.1%), 其最大和最小抑制率相差 2.4 倍。值得注意的是, 和对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的保护作用一样, 迷迭香酸、原儿茶醛、咖啡酸和绿原酸在对 H₂O₂ 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护中也同样表现优异, 最大抑制率都在 90% 以上, 其中以迷迭香酸最为突出, 在浓度 1.6 μg/mL ~ 25.0 μg/mL 浓度范围内, 抑制率变化明显, 并呈一定的量效关系, 浓度为

25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其抑制率已达 83.0%, 当浓度为 49.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其抑制率已达 98.7%, 接近最大值。

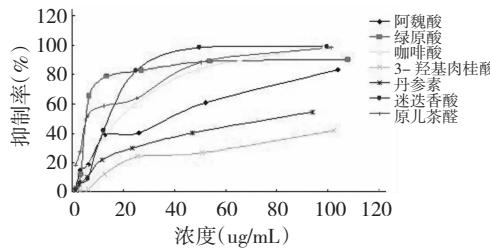


图 3 对 H_2O_2 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护作用

Fig. 3 Protective effects of the 7 investigated polyphenol acids on H_2O_2 induced lipid peroxidation

2.1.3 总还原力测定结果

7 种有机多酚酸的总还原力测定结果见图 4。由图 4 可知, 7 种化合物溶液的吸光度随溶液浓度的增加而增大, 在溶液浓度低于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 吸光度均呈现明显的线性关系, 表明 7 种天然有机多酚化合物均具有一定的还原能力。化合物的结构不同, 其还原能力存在一定的差异, 相同浓度条件下, 原儿茶醛的吸光值最大, 表明其还原能力最强, 咖啡酸、丹参素、迷迭香酸和绿原酸次之, 四者之间差别不明显, 阿魏酸和 3-羟基肉桂酸最弱。相同浓度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 条件下, 原儿茶醛的吸光度 (1.632) 是 3-羟基肉桂酸 (0.772) 的 2.1 倍, 表明化合物的还原能力存在明显的差异。

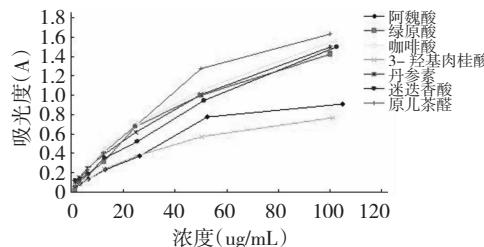


图 4 总还原能力测定

Fig. 4 Determination of total reducing power of the 7 investigated polyphenol acids

2.2 讨论

近年来的研究表明, 酚类化合物苯环上的邻二酚羟基是其抗氧化、清除自由基的主要活性部位^[6], 酚类化合物的一个酚羟基被自由基氧化, 生成半醌式自由基结构, 由于邻二酚羟基的存在, 其半醌式结构相对稳定, 抗氧化能力随邻位酚羟基数目增多而增强, 从丹参中分离获得的丹酚酸 B、丹参

素、原儿茶醛和咖啡酸的体外抗氧化试验研究结果验证了这种构效关系^[7]。分析绿原酸、咖啡酸、3-羟基肉桂酸、迷迭香酸、丹参素、原儿茶醛和阿魏酸 7 种化合物化学结构表明, 共同特点是都在苯环上含有不同数目的酚羟基。迷迭香酸是由两个二羟肉桂酸(咖啡酸)聚合而成的酯, 在苯环上含有 2 对邻二酚羟基, 原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸和丹参素在苯环上还有 1 对邻二酚羟基, 阿魏酸和 3-羟基肉桂酸在苯环上无邻二酚羟基, 抗脂质过氧化实验结果表明, 以迷迭香酸最强, 原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸和丹参素相近, 3-羟基肉桂酸最弱, 咖啡酸和 3-羟基肉桂酸结构差异是在苯环上多了一个酚羟基, 但抗 H_2O_2 诱导的小鼠肝脏脂质过氧化和总还原力相差近两倍, 以上结果进一步验证了酚类化合物苯环上的邻二酚羟基的有无和数量是决定酚类化合物抗氧化、清除自由基的活性大小的关键。比较苯环上其它连接基团不同造成的抗氧化活性差异, 原儿茶醛在苯环上连接醛基, 咖啡酸连接丙烯酸基, 丹参素连接羟丙酸基, 三者均有邻二酚羟基的结构, 但原儿茶醛和咖啡酸的抗氧化活性要强于丹参素, 这可能是苯环上醛基、丙烯酸基的存在增加和延长了共轭结构, 有利于电子云的均匀分布, 邻二酚羟基被自由基氧化形成的半醌自由基较稳定, 有利于氧化链式反应的中断^[8]。阿魏酸结构比较特殊, 没有邻二酚羟基结构, 而是在苯环酚羟基的邻位连接一个氧甲基, 其抗氧化活性要强于 3-羟基肉桂酸, 可能是氧甲基上孤电子对的存在有利于酚羟基被氧化后电子云的均匀分布, 形成较为稳定的醌式结构。

通过上述对化合物结构和抗脂质过氧化活性分析可以看出, 酚类化合物苯环上的邻二酚羟基是其抗氧化、清除自由基的主要活性部位; 苯环上共轭结构的增加和酚羟基邻位吸电子基团的存在, 能够增加酚羟基被自由基氧化形成的半醌自由基的稳定性, 从而增强酚类化合物消除自由基的能力。

3 结论

本实验采用化学模拟和生物组织体系对绿原酸、咖啡酸、3-羟基肉桂酸、迷迭香酸、丹参素、原儿茶醛和阿魏酸 7 种不同结构的天然有机多酚酸进行了脂质抗氧化作用评价。实验表明, 对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化的试验中, 以迷迭香酸的抑制率最高, 原儿茶醛次之, 接下来依次为绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和丹参素, 相互之间差异不显著, 最小为 3-

羟基肉桂酸,最高和最低抑制率相差近90%;对H₂O₂诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护作用也存在很大的差异,按照最大抑制率排序,依次为迷迭香酸>咖啡酸>原儿茶醛>绿原酸>阿魏酸>丹参素>3-羟基肉桂酸,其最大和最小抑制率相差2.4倍;铁氰化钾还原法测定总还原力结果显示,原儿茶醛、迷迭香酸、绿原酸、咖啡酸和丹参素均表现出较强的还原能力,相互之间差异不显著,阿魏酸和3-羟基肉桂酸还原能力较弱,相同浓度(100 μg/mL)条件下,还原能力最强的原儿茶醛和最弱的3-羟基肉桂酸相差近2.1倍,与对小鼠肝脏组织自发脂质过氧化和H₂O₂诱导的小鼠肝脏脂质过氧化的保护作用试验结果基本一致。

参考文献

- 1 Sun DW(孙达旺). Plant Tannins Chemical(植物单宁化学). Beijing: China Forestry Publishing House, 1992. 178-179.
- 2 Tian H(田卉), Ma JH(马建慧), Zhang M(张梅), et al. Anti lipid peroxidation *in vitro* of Pomegranate husk. *Pharm Clin Chin Mat Med*(中药药理与临床), 2009, 25:69-70.

- 3 Sun H(孙宏), Zhang Z(张泽). Progress on the determination of natural polyphenols by spectrophotometric analysis. *Bio Chem Eng*(生物质化学工程), 2008, 42:55-58.
- 4 Song LJ(宋立江), Di Y(狄莹), Shi B(石碧). The significance and development trend in research of plant polyphenols. *Prog Chem*(化学进展), 1998, 27:6-18.
- 5 Zhao WH(赵文红), Deng ZY(邓泽元), Fan YW(范亚苇), et al. Research on antioxidant properties of catechinic acid *in vitro*. *Food Sci Tech*(食品科技), 2009, 34: 278-282.
- 6 Yuan CY(袁从英), Xiong C(熊晨), Guo HC(郭会彩), et al. Effect of semen plantaginis polysaccharides on anti-lipid peroxidation. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2009, 29: 1202-1203.
- 7 Liu M(刘梅), Xia XH(夏鑫华), Zhang ZM(张志敏), et al. Comparison and study on the antioxidant activity of salianic acid, protocatechuic aldehyde, coffee acids and salvianolic acid B. *J Chin Med Mat*(中药材), 2009, 32:265-267.
- 8 Wang H(王虹), Liu M(刘敏), Gu JX(顾建祥), et al. Antioxidant activity of rosemary acid on D-galactose induced aging mice. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2009, 29: 549-551.

(上接第387页)

- 4 Nie QR(聂琼蝶). Research recent situation of the Pharmacokinetics and pharmacologic action of HSYA. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2003, 14:503-505.
- 5 Zhang XX(张晓霞), Na R(娜仁). Analysis on safflower quality. *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2012, 24:392-394.
- 6 Wang HQ, Xie MY, Boqiang F. Determination of yellow pigments in safflower(*Carthamus tinctorius* L.) by RP-HPLC. *J Anal Sci*, 2005, 21:408-410.
- 7 Lu XY(陆仙芸), Lin DJ(林德君), Xu SL(徐升亮). Determination of HSYA in safflower yellow for injection by HPLC. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药), 2008, 24:65-66.
- 8 Tu PF(屠鹏飞), Zhao MB(赵明波), Deng XL(邓秀兰), et al. Determination of hydroxy safflower yellow A in *Carthamus tinctorius* L. by high performance liquid chromatography.

Chin J Chromatogr(色谱), 2003, 21:593-595.

- 9 Wouters J, Grzywacz CM, Claro A. Markers for identification of faded safflower (*Carthamus tinctorius* L.) colorants by HPLC-PDA-MS: Ancient fibres, pigments, paints and cosmetics derived from antique recipes. *Studies in Conservation*, 2010, 55:186-187.
- 10 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol II.
- 11 Hu XW(胡晓炜). Qualitative and quantitative determination of illegally added acid orange II in Croci Stigma by UPLC. *China Pharm*(中国药业), 2011, 20(14):40-41.
- 12 Jiang L(蒋磊), Meng XS(孟祥松), Ji FJ(姬凤娟). Detection of orange II in nvbao capsule by HPLC-DAD method. *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2011, 15:437-438.