技术与方法 文章编号：0253-3626(2011)03-0319-04

没食子酸体外抗氧化作用研究

谢晓艳[1]，刘洪涛[2]，张　吉[1]，李秀英[1]，李文明[1]，于　超[1]

（1. 重庆医科大学生命科学研究院，重庆　400016；2. 中国科学院大连化学物理研究所，大连　116023）

【摘　要】目的：通过对没食子酸（Gallic acid，GA）在体外清除自由基能力的评价，为其抗氧化应用提供实验依据。方法：采用分光光度比色法，分别测定药物对 2,2- 联苯 -1- 苦基肼（2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl，DPPH）自由基、过氧化氢和羟自由基的清除作用，以及对脂质过氧化的抑制作用，采用 Griess 法测定药物对一氧化氮的清除作用。并与公认的自由基清除剂维生素 C（Vitamin C，Vc）同时实验进行比较。结果：GA 在所选浓度范围内（5~50 μg/ml）对 DPPH 自由基就有明显的清除作用，清除率为（20.65 ± 2.67）%~（87.98 ± 4.12）%，明显高于 Vc 的清除作用，并呈一定的浓度依赖关系；对一氧化氮的清除率在所选浓度范围内 50~400 μg/ml 达到（10.45 ± 3.45）%~（40.43 ± 2.76）%，其清除能力很强，只是略低于 Vc；对羟自由基的清除率在所选浓度范围内（50~400 μg/ml）为（47.32 ± 3.26）%~（67.25 ± 2.99）%，其清除作用明显并且高于 Vc。而对过氧化氢清除作用并不明显。不同浓度的 GA 50~400 μg/ml 对脂质过氧化有抑制作用，抑制率为（48.65 ± 5.21）%~（80.03 ± 5.64）%，其抑制效应远远高于 Vc。结论：GA 在体外对不同自由基具有较强的清除能力，这可能是其在体内起到抗氧化作用的重要因素之一。

【关键词】没食子酸；抗氧化；自由基；清除率

【中国图书分类法分类号】R322.8　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2010-09-19

Study on the antioxidative activity of gallic acid in vitro

XIE Xiao-yan, et al

(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce the free radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of gallic acid in vitro and to obtain the experimental data of antioxidant activities. *Methods*: Using spectrophotometry, the effect of gallic acid in scavenging free radical ·OH, free radical ·2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl and H_2O_2 were determined. The antilipoperoxidative effect of gallic acid was also evaluated by spectrophotometry. The scanvenging level of NO was tested by Griess. The experiments were studied respectively and compared with vitamin c (Vc). *Results*: Gallic acid in the suitable concentration 5~50 μg/ml could scavenge 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl by (20.65 ± 2.67)%~ (87.98 ± 4.12)% in dose dependent manner. The scavenging capability of gallic acid for 2,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl was significantly higher than that of vitamin c. Gallic acid in the suitable concentration 50~400 μg/ml could scavenge NO by(10.45 ± 3.45)%~(40.43 ± 2.76)%, which was slightly lower than vitamin c. Gallic acid in the suitable concentration 50~400 μg/ml could scavenge hydroxylion by (47.32 ± 3.26)%~(67.25 ± 2.99)%, which was significantly higher than vitamin c. The capability of gallic acid for scavenging against H_2O_2 in vitro was weak. Gallic acid in various concentrations 50~400 μg/ml could inhibit lipid peroxidation effectively and the rate of inhibition was (48.65 ± 5.21)%~(80.03 ± 5.64)%, which was significantly higher than that of vitamin c. *Conclusion*: There is powerful scavenging effect of gallic acid against different free radicals in vitro. This might be one of the reasons for its antioxidant activities in vivo.

【Key words】gallic acid; anti-oxidant; free radical; scavenging rate

没食子酸（Gallic acid，GA），化学名 3,4,5- 三羟基苯甲酸（见图 1），分子量为 170.12，广泛存在于葡萄，茶叶、五倍花、刺云实豆荚等植物中。主要用于有机合成、医药、涂料、国防、食品、轻工业等领域。GA 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤的药理作用[1]。有研究证明 GA 通过抗氧化作用抑制小鼠红细胞溶血活性、抑制小鼠脑、肾匀浆脂质过氧化作用[2]；对心血管疾病有治疗作用[3]。然而对 GA 的体外抗氧化能力的评价还鲜有报道。为此，本文选用纯度为 98% 的 GA 单体，用超纯水配制成不同浓度的 GA 溶液，特别针对其体外对各种自由

作者介绍：谢晓艳（1985- ），女，硕士，研究方向：药理学。

通信作者：于　超，男，教授，Email：yuchaom@163.com。

基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTC，2009BA5083）；重庆医科大学重点基金资助项目（编号：XBED200806）。

基 [2,2- 联苯 -1- 苦基肼(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、H_2O_2 和羟自由基、NO 以及对脂质过氧化反应]的抑制效果进行考察,并与 Vc 这个公认的自由基清除剂做对比研究,以期为 GA 抗氧化作用的应用提供有价值的参考。

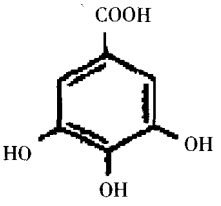


图 1 GA 的分子结构

1 材料和方法

1.1 材料

GA 购自上海同田生物技术有限公司。NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。DPPH、维生素 C(Vitamin C, Vc)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、亚麻酸、硝普钠、2- 脱氧核糖、硫氰酸铵、氯化亚铁、2- 硫代巴比妥酸(TBA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、三氯乙酸、抗坏血酸、过氧化氢购于阿拉丁试剂(中国)有限公司。其它试剂均为分析纯购于商业试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 体外有机自由基 DPPH 清除实验 参考文献[4]报道的方法,利用 DPPH 特征紫红色在 517 nm 处有特征吸收峰,用分光光度计测定加入 GA 后 517 nm 吸光度(A)的改变,以此表示其对有机自由基的清除能力。反应体系含 200 μl 的 90 μmol/L DPPH 与不同浓度 GA 200 μl (空白对照用 200 μl 去离子水替代)用甲醇补足体系至 1 ml(GA 终浓度与阳性对照 Vc 采用相同的浓度分别为 5、10、30、50 μg/ml)。室温避光反应 1 h,光度计用甲醇调零,在 517 nm 检测吸光度,包括空白对照 Ab 和样本 As。按下述公式计算 DPPH 自由基的清除率。

DPPH 自由基的清除率(%)=(Ab−As)/Ab × 100

1.2.2 体外 H_2O_2 清除实验 参考文献[4]报道的方法,在 300 nm 处检测 H_2O_2 吸光度,药物清除 H_2O_2 则会降低此处吸光度。反应体系为 600 μl 的 40 mmol/L H_2O_2 与 200 μl 不同浓度 GA (空白对照用 200 μl PBS 替代)在室温下反应 10 min(GA 与阳性对照 Vc 采用相同终浓度分别为 50、100、200、400 μg/ml),于 300 nm 测吸光度,包括空白对照 Ab 和样本 As。按下述公式计算 H_2O_2 清除率。

H_2O_2 清除率(%)=(Ab−As)/Ab × 100

1.2.3 体外羟自由基清除实验 参考文献[5~7]报道的方法,在 532 nm 波长处检测羟自由基吸光度。Fenton 反应产生的羟自由基与脱氧核糖反应,生成的丙二醛与硫代巴比妥酸在 pH 较低的条件下加热生成红色络合物,药物与脱氧核糖竞争羟自由基,在 532 nm 处出现吸光度下降。将 GA 与阳性对照 Vc 采用相同浓度为(50、100、200、400 μg/ml)或 200 μl PBS (空白对照)分别加入 Fenton 体系(终浓度为 3 mmol/L 2- 脱氧核糖、0.1 mmol/L $FeCl_2$、1 mmol/L H_2O_2、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L抗坏血酸),充分混匀并用 0.02 mol/L PBS 补足 3 ml,于 37℃反应 1 h。反应完毕,分别加入 1 ml 三氯乙酸(2.8%)及 1 ml TBA(1%),充分混匀后将各样品管于 100℃加热 20 min。冷却后于 532 nm 处测吸光度。按下述公式计算羟自由基清除率。

羟自由基清除率(%)=(Ab−As)/Ab × 100

1.2.4 体外 NO 清除实验 参照文献[8]的方法。取不同浓度的 GA 溶液 1.8 ml(终浓度分别为 50、100、200、400 μg/ml),同时另取与 GA 相同浓度的阳性对照 Vc 分别与 0.2 ml 硝普钠(2.5 mmol/L)充分混匀,25℃光照下准确反应 2 h,之后取上清液,采用 Griess 法于 540 nm 波长下测定 GA 对 NO 清除能力,空白管为 1.8 ml 双蒸水加 0.2 ml 硝普钠(2.5 mmol/L)。检测空白对照 Ab 和样本 As。按下述公式计算 NO 清除率。

NO 清除率(%)=(1−As/Ab) × 100

1.2.5 抑制脂质过氧化反应的试验 参照文献[9]的方法。将 1 ml 乙醇(99.5%)与 13 μl 亚麻酸于 10 ml 离心管中混匀后,加入 1 ml GA 使其终浓度分别为 50、100、200、400 μg/ml。用 Vc 作为阳性对照,与 GA 采用相同的 4 个浓度同时实验。空白对照管加入 1 ml 去离子水与 0.5 ml PBS(pH 7.0)混匀,40℃避光孵育 24 h,之后取反应混合物 100 μl 与 4.9 ml 硫氰酸铁反应体系(4.7 ml 75 % 的乙醇、0.1 ml 30%的硫氰酸铵及 0.1 ml 的 2×10^{-2} mol/L 氯化亚铁)充分混匀,准确反应 3 min 后,于 500 nm 处测定吸光度,并按下述公式计算 GA 对脂质过氧化反应的抑制率(As 及 Ab 分别代表样品及空白对照的吸光度)。

抑制脂质过氧化反应率(%)=(1− As/Ab) × 100

1.2.6 数据处理 每组试验至少重复 3 次,每次 4~5 个平行实验,数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS11.0 软件分析,两组间差异用 Student's t 检验分析,多组间比较用方差分析法处理数据,$P<0.01$ 表示有显著性差异;$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 比色法测定 GA 体外抗氧化的可靠性

为了确定最佳测试条件,排除干扰因素,首先对 GA 溶液进行了全波长扫描,测得最大吸收峰为:235.5 nm,而在实验测试条件 500、517、532、540 nm 及 300 nm 处均无明显吸收(见图 2),不会对测定结果造成干扰。因此,用比色法测定 GA 对 DPPH 自由基、H_2O_2、脂质过氧化、羟自由基和 NO 清除能力是可行的。

2.2 GA 对体外 DPPH 自由基的清除率分析

为了测定不同浓度 GA(5~50 μg/ml)对 DPPH 自由基的清除能力。采用分光光度比色法测定了 1 h 清除反应后 517 nm 波长下的吸光度的变化。以空白对照调零,GA 处理组的清除率分别为(20.65 ± 2.67)%、(47.34 ± 3.78)%。(77.76 ± 3.78)%

和(87.98 ± 4.12)%。并具有浓度依赖关系(F=10.13, P<0.01)。而阳性对照 Vc 组的清除率分别为:(1.94 ± 1.56)%、(1.98 ± 1.78)%、(28.21 ± 2.21)%和(49.05 ± 3.05)%(见图 3)。结果显示 GA 对 DPPH 的体外清除能力与公认的抗氧化剂 Vc 相比，其清除 DPPH 的能力更为显著。

2.3 GA 对体外 H_2O_2 清除率分析

采用分光光度比色法检测 GA 对 H_2O_2 的清除率时,发现在相同浓度范围内(50~400 μg/ml)GA 对 H_2O_2 的清除率与对照组(调零组)相比没有超过(2.08 ± 0.82)%(见图 4),且组间差异没有统计学意义(F=0.84, P>0.05)。而 Vc 组在与 GA 相同浓度处理时，各组清除率分别达到 (12.45 ± 2.98)%、(54.34 ± 3.01)%、(63.78 ± 2.12)%和(76.09 ± 2.66)%。表明 GA 在体外对 H_2O_2 的清除作用不明显，具体原因有待进一步研究。

2.4 GA 对体外羟自由基的清除率分析

采用分光光度比色法测定清除反应后溶液在 532 nm 波长处吸光度,不同浓度 GA(50~400 μg/ml)对羟自由基清除率与对照组(调零组)相比分别为:(47.32% ± 3.26%)、(53.57% ± 2.56%)、(60.34% ± 3.79%)和(67.25% ± 2.99%)。并显示出一定的浓度依赖关系(F=0.01, P<0.01),而 Vc 组的清除率分别为:(17.54% ± 2.07%)、(51.08% ± 2.98%)、(56.54% ± 3.81%)和(60.23% ± 3.12%)(见图 5)。表明 GA 在相同浓度下对羟自由基的清除率均强于 Vc,特别是在较低浓度时两组差别更显著(t=99.85, P<0.01)。结果显示相对于 Vc,GA 在较低浓度时对羟自由基清除效率更高。

2.5 GA 对体外 NO 的清除率分析

采用 Griess 法,按试剂盒说明书操作,测定各组 NO 清除效果。结果显示,不同浓度 GA(50~400 μg/ml)对 NO 清除率分别为(10.45 ± 3.45)%、(24.58 ± 3.76)%、(34.76 ± 3.12)%和(40.43 ± 2.76)%。而阳性对照 Vc 组的清除率分别为(13.25 ± 1.45)%、(28.45 ± 3.03)%、(37.68 ± 2.74)%和(45.08 ± 2.34)%(见图 6)。由此可见,GA 在体外对 NO 的清除能力与 Vc 相当,同样呈浓度依赖关系(F=1.28, P<0.05)。

2.6 体外抑制脂质过氧化反应率分析

药物对脂质过氧化反应的影响常常用来衡量其体外抗氧化的能力。采用分光光度比色法,测定不同浓度 GA(50~400 μg/ml)对脂质过氧化反应抑制率。结果显示:与对照组相比其抑制率分别为:(48.65 ± 5.21)%、(65.78 ± 5.75)%、(79.09 ± 6.07)%和(80.03 ± 5.64)%。呈浓度依赖关系(F=3.22, P<0.01)。而 Vc 组的清除率分别为:(17.34 ± 3.45)%、(37.87 ± 3.87)%、(47.89 ± 4.05)%和(59.69 ± 4.68)%(见图 7)。结果显示 GA 能明显的抑制体外脂质过氧化反应。与公认的自由基清除剂 Vc 相比,其体外抑制脂质过氧化反应能力更为显著。

3 讨 论

氧化应激(Oxidative stress,OS)是指机体活性氧族产生过多,机体抗氧化能力降低,氧化系统和抗氧化系统平衡紊乱,导致组织或细胞损伤的病理过程。在病理条件下或衰老时,细胞内活性氧的增加超过抗氧化防御能力,就会引起脂质、蛋白质和 DNA 的氧化损伤,可能导致动脉粥样硬化、心力衰竭、高血压等心血管疾病的发生[10]。研究显示氧化应激在心血管疾病的发病机理中起到重要作用,但临床上现有的具有抗氧化作用的药物,其治疗效果有一定的局限[10]。从中药或天然植物药中筛选抗氧化活性成分,以此为基础开发新药是解决此问题的有效途径之一[11]。

自由基是指带有不配对的电子的分子基团,具有高度的化学反应活性,是人体生命活动中多种生化反应的中间代谢产物。人体自由基过多会严重损害健康,因为它使细胞内核

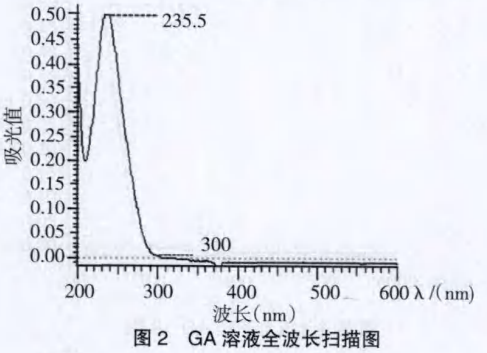


图 2 GA 溶液全波长扫描图

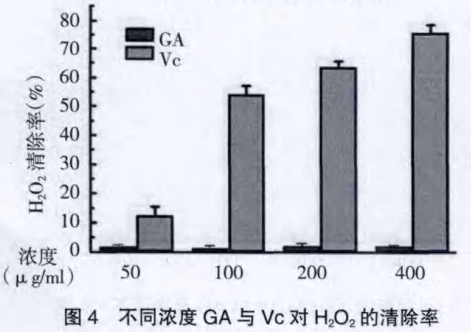


图 4 不同浓度 GA 与 Vc 对 H_2O_2 的清除率

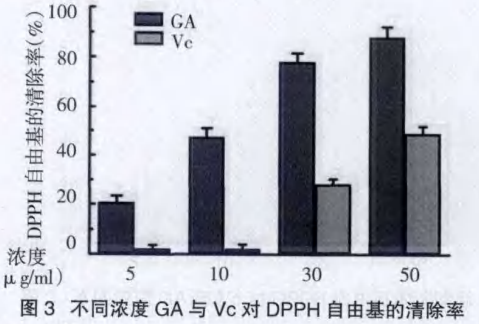


图 3 不同浓度 GA 与 Vc 对 DPPH 自由基的清除率

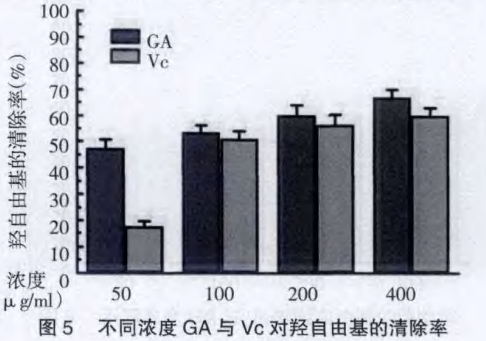


图 5 不同浓度 GA 与 Vc 对羟自由基的清除率

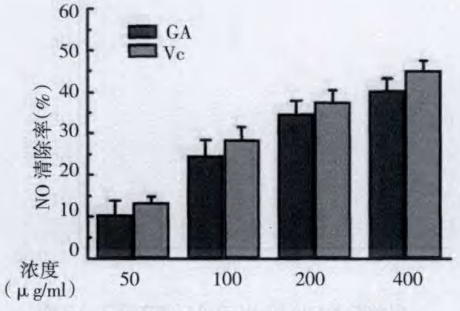


图 6　不同浓度 GA 与 Vc 对 NO 的清除率

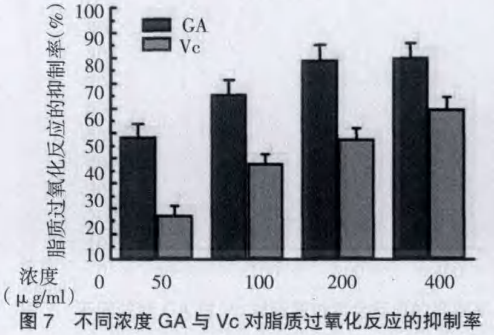


图 7　不同浓度 GA 与 Vc 对脂质过氧化反应的抑制率

酸、蛋白质、不饱和脂肪酸和膜系统引起超氧化反应，导致细胞结构和功能的破坏[12]。自由基与衰老和心血管疾病有着直接的关系。具有清除自由基能力的化合物常被作为研发药物的前体而备受关注。GA 在体外模拟氧化体系下，对几种自由基（DPPH，羟自由基）、NO、H_2O_2 的清除作用以及脂质过氧化反应的抑制作用如何，自然成为我们关注的焦点。

实验结果表明，GA 在一定浓度范围内，对不同自由基的清除能力显示出差别。与以往公认的自由基清除剂 Vc 相比，GA 在对 DPPH、羟自由基清除能力和对脂质过氧化反应的抑制作用上比 Vc 还要强。这与之前文献报道的数据相符合[13,14]。而对 NO 的清除率也较强，仅略低于 Vc。说明 GA 在抗氧化方面具有良好的应用前景。实验结果也首次在体外模拟体系下为 GA 抗氧化的应用提供了实验依据。

实验中还发现了一个有趣的现象，GA 在体外与 H_2O_2 几乎不发生反应，而 H_2O_2 在体内往往通过次级的级联反应产生各种自由基达到损伤细胞的作用，说明 GA 的抗氧化作用可能主要是由于其与自由基的亲和力强，从而达到清除自由基的效果，并非直接与过氧化物发生反应所致。

NO 在机体内由一氧化氮合酶催化生成，当机体处于氧化应激等情况下，NO 可与体内其它自由基结合生成氧化性更强的过氧化亚硝基阴离子，从而具有更大的危害性[15]，所以，在体内清除过氧化亚硝基阴离子可以起到保护细胞的作用。实验结果显示，GA 在所选浓度（50~400 μg/ml）范围内，对体外 NO 清除作用显著。说明其具有潜在的抗细胞损伤作用。随着年龄增长，人体内氧自由基水平、脂质过氧化产物及 DNA 损伤在不断增加，抗氧化酶活性及谷胱甘肽等还原性物质则呈现减少的趋势。GA 对脂质过氧化反应抑制作用，从另一个方面显示其在动物体内可能存在的抗氧化作用。提示，也许具有 GA 母核结构的化合物将可以通过结构改造研发出毒性小、抗氧化活性高的临床应用的新药。

综上所述，GA 具有较强的体外抗氧化作用，与 Vc 相比也是一种有效的抗氧化剂。本研究为 GA 的抗氧化作用的应用提供了实验依据。提示具有该类结构的抗氧化剂将显示出良好的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] 韦国锋，覃特营，莫少泽.提取没食子酸工艺改进的研究[J].右江民族医学院学报，1994，16(4)：11-13.

[2] 牛淑敏，李　巍，李　乐. 玫瑰花中两种抗氧化成分的分离鉴定与活性测定[J]. 南开大学学报，2006，39(1)：90-94.

[3] Laser E S，Miao C K，Cywin C L，et al.Effect of structural modification of enolcalboxamide-type nonsteroidal antiinflammatory drugs on COX-2 /COX-1 selectvity[J].Med Chem，1997，40(6)：980.

[4] Harminder Pal Singh，Sunil Mittal，Shalinder Kaur，et al.Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of Artemisia scoparia [J]. Food Chemistry，2009，114(2)：642-645.

[5] Xing Ron-ge，Yu H H，Liu Song，et al.Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry，2005，13(4)：1387-1392.

[6] Singh H P，Mittal S，Kaur S，et al.Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of Artemisia scoparia [J].Food Chemistry，2009，114(2)：642-645.

[7] 吕晓玲，朱惠丽，姜平平，等. 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J].中国食品添加剂，2003，6(5)：22-25.

[8] Meng X L，Yang J Y，Chen G L，et al.RV09，a novel resveratrol analogue，inhibits NO and TNF-alpha production by LPS- activated microglia[J].International Immunopharmacology，2008，8(8)：1074-1082.

[9] Huang R H，Mendis E，Kim S K.Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2005，36(1-2)：120-127.

[10] 吴　蕊，徐　玲. 氧化应激与心血管疾病[J].心血管病学进展，2007，28(1)：110-113.

[11] 熊江波，孙柳燕，王如伟.临床治疗心脑血管疾病的中药与天然植物药[J].中国药业，2009，18(13)：3-6.

[12] 李　勇，孔令青，高　洪，等.自由基与疾病研究进展[J].动物医学进展，2008，29(4)：85-88.

[13] 张建平，易　醒，肖小年，等.泽泻提取物自由基清除能力的研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(5)：1181-1182.

[14] 陈　平，樊瑞胜，聂　芊，等.橙皮苷磺酸钠对自由基清除能力研究[J].食品工业科技，2007，28(9)：64-69.

[15] Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function：origins，mechanisms，and consequences[J].Cardiovasc Res，2005，68(1)：26-36.

（责任编辑：关蕴良）