# 绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化的研究

胡宗福，于文利，赵亚平*
(上海交通大学化学与化工学院，上海 200240)

**摘 要**：采用化学发光法，研究了不同浓度的绿原酸溶液对3种活性氧(Reactive Oxygen Species) $O_2^{\cdot-}$、·OH和$H_2O_2$的清除和抗脂质过氧化能力。研究表明，绿原酸对三种活性氧均有清除作用，其清除能力与浓度呈剂量关系，还与所清除的自由基种类有关系。绿原酸溶液浓度较大时，对三种活性氧的清除效果均明显而且稳定，而浓度较低时，对$O_2^{\cdot-}$和·OH清除效果则不理想，甚至产生一定的促氧化作用。同样，绿原酸对脂质过氧化也有明显的抑制作用，抑制效果也与浓度呈剂量关系。

**关键词**：绿原酸；自由基；脂质过氧化；化学发光法

## Study on the Scavenging of ROS and Anti-lipid Peroxidation by Chlorogenic Acid

HU Zong-fu, YU Wen-li, ZHAO Ya-ping*
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract**: The scavenging ability on ROS(Reactive Oxygen Species)—$O_2^{\cdot-}$, ·OH and $H_2O_2$ and anti-lipid peroxidation of chlorogenic acid was evaluated by means of chemiluminescence system. The results show that the scavenging ability varies with the concentration of chlorogenic acid and the type of reactive oxygen species. High concentration of chlorogenic acid has significant scavenging effects, while very low concentration has less effect, even has prooxidative actions towards $O_2^{\cdot-}$ and ·OH. The anti-lipid peroxidation of chlorogenic acid is also obvious and is related with the concentration of chlorogenic acid.

**Key words**: chlorogenic acid; ROS; lipid peroxide; chemiluminescence
中图分类号：R285.5 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2006)02-0128-03

生物体系中包含有大量的脂质过氧化和自由基反应。正常情况下，生物体内自由基的产生和清除呈平衡状态，失去平衡时，在机体内可造成多种功能行障碍与疾病的发生。脂质过氧化严重破坏细胞膜的脂质结构中的脂肪酸，使膜酶损伤导致细胞功能障碍。研究发现，肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应、自身免疫病、辐射损伤、血管疾病、癌症、衰老、DNA损伤等生理过程与二者有密切联系[1,2]。

绿原酸(Chlorogenic acid)是我国传统中药金银花、杜仲叶的主要有效成分，也存在于葵花籽、水果、蔬菜、大豆、小麦、咖啡豆中。研究表明，绿原酸具有清热解毒、消炎利胆、抗菌、降血脂等生理功能[3]，

收稿日期：2005-01-24 *通讯作者
作者简介：胡宗福(1981-)，男，硕士研究生，研究方向为天然抗氧化剂的提取。

下保存1h酶活仍较高；最适pH值为7.0，在pH值4.0～7.0的范围内较稳定；$Ca^{2+}$浓度在7～9mmol/L时对该酶有激活作用。G-200酶的最适温度为80℃，在95℃下保存1h几乎失去酶活；最适pH值为7.0，在pH值4.0～7.0的范围内也较稳定；$Ca^{2+}$浓度在7～9mmol/L时对该酶也有激活作用。从性价比分析，建议生产上选用N酶。

**参考文献**：

[1] 鲍元兴, 等. 低聚异麦芽糖的质量与工艺设备[J]. 食品工业, 1999, (3): 8-9.
[2] 刘汉文, 等. 几种α-淀粉酶生产麦芽低聚糖工艺研究[J]. 食品科技, 1999, (6): 31-32.
[3] 高雯, 等. 食品酶学原理与分析方法(第一版)[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1991. 237-273.
[4] 罗九甫. 酶和酶工程(第一版)[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1996. 176-202.
[5] 彭志英. 食品酶学导论(第一版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 122-165.
[6] 吴东儒. 糖类的生物化学(第一版)[M]. 上海: 高等农业教育出版社, 1987. 222-255.
[7] 周晓云. 酶技术(第一版)[M]. 北京: 石油工业出版社, 1995. 180-297.

还有抗肿瘤、抑制突变等作用[4]。虽然其作用机理至今尚不十分清楚，但是大多认为与绿原酸能够清除自由基有一定关系。因此，本文用化学发光法对不同浓度的绿原酸在清除氧自由基和抗脂质过氧化方面进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

SHG-D 型生物化学发光测量仪 上海计量局实验工厂。

### 1.2 试剂

95% 绿原酸 广东中大亿达洲生物科技股份有限公司；邻苯三酚(Parogallo) 北京化学药品有限公司；鲁米诺(luminol)、邻菲啰啉(1,10－phenanthroline) Sigma 化学药品公司；CuCl(分析纯)、NaOH(分析纯)、乙醇(分析纯)、30% 双氧水、HCl(分析纯) 上海试剂二厂；碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液(实验室制备)。

### 1.3 方法

不同浓度的绿原酸溶液与三种活性氧和脂质过氧化的发生体系反应，所得的发光强度与空白时作比较(发光值降低程度越大，说明清除活性氧或抗脂质过氧化能力越强；反之，降低程度越小，说明能力越弱)，从而说明其清除自由基和抗脂质过氧化的能力。

#### 1.3.1 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力的检测[5]

在 6 个样品管中分别加入 100μl 的乙醇(作空白实验)和浓度不同的待测样品的乙醇溶液，然后均加入 100μl 1mmol/L 的邻苯三酚溶液、100μl 1mmol/L 的鲁米诺溶液(配置时，先用 2～3 滴稀氢氧化钠溶解)，再加入碳酸盐缓冲溶液(pH=10.28)，使反应总体积为 1ml。放入样品池，立即开始测定。

#### 1.3.2 清除 ·OH 能力的检测[5]

在 6 个样品管中分别加入 100μl 的乙醇(作空白实验)和浓度不同的待测样品的乙醇溶液，然后均加入 100μl 3mmol/L 的邻菲罗啉溶液(配置时，先用 2～3 滴稀盐酸溶解)、100μl 2mmol/L 的 CuCl 溶液(配置时，先用 2～3 滴稀盐酸溶解)和 100μl 0.6% 的双氧水，再加入磷酸盐缓冲溶液(pH7.38)，使反应总体积为 1ml。放入样品池，立即开始测定。

#### 1.3.3 清除 $H_2O_2$ 能力的检测[5]

在 6 个样品管中分别加入 100μl 的乙醇(作空白实验)和浓度不同的待测样品的乙醇溶液，然后均加入 100μl 30% 的双氧水、100μl 1mmol/L 的鲁米诺溶液，再加入磷酸盐缓冲溶液(pH7.38)，使反应总体积为 1ml。放入样品池，立即开始测定。

#### 1.3.4 抗脂质过氧化能力的检测

此方法的原理是利用羟基自由基的发生体系产生 ·OH，作为起动脂质过氧化反应的引发剂，产生脂过氧自由基(LOO ·)作为体系的发光剂。发光强度的大小代表了反应生成 LOO · 的多少，从而可以看出脂质过氧化进行的程度。

在 6 个样品管中分别加入 100μl 的乙醇(作空白实验)和浓度不同的待测样品的乙醇溶液，然后均加入 100μl 月见草油、100μl 2mmol/L 的 CuCl 溶液、100μl 0.6% 的双氧水，再加入磷酸盐缓冲溶液(pH7.38)，使反应总体积为 1ml。摇匀后，放入样品池，立即开始测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

图 1 为不同浓度绿原酸溶液加入 $O_2^{\cdot-}$ 发生体系后，发光强度随时间的变化关系图。

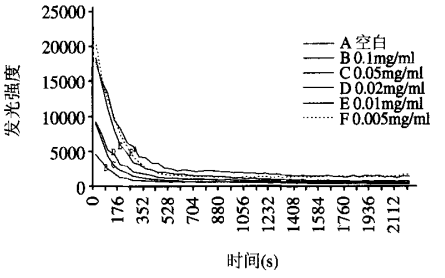



图 1 不同浓度绿原酸溶液清除 $O_2^{\cdot-}$ 时的发光强度与时间的关系

Fig.1 The relation between chemiluminescence and time with chlorogenic acid on $O_2^{\cdot-}$

从图 1 中可以看出，在一开始的一段时间内，绿原酸液浓度大于等于 0.02mg/ml 时，发光强度较空白值有明显的降低，即对 $O_2^{\cdot-}$ 有明显的清除作用，而且清除程度与绿原酸溶液的浓度呈线性量效关系；而浓度小于 0.02mg/ml 时，对发光值强度的抑制作用不明显，浓度为 0.005mg/ml 时甚至使发光值升高，即浓度较低时，清除作用减弱甚至产生促氧化作用。还可以看到，随着时间的延长，所有溶液的发光强度值都很快降低到很小，这是 $O_2^{\cdot-}$ 的寿命非常短，$O_2^{\cdot-}$ 浓度迅速降低的原因。

### 2.2 对 ·OH 的清除作用

图 2 为不同浓度绿原酸溶液在与 ·OH 体系作用时，发光强度与时间的变化图。

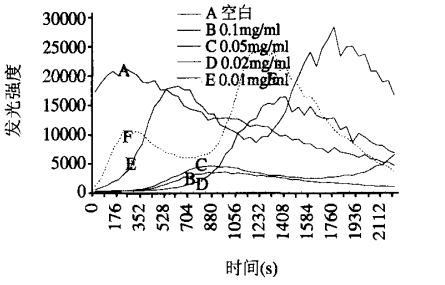



图 2 不同浓度绿原酸溶液清除 ·OH 时的发光强度与时间的关系

Fig.2 The relation between chemiluminescence and time with chlorogenic acid on ·OH

由图2可以看出，只有曲线B的发光强度值始终低于曲线A，而F、E、D曲线，随着时间的延长，三条曲线(浓度由低到高)依次出现“波峰、波谷”(发光值随着时间的延长，先增大，减小，再增大，减小)现象，C曲线的发光强度在最后也有升高趋势。说明只有绿原酸浓度为0.1mg/ml时才能对·OH产生明显且稳定的清除作用。而浓度小于0.1mg/ml时清除效果则不理想，在一定时间内甚至产生促氧化作用。至于出现“波峰、波谷”现象，可能是低浓度的绿原酸，在·OH浓度较小时促进·OH的产生，·OH浓度达到一定程度时，又对其产生清除作用，如此反复，便产生此现象。对此过程的作用机理还有待于进一步研究。

2.3 对$H_2O_2$的清除作用

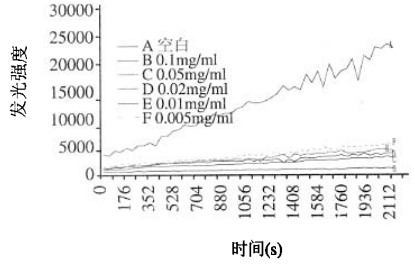



图3 不同浓度绿原酸溶液清除过氧化氢时的发光强度与时间的关系图

Fig.3 The relation between chemiluminescence and time with chlorogenic acid on $H_2O_2$

表1 不同浓度绿原酸对过氧化氢在2200s内的最大清除率

Table 1 The highest scavenging rate within 2200 seconds with chlorogenic acid on $H_2O_2$

| 不同浓度绿原酸溶液(mg/ml) | 对$H_2O_2$的最大清除率(%) |
|---|---|
| 0.1 | 95.43 |
| 0.05 | 87.44 |
| 0.02 | 83.58 |
| 0.01 | 81.27 |
| 0.005 | 76.26 |

图3为不同浓度绿原酸溶液在加入$H_2O_2$发生体系后，发光强度与时间的变化图。表1为根据图3计算出的对过氧化氢在2200s内的最大清除率。

由图3可以看出，在体系中加入不同浓度绿原酸溶液时，其发光强度较空白溶液均有明显的降低，而且降低的程度与浓度大小的关系不大。结合表1不同浓度绿原酸对过氧化氢在2200s内的最大清除率，说明绿原酸溶液对活性氧$H_2O_2$的清除能力非常强，0.1mg/ml的最大清除率达到95.43%，即使浓度为0.005mg/ml时，最大清除率也达到76.26%，清除效果依然非常好。

2.4 对脂质过氧化的抑制作用

图4为不同浓度的绿原酸溶液在与脂质过氧化反应体系作用时，发光强度与时间的关系图。

从图4中可以看到，在一开始的一段时间内，所有浓度绿原酸溶液的发光强度值较空白溶液都有明显降低，其中B曲线降低程度最大，曲线C、D、E次之，

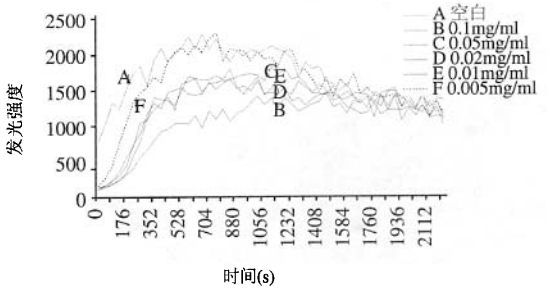
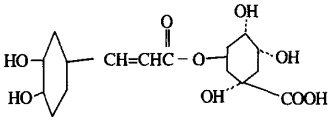



图4 不同浓度绿原酸溶液抑制脂质过氧化时的发光强度与时间的关系图

Fig.4 The Relation between chemiluminescence and time with chlorogenic acid on anti-lipid peroxidation

且发光值接近，曲线F降低程度最小。说明绿原酸溶液有明显的抑制脂质过氧化作用，而且抑制程度与浓度呈剂量关系。随着时间的推移，大约352s后，浓度为0.005mg/ml的绿原酸液的发光值已与空白溶液接近，说明抗脂质过氧化作用不再明显。最后，所有浓度的发光值趋于接近，这是脂质过氧化反应已经趋于停止的原因。

绿原酸的化学结构式为：



从结构上看，绿原酸是由咖啡酸和奎宁酸缩合而成的酯，属于酚类化合物。由于分子具有邻二酚羟基，因此具有极强的还原性而更易被自由基氧化[6]，从而表现出很好的自由基清除作用和抗脂质过氧化作用。

## 3 结 论

绿原酸对三种活性氧均有清除作用，其清除作用与浓度呈剂量关系，还与所清除的自由基种类有关系。绿原酸溶液浓度较大时，对三种活性氧的清除效果均明显而且稳定，其中0.1mg/ml的绿原酸溶液对过氧化氢的最大清除率达到95.43%；而浓度较低时，对$O_2^-$·和·OH清除效果则变差，甚至产生一定的促氧化作用。绿原酸也是很好的预防性抗氧化剂，可以有效清除起动脂质过氧化的引发剂，从而起到抑制脂质过氧化的作用，其抑制程度也与浓度呈剂量关系。

**参考文献：**

[1] 仲飞, 李秀锦. 脂质过氧化对机体的作用及其在兽医学研究中的意义[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1996, 10(4):59-63.

[2] 张仲伦. 微弱发光分析技术原理及应用实例(二)[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(5): 505-507.

[3] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 146.

[4] Hai-Tao Lu, Yue Jiang, Feng Chen. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of chlorogenic acid from Flos Lonicera[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1026: 185-190.

[5] 舒铂, 等. 两种天然原花青素清除活性氧的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(2): 114-115.

[6] 李会军, 李萍, 张重义, 等. 金银花中药提取物清除自由基的作用[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 496-498.