

葡萄籽多酚的分离鉴定及其对细胞 DNA 氧化损伤的防护作用

范培红, 娄红祥*

(山东大学药学院天然药物化学教研室, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 从葡萄籽中分离多酚化合物, 进行抗氧化作用研究。方法 采用 Diaion HP-20, Toyopearl HW40 柱色谱与制备型 RP-HPLC 相结合从葡萄籽乙酸乙酯萃取部位分离多酚物质, 根据 IR, MS, NMR, CD, X 射线单晶衍射等谱学数据并与已知化合物对照, 确定化合物结构。对不同类型化合物经还原能力、DPPH· (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基捕获试验进行抗氧化能力筛选, 选择有抗氧化潜力的化合物施于小鼠脾细胞 H_2O_2 损伤模型, 用单细胞凝胶电泳 (SCGE, single cell gel-electrophoresis) 技术分析化合物对细胞内 DNA 氧化损伤的防护作用。结果 共分离到 11 个化合物 (包括 3 个新结构), 葡酚酮 A, B, C, 抗氧化试验表明, 原花青素 B4、儿茶素、表儿茶素与没食子酸的体外抗氧化能力较强, 且低浓度 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均表现对细胞 DNA 氧化损伤的防护作用, 但 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素导致细胞 DNA 氧化损伤。结论 葡酚酮 A, B, C 为首次报道。多酚类物质在低浓度有较好的细胞 DNA 氧化损伤的防护作用, 可解释多酚物质的营养保健作用, 而高浓度的多酚物质也可成为致氧化损伤物质, 提示天然抗氧化剂的保健作用可能受剂量的影响。

关键词: 葡萄籽; 抗氧化; 葡酚酮; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2004)11-0869-07

Isolation and structure identification of grape seed polyphenols and its effects on oxidative damage to cellular DNA

FAN Pei-hong, LOU Hong-xiang

(College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Aim** To isolate polyphenols from grape seeds and to evaluate their antioxidant effects. **Methods** Pure compounds were isolated by using Diaion HP20, Toyopearl HW40 chromatography repeatedly, as well as semi-preparative RP-HPLC, from ethyl acetate extract of grape seeds. IR, MS, NMR, CD, X-Ray crystal diffraction spectral analysis were used to identify the structures. The antioxidant effects of different type of structures were screened by reducing power and DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging tests. Then, SCGE (single cell gel-electrophoresis) technique was used to investigate the effects of these potent antioxidant phytochemicals on cellular DNA oxidative damage with mice spleen cells, damage was induced by H_2O_2 . **Results** Eleven compounds were obtained including 3 novel structures, viniferones A, B and C. Proanthocyanidin B4, catechin, epicatechin and gallic acid showed strong antioxidant power, and at lower concentration ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), they can prevent cellular DNA damage, while $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin induced damage by itself. **Conclusion** Viniferones A, B and C were reported for the first time. That polyphenols investigated were shown to be good cellular DNA oxidative damage-preventing phytochemicals at lower concentration, could be used to explain the nutrient effect of grape seed polyphenols at certain degree. At the same time, higher concentration of polyphenols can induce oxidative damage, suggesting that dose is one factor to determine the nutrient effects.

收稿日期: 2004-03-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070885).

通讯作者 Tel / Fax: 86-531-8382019, E-mail: louhongxiang@sdu.edu.cn

Key words: grape seeds; antioxidant; viniferone; single cell gel-electrophoresis

自由基可导致脂质、蛋白质和 DNA 的氧化性退化、激活致癌原、抑制胞内抗氧化防御系统等,从而参与了人类上百种疾病的发生、发展过程(如关节炎、动脉粥样硬化、早衰、器官局部缺血与再灌注损伤、老年性痴呆、胃肠道功能紊乱和肿瘤等),近年来寻找抗氧化剂,特别是天然的安全有效的抗氧化剂成为研究热点^[1]。自“法兰西之谜”现象^[2]揭示以来,不断有关于葡萄籽提取物(GSE, grape seeds extract)的报道,其主要生物活性有心血管保护、化学预防、细胞保护等^[3-5],所含主要成分为儿茶素、表儿茶素及其没食子酸酯以不同方式、不同程度聚合而成的原花青素类物质^[6]。

本文从葡萄籽乙酸乙酯提取部位分离多酚化合物的过程中,除分得没食子酸、儿茶素、表儿茶素与原花青素 B1 - B5 8 个已知化合物外,还获得 3 个同分异构的新结构:葡萄酚酮(viniferone) A, B, C(图 1)。选取不同结构类型的化合物进行还原能力、DPPH·(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)自由基捕获试验,对有抗氧化潜力的化合物利用小鼠脾细胞 H₂O₂ 损伤模型,用单细胞凝胶电泳(SCGE, single cell gel-electrophoresis)技术分析化合物对细胞内 DNA 氧化损伤的防护作用,并讨论结构、剂量与药效的关系。

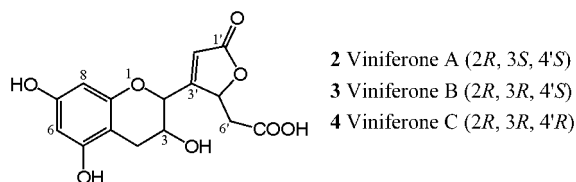


Figure 1 Structures of compounds 2 - 4

材料和方法

药品 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl, 低熔点(LMP, low melting-point agarose)与正常熔点(NMP, normal melting-point agarose)的琼脂糖凝胶,三羟甲基氨基甲烷(Tris), Triton X-100, 溴乙锭(EB, ethidium bromide)均购自 Sigma 公司。葡萄籽由烟台葡萄酒厂提供。

动物 小鼠, 18 - 22 g, 由山东大学实验动物中心提供

仪器 Waters 600-900 半制备高效液相色谱仪, Eyla FD-1000 冻干机, Nicolet Nex us 470 傅立叶变换红外光谱仪, API 4000 质谱仪, Avance 500 Bruker 核磁共振仪, Agilent 8450 紫外可见分光光度仪,

Brucker P4 Kappa CCD 单晶衍射仪, DY-3A 型稳压稳压电泳仪, Olympus IX-70a 倒置荧光显微镜配备 Kodak 成像系统。

提取分离 葡萄籽粉碎得 10.52 kg 粗粉, 经石油醚室温浸泡脱脂后, 用 70% 丙酮室温冷浸, 浸取液低温减压浓缩至无丙酮味, 用乙酸乙酯萃取, 萃取液低温回收得浸膏 153.5 g。将浸膏用蒸馏水溶解, 分次用 Diaion HP20 柱(8 cm × 15 cm) 色谱, 甲醇-水梯度洗脱, 合并相同部位分别用 Toyopearl HW40(F) 柱(5 cm × 24 cm) 色谱, 丙酮-水-甲酸梯度洗脱, 经聚酰胺薄膜色谱合并为 6 部分(Fr. 1 - 6), 再经 Toyopearl HW40(F) 反复柱色谱, 重结晶纯化, 由 Fr. 1 得白色结晶 1(430 mg), Fr. 2 得 2(40 mg), 3(64 mg), 4(22 mg), Fr. 3 得 5(7.07 g), 6(3.4 g)。Fr. 4, Fr. 5 分别经 RP-HPLC 分析, 270 nm 检测得多个成分, 多次收集单峰合并, 低温减压回收, 分析纯度, 必要时经 2 次 HPLC 制备纯化, 浓缩后冻干, 由 Fr. 4 得化合物 8(167 mg), 10(600 mg), 由 Fr. 5 得化合物 7(40 mg), 9(38 mg), 11(31 mg)。

化合物的抗氧化活性筛选 配置梯度浓度的样品甲醇溶液(0 - 3 mmol·L⁻¹), 根据文献[7]报道的方法, 考察还原能力。根据文献[8]的方法, 考察化合物的自由基捕获活性。

单细胞悬液的制备 按文献[9]方法进行。

H₂O₂ 诱导细胞 DNA 损伤(染毒)与多酚的防护作用 按文献[10]方法进行。

多酚诱导细胞 DNA 损伤作用 取细胞用不同浓度的样品溶液(10, 25, 50, 150 μmol·L⁻¹) 于 37 °C 5% CO₂ 孵箱中培养 30 min, 离心洗涤后悬于 37 °C 0.8% LMP agarose 中待 SCGE 检测。

SCGE 检测细胞 DNA 损伤 按文献[11]方法进行。组间单因素方差分析用 SAS 软件完成^[12]。

结果

1 化合物结构鉴定

经 IR, MS, NMR 谱图分析, 并与标准化合物谱图对照, 确定化合物 1 为没食子酸(gallic acid), 化合物 5, 6 分别为儿茶素(catechin)、表儿茶素(epicatechin)^[13], 化合物 7 - 11 分别为原花青素 B1 - B5(procyanidin B1 - B5)^[14]。

化合物 2 淡黄色片状结晶, mp 199.1 -

201.6 °C, CD (MeOH, c 4E - 4 g·mL⁻¹): $\Delta\epsilon_{232\text{ nm}}$ - 2.56, $\Delta\epsilon_{280\text{ nm}}$ + 0.695。单晶衍射主要数据如下: C₁₅H₁₄O₈·H₂O, monoclinic, P2₁, a = 5.352 7(7), b = 15.024(2), c = 8.988 0(13) Å, β = 96.697(10)°, V = 717.89(17) Å³, Z = 2, 根据 F² 由 SIR-97 计算 R = 0.042 2, wR2 = 0.098 8。¹H NMR 中 δ 5.98(1H, d, J = 2.8 Hz, H-6) 与 δ 5.92(1H, d, J = 2.8 Hz, H-8) 为芳环间位偶合信号, δ 4.61(1H, dd, J = 8.4, 1.2 Hz, H-2), 3.87 - 3.92(1H, m, H-3), 3.02(1H, dd,

J = 16.0, 5.5 Hz, Ha-4) 与 2.53(1H, dd, J = 16.0, 9 Hz, Hb-4) 为典型的黄烷-3-醇的 C 环信号, 故 2 的结构中应该含有黄烷-3-醇的 A, C 环结构, 即苯并二氢吡喃结构, ¹H-¹H COSY 与 HMBC 也验证了这一推断(表 1)。¹³C NMR 中剩余 6 个碳信号: δ 171.8(s), 171.0(s), 173.4(s), 117.0(d), 80.7(d), 37.4(t), 显然不是黄烷-3-醇的 B 苯环结构。 δ 37.4 对应的两个亚甲基氢信号 δ 3.13(1H, dd, J = 16.3, 5.5 Hz, Ha-5'), 2.58(1H, dd, J = 16.3, 8.5 Hz, Hb-5')

Table 1 NMR data of compound 2 (600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C, δ , CD₃OD)

Position	δ_C	δ_H	¹ H- ¹ H COSY	HMBC (H → C)	NOESY
2	76.0	4.61 dd(8.4, 1.2)	H-3, H-4'	C-4, C-3, C-2', C-4', C-3', C-9	H _b -4, H-5', H-3, H-2', H-4'
3	67.0	3.87 - 3.92 m	H-4, H-2	C-3', C-10	H-4, H-2, H-4'
4	28.9	a: 3.02 dd(16.0, 5.5) b: 2.53 dd(16.0, 9.0)	H _b -4, H-3 H _a -4, H-3	C-5, C-9, C-10, C-3, C-2 C-5, C-9, C-10, C-3, C-2	H _b -4, H-3 H _a -4, H-3, H-2
5	156.6				
6	96.0	5.98 d(2.8)	H-8	C-5, C-10, C-8, C-7	
7	157.1				
8	94.5	5.92 d(2.8)	H-6	C-7, C-10, C-6	
9	154.5				
10	99.4				
1'	173.4				
2'	117.0	6.19 brs	H-4', H-2	C-4', C-1', C-3', C-2	H-3, H-2, H-4'
3'	171.0				
4'	80.7	5.73 - 5.75 m	H-5', H-2'	C-5', C-3', C-6', C-4'	H-5', H-3, H-2
5'	37.4	a: 3.13 dd(16.3, 5.5) b: 2.58 dd(16.3, 8.5)	H _b -5', H-4' H _a -5', H-4'	C-6', C-3', C-4' C-6', C-4'	H _b -5', H-3, H-2, H-4' H _a -5', H-4', H-2
6'	171.8				

Table 2 NMR data of compounds 3 and 4 (600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C, δ , CD₃OD)

Position	3			4		
	δ_C	δ_H	NOESY	δ_C	δ_H	NOESY
2	76.2	4.95 brs	H _a -4, H-5', H-3, H-2', H-4'	76.2	4.95 brs	H _a -4, H _a -5', H-3, H-2', H-4'
3	66.1	4.28 - 4.31 m	H-4, H-2, H-4'	66.0	4.34 - 4.36 m	H-4, H-2
4	28.5	a: 2.85 dd(16.0, 5.0) b: 2.52 dd(16.0, 5.0)	H _b -4, H-3, H-2 H _a -4, H-3	28.5	a: 2.86 dd(16.0, 5.0) b: 2.57(overlapped with H _b -5')	H _b -4, H-3, H-2 H _a -4, H-3
5	158.4			158.4		
6	97.4	5.95 d(3.0)		97.4	5.95 d(3.0)	
7	158.6			158.4		
8	96.1	5.90 d(3.0)		96.1	5.91 d(3.0)	
9	155.9			156.0		
10	100.2			100.2		
1'	174.7			175.0		
2'	119.1	6.05 brs	H-3, H-2, H-4'	118.7	6.07 brs	H-3, H-2
3'	172.1			172.6		
4'	81.2	5.59 - 5.61 m	H-5', H-3, H-2	81.9	5.61 - 5.63 m	H-5', H-3, H-2
5'	39.0	a: 3.12 dd(16.0, 3.4) b: 2.60 dd(16.0, 8.3)	H _b -5', H-2, H-4' H _a -5', H-4', H-2	40.6	a: 2.98 dd(16.0, 4.5) b: 2.60(overlapped with H _b -4)	H _b -5', H-2, H-4' H _a -5', H-4'
6'	173.4			174.9		

与 $\delta 171.8$ (C-6') 存在 HMBC 关系, 与 $\delta 5.73 - 5.75$ (1H, m, H-4') 存在 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 关系。 $\delta 6.19$ (1H, br s, H-2') 可归属为三取代双键的氢信号。在 HMBC 谱图中还存在 H-4', H-5' 与 $\delta 171.0$ (C-3'), H-4' 与 $\delta 173.4$ (C-1') 的相关关系。由此推断可能存在五元不饱和和内酯环, 连接为图 2 片断。进一步分析远程相关关系, 该片断以 3' 位连于苯并二氢吡喃的 2 位 (表 1)。而且由 $J_{2,3} = 8.4$ Hz 判断化合物为 2,3-*trans* 构型, CD 数据特征区显示负 Cotton 效应, 故确定为 2-*R* 绝对构型, 结合单晶衍射结构 (图 3) 确定 4' 位绝对构型。由此推定 2 为 (2*R*, 3*S*, 4'*S*)-2-(4-carboxymethyl- β -butenolide-3-yl)-3,5,7-trihydroxychroman, 命名为葡萄酚酮 (viniferone) A。

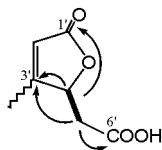


Figure 2 Important correlations of compound 2 (bold represents $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY correlation, arrows represent HMBC correlation)

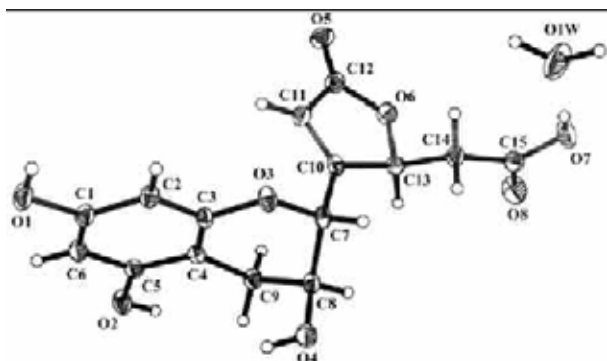


Figure 3 ORTEP structure of compound 2

化合物 3 白色针状结晶, mp 225.6 - 227 $^{\circ}\text{C}$, CD (MeOH, c 4E - 4 g \cdot mL $^{-1}$): $\Delta\epsilon_{214\text{ nm}} - 4.879$, $\Delta\epsilon_{228\text{ nm}} - 2.195$, 4 为白色颗粒, 高温降解未测得熔点, CD (MeOH, c 4E - 4 g \cdot mL $^{-1}$): $\Delta\epsilon_{225\text{ nm}} - 4.39$, $\Delta\epsilon_{282\text{ nm}} + 0.356$ 。二者与 2 的 NMR 谱图十分相似 (表 1 和表 2)。ESI-MS 均显示 [M+1] 峰 m/z 323, 提示分子量 322。同法解析 3, 4 的结构, $\delta 4.95$ (1H, br s, H-2) 显示 2,3-*cis* 构型, CD 中负 Cotton 效应说明为 2-*R* 构型, 比较 2, 3, 4 三者 ^1H NMR 谱图的细微差别, 3 与 2 的 5' 位两质子位移常数、偶合关系十分相似, 均呈现明显的双二重峰: $\delta 3.12$ (1H, dd, $J = 16.0, 3.4$ Hz, H α -5'), $\delta 2.60$ (1H, dd, $J = 16.0, 8.3$ Hz, H β -5'), 而 4 中 5' 位两质子偶合裂分较小, 且较低场 H α -5' 向高场位移至 $\delta 2.98$, 说明 2, 3 中 4' 构型相近, 4 有所不

同。三者 NOESY 谱图也显示这种差别, 在 2, 3 中 H-2 与两个 H-5' 均有 *noe* 相关, 而在 4 中 H-2 仅与较低场的 H-5' 相关。故推断 3 为 (2*R*, 3*R*, 4'*S*)-2-(4-carboxymethyl- β -butenolide-3-yl)-3,5,7-trihydroxychroman, 4 为 (2*R*, 3*R*, 4'*R*)-2-(4-carboxymethyl- β -butenolide-3-yl)-3,5,7-trihydroxychroman, 分别命名为葡萄酚酮 (viniferone) B, C。

2 还原能力与自由基捕获试验

根据所获得化合物的结构类型与含量, 选择 gallic acid, viniferone B, catechin, epicatechin, procyanidin B 4 进行抗氧化活性考察, 并与市售抗氧化剂 Vit C 比较。在还原能力试验中, 所测化合物均表现活性随浓度增加而增加, procyanidin B 4 活性增加最迅速, 还原也最彻底, 其次为 epicatechin, gallic acid 和 catechin, 均强于等量 Vit C 的作用 (图 4)。在自由基捕获试验中, 同样存在量效关系, 计算的半数抑制浓度 IC $_{50}$ 分别为: procyanidin B4, 0.109 mmol \cdot L $^{-1}$; gallic acid, 0.112 mmol \cdot L $^{-1}$; catechin, 0.127 mmol \cdot L $^{-1}$; epicatechin, 0.133 mmol \cdot L $^{-1}$; Vit C, 0.39 mmol \cdot L $^{-1}$ 。作用强度顺序与还原能力稍有出入, 但仍然是 procyanidin B4 活性最好, 且均强于 Vit C。在两项试验中, viniferone B 均未表现很强的活性, 自由基捕获试验半数抑制浓度 IC $_{50}$ 为 0.23 mmol \cdot L $^{-1}$ 。

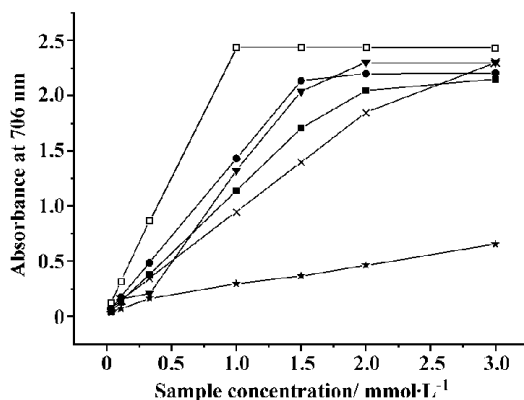


Figure 4 Spectrophotometric analysis of the phenolic phytochemicals for reducing power. Catechin (Cat), epicatechin (Epi), viniferone B (Vin), gallic acid (Gal), proanthocyanidin B 4 (Pc B4), as well as the control, Vit C, were reacted with ferricyanide ion, the reduced product then complexed with ferric chloride. The absorbance of the resulting solution was measured at 706 nm. The increase of absorbance reflected more ferricyanide ion was reduced. Data represent the mean of three experimental determinations. The SEM was very small and not shown in figure to keep it distinct enough

3 SCGE (Comet assay) 结果

根据体外抗氧化活性试验结果,继续对 gallic acid, catechin 和 procyanidin B 4 进行抗细胞 DNA 氧化损伤试验, viniferone B 因活性不强而排除, epicatechin 因其结构与活性均与 catechin 相似也不作研究。彗星图像如图 5 所示。

50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 损伤阳性对照组 comet score 为 180 ± 8 , 空白对照为 15 ± 3 , 加药保护后 comet score 下降(表 3)。可见所测药物显示较好的保护效果。图 6 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物作用与对照组的比较。分析不同药品组的数据发现量效关系不规律, 保护作用并不总是随浓度增加而增强, 在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 以 procyanidin B 4 活性最强, 但 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性低于 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。考察另一个 DNA 损伤指标, DNA Migration 可揭示相一致的规律(表 3)。

进一步考察不同浓度药品本身对细胞的影响, 用不同浓度 catechin(10, 25, 50 和 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 同法孵育细胞, 所得 comet score 分别为 30 ± 4 , 39 ± 6 , 79 ± 16 和 183 ± 11 , 阴性对照组为 15 ± 2 。组间比较认为 10, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可视为无损伤, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组开始有彗星状细胞出现, 至 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈现明显的氧化损伤作用($P < 0.05$)。

讨论

葡萄籽多酚主要由原花青素类物质构成, 本研究获得化合物 2, 3, 4, 它们的结构与儿茶素、表儿茶

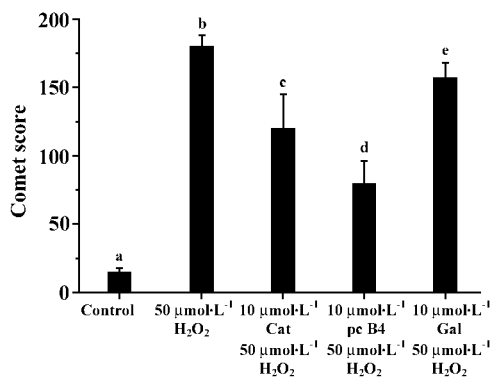


Figure 6 Inhibitory effect of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin (Cat), procyanidin B 4 (Pc B 4) and gallic acid (Gal) on hydrogen peroxide-induced oxidative damage to DNA in mice spleen cells. Cells were preincubated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of compound at 37 °C for 30 min before being challenged with 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 at 4 °C for 20 min. The extent of oxidative damage to DNA was assessed by comet assay. Data represent the mean \pm SEM of three experimental determinations. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($P < 0.05$).

素相比, 差别仅在 B 环, 查阅文献发现茶多酚结构 B 环在茶发酵过程中会氧化成醌, 继而还会发生水解、继续氧化等变化^[15], 故认为 3 个新结构可能为儿茶素、表儿茶素的衍变产物。这类化合物的抗氧化作用不明显, 可能与其氧化度较高有关。

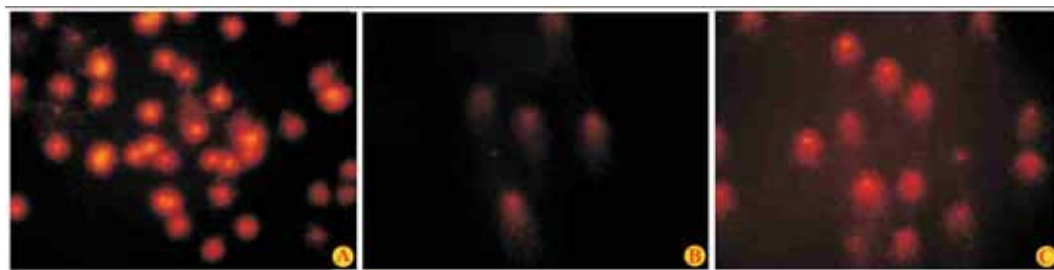


Figure 5 Representative photomicrographs of comet image in experiments (A: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin; B: H_2O_2 treatment; C: Protection against H_2O_2 -induced damage by 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin)

Table 3 Inhibitory effect of catechin, procyanidin B4 and gallic acid on hydrogen peroxide induced oxidative damage to DNA in mice spleen cells. The extent of oxidative damage to DNA was assessed by comet assay and was expressed by comet score and averaged tail length (migration of DNA from the head of nuclei). Data represent the mean \pm SEM

	Control	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2	Catechin/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Procyanidin/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Gallic Acid/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
			10	25	10	25	10	25
Comet score	15 \pm 3	180 \pm 8	120 \pm 25	93 \pm 12	87 \pm 16	106 \pm 18	114 \pm 7	157 \pm 11
Tail length / μm	32 \pm 5	903 \pm 47	691 \pm 40	320 \pm 15	315 \pm 24	397 \pm 15	707 \pm 34	410 \pm 16

体外抗氧化实验结果均体现化合物的抗氧化作用随浓度增加而增加,从整体趋势看,酚羟基数目增加,抗氧化活性增加,在两项试验中作为二聚体的 procyanidin B 4 的活性均强于单倍体 catechin 或 epicatechin,但是酚羟基不是唯一的决定因素,在自由基捕获试验中,含 3 个邻酚羟基的 gallic acid 的活性却强于 4 个酚羟基的 catechin 或 epicatechin。procyanidin B 4, catechin, epicatechin 和 gallic acid 均表现了比 Vit C 强的抗氧化作用。

体外抗氧化实验仅从化学反应角度对化合物抗氧化作用进行了初步评价与筛选,作者进一步进行了细胞水平试验,预试验表明,小鼠脾细胞对 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级浓度样品液即产生敏感反应,因此本文在 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级水平上讨论体外抗氧化作用较显著的 procyanidin B 4, catechin 和 gallic acid 对细胞的保护作用。

细胞试验结果表明,低浓度 procyanidin B 4, catechin 和 gallic acid 均有一定程度的抑制 H_2O_2 诱导细胞 DNA 损伤的作用。在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下 procyanidin B 4 活性约为 catechin 的两倍,与其酚羟基数目一致。但值得注意的是化合物量效关系并不规律, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ procyanidin B 4 可产生 56% 左右的损伤抑制,而 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仅为 40%, 弱于 catechin, 这种矛盾可用多酚类化合物存在抗氧化与促氧化两种作用来解释^[16,17], 对不同浓度 catechin 的研究结果也证实了这一点, $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin 可产生接近 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 的损伤程度,故高浓度时可表现促氧化作用。文献^[18]也报道高浓度黄酮类物质会抑制生长,诱导人正常淋巴细胞的断裂等。因此不能靠单纯增加药品浓度来增加抗氧化保护作用,提示剂量在多酚类物质发挥营养作用中有制约作用,真正的量效关系比较复杂。多酚类物质的促氧化作用可能源自其与体内金属离子的反应,如还原 Fe^{3+} 后便可催化羟自由基的形成^[19]。

致谢:北京师范大学邓志威测定 NMR, 山东大学晶体所于文涛测定 X 射线单晶衍射, 中科院上海生化所林小静测定 CD, 本院分析测试中心田进国测定 IR, 高彦慧测定 MS, 程秀民协助测定 UV, 山东大学卫生毒理教研室郝小宁协助 SCGE 分析。

References:

- [1] Bagchi D, Bagchi M, Sidney J, *et al.* Free radicals and grape seed procyanidin extract: important in human health and disease prevention [J]. *Toxicology*, 2000, **148**(3):187 - 197.
- [2] Frankel EN, Kanner J, German JB, *et al.* Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine [J]. *Lancet*, 1993, **341**(8843):454 - 457.
- [3] Sato M, Maulic G, Ray PS, *et al.* Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against isochemic reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**(6):1289 - 1297.
- [4] Bagchi M, Milnes M, Williams C, *et al.* Acute and chronic stress-induced gastrointestinal injury in rats, and protection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Nutr Res*, 1999, **19**(8):1189 - 1199.
- [5] Ray SD, Hickey E, Bagchi D. A novel grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) protects multiple target organ toxicities induced by aminodranone (lung), dimethylnitrosamine (spleen), CdCl₂ (kidney) and MOCAP (brain) [J]. *FASEB J*, 1999, **13**(2):A187.
- [6] Prieur C, Rigaud J, Cheyrier V, *et al.* Oligomeric and polymeric proanthocyanidins from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1994, **36**(3):781 - 784.
- [7] Guo JT, Lee HL, Chiang SH, *et al.* Antioxidant properties of the extracts from different parts of Broccoli in Taiwan [J]. *J Food Drug Anal*, 2001, **9**(2):96 - 101.
- [8] Saint-cricq de Gaulejac N, Provost C, Vivas N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, **47**(2):425 - 431.
- [9] Wei XT, Jiang JJ, Wu T, *et al.* Antagonistic effect of curcumin on sodium arsenite induced DNA damage in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, **37**(11):833 - 836.
- [10] Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, *et al.* Quercetin and myricetin protect against hydrogenperoxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes [J]. *Mutat Res*, 1997, **393**(3):223 - 231.
- [11] Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp cell Res*, 1988, **175**(1):184 - 191.
- [12] McCarthy PJ, Sweetman SF, McKenna PG, *et al.* Evaluation of manual and image analysis quantitation of DNA damage in the alkaline comet assay [J]. *Mutagenesis*, 1997, **12**(4):209 - 214.
- [13] Foo LY, Lu Y, McNabb WC, *et al.* Proanthocyanidins from *Lotus Pedunculatus* [J]. *Phytochemistry*, 1997, **45**(8):1689 - 1696.
- [14] Jorge M, Ricardo da Silva, Rigard J, *et al.* Procyanidin dimers and trimers from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1991, **30**(4):1259 - 1264.
- [15] Ferreira D, Bekker R. Oligomeric Proanthocyanidins: Naturally Occurring O Heterocycles [J]. *J Nat Prod Reports*, 1996, **13**(5):411 - 433.
- [16] Oshima H, Yoshie Y, Auriol S, *et al.* Antioxidant and prooxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite and nitroxyl anion [J]. *Free Radical Biol Med*, 1998, **25**(9):1057 - 1065.
- [17] Yen GC, Chen HY, Peng HH. Antioxidant and prooxidant effects of various tea extracts [J]. *J Agric Food Chem*,

1997 ,**45**(1) :30 - 34 .

[18] Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) and growth in human cells [J]. *Mutat Res* ,

1997 ,**390**(1 - 2) :141 - 151 .

[19] Sahu SC, Washington MC. Effects of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation [J]. *Cancer lett* , 1991 ,**60**(2) :259 - 264 .