

L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯的合成及抗氧化活性研究^{*}

巫晓琴, 乔薇, 闫素君, 黎峰, 李宁琳, 马林

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 采用直接酯化法, 合成了 L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯 (APHB), 并从清除羟自由基、超氧阴离子自由基、DPPH 自由基能力及还原能力测试 4 个方面研究了它的体外抗氧化活性。结果表明, L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯对上述 3 种自由基均有较好的清除效果, 还原能力也较强, 其抗氧化性能总体上与 V_C 相当, 优于市面上常用的抗氧化剂 TBHQ。是一种有潜力的 V_C 衍生物。

关键词: L-抗坏血酸; 对羟基苯甲酸酯 (尼泊金酯); L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯; 合成; 抗氧化

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 04-0059-05

L-抗坏血酸 (又名维生素 C, V_C) 是一种人体必需的水溶性维生素, 目前广泛用于医疗保健、食品添加剂和食品营养强化剂、美容、畜牧业和水产养殖业等领域^[1]。由于 V_C 分子中有烯二醇基团, 具有较强的还原能力, 因此极易被氧化为去氢抗坏血酸, 特别是在空气、光线、热和金属离子的存在下, 反应更迅速, 使 V_C 的功效减弱甚至消失。V_C 的不稳定性成为其使用过程中的一大障碍^[2-3]。同时, V_C 在除 DME、DMSO 外的大多数有机溶剂中溶解性很差, 这也限制了其应用范围。目前世界上许多公司和学者都在积极开发各种 V_C 衍生物, 已经研制出来的产品主要包括 V_C 的金属盐类, V_C 与各种酸形成的酯 (如 V_C 棕榈酸酯和 V_C 硬脂酸酯) 及 V_C 与糖类的化合物等。

我们根据对羟基苯甲酸酯的抗菌性能及其对酪氨酸酶的抑制作用, 合成了具有良好脂溶性的 L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯 (L-ascorbyl 6-p-hydroxy benzoate, APHB), 希望该 V_C 衍生物同时具有抗氧化、抗菌以及增白等多种生物活性。在本文中, 我们测试了 L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯的一系列抗氧化性能, 并与 L-抗坏血酸、TBHQ 进行了比较。目前在国内外文献中还未找到该化合物的抗氧化活性报道, 类似的有国内黄志良等人于 2004 年报道的 L-抗坏血酸苯甲酸酯^[4]。本研究可为新型 V_C 衍生物的开发提供依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

L-抗坏血酸、对羟基苯甲酸、无水硫酸镁、碳酸氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、邻二氮菲、FeSO₄、TBHQ (特丁基对苯二酚)、Tris、邻苯三酚、铁氰化钾、三氯乙酸、FeCl₃ 均为市售国产分析纯试剂; DPPH 购自 Alfa Aesar 公司。

质谱用岛津 LCMS2010A 液相色谱质谱联用仪测定; ¹H NMR 用美国 VARIAN 公司的 Mercury Plus300 核磁共振波谱仪测定; 熔点在上海精密科学仪器有限公司生产的申光牌 WRS-1B 数字熔点仪上测定; 紫外吸收用岛津 UV-2501PC 紫外分光光度计测定。

1.2 实验方法

1.2.1 L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯 (APHB) 的合成 采用直接酯化法^[5-6]。向 20 mL 浓硫酸中缓慢加入 5.28 g (30 mmol) 的 L-抗坏血酸和 1.38 g (10 mmol) 的对羟基苯甲酸, 25 °C 下反应 20 h 反应结束后在冰浴下加入 50 mL 冰水及 50 mL 乙酸乙酯, 分出乙酸乙酯层。水层用乙酸乙酯多次萃取。合并乙酸乙酯层, 用饱和 NaHCO₃ 冰冷溶液洗涤 2 次, 再用冰水洗涤 1 次。剩下的乙酸乙酯用无水 MgSO₄ 干燥。0.1 Pa 下 30~35 °C 旋转蒸发至开始有沉淀析出。剩余的液体放入冰箱上层冷冻过夜, 第二天抽滤, 滤渣用二氯甲烷洗两次, 然后真空干燥。产物为奶白色晶体, 产率约 27%。θ_{mp}

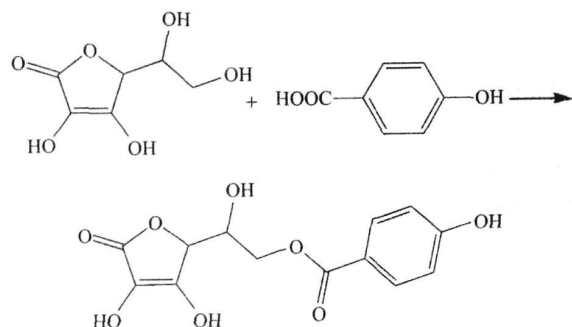
* 收稿日期: 2007-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20032020)

作者简介: 巫晓琴 (1982 年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 马林; E-mail: cesma@mail.sysu.edu.cn

230.5 ~ 231.8 °C; ^1H NMR(DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 7.84(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.83(d, $J=8.1$ Hz, 2H), 4.79(s, 1H), 4.30 ~ 4.17(m, 2H), 4.08(t, $J=6.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 75 MHz) δ 170.97, 166.07, 162.38, 152.69, 132.36(2C), 120.80, 118.70, 115.91(2C), 75.88, 66.29, 65.53. ESIMS m/z : 295 (M^+ , 100%).

反应路线如下:



1.2.2 APhB清除羟自由基能力测定 测定方法采用 Fenton 反应^[7-8]。先将样品配成一定浓度溶液, 然后向 1.5 mL 离心管中加入 100 μL 邻二氮菲溶液 (7.5 mmol/L, 无水乙醇配), 100 μL FeSO_4 溶液 (7.5 mmol/L, 去离子水配), 样品溶液, 100 μL H_2O_2 溶液 ($\rho=0.1\%$), 用磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, $\text{pH}=7.4$) 配至 1 mL, 在 37 °C 下保温 1 h, 然后倒入比色皿中, 测定其在 536 nm 处的吸光值 A 。

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{A - A_0}{A_0 - A} \times 100\%$$

A 为不加样品时溶液的吸光值, A_0 为不加样品和 H_2O_2 时溶液的吸光值。

1.2.3 APhB清除超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 能力测定 测定方法采用邻苯三酚自氧化反应。参考文献 [8-9], 并作适当改动。先将样品配成一定浓度溶液, 然后向 1.5 mL 离心管中加入 550 μL Tris-HCl (0.05 mol/L, $\text{pH}=8.2$) 及样品溶液, 用去离子水配至 950 μL , 然后加入 50 μL 邻苯三酚溶液 (3 mmol/L, 用 0.01 mol/L HCl 配), 混合均匀后迅速倒入比色皿中, 测定其在 320 nm 处的动力学曲线 ($t=200$ s), 得到吸光值随时间变化的速率 K_0 。所用的各种溶液均已 27 °C 水浴预热。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = \frac{K_0 - K_0'}{K_0} \times 100\%$$

K_0' 为不加样品时邻苯三酚的自氧化速率。

1.2.4 APhB清除 DPPH 自由基 (DPPH $^{\cdot}$) 能力测定 参考文献 [10]。先将样品配成一定浓度溶液, 然后向 1.5 mL 离心管中加入样品溶液, 用无

水乙醇配至 650 μL , 混合均匀后加入 350 μL DPPH $^{\cdot}$ 溶液 (15.7×10^{-5} mol/L, 无水乙醇配), 放置 30 min, 倒入比色皿中, 测量其在 517 nm 处的吸光值 A 。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

A_0 为不加样品时溶液的吸光值。

1.2.5 AHB 还原能力测定 测定方法采用普鲁士蓝法, 参考文献 [11], 并加以改动。先将样品配成一定浓度溶液, 然后在 1.5 mL 离心管中加入 250 μL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液 ($\rho=1\%$) 及样品溶液, 用磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, $\text{pH}=6.6$) 配至 650 μL , 50 °C 下保温 20 min, 之后依次加入 250 μL 三氯化铁溶液 ($\rho=10\%$), 100 μL FeCl_3 溶液 ($\rho=0.1\%$)。混合均匀后静置 10 min, 倒入比色皿中, 测量其在 700 nm 处的吸光值。

2 结果与讨论

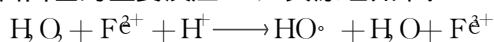
2.1 原料比例与反应条件的选择

由于对羟基苯甲酸含有一个羟基, 其给电子共轭效应降低了对位羧基的酸性, 大大影响了反应活性, 因此我们试图通过增加 V_c 的投料量来替高产率。实验中, 当 V_c 与对羟基苯甲酸的摩尔投料比为 1.5:1 时, 产率极低, 并且产物中混有对羟基苯甲酸, 不易除去, 影响产物纯度。而当投料比增至 3:1 时, 产率有明显提高, 并且基本上已不含有对羟基苯甲酸, 产物较纯, 通过核磁与质谱也确认了这一点。

V_c 的耐热性较差, 高温下易分解, 因此反应温度不能太高。在反应的选择性方面, V_c 的 5 位和 6 位碳上都含有羟基, 但 6 位羟基为一级羟基, 位阻小, 容易酯化; 而 5 位的羟基为二级羟基, 位阻相对较大, 不易酯化。另外, 我们还采用低温反应与缓慢加料等方法试图进一步提高酯化反应的选择性, 但是温度过低时反应速度又太慢。综合以上因素, 我们选择 25 °C 作为反应温度, 并且后处理时旋转蒸发温度保持在 30 ~ 35 °C。

2.2 AHB 清除羟自由基 ($\text{HO}^{\cdot}$) 能力

$\text{HO}^{\cdot}$ 是造成组织脂过氧化、蛋白质解聚与聚合、核酸断裂、多糖解聚的重要活性氧。因此 $\text{HO}^{\cdot}$ 清除率是反映物质抗氧化作用的重要指标。能产生 $\text{HO}^{\cdot}$ 的体系很多, 其中 Fenton 反应是体内产生自由基的重要反应^[12], 其原理如下:



邻二氮菲与 Fe^{2+} 能形成红色的络合物, 在 536 nm 处有最大吸收峰。当加入 H_2O_2 后, Fe^{2+} 被 $\text{HO}^{\cdot}$

氧化为 $\text{F}^{\delta+}$ ，从而使溶液在 536 nm 处的最大吸收峰消失。若加入的抗氧化剂清除羟自由基能力越强，则溶液在 536 nm 处的吸光值就越高。通常用 EC_{50} 值来表示清除 50% 自由基时所需抗氧化剂的量， EC_{50} 已经成为广泛使用的表示抗氧化剂活性的一个参数^[13-14]。

根据以上原理，我们测量了 APHB 清除 $\text{HO}^{\cdot}$ 的能力，并以 V_C 和市售常用的抗氧化剂 TBHQ 作为对照。

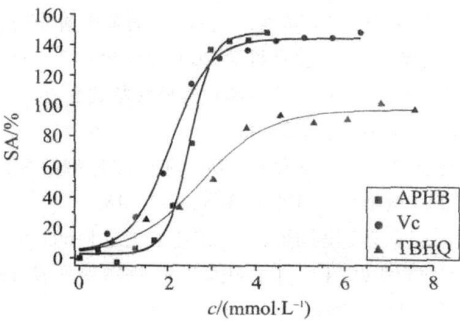


图 1 APHB 对 $\text{HO}^{\cdot}$ 的清除率

Fig 1 Hydroxyl radical scavenging activity of APHB

由图 1 可见，APHB、 V_C 与 TBHQ 对羟自由基均有清除作用，其中 APHB 与 V_C 的清除能力要优于 TBHQ。三者清除羟自由基的 EC_{50} 值分别为 2.3、1.7 和 2.7 mmol/L。另外，从图 1 中还可以看出，APHB 清除羟自由基时有明显的延迟效应，即样品要达到一定的浓度才开始产生清除效果。

2.3 APHB 清除超氧阴离子自由基能力

邻苯三酚自氧化的比色分析法由于其所用试剂简单，稳定性和重现性好，因而广泛用于测定样品对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除能力。邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化，产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及有色中间物质。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 对自氧化有催化作用，当加入抗氧化剂后， $\text{O}_2^{\cdot-}$ 被清除，邻苯三酚自氧化速率下降，有色中间物质的产生速率随之降低。通过测量有色中间物质的产生速率，即邻苯三酚的自氧化速率，可间接得到样品对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率。

经测定，APHB 和 V_C 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 EC_{50} 值分别为 0.051 和 0.047 mmol/L，说明 APHB 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的效果要略逊于 V_C 。TBHQ 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的 EC_{50} 值为 8.37 mmol/L，远大于 APHB 和 V_C 。

我们还扫描了 APHB 与邻苯三酚混合液的紫外吸收光谱 (图 2 a)。从图中可以看出，随着时间的增加，320 nm 处的吸光值增加，说明邻苯三酚通过自氧化逐渐产生有色中间产物。另一方面，265 nm 处的吸收峰逐渐变小。由于 V_C 和 APHB 在 265

nm 处均有最大吸收峰 (图 2 b)，可以推断这个吸收峰是属于两者共有的 α, β 不饱和酮结构的，它的减小说明该结构发生了变化。因此，APHB 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的机理应该是通过 α, β 不饱和酮部分发生变化而起到清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的作用。

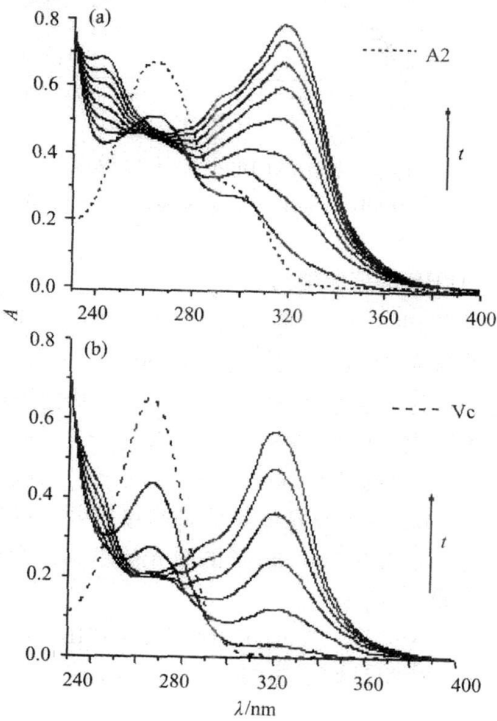


图 2 APHB 与邻苯三酚混合液 (a) 和 V_C 与邻苯三酚混合液 (b) 的紫外吸收光谱图

Fig 2 UV spectra of the mixture of APHB and pyrogallol (a) and the mixture of V_C and pyrogallol (b)

2.4 APHB 清除 DPPH 自由基 ($\text{DPPH}^{\cdot}$) 能力

$\text{DPPH}^{\cdot}$ 是测定抗氧化活性使用最广的两种人工生成的自由基之一。 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 法早在 20 世纪 50 年代就已提出，现在广泛用于定量测定生物试样、酚类物质和食品的抗氧化能力^[15]。

$\text{DPPH}^{\cdot}$ (二苯代苦味酰基自由基, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 在有机溶剂中是一种稳定的自由基，呈深紫色，其孤对电子在 517 nm 有强吸收。 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 和抗氧化剂混合后，随着 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 与抗氧化剂给出的氢相结合，使体系颜色由紫色变为淡黄，517 nm 处的光吸收值减少，反应结束后达到稳定。 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 剩余百分率与抗氧化剂的清除能力相对应^[16]。

由图 3 可见，APHB、 V_C 和 TBHQ 均对 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 有较好的清除效果，三者的 EC_{50} 值分别为 16、20 和 14 $\mu\text{mol/L}$ 。虽然 TBHQ 的 EC_{50} 值最低，但是它对 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 清除率只能达到 80%，而 APHB 和 V_C 对 $\text{DPPH}^{\cdot}$ 的清除率可达到 90% 以上。

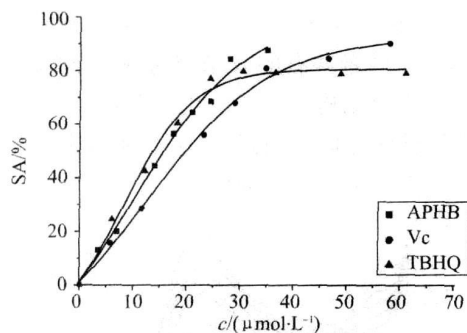


图 3 APHB对 DPPH· 的清除率

Fig 3 DPPH radical scavenging activity of APHB

2.5 APHB的还原能力

早在 1988 年, Tanaka 等^[17]就指出, 样品的还原能力与抗氧化活性之间有显著的相关性。本实验所用的普鲁士蓝法测量的是样品将铁氰化钾中的 Fe^{III} 还原成 Fe^{II} 的能力。由于普鲁士蓝 ($\text{K}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$) 在 700 nm 处有强吸收峰, 因此可以根据 700 nm 处的吸光值高低来间接判断样品的还原能力。溶液在 700 nm 处的吸光值越高, 则样品的还原能力越强。

由图 4 可见, 在相同浓度下, APHB 和 Vc 的还原能力均明显强于 TBHQ。

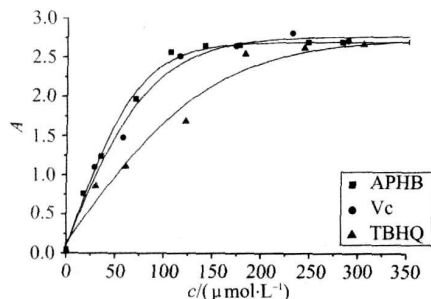


图 4 APHB的还原能力

Fig 4 Reducing ability of APHB

3 结 论

实验表明, L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯对羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基均有较好的清除效果, 还原能力也较强, 并且具有良好的脂溶性, 可以为新型食品添加剂及化妆品原料的开发提供参考。

L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯含有对羟基苯甲酸基团, 对羟基苯甲酸酯 (尼泊金酯) 本身就是一种强抗菌剂, 因此我们估计 L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯应该也具有抗菌作用。未来我们将研究它的抗菌性能、抗油脂氧化性能及对酪氨酸酶的抑

制作用, 以期进一步对它作全面的评价。

参考文献:

- [1] 张彦玲, 刘建峰, 齐永斌. 维生素 C 衍生物的现状与发展 [J]. 河北化工, 2005 (3): 18—21.
- [2] 陈慧, 姚军, 马慧丽. L-抗坏血酸-2-磷酸酯镁的合成和应用 [J]. 河北工业科技, 2005 22 (3): 176—178.
- [3] 蔡力创, 吕积国, 高立贞, 等. L-抗坏血酸-6-棕榈酸酯的合成研究 [J]. 江西科学, 1999 17 (3): 154—157.
- [4] 黄志良, 何璧如, 莫弛. L-抗坏血酸苯甲酸酯的合成与性能研究 [J]. 食品科学, 2004 25 (4): 87—90.
- [5] 刘立峰, 王清格. 维生素 C 棕榈酸酯的合成 [J]. 河北化工, 2004 (6): 42—43.
- [6] 陆豫, 甘利军, 陈葆仁. L-抗坏血酸棕榈酸酯的合成 [J]. 精细化工, 1996 13 (3): 17—18.
- [7] 贾之慎, 郭建敏, 唐孟成. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996 23 (2): 184—186.
- [8] 何玲玲, 王新, 石中亮, 等. 醇提板栗壳色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用 [J]. 安徽农业科学, 2006 34 (10): 2054—2058.
- [9] 李彩霞, 焦扬, 梁倩倩, 等. 黑果枸杞提取物抗氧化性研究 [J]. 食品工业科技, 2006 27 (10): 55—57.
- [10] 李瑜, 许时婴. 蒜粉体外抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2006 27 (1): 25—28.
- [11] 刘杰超, 焦中高, 周红平, 等. 甜樱桃红色素的体外抗氧化活性 [J]. 果树学报, 2006 23 (5): 756—759.
- [12] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996 23 (6): 553—555.
- [13] SUN Y X, HAYAKAWA S, OGAWA M, et al. Antioxidant Properties of custard pudding dessert containing D-psicose rare hexosq [J]. Food Control 2007 18: 220—227.
- [14] KANNER J, FRANKEL E, GRANIT R, et al. Natural antioxidants in grapes and wines [J]. J Agricultural and Food Chemistry 1994 42: 64—69.
- [15] 王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法 (一) [J]. 食品与发酵工业, 2006 32 (3): 92—98.
- [16] 纪俊敏, 谢文磊. 生物体系中脂质过氧化及抗氧化剂抗氧化活性的检测与评价 [J]. 中国油脂, 2004 29 (7): 33—37.
- [17] TANAKA M, KUIE C W, NAGASHIMA Y, et al. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products [J]. Nippon Suisan Gakkaishi 1988 54: 1409—1414.

(下转第 68 页)

Interspecies Variations in Stomatal Sensitivity to Vapor Pressure Deficit in Four Plant Species

ZHAO Ping LU Hui SUN Guochou

(Heshan Hill Land Interdisciplinary Experimental Station, South China
Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Stomatal conductance at leaf and canopy levels (g_s and G_s) was measured by employing CO_2 exchange—measuring system and sap flow measurements to evaluate the stomatal sensitivities ($-dg_s/d\ln D_s$ or $-dG_s/d\ln D$) in proportional to magnitude of g_s or G_s to water vapor pressure deficit (D) under condition of $D=1$ kPa. However, the magnitude of the stomatal sensitivity varied considerably among species. The sensitivity was correlated with the reference stomatal conductance (g_{sref}) with a slope of 0.58 at leaf-level ($r=0.88$) and with a slope of 0.65 at canopy-level ($r=0.86$). The results showed that the species with higher g_s or G_s at low D_s or D showed a higher sensitivity to D_s or D . Sun plant such as *Rhodomyrtus tomentosa* and *Schinus molle* had stomata higher stomatal conductance and exhibited a greater sensitivity to D_s at leaf-level and to D at canopy-level. However, a shade-tolerant species *Adiantum quinquangulatum* with lower stomatal conductance was less sensitive to D_s or D . Mean canopy stomatal conductance (G_s) was measured by using sap flow measurement in whole tree of *Acacia mangium*. The relationship between G_s and D was close ($r=0.94$). When $D=1$ kPa, the sensitivity of G_s to D ($-m$) was $72.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \ln(\text{kPa})^{-1}$ showing $G_s > m$. The relationship between mean canopy stomatal conductance and sap flux density was $r=0.45$. A higher G_s at low D in *A. mangium* showed a greater sensitivity to D , which is similar to that of *S. molle*, implying that it be well capable of regulating leaf water potential if grown in subtropical environment where seasonal dry period occurs.

Key words: stomatal conductance; mean canopy stomatal conductance; vapor pressure deficit; sensitivity to vapor pressure deficit

(上接第 62 页)

Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of L-ascorbyl 6-p-Hydroxy Benzoate

WU Xinqin QIAO Wei YAN Suijun LI Feng LIN Jinglin MALin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: L-ascorbyl 6-p-hydroxy benzoate (APHB) was prepared by esterification of L-ascorbic acid and p-hydroxy benzoic acid. The antioxidant properties were evaluated by several methods: scavenging effect on hydroxyl radical, superoxide radical, DPH radical and reducing power. The results showed that APHB had significant antioxidative properties and could be a potential VC derivative.

Key words: L-ascorbic acid; p-hydroxy benzoate; L-ascorbyl 6-p-hydroxy benzoate; synthesis; antioxidant