L-抗坏血酸肉桂酸酯的合成及其抗氧化活性研究

王园，惠爱玲，潘见，汪昊曙，石林娟
（农产品生物化工教育部工程研究中心(合肥工业大学)，安徽合肥 230009）

摘要：以 L-抗坏血酸和肉桂酸为原料，采用酰氯法合成得到了 L-抗坏血酸肉桂酸酯。用分光光度法研究了酯化产物的稳定性、清除羟自由基(·OH)和二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)的能力，并与 Vc 和常用的油溶性抗氧化剂叔丁基对苯二酚(TBHQ)进行比较，结果表明：新合成的 L-抗坏血酸肉桂酸酯与 Vc 相比，稳定性得以明显改善，其清除 DPPH·的 EC_{50} 值为 63.96 μmol/L，清除能力与 Vc 相当，清除·OH 的 EC_{50} 值为 7.84 mmol/L，在浓度较高时优于 TBHQ。

关键词：L-抗坏血酸；肉桂酸；L-抗坏血酸肉桂酸酯；抗氧化；自由基清除率

文章篇号：1673-9078(2013)6-1337-1341

Synthesis of L-ascorbic Acid Cinnamic Acid Ester and Its Antioxidant Activities

WANG Yuan, HUI Ai-ling, PAN Jian, WANG Hao-shu, SHI Lin-juan
(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, HeFei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: This experiment was obtained L-ascorbic cinnamic acid ester by esterification with L-ascorbic acid and cinnamic acid as raw materials. Stability of esterification product in solution clear hydroxyl free radical (·OH) and diphenyl generation bitter hydrazine group free radicals (DPPH·) ability were studied using spectrophotometric method. And the corresponding free radical activity was compared with Vc and tertiary butyl hydroquinone (TBHQ). The results showed thatL-ascorbic acid cinnamic acid ester had higher stability than Vc. The DPPH· scavenging ability of the product was similar to that of Vc, with the EC_{50} values being of 63.96 μmol/L. Its EC_{50} values for removing ·OH was of 7.84 mmol/L, better than that of TBHQ in high concentration.

Key words: L-ascorbic acid; cinnamic acid; L- ascorbic acid cinnamic acid ester; antioxidant activity; radical scavenging activity

L-抗坏血酸又名维生素 C，是一种重要的以抗氧化功能为特色的水溶性维生素，L-抗坏血酸及其多种衍生物是我国允许使用的食品添加剂，由于它价格低廉和较好的抗氧化性能，在医药、食品、化妆品等行业中有广泛应用[1~2]。同时，它还具有抗癌活性、预防心血管疾病以及通过捕获人体正常代谢过程中所产生的自由基而起到延缓衰老的作用[3]。

由于 Vc 分子中有烯二醇基团，具有较强的还原能力，特别是在空气、热和金属离子的存在下，氧化速度加剧，因此 Vc 的不稳定性成为其使用过程中的一大障碍。同时，Vc 在除 DMF、DMSO 外的大多数有机溶剂中溶解性很差，因此对 Vc 进行改性，增强其稳定性和改善脂溶性进而扩展其应用范围成为研究的热点[4]。除了已成功开发的抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、抗坏血酸棕榈酸酯和抗坏血酸硬酸酯外，近年来又有壳聚糖抗坏血酸盐、反丁烯二酸-6-抗坏血酸甲酯、甲氧基羰基丙烯酸-6-抗坏血酸酯等[5~7]衍生物被报道。

肉桂酸化学名 3-苯基-2-丙烯酸，又名桂皮酸，具有防霉防腐杀菌作用可应用于蔬菜水果的防腐保鲜，此外可广泛直接添加于一切食品中。另外，许多体内外实验表明，肉桂酸能明显对抗由 ADP 和胶原诱导的血小板聚集，从而有利于减少血栓形成[8]。本文以 L-抗坏血酸和肉桂酸为主要原料，采用酰氯酯化法[9~10]对 L-抗坏血酸进行改性，合成得到了 L-抗坏血酸肉桂酸酯，提高了 Vc 的脂溶性和稳定性，并对其对·OH 和 DPPH·的清除能力进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-抗坏血酸、肉桂酸、叔丁基对苯二酚（TBHQ）、亚硫酰氯($SOCl_2$)、丙酮、二甲基甲酰胺(DMF)、氯仿、二氯甲烷（CH_2Cl_2）、三乙胺（Et_3N）、无水硫酸钠、无水氯化钙、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、邻二氮菲、

收稿日期：2013-01-27

作者简介：王园（1987-），女，硕士研究生，研究方向为食品化学

硫酸亚铁、双氧水（30%）、无水乙醇等，均为市售国产分析纯试剂；二苯苦味肼基自由基(DPPH·)，Alfa公司，分析纯试剂。

AR1140/C 型电子天平，上海奥豪斯公司；旋转蒸发器，上海申胜生物技术有限公司；85-1磁力搅拌器，上海司乐仪器有限公司；SHB-III循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸易有限公司；电热恒温干燥箱，上海三发科学仪器有限公司；ZF-2 型三用紫外仪，上海市安亭电子仪器厂；VNMRS600 超导核磁共振波谱仪，美国安捷伦科技公司；UV-1600 紫外分光光度计，北京瑞丽分析仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肉桂酸酰氯的合成[11]

取 1.48 g（约 10 mmol）肉桂酸和 7~8 mL 的 $SOCl_2$ 于反应瓶中，45 ℃加热反应 4 h，减压浓缩除去未反应的亚硫酰氯，再加入甲苯重复浓缩两次，以除去残存的亚硫酰氯，生成的肉桂酸酰氯密封保存或加入二氯甲烷稀释待用。

1.2.2 L-抗坏血酸肉桂酸酯的合成

准确称取 5 mmolL-抗坏血酸置于 50 mL 圆底烧瓶中，加入 4 mL DMF 和 6 mL 二氯甲烷混合溶剂（或者 10mL 二氯甲烷），搅拌使 L-抗坏血酸完全溶解（10 mL 二氯甲烷的未溶解），再加入 5~10 mmol 的已干燥过的三乙胺，控制整个反应在冰浴条件下，从恒压漏斗中缓慢滴加 5~10 mmol 肉桂酰氯的二氯甲烷溶液，滴毕常温反应，TLC 监测反应进度。待反应结束后，向混合物中加入 30 mL 水及 30 mL 二氯甲烷，分液漏斗萃取得到有机层，经水洗、干燥、减压浓缩得到粗产品，硅胶柱层析进一步纯化。在 DMF-CH_2Cl_2 混合溶剂中仅得到一种产物，标记为(a)，在二氯甲烷中分别得到两种不同的产物，分别标记为(a)和(b)，但(b)的量很少，不易获得纯品。经 ^{1}H-NMR 对所纯化的产物（a）及（b）进行结构表征。

合成路线图如图 1 所示。

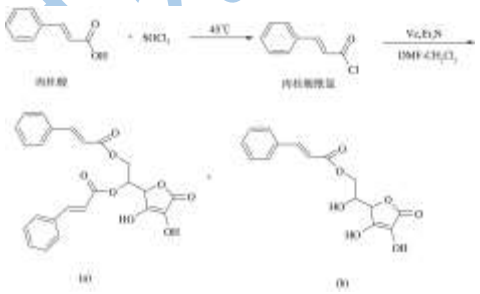


图 1 L-抗坏血酸肉桂酸酯的合成路线

Fig.1 The synthetic route of L-ascorbic acid cinnamic acid ester

1.2.3 L-抗坏血酸肉桂酸酯的稳定性测试

分别配置不同浓度梯度的 L-抗坏血酸和 L-抗坏血酸肉桂酸酯溶液，在紫外分光光度计下进行全波长扫描，根据分光光度法中“吸收最大，干扰最小”的波长选择原则，选择出合适的测定浓度，通过测出的吸收曲线找到其最大吸收波长(λ_{max})，取适当的浓度溶液置于 36 ℃恒温箱中，然后在 λ_{max} 处每间隔 1 h 分别测定其最大吸收峰强度(A)，根据其最大吸收波峰的变化情况来研究它们在溶液中的稳定性。

1.2.4 清除 DPPH 自由基（DPPH·）能力的测定[12]

DPPH·(二苯代苦味酰基自由基)经常被用来测定样品的抗氧化性能，在有机溶剂中是一种稳定的自由基，其醇溶液呈紫色，具有单一电子，故能接受一个电子或氢离子，在波长为 517 nm 下具有最大吸收。有自由基清除剂存在时，DPPH·的单电子被捕捉而使其颜色变浅，在最大光吸收波长处的吸光值下降，从而以评价试验样品的抗氧化能力[13]。通常用 EC_{50} 值来表示清除 50%自由基时所需抗氧化剂的量，是衡量抗氧化剂活性的有效指标[14]。

用无水乙醇配置浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液，置于 0~4 ℃下避光保存。分别吸取用乙醇溶解的不同浓度的 L-抗坏血酸肉桂酸酯样品 2 mL，加入 DPPH 溶液 2 mL，充分振荡摇匀，于黑暗处放置 30 min 后，以无水乙醇作为空白参比，测定其在 517 nm 处的吸光度值 A_i。取 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 无水乙醇的混合溶液，测定其在 517 nm 处的吸光度值 A_{DPPH}。每个浓度的样品重复三次，并取其平均值，同时与 L-抗坏血酸、TBHQ 的清除自由基能力做对比。

样品对 DPPH 自由基的清除能力按下式计算：

$$DPPH\cdot\text{清除率}(\%)=(A_{DPPH}-A_i)/A_{DPPH}\times 100$$

1.2.5 清除羟自由基（·OH）能力的测定

·OH 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·OH 清除率是反映物质抗氧化作用的重要指标。能产生·OH 的体系很多，其中 Fenton 反应是体内产生自由基的重要反应，其原理如下[15]：

$$H_2O_2+Fe^{2+}+H^+\rightarrow\cdot OH+H_2O+Fe^{3+}$$

邻二氮菲溶液与 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·OH 氧化为 Fe^{3+}，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[16]。

先配置 7.5 mmol/L 的邻二氮菲无水乙醇溶液、7.5 mmol/L 的硫酸亚铁水溶液和 0.1%的过氧化氢溶液。向 10 mL 离心管中依次加入 1 mL 的邻二氮菲无水乙醇溶液和 2 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液，混合均匀

后，加入 1 mL 硫酸亚铁水溶液和 1 mL 已配置好的不同浓度的样品溶液（无水乙醇配），最后加入 0.1%的双氧水 1 mL，反应液在 37 ℃下保温 1 h 后，倒入比色皿中，测其在 536 nm 处的吸光光度值 A_i。每个浓度的样品重复三次，并取其平均值，同时与 L-抗坏血酸、TBHQ 的清除自由基能力做对比。

不同浓度样品的羟自由清除率按下式计算：

$$SA(\%)=(A_i-A_0)/(A_{00}-A_0)\times 100$$

注：A_0 为不加样品时溶液的吸光光度值，A_{00} 为不加样品和双氧水时溶液的吸光光度值。

2 结果与讨论

2.1 L-抗坏血酸肉桂酸酯的结构鉴定

Vc 的耐热性比较差，因此整个反应中温度不能太高，以防 Vc 高温分解，此外 Vc 的溶解性很差，因此反应尝试用 DMF-CH_2Cl_2 混合溶剂。从分子结构上看，L-抗坏血酸的 5 位和 6 位都有羟基，都可以反生酯化反应，从反应位阻上看，6 位羟基为一级羟基，位阻较小，更易反生酯化，5 位羟基位阻相对较大，不易酯化。产物纯化后经鉴定基本上为 Vc-5,6-二肉桂酸酯(a)，反应除得到产物(a)外，还得到极少量的 Vc-6-肉桂酸酯（b），合成产物(a)(b)的核磁数据分析见图 2。

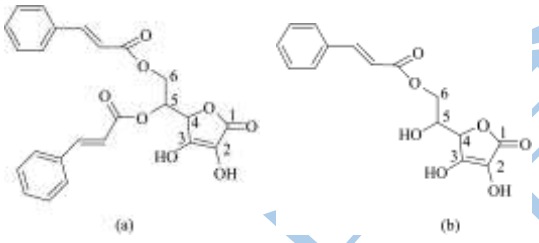


图 2 合成产物(a) (b)的结构图

Fig.2 The structures of the products (a) and (b)

产物（a）的 ^{1}HNMR 的数据及解析：从低场到高场依次是 7.33~7.99（m，12H）两个苯环上的五个氢和肉桂酸双键上临近苯环上的一个氢，6.59~6.62（m，1H），6.48~6.49（m，1H）是两个肉桂酸双键上临近羰基的氢，4.95（d，1H）为 L-抗坏血酸内酯环上 C4 的氢，4.37~4.54（m，3H）为 L-抗坏血酸 5，6 位碳上的氢。

产物（b）的 ^{1}HNMR 的数据及解析：从低场到高场依次是 7.58~7.83（m，6H）苯环上的五个氢和肉桂酸双键上临近苯环上的一个氢，6.42~6.45（d，1H PhCH=CH）是肉桂酸双键上临近羰基的氢，4.55~4.59（m，3H）为 L-抗坏血酸内酯环上 C4 氢及 C6 位的两氢，3.90（m，1H）为 L-抗坏血酸的 C5 位氢。

2.2 反应条件对 L-抗坏血酸肉桂酸酯得率的影响

2.2.1 原料配比对 L-抗坏血酸肉桂酸酯得率的影响

选择 L-抗坏血酸的用量为 5 mmol、总反应时间为 6 h、温度 25 ℃，改变肉桂酰氯的用量，考察了不同原料配比对产率的影响，结果见表 1。

表 1 原料配比对产率的影响

Table 1 The effect of raw materials ratio on the yield

n(L-抗坏血酸):n(肉桂酰氯)	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2
产率/%	38.42	59.80	68.64	63.71

表 1 可以看出，随着肉桂酰氯的用量增加，L-抗坏血酸肉桂酸酯的得率逐渐增大，但是当原料配比为 1：2 时，得率下降，最后选择原料配比为 1:1.5。

2.2.2 滴加时间对 L-抗坏血酸肉桂酸酯得率的影响

确定了反应中 n(L-抗坏血酸):n(肉桂酰氯)比为 l:1.5，其他条件不变，考察肉桂酰氯的滴加时间对产品收率的影响，如表 2 所示。

表 2 滴加时间对产率的影响

Table 2 The effect of drop time on the yield

滴加时间/h	0.5	1.0	1.5	2.0
产率/%	52.42	70.32	64.71	55.23

肉桂酰氯的滴加时间对得率也有一定的影响，当滴加时间大于 1 h 后，得率反而下降，可能是与酰氯的活泼性很好，不稳定，时间过长，导致酰氯转换成羧酸，从而使反应原料减少，副产物增加，所以选择滴加时间为 1 h。

2.2.3 反应温度对 L-抗坏血酸肉桂酸酯得率的影响

在确定了原料配比和滴加时间的基础上，考察了反应温度对得率的影响，结果如表 3。

表 3 温度对产率的影响

Table 3 The effect of temperature on the yield

温度/℃	15	25	35	45
产率/%	57.83	68.30	60.22	41.72

从表 3 得出，随着温度的升高，得率先增加后又减少，原因是 L-抗坏血酸本身不耐热，稳定性差，过高的温度会导致 L-抗坏血酸发生氧化分解，从而导致得率下降，并且滴加肉桂酰氯时，反应放热，使整个实验反应温度升高。

2.3 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的稳定性

2.3.1 最大紫外吸收波长的确定

通过对不同浓度的样品溶液的测量，最后选取合适的浓度进行全波长扫描，结果如上图，从图 3 可以看出：L-抗坏血酸的最大紫外吸收波长为 245 nm；L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的最大紫外吸收波长为 284 nm，这也与许多文献[17]报道肉桂酸酯在 280~310 nm 处有最大紫外吸收相符。

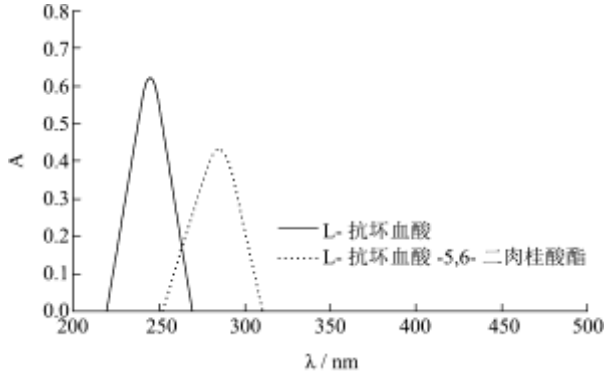


图 3 L-抗坏血酸和 L-抗坏血酸-5，6-二肉桂酸酯的全波长扫描

Fig.3 Full wavelength scanning of L-ascorbic cinnamic and L-ascorbic acid-5,6- cinnamic acid ester

2.3.2 标准曲线的绘制

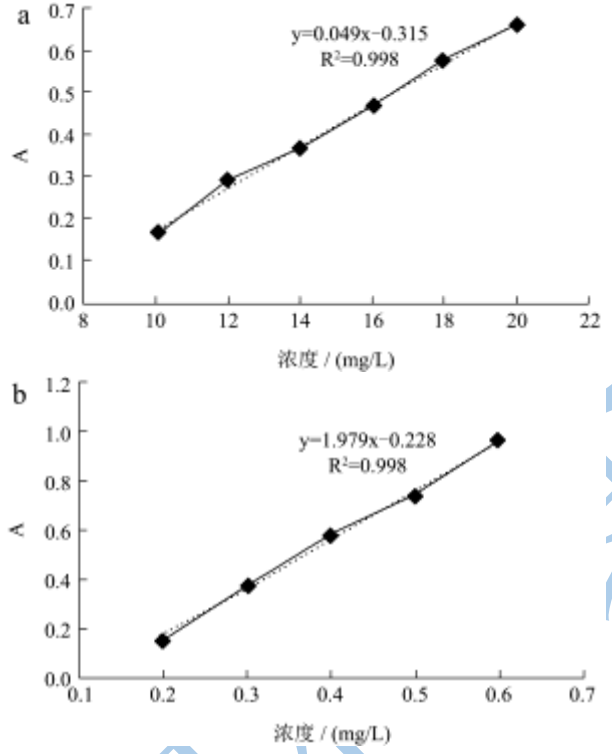


图 4 L-抗坏血酸和 L-抗坏血酸-5，6-二肉桂酸酯的标准曲线

Fig.4 Standard curve of L-ascorbic acid and L-ascorbic acid-5,6- cinnamic acid ester

注：a 为 L-抗坏血酸，b 为 L-抗坏血酸-5，6-二肉桂酸酯。

对不同浓度 L-抗坏血酸和 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯溶液在最大紫外吸收波长处进行测定，以样品浓度（mg/L）为横坐标，吸光光度值（A）为纵坐标绘制标准曲线。L-抗坏血酸的标准曲线线性回归方程为 y=0.049x-0.315，相关系数 R^2=0.998，L-抗坏血酸在 10~20 mg/L 之间呈现很好的线性关系；L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的标准曲线线性回归方程为 y=1.979x-0.228，相关系数 R^2=0.998，在 0.2~0.6 mg/L 之间呈现很好的线性关系。

2.3.3 稳定性测试

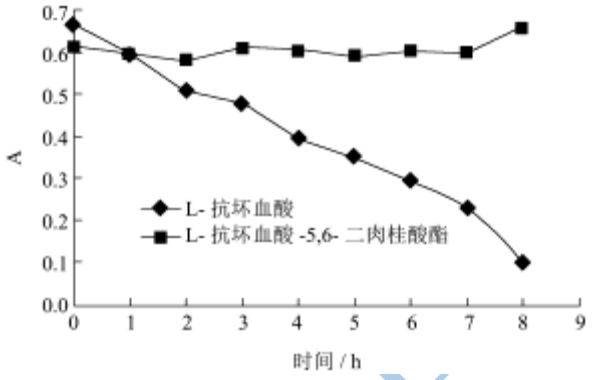


图 5 L-抗坏血酸和 L-抗坏血酸-5，6-二肉桂酸酯的稳定性

Fig.5 Stability of L-ascorbic acid and L-ascorbic acid-5,6-cinnamic acid ester

在温度、光照、金属离子等条件下，L-抗坏血酸很容易被氧化，表现出极大的不稳定性。实验时采用提高温度来加速对稳定性考察，从图 5 可以看出 L-抗坏血酸在保温时随着时间的增加吸光光度值显著降低，L-抗坏血酸的稳定性很差，而 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的含量基本没有变化，且 7 h之后由于溶剂的少量挥发，含量略有增加，可以说明通过酯化得到的 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯相对于 L-抗坏血酸具有很好的稳定性。

2.4 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯对 DPPH·的清除率

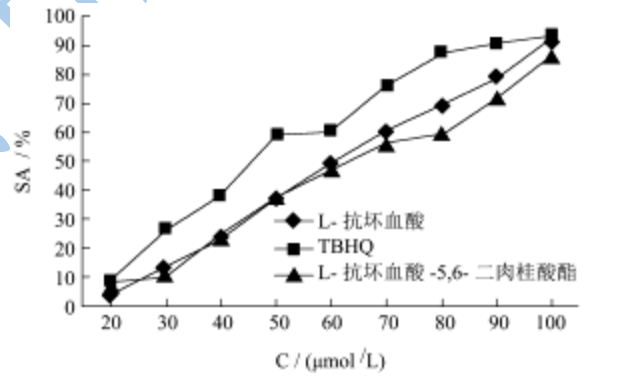


图 6 L-抗坏血酸肉桂酸酯对 DPPH · 的清除率

Fig.6 DPPH radical scavenging activity of L-ascorbic cinnamic acid ester

从图 6 可以看出，L-抗坏血酸、TBHQ 和 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯随着浓度的增大对 DPPH·的清除率逐渐增强，三者的 EC_{50} 值分别为：59.78、46.31 和 63.96 μmol/L，虽然新合成的 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的抗氧化活性小于 TBHQ，但是与 L-抗坏血酸相比，抗氧化活性相当，说明新合成的 L-抗坏血酸-5, 6-二肉桂酸酯保留了 L-抗坏血酸本身具有的抗氧化性。

2.5 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯对·OH 的清除率

从图 7 可以看出，L-抗坏血酸对·OH 的清除率要高于 TBHQ 和 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯，它们的 EC_{50} 值分别为：5.78、8.38、7.84 mmol/L。在较低的

浓度时 TBHQ 的抗氧化性能高于新合成的 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯，当浓度大于 6 mmol/L，L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯的抗氧化性显著增高，这可能是由于 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯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较好的清除效果。

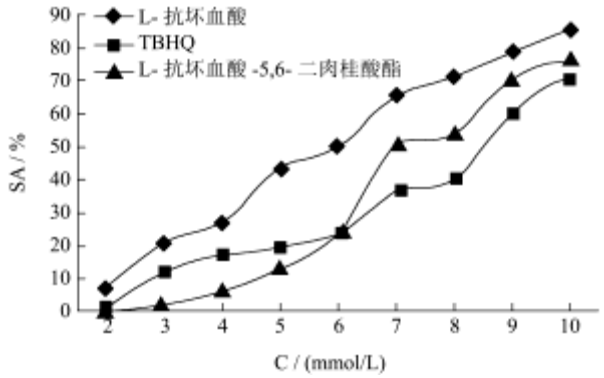


图 7 L−抗坏血酸肉桂酸酯对・OH 的清除率

Fig.7 Hydroxyl radical scavenging activity of L-ascorbic cinnamic acid ester

3 结论

通过采用酰氯法对 L-抗坏血酸进行改性，并对实验条件优化，最后对产物核磁氢谱结构分析，主要为 L-抗坏血酸-5,6-二肉桂酸酯，性质测定结果表明：新合成出的 L-抗坏血酸肉桂酸酯的脂溶性明显提高，新基团的加入也大大提高了它的稳定性；对羟自由基的清除率虽不及 L-抗坏血酸，但在一定浓度时，清除率要优于 TBHQ；对 DPPH 自由基的清除率可达到 86.52%，保留了 L-抗坏血酸本身具有的抗氧化性能。初步结构分析 L-抗坏血酸肉桂酸酯还可能具有较好的抗菌性能和抗血小板聚集的作用，未来我们将继续研究它的这些性能，以此为新型食品添加剂的开发提供一定的理论基础。

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] 郑大贵,肖竹平,余衍文,等.5,6-O-苯乙烯基亚甲基-L-抗坏血酸的合成及其清除自由基和抗菌性能研究[J].化学试剂,2010,32(5),403-406,436

[3] KUWABARAK, WATANABEY,ADACHIS, et al . Stability of saturated acyl L-ascorbates inaqueous solution [J]. Food Sci(E), 2005, 70(1): 7-11

[4] 刘建伟,赵海珍,吕凤霞,等.L-抗坏血酸脂肪酸酯抗氧化活性[J].食品与生物技术学报 2011,30(2):207-212.

[5] 刘静娜,庄远红,耿微微.壳聚糖抗坏血酸盐的制备及其抗氧化性的研究[J].食品工业科技,2011,32(10):139-141,145

[6] 吴亚凉,宁正祥.反丁烯二酸-6-L-抗坏血酸甲酯的合成及抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2009,25(8):900-902,876

[7] 何莉斌,宁正祥,李娜.顺-β-甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯的合成及在猪油中抗氧化性能的研究[J].现代食品科技,2008,24(10):992-994

[8] 张军,陈玟,居文政,等.脉络宁注射液中肉桂酸血药浓度的 LC-MS-MS 测定及人体药动学研究[J].中国中药杂志,2010,35(14):1887-1891

[9] 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,1996,3:17-18

[10] 梁国栋.多功能抗氧化剂 L-抗坏血酸衍生物的合成及其性能研究[D].广州:华南理工大学化学与化工学院硕士学位论文,2011

[11] 许肇成,何松,陈永恒,等.酰氯法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的研究[J].现代食品科技,2010,26(8):822-823

[12] Xiaoming Yang, Wei Yu, Zhongping Ou, et al. Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from Ficus carica fruit [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64: 167-173

[13] 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

[14] SUN Y X, HAYAKAWA S, OGAWAM, et al. Antioxidant properties of custard pudding dessert Containing D-psicose rare hexose [J]. Food Control, 2007, 18: 220-227

[15] WU Xiao-qin, QIAO Wei, YAN Su-jun, et al. Synthesis and antioxidant activity evaluation of L-ascorbyl-6-p-Hydroxyl benzoate [J]. Acta Scifntiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(4): 59-62

[16] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等.邻二氮菲-Fe^{2+}氧化法检测 H_2O_2/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

[17] 申凯华,李晓莲,崔东熏.一种含螺吡喃和肉桂酸酯双光功能基团的光致变色染料的合成与性能[J].高等学校化学学报,2005,5(26):935-938