

绿原酸与卵磷脂复合物的理化性质及其抗氧化活性研究

耿升¹, 马宇祥², 莫海珍¹, 马汉军¹, 葛晓虹¹, 李刚¹, 刘本国¹

(1. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003) (2. 河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450052)

摘要: 绿原酸具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤等多种生物活性功能, 在食品工业中具有广泛的应用前景, 但其脂溶性低的缺点限制了它的应用范围。本研究采用溶剂法制备了绿原酸与卵磷脂的复合物, 采用紫外(UV)、红外(IR)、扫描电子显微镜(SEM)、差示量热扫描(DSC)、X-射线衍射(XRD)等波谱分析手段对该复合物的理化性质进行了研究, 并考察了该复合物的 DPPH 自由基清除能力和 Rancimat 抗油脂氧化能力。结果表明, 绿原酸与卵磷脂复合后, 其物相发生了重大改变, 绿原酸以无定形状态完全分散于卵磷脂中。其在 25 °C 正辛醇中的溶解度, 由最初的 34.73 μg/mL 变为复合后的 4715.84 μg/mL, 脂溶性得了显著提高。在抗氧化试验中, 该复合物的 DPPH 自由基清除能力虽然低于绿原酸和 BHT, 但其抗油脂氧化的能力与 BHT 接近, 显著高于绿原酸, 表明与卵磷脂复合可以显著提高绿原酸在油溶性体系中的抗氧化能力。

关键词: 绿原酸; 卵磷脂; 复合物; 理化性质; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2015)5-124-129

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.020

Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chlorogenic Acid-lecithin Complex

GENG Sheng¹, MA Yu-xiang², MO Hai-zhen¹, MA Han-jun¹, GE Xiao-hong¹, LI Gang¹, LIU Ben-guo¹

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

(2. College of Grain, Oil and Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Chlorogenic acid exhibits bioactivities including antioxidant, antibacterial, and antitumor. Therefore, it has several applications in the food industry; however, its scope is limited by low liposolubility. Here, chlorogenic acid-lecithin complex was prepared by a solvent method and physicochemical properties were studied by ultraviolet-visible spectrometry, infrared spectrometry, scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, and X-ray diffractometry. Additionally, the antioxidant activity of the complex were also evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay and Rancimat test. The results indicated that the physical phase of chlorogenic acid significantly changed after forming a complex with lecithin, where it remained in an amorphous state and completely dispersed in lecithin. The solubility of chlorogenic acid in *n*-octanol at 25 °C increased from 34.73 to 4715.84 μg/mL after complex formation, and the liposolubility of chlorogenic acid significantly improved. The antioxidant assay showed that the DPPH scavenging activity of the complex was inferior to that of chlorogenic acid and BHT. On the other hand, antioxidant activity of the complex in oil was close to that of BHT and superior to that of chlorogenic acid, which suggested that antioxidant activity of chlorogenic acid in oil could be significantly improved by forming a complex with lecithin.

Key words: chlorogenic acid; lecithin; complex; physicochemical property; antioxidant activity

绿原酸(Chlorogenic acid)是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种多酚类化合物, 其是许

收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 国家自然科学基金(21166024), 河南省高校科技创新团队支持计划项目(13IRTSTHN006), 河南省高校科技创新人才支持计划项目(14HASTIT019), 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B550016)

作者简介: 耿升(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品化学研究

通讯作者: 刘本国(1978-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品化学研究

多中草药如金银花、杜仲叶的主要有效成分, 也是众多水果蔬菜的重要活性成分^[1~3]。大量研究表明绿原酸具有抗氧化、降血压、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、保肝利胆、降血脂、抗衰老和兴奋中枢神经系统等多种生物活性功能, 其在食品及医药工业有很好的应用前景, 但其脂溶性低的缺点限制了它的应用范围^[4~7]。

目前, 提高多酚类物质脂溶性最常见的方法是用酸酐或酰氯与其作用制备脂溶性的多酚酯化物。但是

由于多酚类物质的羟基参加了酯化反应,而羟基是其发挥其生理功能所必需的,所以该法有可能会降低多酚的生理活性。且其合成步骤复杂,产物分离困难,所用试剂毒性较大,因此该方法不适用于食品工业。磷脂是细胞膜的重要组成部分,其作用在于保持细胞膜的流动性。有关研究表明,天然活性成分与卵磷脂在一定条件下可以复合,得到具有较强亲脂性的复合物,其理化性质和生物活性较原化合物均有不同程度的改变,可有效的提高活性成分在体内的吸收与利用程度^[8]。肖衍宇等制备了水飞蓟宾磷脂复合物,采用紫外、红外等技术考察了该复合物的理化性质,发现水飞蓟宾磷脂复合物与水飞蓟宾原料相比亲脂性显著增加,水飞蓟宾在大鼠胃肠道中的吸收得到了显著提高,水飞蓟宾的口服生物利用度也得到了增强^[9]。有鉴于此,本研究拟采用溶剂法制备绿原酸与卵磷脂的复合物,采用紫外、红外、扫描电镜、差示扫描量热及X-射线衍射等手段研究该复合物的理化性质,并测定其油溶性及抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

绿原酸,陕西慧科植物开发有限公司;大豆卵磷脂,生工生物工程(上海)有限公司,色谱纯甲醇,美国Tedia公司;其他试剂皆为分析纯试剂。

1.1.2 仪器

TU-1810PC型紫外可见光光度计,北京普析通用仪器有限公司;TENSOR27型红外光谱仪,德国Bruker公司;Quanta200扫描电子显微镜,美国FEI公司;D8型X-射线衍射仪,德国Bruker公司;Q200差示量热扫描仪,美国TA公司;WFJ-7200型可见光分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;1260型高效液相色谱,美国Agilent公司;Rancimat743食用油氧化稳定性测定仪,瑞士Metrohm公司。

1.2 方法

1.2.1 复合物的制备方法

将200 mg绿原酸和400 mg卵磷脂溶于50 mL四氢呋喃中,在室温下磁力搅拌24 h,然后过滤,将所得滤液放入80 °C的水浴中使四氢呋喃挥发完全,冷却后收集淡黄色固体即为绿原酸-卵磷脂复合物。

1.2.2 物理混合物的制备方法

将200 mg绿原酸和400 mg卵磷脂放入研钵中充分研碎、混匀,制得绿原酸与卵磷脂的物理混合物。

1.2.3 绿原酸脂溶性的测定

分别取过量的绿原酸及其复合物到2 mL正辛醇中,在25 °C的水浴震荡器中震荡24 h,取上清液采用高效液相色谱仪测定绿原酸含量。在进行液相色谱分析前所有样品都要经过孔径为0.45 μm的微滤膜。进样量为10 μL,检测波长为250 nm。采用Agilent公司的ZORBAX SB-C18反相柱(4.6 × 150 mm, 5 μm)对样品进行分离,流动相为甲醇和水(8:2),流量为1.0 mL/min。绿原酸的定量采用外标法。色谱数据的记录和处理采用Agilent OpenLAB ChemStation软件。

1.2.4 紫外分析方法

分别取绿原酸、卵磷脂、绿原酸卵磷脂的物理混合物及复合物各1 mg溶于10 mL甲醇,经适当稀释后测定其在220~400 nm波长范围内的紫外吸收光谱。

1.2.5 红外分析方法

取适量的绿原酸、卵磷脂、绿原酸与卵磷脂的物理混合物和复合物,用溴化钾压片后,用红外光谱仪记录其红外光谱。

1.2.6 扫描电镜分析方法

取适量绿原酸、卵磷脂、绿原酸与卵磷脂的物理混合物及复合物依照扫描电镜的要求制样,进行样品形态的微观扫描。

1.2.7 差式扫描量热分析方法

将2.0 mg左右的绿原酸、卵磷脂、绿原酸与卵磷脂的物理混合物与复合物分别均匀的铺在铝坩埚中放入差示量热扫描仪中,在氮气下进行扫描分析,扫描温度范围为50 °C~300 °C。

1.2.8 X衍射分析方法

取适量的绿原酸、卵磷脂、绿原酸与卵磷脂的物理混合物与复合物,进行X射线衍射,衍射角扫描范围为5 °C~70 °C。

1.2.9 DPPH自由基清除试验

DPPH自由基清除能力的测定参照文献^[10]的方法,分别吸取不同浓度的复合物、BHT及绿原酸的乙醇溶液2 mL,加入 2×10^{-4} mol/L的DPPH乙醇溶液2 mL,摇匀后,在室温下、黑暗处放置30 min。以无水乙醇调零,测定517 nm处的吸光值A_{样品}。同时,测定样品溶液2.0 mL与乙醇2.0 mL混合液在517 nm处的吸光值A_{样品},再测定2.0 mL DPPH溶液与2.0 mL乙醇在517 nm处的吸光值A_{对照}。同一测定重复3次,样品的DPPH自由基清除率根据下列公式计算:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$$

1.2.10 抗油脂氧化试验

抗油脂氧化能力的测定采用Rancimat法^[11],分别将绿原酸-卵磷脂复合物、BHT及绿原酸加入到5 g猪

油中(添加量均为 0.02%), 采用 Rancimat743 食用油氧化稳定性测定仪在 110 °C、气流 20 L/h 的条件下, 分析各样品的氧化诱导时间(Induction time, IP)。

1.2.11 数据分析

所有实验均进行 3 次平行试验, 采用 Origin 8.0 软件对实验数据分析处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 复合物的制备

绿原酸是由咖啡酸与葡萄糖形成的酯, 其分子结构中虽然具有酯键, 但其脂溶性却很低, 该缺点限制了绿原酸的广泛应用。限于食品工业对食品配料低成本与高安全性的要求, 对绿原酸采用化学和酶法修饰, 合成新型的绿原酸衍生物的方法并不适用于当前的食品工业, 而采用与卵磷脂复合的方法增加绿原酸的脂溶性, 则是一条可行之路。考虑到原料的溶解性和产物的安全性, 本研究选取了四氢呋喃为溶剂, 制备绿原酸与卵磷脂的复合物。在前期实验中, 我们分别按磷脂与绿原酸的质量比为 0.1、0.5、1 和 2 制备了绿原酸与卵磷脂的复合物。结果表明, 当磷脂与绿原酸的质量比为 2 时, 复合物的稳定性较好。而当其质量比小于 2 时, 所得产品中绿原酸含量较低, 而且质量比越小, 绿原酸含量越低。出于用最少的磷脂达到最好效果的考虑, 最后选择磷脂与绿原酸的质量比为 2。经 HPLC 分析, 在此条件下制备的产品中绿原酸的含量高达 29.19%。如图 1 所示, 脂溶性研究表明绿原酸在 25 °C 正辛醇中的溶解度仅为 34.73 $\mu\text{g/mL}$, 而与卵磷脂复合后, 其溶解度可上升为 4715.84 $\mu\text{g/mL}$, 其脂溶性得到了显著提高 ($p < 0.01$)。

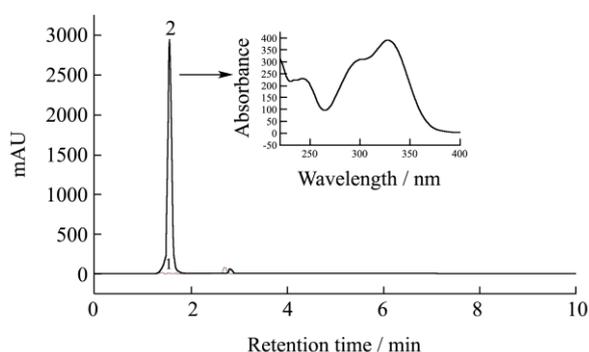


图 1 绿原酸(1)、绿原酸与卵磷脂的复合物(2)在正辛醇中溶解度的比较

Fig.1 Comparison of the solubilities of chlorogenic acid (1) and its complex (2) in *n*-octanol

2.2 紫外光谱分析

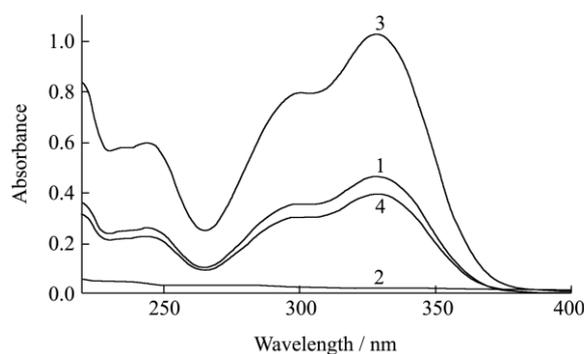


图 2 绿原酸(1)、卵磷脂(2)、绿原酸与卵磷脂的物理混合物(3)及复合物(4)的紫外图谱

Fig.2 Ultraviolet spectra of chlorogenic acid (1), lecithin (2), their mixture (3), and their complex (4)

紫外吸收光谱可以反映化合物的不饱和键的变化情况。绿原酸、卵磷脂、及其混合物和复合物的紫外图谱如图 2 所示。绿原酸属于酚类物质, 含有苯环、双键、羰基等不饱和结构, 其 244 nm 和 328 nm 有紫外吸收峰。与绿原酸相比, 卵磷脂在紫外区的吸收很弱。绿原酸与卵磷脂物理混合物和复合物紫外图谱相同, 均在 244 nm 和 328 nm 处有吸收峰, 和绿原酸相同, 表明复合过程中绿原酸与卵磷脂间没有形成新的双键。

2.3 红外光谱分析

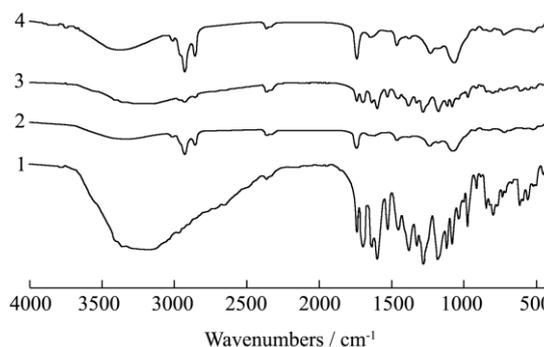


图 3 绿原酸(1)、卵磷脂(2)、绿原酸与卵磷脂的物理混合物(3)及复合物(4)的红外图谱

Fig.3 Infrared spectra of chlorogenic acid (1), lecithin (2), their mixture (3), and their complex (4)

红外光谱是研究分子运动的吸收光谱, 根据红外光谱中吸收峰的位置和形状可以推断化合物的官能团信息。由图 3 可知, 绿原酸具有酚羟基(3169 cm^{-1})、苯环(1451 、 1528 、 1598 cm^{-1})、羰基(1693 cm^{-1})的特征吸收峰, 卵磷脂具有羟基(3358 cm^{-1})、亚甲基(2926 cm^{-1})和羰基(1740 cm^{-1})的特征吸收峰。绿原酸与磷脂物理混合物的红外光谱基本上保留了绿原酸与磷脂的特征吸收峰, 为二者红外光谱的简单叠加, 各峰波数基本

保持不变,只是相对强度发生了一些变化,说明混合物中二者之间并没有相互作用。与物理混合物相比,复合物的图谱发生了明显的变化,虽保留了磷脂的大部分吸收峰,但绿原酸在 500 cm^{-1} 到 1750 cm^{-1} 之间的大部分特征吸收特征峰消失了,表明绿原酸与卵磷脂发生了相互作用,但复合物在扫描范围内是没有出现新的吸收峰的,说明复合物的形成并没有生成新的共价键,绿原酸与卵磷脂保留了各自的化学结构。

2.4 扫描电镜分析

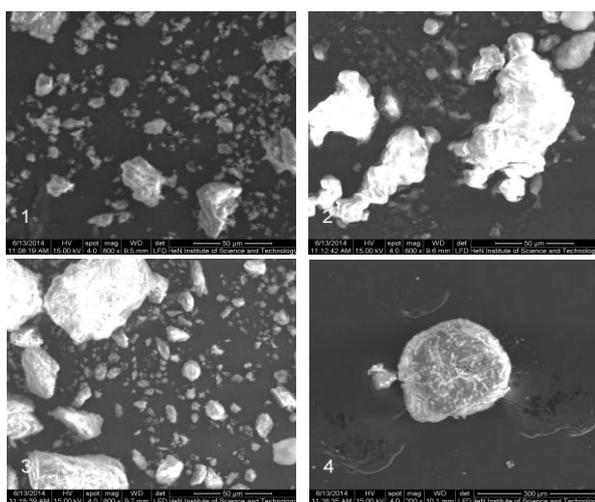


图4 绿原酸(1)、卵磷脂(2)、绿原酸与卵磷脂的物理混合物(3)及复合物(4)的扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron microscopic images of chlorogenic acid (1), lecithin (2), their mixture (3), and their complex (4)

扫描电镜是一种利用电子束扫描样品表面从而获得样品表面三维信息的现代显微技术。绿原酸、卵磷脂、及其混合物和复合物的扫描电镜结果如图4所示,放大倍数均为800倍。图中绿原酸为实心的小块颗粒,而卵磷脂为无定形状态的大块颗粒,其尺寸明显大于绿原酸。在二者的物理混合物中,两种形态的颗粒均能被观察到。而二者的复合物则呈明无定形块状,其形态与绿原酸和卵磷脂相比发生了非常显著的变化。

2.5 X-衍射分析

X衍射分析是利用晶体形成的X射线衍射,对物质内部原子在空间的分布状况进行分析的方法。由图5可知,绿原酸具有众多尖锐的衍射峰,表明其具有结晶状态,而卵磷脂仅在 20° 附近有一个宽大的吸收峰,表明其具有不定形状态^[12]。二者的物理混合物中,绿原酸的尖锐的结晶衍射峰和卵磷脂的宽大吸收峰均能观察,而在二者的复合物的X-衍射图中绿原酸尖锐的结晶衍射峰消失,复合物的X-衍射图谱与卵磷脂类

似,呈现不定形状态,这表明复合物中的绿原酸的物相发生了重大改变,其已完全分散于卵磷脂中。

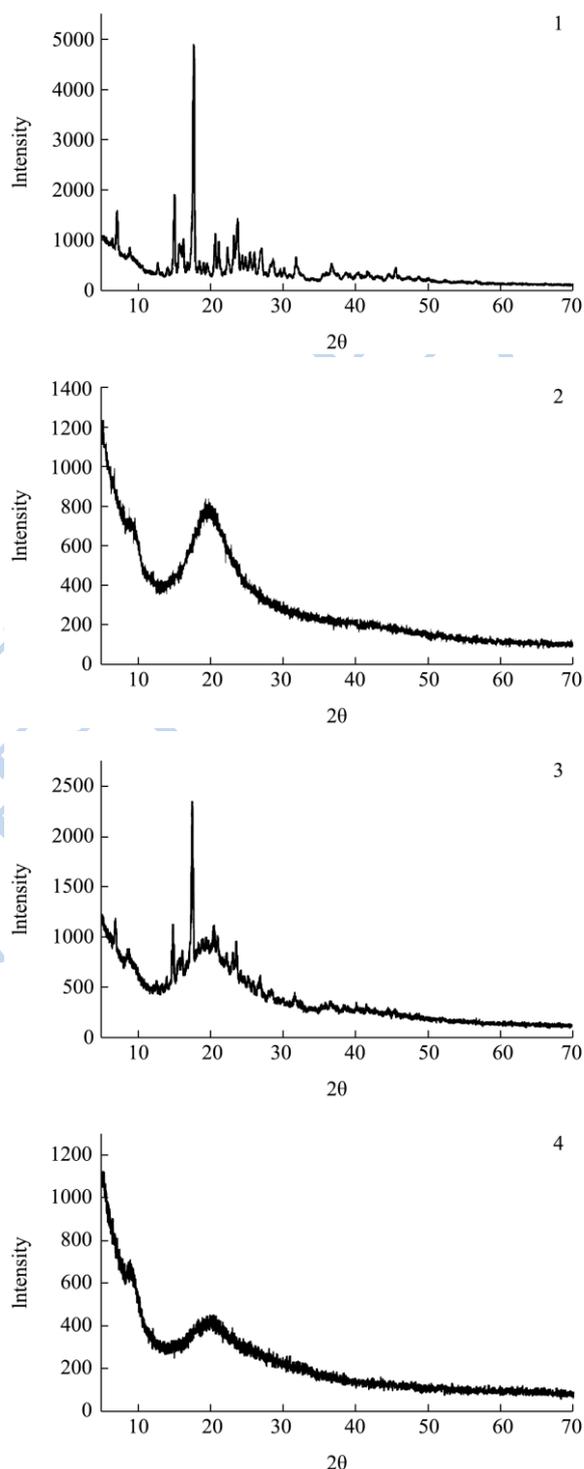


图5 绿原酸(1)、卵磷脂(2)、绿原酸与卵磷脂的物理混合物(3)及复合物(4)的X衍射图

Fig.5 X-Ray diffractometry patterns of chlorogenic acid (1), lecithin (2), their mixture (3), and their complex (4)

2.6 差示扫描热量分析

差示扫描量热法(DSC)是在程序控制温度下,测

量输给物质和参比物的功率差与温度关系的一种技术。绿原酸、卵磷脂、及其混合物和复合物的 DSC 图谱如图 6 所示,绿原酸在 210 °C 处开始有一个吸热峰,其对应着绿原酸的熔融。卵磷脂是一种无定型物质,没有固定熔点,没有明显的吸热峰,二者的物理混合物的 DSC 图谱则主要表现为两种物质图谱的叠加,绿原酸的熔融峰仍然可以观察到,而复合物中绿原酸的熔融峰完全消失,整体上与卵磷脂的 DSC 图谱类似,表明绿原酸不再以晶态形式存在,其已完全分散于卵磷脂中。

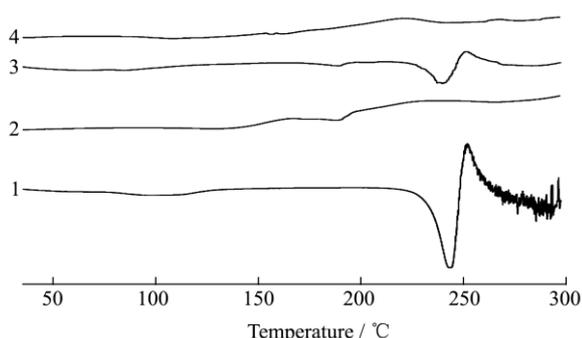


图 6 绿原酸(1)、卵磷脂(2)、绿原酸与卵磷脂的物理混合物(3)及复合物(4)的差式扫描量热图

Fig.6 Differential scanning calorimetry curves of chlorogenic acid (1), lecithin (2), their mixture (3), and their complex (4)

2.7 DPPH 自由基清除能力

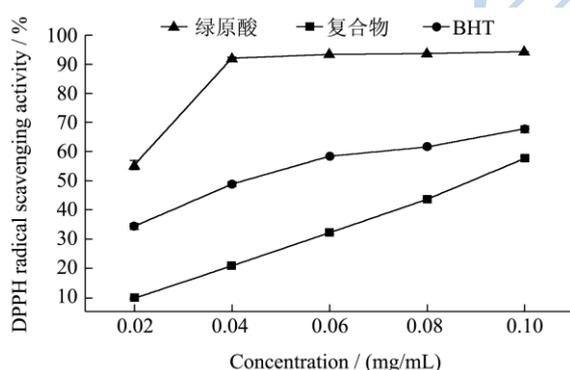


图 7 绿原酸、复合物、BHT 的 DPPH 自由基清除能力

Fig.7 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of chlorogenic acid, the complex, and BHT

DPPH 分析法被广泛用于活性成分的抗氧化活性研究, DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其在 517 nm 附近有强吸收(呈深紫色)。当自由基清除剂存在时, DPPH 的孤对电子被配对,其 517 nm 吸收消失或减弱,通过测定吸收减弱的程度,可评价自由基清除剂的活性。本抗氧化测试体系以乙醇为反应体系,所有的样品均能获得很好的溶解。图 7 为绿原酸及其复合物与常用的食品抗氧化剂 BHT 清除 DPPH

自由基能力的对比,由图可见,在相同浓度下 DPPH 自由基的清除能力依次为:绿原酸>BHT>复合物。绿原酸的 DPPH 自由基清除能力显著高于复合物。

2.8 抗油脂氧化能力

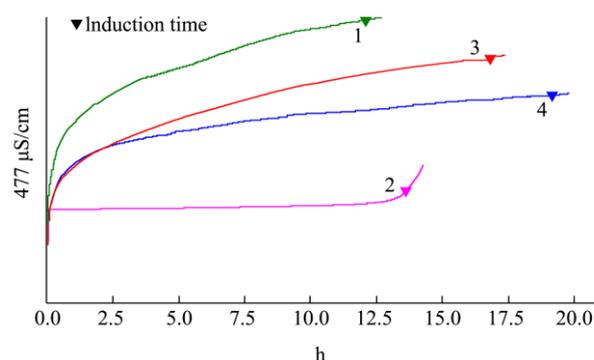


图 8 空白(1)、绿原酸(2)、复合物(3)、BHT(4)的抗油脂氧化能力

Fig.8 Antioxidant activities of control (1), chlorogenic acid (2), the complex (3), and BHT(4) in oil

Rancimat 法是一种全自动在线测定样品抗油脂氧化能力的方法,其是在恒温下,向油脂中以恒定速率通入干燥的空气,油脂中易氧化的成分被氧化成易挥发的小分子,这些小分子被空气带入盛水的电导率测量池中,通过在线测量测量池中的电导率,记录电导率对反应时间的氧化曲线,通过对曲线求二阶导数,从而测出油样的诱导时间(IP)。诱导时间越长,表明该油样的抗氧化稳定性越强,其所含抗氧化剂的抗油脂氧化能力也越强。如图 8 所示,本实验中空白、绿原酸、复合物及 BHT 的诱导时间分别为 12.08 h、13.61 h、16.81 h、19.18 h。在 DPPH 自由基清除实验中,复合物的抗氧化能力虽然低于绿原酸和 BHT,但其抗油脂氧化的能力与 BHT 接近,显著高于绿原酸,表明与卵磷脂复合可以显著提高绿原酸在脂溶性体系中的抗氧化能力。

3 结论

绿原酸来源广泛,具有多种生物活性,在食品工业具有广阔的应用前景。本研究采用溶剂法制备了绿原酸和卵磷脂的复合物,液相分析表明通过与卵磷脂复合,绿原酸的油溶性可以得到显著提高。紫外、红外、电镜、X-射线衍射、差示扫描量热分析表明与卵磷脂复合后绿原酸的物相发生了重大改变,其在复合物中以无定形状态存在。在抗氧化试验中,该复合物的 DPPH 自由基清除能力低于绿原酸和 BHT,但其抗油脂氧化的能力与 BHT 接近,显著高于绿原酸,表明与卵磷脂复合可以显著提高绿原酸在脂溶性体系中

的抗氧化能力。

参考文献

- [1] Ji L, Jiang P, Lu B, et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(11): 1911-1919
- [2] Shao P, Zhang J, Fang Z, et al. Complexing of chlorogenic acid with β -cyclodextrins: inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 41: 132-139
- [3] Narita Y, Inouye K. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(4): 1532-1539
- [4] Li S, Bian H, Liu Z, et al. Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 674(2-3): 65-72
- [5] 刘雪辉,李觅路,谭斌,等.紫甘薯茎叶中绿原酸及异绿原酸对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].*现代食品科技*,2014,30(3): 103-107
LIU Xue-hui, LI Mi-Lu, TAN Bin, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid and isochlorogenic acid from purple sweet potato leaves on α -glucosidase [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(3): 103-107
- [6] Kwon S H, Lee H K, Kim J A, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1-3): 210-217
- [7] Stalmach A, Steiling H, Williamson G, et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 501(1): 98-105
- [8] 乐粉鹏,朱靖博,王颖,等.丹酚酸 B-卵磷脂复合物的制备及性能[J].*大连工业大学学报*,2008,27(3):219-222
LE Fen-peng, ZHU, Jing-bo, WANG Ying, et al. Preparation and characterization of salvianolic acid B-lecithin complex [J]. *Journal of Dalian Dalian Polytechnic University*, 2008, 27(3): 219-222
- [9] 肖衍宇,宋赞梅,陈志鹏,等.水飞蓟宾磷脂复合物的制备与大鼠生物利用度的研究[J].*药学报*,2005,40(7): 611-617
XIAO Yan-yu, SONG Yun-mei, CHEN Zhi-peng, et al. Preparation of silybin-phospholipid complex and its bioavailability in rats [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2005, 40(7): 611-617
- [10] Sun T, Ho C. Antioxidant activities of buckwheat extracts [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(4): 743-749
- [11] Proestos C, Boziaris I S, Nychas G-J E, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(4): 664-671
- [12] 刘本国,张瑞婷,吴晓楠,等.橙皮苷/羟丙基- β -环糊精复合物的理化性质研究[J].*现代食品科技*,2013,29(10):2349-2352
LIU Ben-guo, ZHANG Rui-ting, WU Xiao-nan, et al. Physicochemical properties of the complex of hesperidin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(10): 2349-2352