

## 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的抗氧化活性

张凝, 闫慧丽, 张立新\*, 朱敏, 徐宝芹, 王宗花  
(青岛大学化学化工与环境学院, 山东 青岛 266071)

**[摘要]** 目的:评价实验室合成的溴酚类化合物 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的抗氧化活性。方法:分别用清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基法测定。结果:3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对 DPPH 自由基的清除能力要明显强于维生素 C(Vit C)和特丁基对苯二酚(TBHQ),半清除率( $IC_{50}$ ) = 4.49  $mg \cdot L^{-1}$ ;对超氧阴离子自由基的清除能力也强于 TBHQ,  $IC_{50}$  = 0.93  $g \cdot L^{-1}$ ;而对羟基自由基的清除能力则稍弱于 VC 和 TBHQ,  $IC_{50}$  = 122.42  $mg \cdot L^{-1}$ 。结论:3-溴-4,5-二羟基苯甲醛具有较强的抗氧化活性,可以作为食品工业中一种有潜力的天然抗氧化剂成分。

**[关键词]** 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛; 抗氧化; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH); 羟基自由基; 超氧阴离子自由基

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0091-04

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20120313.1301.003 **[网络出版时间]** 2012-03-13 13:01

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120313.1301.003.html>

## Antioxidant Activity of 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde

ZHANG Ning, YAN Hui-li, ZHANG Li-xin\*, ZHU Min, XU Bao-qin, WANG Zong-hua

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Environment, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[收稿日期]** 20111211(001)

**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2009BM018)

**[第一作者]** 张凝, 硕士, 从事天然产物的分离与分析研究, Tel:13698686561, E-mail:znlxb1988@163.com

**[通讯作者]** \*张立新, 副教授, 博士, 从事天然产物的分离与分析研究, Tel:0532-85953292, E-mail:lxzhanghot@hotmail.com

- [ 3 ] Akihisa T, Arai K, Kimura Y, et al. Camelliols A-C, three novel incompletely cyclized triterpene alcohols from sasanqua oil (*Camellia sasanqua*) [J]. J Nat Prod, 1999, 62 (2):265.
- [ 4 ] Matsuda H, Nakamura S, Fujimoto K, et al. Medicinal flowers. XXXI. Acylated oleanane-type triterpene saponins, sasanquasaponins I-V, with antiallergic activity from the flower buds of *Camellia sasanqua* [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58 (12): 1617.
- [ 5 ] Yoshida T, Chou T, Maruyama Y, et al. Tannins of theaceous plants. II. Camelliins A and B, two new dimeric hydrolyzable tannins from flower buds of *Camellia japonica* L. and *Camellia sasanqua* THUNB [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38 (10): 2681.
- [ 6 ] Saito N, Yokoi M, Yamaji M, et al. Cyanidin 3-p-coumaroylglucoside in *Camellia* species and cultivars [J]. Phytochem, 1987, 26 (10): 2761.
- [ 7 ] Fujimori, Ashihara H. Adenine metabolism and the synthesis of purine alkaloids in flowers of *Camellia* [J]. Phytochem, 1990, 29 (11): 3513.
- [ 8 ] 黄燕, 吴怀恩, 韦志英, 等. 大头陈挥发油的化学成分分析及其抗菌活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (12):79.
- [ 9 ] 袁艺, 龙子江, 刘伟, 等. 鱼腥草野生苗与组培苗挥发油抗炎作用的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9):41.
- [ 10 ] 徐礼英, 张小平, 蒋继宏. 栝楼子挥发油的成分分析及其生物活性的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9):38.
- [ 11 ] Maffei M E, Gertsch J, Appendino G. Plant volatiles: production, function and pharmacology [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(8):1359.
- [ 12 ] Dudareva N, Negre F, Nagegowda D A, et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives [J]. Crit Rev Plant Sci, 2006, 25(5):417.

[责任编辑 邹晓翠]

**[ Abstract ] Objective:** The antioxidant activity of synthesized 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde was studied. **Method:** Radical scavenging effects were determined, with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical and superoxide anion radical respectively. **Result:** It was found that 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde had obvious scavenging effect on DPPH radical activity with  $IC_{50}$  as  $4.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . It was better than positive controls, Vit C and t-butyl hydroquinone (TBHQ). The scavenging ability on  $O_2^-$  radical is stronger than TBHQ, with  $IC_{50} = 0.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , while on hydroxyl free radical, weaker than Vc and TBHQ with  $IC_{50} = 122.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** The antioxidant activity of 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde was obvious and could be developed to a medicine or antioxidant ingredient in food.

**[ Key words ]** 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde; antioxidant activity; 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); hydroxyl radical; superoxide anion radical

溴酚类化合物是海洋特有的一类化合物,广泛分布于海洋藻类中,结构从简单的单苯环溴酚类化合物到溴酚苄基与生物碱基等形成的化合物,复杂多样<sup>[1]</sup>。已经证明这类化合物具有抗氧化<sup>[2]</sup>、降血糖<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>和抗菌<sup>[5]</sup>等生物活性,近年来引起了海洋药物研究人员的重视。在抗氧化活性方面, Li<sup>[6]</sup>对多管藻 *Polysiphonia urceolata* 中分离得到 3 种溴酚化合物进行了 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除实验,其半清除率  $9.67 \sim 21.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 证明其具有很好的抗氧化活性。赵万一等<sup>[7]</sup>证明多个酚羟基是卤酚化合物抗氧化活性的必须官能团,卤原子的位置和数目对抗氧化活性也有一定影响。其中,临位氯代物的活性弱于间、对位氯代物,二溴代化合物的活性强于单溴代产物。Kim<sup>[8]</sup>研究了溴酚化合物的降血糖活性,从椭圆蜈蚣藻 *Grateloupia elliptica* 中分离得到的两种溴酚化合物 2,4,6-三溴苯酚和 2,4-二溴苯酚,对来源于酵母菌的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶半抑制率分别为  $60.3, 110.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对来源于霉菌的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶半抑制率分别为  $130.3, 230.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另外,目前对溴酚其他活性的研究也较为广泛,其中 Xu<sup>[9]</sup>从松节藻 *Rhodomela confervoides* 中得到了 5 种溴酚化合物,并用倾注培养法测定了它们的抗菌活性,其中双-(2, 3-二溴-, 5-二羟基苄基)-乙醚的抑菌活性较强,其最小抑菌浓度 (MIC)  $< 70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

虽然溴酚类化合物在藻类中分布广泛,但是其含量很低,提取所需成本较高。如果能够通过合成的方法得到大量溴酚化合物则可以实现溴酚的大量生产,且成本较低。闫慧丽<sup>[10]</sup>以香兰素为原料,经过脱甲基反应、溴代反应,合成了一种溴酚化合物 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛,并进行了 IR, H-NMR 谱图表征。作者对 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的抗氧化活性进行评价,为天然抗氧化剂的开发提供实验数据。

## 1 材料

**1.1 试剂** 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) (Sigma 公司), 特丁基对苯二酚 (TBHQ, 法国罗地亚公司), 维生素 C (Vit C, Vc) (天津博迪化工股份有限公司), 邻二氮菲 (上海化学试剂总厂所属上海试剂三厂), 邻苯三酚 (遵义林园医药化工有限责任公司), Tris (三羟甲基氨基甲烷, 上海化学试剂采购供应站分装厂), 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛 (实验室合成), 硫酸亚铁铵、 $H_2O_2$ 、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸、EDTA、95% 乙醇等试剂均为国产分析纯。

**1.2 仪器** PHS-3C 型酸度计 (上海盛磁仪器有限公司), AL204 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司], 722 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), HH-6 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 清除 DPPH 自由基活性** 用 95% 乙醇溶液配制浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DPPH 溶液, DPPH 溶液每次实验前需用现配现配。将 1 mL 不同质量浓度的样品溶液加入 3 mL DPPH 溶液中, 迅速混匀, 黑暗中放置 30 min。以 95% 乙醇作为参比, 用 722 型分光光度计在 517 nm 处测定其吸光度。空白组以 95% 乙醇代替 DPPH, Vc 和 TBHQ 为阳性对照, 进行 3 次平行试验, 记录实验数据。DPPH 自由基清除率方程为:

$$I = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中,  $A_0$  为未加样品组的吸光度;  $A_1$  为样品组的吸光度;  $A_2$  为空白组的吸光度。

**2.2 清除羟基自由基活性** 按照邻二氮菲- $Fe^{2+}$  氧化法<sup>[11]</sup>进行实验, 取  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 的 PBS 2.0 mL 于刻度试管中, 依次加入 1.5 mL  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  邻二氮菲溶液, 1 mL  $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $Fe(NH_4)_2$

(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶液,每加一管立即混匀,最后加入 1.0 mL 样品(使终质量浓度为 10,20,30,40,50 mg·L<sup>-1</sup>),1.0 mL 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,以蒸馏水补充体积至 10.0 mL。将试管置于恒温水浴锅中,37 °C 下保温 60 min,于波长 536 nm 处测其吸光度,记为 A<sub>加药</sub>。采用上述方法,分别以蒸馏水代替抗氧化试剂和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,测定其吸光度,记为 A<sub>损伤</sub>和 A<sub>未损</sub>。进行 3 次平行试验,取平均值。按下式计算羟基自由基清除率:

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\%$$

**2.3 清除超氧阴离子自由基活性** 运用改进后的邻苯三酚自氧化法<sup>[12]</sup>进行实验,依次向试管中加入 2.8 mL pH 8.2,0.1 mol·L<sup>-1</sup>的 Tris-HCl 缓冲液(内含 1 mmol·L<sup>-1</sup>的 EDTA),0.1 mL 不同质量浓度(0.05,0.1,0.2,0.5,1.0 g·L<sup>-1</sup>)的样品溶液(以 Vc,TBHQ 为对照)于 25 °C 保温 15 min,然后加入 0.1 mL 25 °C 预热的 60 mmol·L<sup>-1</sup>邻苯三酚(以 10 mmol·L<sup>-1</sup>的 HCl 配制),总体积 3.0 mL,迅速摇匀,倒入比色皿中,在 420 nm 处,每隔 30 s 测定 1 次吸光度,共测 3 min。进行 3 次平行实验,计算平均值,以时间为横坐标、吸光度为纵坐标,计算回归方程和相关系数。采用上述方法,自氧化管以 0.1 mL 蒸馏水代替抗氧化试剂,对照管以 0.1 mL 10 mmol·L<sup>-1</sup>的 HCl 代替邻苯三酚,0.1 mL 蒸馏水代替抗氧化试剂,测定其自氧化速率。按下式计算抗氧化剂对超氧阴离子自由基的抑制率:

$$\text{超氧阴离子自由基的抑制率} = (V_0 - V) / V_0 \times 100\%$$

式中, V<sub>0</sub> 为邻苯三酚自氧化速率; V 为添加抗氧化剂的样液氧化速率。

### 3 结果

**3.1 清除 DPPH 自由基活性结果** DPPH 法为经典的抗氧化剂筛选模型,DPPH 是一种性质很稳定的自由基,溶于乙醇溶剂时为紫色,在 517 nm 处有最大稳定吸收,若结合抗氧化剂则得到电子,在紫外下表现为吸收变弱,可以利用这一性质来判断提取物的抗氧化活性能力<sup>[13]</sup>。

从图 1 中可知,当 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的质量浓度为 20 mg·L<sup>-1</sup>时,其对 DPPH 自由基的清除率是 87.43%,而随着质量浓度的增加对 DPPH 自由基的清除率却基本达到稳定。当质量浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup>时,对 DPPH 自由基的清除率达到 92.81%。本实验得到的数据可知 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对 DPPH 自由基的半清除率(IC<sub>50</sub>) = 4.49

mg·L<sup>-1</sup>,而对照品 Vc 和 TBHQ 的半清除率分别为 28.44,33.34 mg·L<sup>-1</sup>,可见其对 DPPH 自由基的半清除率明显较低,说明 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对 DPPH 自由基具有较好的清除活性且明显强于天然抗氧化剂 Vc 和人工合成抗氧化剂 TBHQ。此前,柳全文<sup>[14]</sup>测定了从多管藻中提取得到的溴酚化合物的抗氧化活性,其对 DPPH 自由基的半清除率为 4.086 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>,与此实验结果相似。

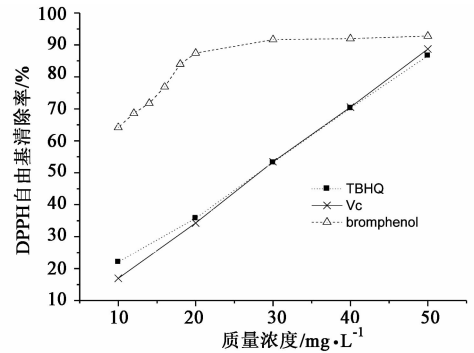


图 1 不同浓度 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对 DPPH 自由基的清除率

**3.2 清除羟基自由基活性结果** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>体系在 Fenton 反应中能够产生羟基自由基,羟基自由基将邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>水溶液氧化为邻二氮菲-Fe<sup>3+</sup>,其在 536 nm 处的最大吸收峰消失。根据上述原理,可以通过比色法测定样品的抗氧化能力。

从图 2 中可以看出,随着抗氧化试剂质量浓度的增加,抗氧化试剂对羟基自由基清除率也增加。与对照品 TBHQ 和 Vc 相比,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对羟基自由基的清除作用较弱。TBHQ 和 Vc 对羟基自由基的半清除率分别为 IC<sub>50</sub> = 17.07 mg·L<sup>-1</sup>和 IC<sub>50</sub> = 38.47 mg·L<sup>-1</sup>,而溴酚对羟基自由基的半清除率为 IC<sub>50</sub> = 122.42 mg·L<sup>-1</sup>。虽然 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对羟基自由基的清除作用不如 Vc 和 TBHQ,但从数据上看,对羟基自由基也有一定的清除作用。

**3.3 清除超氧阴离子自由基活性结果** 邻苯三酚在碱性条件下,能够迅速自氧化,生成一系列 400 ~ 425 nm 有强烈光吸收的中间产物,同时释放出超氧阴离子自由基,超氧阴离子自由基又加速邻苯三酚的自氧化速率,而抗氧化剂可以清除超氧阴离子自由基,从而阻止中间产物的积累,自氧化受阻,因此可用邻苯三酚自氧化法进行抗氧化活性研究。

由图 3 中可以看出,随着 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛质量浓度的增大,对超氧阴离子自由基的清除能力也明显增强,当质量浓度达到 1.0 g·L<sup>-1</sup>时,清除率可以达到 53.46%。当抗氧化试剂处于低质量浓

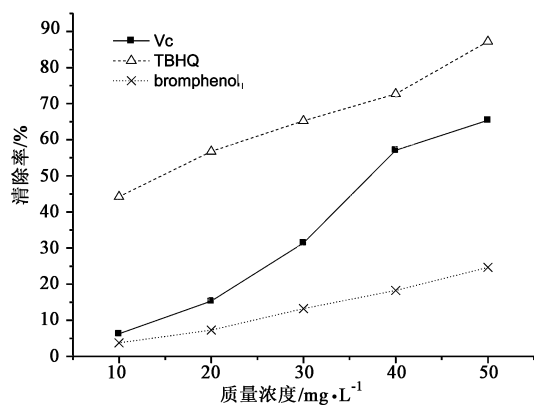


图 2 不同浓度 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对羟基自由基的清除率  
度时,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对超氧阴离子自由基的清除作用与天然抗氧化剂 Vc 相当,明显高于人工合成抗氧化剂 TBHQ,且随着质量浓度增大,溴酚的对超氧阴离子自由基的清除活性一直高于 TBHQ。在本次实验中,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对超氧阴离子自由基的 IC<sub>50</sub> = 0.93 g·L<sup>-1</sup>,明显低于 TBHQ 的 IC<sub>50</sub> (1.28 g·L<sup>-1</sup>),稍高于 Vc 的 IC<sub>50</sub> (0.62 g·L<sup>-1</sup>)。因此证明,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对超氧阴离子自由基的清除能力明显高于 TBHQ,稍低于 Vc,但在低质量浓度时与 Vc 相当。

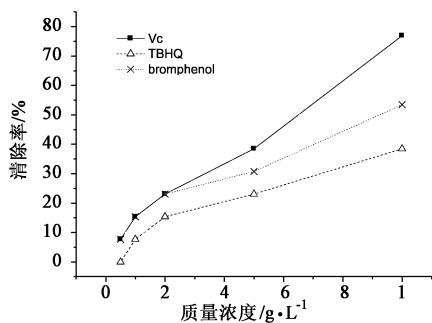


图 3 不同浓度 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的对超氧阴离子自由基的清除率

#### 4 讨论

通过抗氧化活性的实验可证明,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛对 DPPH 自由基和超氧阴离子自由基具有较强的清除能力,尤其是对 DPPH 自由基的清除活性明显高于天然抗氧化剂 Vc 和人工合成抗氧化剂 TBHQ,对超氧阴离子自由基的清除活性也高于 TBHQ。在对羟基自由基的清除实验中,清除活性虽不如 Vc 和 TBHQ,但也表现出了自由基清除作用。因此可以确定,3-溴-4,5-二羟基苯甲醛具有强的抗氧化活性,可以用于进一步合成复杂的溴酚,具有开发出天然抗氧化剂的潜能。

#### [参考文献]

- [1] 郭书举,李敬,苏华,等. 海藻中溴酚化合物研究进展[J]. 海洋科学,2010,34(4):89.
- [2] 张婷,柳成荫,柳全文,等. 多管藻提取物的抗氧化作用[J]. 食品科学,2009,30(1):255.
- [3] 史大永,许凤,贺娟,等. 溴酚化合物 PTPIB 抑制活性与松节藻提取物在糖尿病大鼠体内降血糖活性[J]. 科学通报,2008,53(10):1196.
- [4] 孙雪,徐年军,郭俊明,等. 2 种海藻溴酚化合物的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(9):1174.
- [5] Oh K B, Lee J H, Chung S C, et al. Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives [J]. Bioorg Med Chem,2008, 18:104.
- [6] LI Ke, LI Xiaoming, JI Naiyun, et al. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity [J]. Bioorg Med Chem,2007,15:6627 [6].
- [7] 赵万一,冯秀娥,班树荣,等. 新型卤酚类化合物的合成及其体外抗氧化活性[J]. 中国药物化学杂志,2010,20(4):264.
- [8] Kim K Y, Nam K A, Kurihara H, et al. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica* [J]. Phytochemistry, 2008, 60: 2820.
- [9] XU Nianjun, FAN Xiao, YAN Xiaojun, et al. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides* [J]. Phytochemistry, 2003, 62:1221.
- [10] 闫慧丽,张立新. 三种溴酚类中间体化合物的合成与分析[J]. 化工中间体,2011,11(5):59.
- [11] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553.
- [12] 曹燕,庞市宾,徐磊,等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):144.
- [13] 刘平怀,汪春牛,陈德力,等. DPPH 法测定青皮加速溶剂萃取提取物的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):69.
- [14] 柳全文,徐慧,李桂华,等. 多管藻中新溴代酚的鉴定及其自由基清除活性[J]. 食品科学,2009,30(7):127.

[责任编辑 邹晓翠]