

# 鞣花酸和石榴皮多酚 提取物抗氧化活性的比较

饶 夙, 陈祥贵\*, 刘振平, 文春鹃, 何宇新, 杨文字

(西华大学生物工程学院, 食品生物技术四川省高校重点实验室, 四川成都 610039)

**摘要:**对鞣花酸提取物(EA)和石榴皮多酚提取物(PE)的抗氧化活性进行比较研究。通过 HPLC 法检测 EA 和 PE 中鞣花酸的含量, Folin-酚法检测 PE 中总多酚含量;采用  $H_2O_2$  处理 HepG2 细胞建立细胞氧化应激损伤模型, MTT 法比较不同浓度的 EA 和 PE 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用;采用 DPPH 法、 $\cdot OH$  清除法检测 PE 和 EA 体外抗氧化作用。结果表明:与 EA 相比, PE 中鞣花酸含量很低, 但 PE 和 EA 均以剂量依赖的方式提高氧化损伤的 HepG2 细胞生存率, 有显著的保护作用, 且在同一的浓度下, PE 的保护作用显著高于 EA。PE 和 EA 对 DPPH 法、 $\cdot OH$  清除法的清除率均呈剂量依赖性增强。

**关键词:**石榴皮多酚, 鞣花酸, HepG2 细胞,  $H_2O_2$ , 抗氧化

## Comparative study of antioxidant activities of ellagic acid and pomegranate peel extract

RAO Su, CHEN Xiang-gui\*, LIU Zhen-ping, WEN Chun-juan, HE Yu-xin, YANG Wen-yu

(School of Bioengineering, Key Laboratory of Food Biotechnology  
of Sichuan Provincial University, Xihua University, Chengdu 610039, China)

**Abstract:** The comparative study was conducted on the antioxidant activities of ellagic acid extract (EA) and pomegranate peel extract (PE). The content of ellagic acid in PE and EA were detected by HPLC, and the content of total polyphenol in PE by folin-phenol. Oxidative stress experimental model of cells was established with HepG2 cell treated by  $H_2O_2$ . Then the MTT was employed to determinate the protective effects of various levels of PE and EA for HepG2 cell against oxidative stress injury. DPPH method and  $\cdot OH$  scavenging method were used to estimate the free radicals elimination ability in vitro of PE and EA. The result showed that the content of ellagic acid was much lower in PE than that in EA, but both PE and EA, in a dose-reliant way, increased the survival rate of HepG2 cells which were under oxidative stress injury—they demonstrated remarkable protective effect. At the same time, the protective effect of PE was markedly better than that of EA. The elimination rate of both PE and EA upon DPPH method and  $\cdot OH$  scavenging method was also in a dose-reliant fashion.

**Key words:** PE; EA; HepG2 cells;  $H_2O_2$ ; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)12-0111-04

石榴 (*Punica granatum L.*) 在我国多个地区广泛种植, 是一种药食两用的植物资源。石榴各部位都含有多种功能性成分, 具有广泛的药理活性。石榴皮为传统中药, 主要用于久泻、出血、蛔虫等症状。国内外大量的研究表明, 石榴皮多酚在预防和治疗心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病等方面具有显著效果<sup>[1-3]</sup>。多酚类物质是石榴皮主要的药理活性成分, 包括鞣花酸 (Ellagic acid)、安石榴苷 (Punicalagin)、石榴皮鞣素 (Punicalin) 等多种多酚类物质, 一般认

为鞣花酸是代表性成分<sup>[4]</sup>。虽然已有研究表明, 石榴皮多酚具有显著的抗氧化活性, 但对其中的各种多酚成分之间抗氧化活性的比较尚未见研究报道。本文在测定石榴皮多酚提取物的成分的基础上, 初步比较鞣花酸和石榴皮多酚对  $H_2O_2$  导致的 HepG2 细胞损伤的保护作用和体外的抗氧化活性, 为进一步研究不同的石榴皮多酚组分的抗氧化提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

人肝癌细胞株 HepG2 四川大学; 石榴皮多酚提取物 (PE)、鞣花酸提取物 (EA) 西安天一生物技术有限公司; 鞣花酸对照品 纯度  $\geq 98\%$ , 山东中药化学标准品工程技术研究中心; 安石榴苷、石榴皮鞣素对照品 纯度  $\geq 98\%$ , 成都曼斯特生物科技有限公司; 没食子酸对照品 纯度  $\geq 98\%$ , 四川省食品药

收稿日期: 2011-10-12 \* 通讯联系人

作者简介: 饶夙 (1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物与营养保健方面的研究与开发。

基金项目: 国家星火计划项目 (2010GA810002); 四川省科技攻关项目 (05SG011-021)。

品检验所;DMEM 培养基、新生牛血清 Gibco 公司;MTT、DPPH 自由基、 $H_2O_2$ 、DMSO、TFA、邻二氮菲 Sigma 公司。

酶标仪 美国 TECAN 公司;UV-2600 型紫外分光光度计 上海尤尼柯;倒置显微镜 Leica 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品 HPLC 分析

1.2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素对照品适量溶于甲醇,制成 340、40、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,分别取上述对照品溶液各 100 $\mu\text{L}$  混合并稀释定容至 1mL 作为对照品溶液,安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素的浓度分别为 34、4、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,备用。

1.2.1.2 样品溶液的制备 取石榴皮多酚提取物和鞣花酸提取物 1.00g 加甲醇 50mL 超声 30min,完全溶解后定容至 100mL,10000r/min 离心 3min 后取上清液,稀释制备成含提取物为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PE) 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (EA) 的样品溶液。

1.2.1.3 色谱条件 色谱柱:Arcus EP-C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-TFA (0.1%),梯度洗脱条件:0~5min, TFA (0.1%) 92%~70%; 5~11min, TFA (0.1%) 70%; 11~11.5min, TFA (0.1%) 70%~55%; 11.5~30min, TFA (0.1%) 55%;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ;流速 1.0mL/min;进样量 10 $\mu\text{L}$ ;检测波长 254nm。在此色谱条件下,安石榴苷、鞣花酸、石榴皮鞣素能很好的分开,分离度均大于 1.5。

1.2.2 总多酚含量的测定 参考文献[5],以没食子酸为标准品,采用 Folin-酚法测定石榴皮提取物的总多酚含量。

1.2.3 细胞培养 HepG2 细胞采用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养,选取对数生长期细胞进行实验。

1.2.4 细胞氧化损伤浓度确定 制备密度为  $1 \times 10^5$  个/mL HepG2 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 $\mu\text{L}$ ,培养过夜,待细胞贴壁后,加  $H_2O_2$  进行处理, $H_2O_2$  终浓度分别为 0.4、0.8、1.2、1.6mmol/L。处理 20h 后 MTT 法检测细胞活力作为判断氧化损伤程度的指标,并选择适当的  $H_2O_2$  浓度,进行 PE、EA 对 HepG2 细胞氧化损伤的保护实验。

1.2.5 PE、EA 对 HepG2 细胞增殖的影响 制备密度为  $1 \times 10^5$  个/mL HepG2 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 $\mu\text{L}$ ,培养过夜,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度的 PE 和 EA 溶液,终浓度分别为 50、100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (以测定出来的有效浓度计算)。每个剂量设 4 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 培养箱中培养 20h,MTT 法检测细胞活力。

1.2.6 PE、EA 对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用实验 制备密度为  $1 \times 10^5$  个/mL HepG2 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 $\mu\text{L}$ ,培养过夜,待细胞贴壁后,给药处理。空白对照组:120 $\mu\text{L}$  DMEM 培养液; $H_2O_2$  损伤组:DMEM 培养液 110 $\mu\text{L}$  +  $H_2O_2$  (终浓度 1.2mmol/L) 10 $\mu\text{L}$ ;保护组:DMEM 培养液 100 $\mu\text{L}$ 、不同浓度的 PE、EA 10 $\mu\text{L}$ ,孵育 2h 后加入  $H_2O_2$  (终浓度

1.2mmol/L) 10 $\mu\text{L}$ 。每个剂量设 4 个复孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 培养箱中培养 20h,MTT 法检测细胞活力。

1.2.7 MTT 法检测细胞活力<sup>[6]</sup> 96 孔板培养细胞加 MTT 至终浓度 5mg/mL 孵育 4h,吸去培养液,每孔加入 150 $\mu\text{L}$  DMSO,酶标仪检测每孔 490nm 处吸光值 ( $A_i$ ),计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (各浓度组吸光值/对照组吸光值) × 100。

1.2.8 DPPH 法检测自由基清除作用<sup>[7]</sup> 准确称取 DPPH 10mg,无水乙醇定容至 250mL (质量浓度为 0.04g/L)。取此溶液 3mL,加入不同质量浓度样品溶液 1mL,摇匀,室温放置 30min,517nm 处测吸光度 ( $A_i$ )。同时测 1mL 溶剂与 3mL DPPH · 混合后吸光度 ( $A_c$ ),1mL 样品液加 3mL 乙醇混合后吸光度 ( $A_j$ )。每个样品剂量平行操作 3 次,取平均值,计算

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(d_2, \%) : d_2 = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

1.2.9 羟基自由基的清除作用<sup>[8]</sup> 配制 0.75mmol/L 邻二氮菲溶液 1mL,加入 pH7.4 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 2mL 和蒸馏水 1mL,充分混匀后,加入 0.75mmol/L 硫酸亚铁溶液 1mL,然后再加入 0.01% 过氧化氢 1mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温 60min,在波长 536nm 处测吸光度  $A_p$ ;用 1mL 乙醇代替 1mL 过氧化氢,测得吸光度  $A_b$ ,1mL 不同质量浓度的样液代替蒸馏水,测得吸光度  $A_s$ 。计算 PE、EA 对  $\cdot\text{OH}$  的清除率:

$$H(\%) = \left(\frac{A_s - A_p}{A_b - A_p}\right) \times 100$$

1.2.10 统计学处理 实验数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用 SPSS10.0 进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PE、EA 的 HPLC 分析结果

经 HPLC 分析,PE、EA 样品中鞣花酸的含量,结果表明:EA 中鞣花酸含量达到 93%,而 PE 中鞣花酸含量为 2.1%、安石榴苷含量为 1.3%、石榴皮鞣素为 3.7%。

### 2.2 总多酚含量的测定

经 Folin-酚法测得石榴皮多酚提取物中多酚含量为 41.5%。

### 2.3 $H_2O_2$ 对 HepG2 细胞的损伤作用

$H_2O_2$  处理培养的哺乳动物细胞是常用的体外细胞氧化损伤模型,如图 1 所示,0.4mmol/L 浓度的  $H_2O_2$  对细胞存活率的降低作用不明显,但随着浓度的不断增加,HepG2 细胞存活率降低,1.2mmol/L 作用 20h 后细胞活力减少到 22.2%,所以选择 1.2mmol/L  $H_2O_2$  作用于 HepG2 细胞以考察 PE、EA 对氧化损伤的保护作用。

### 2.4 PE、EA 对 HepG2 细胞的作用

如图 2 所示,PE、EA 对 HepG2 细胞的增殖具有一定的抑制作用,并且随着浓度增加,呈现一定的剂量相关性。在浓度 50~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 EA 对细胞增殖的抑制作用强于 PE,而在 600~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 PE 对细胞增殖的抑制作用强于 EA。

2.5 PE、EA 对  $H_2O_2$  损伤后 HepG2 细胞存活率的影响

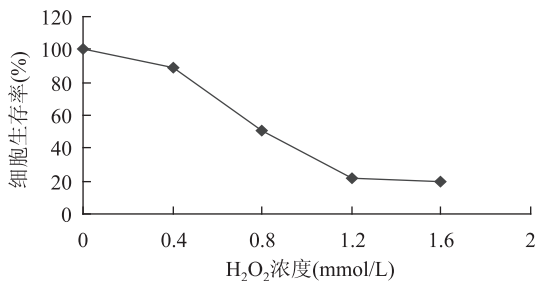


图1 不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HepG2 细胞的损伤作用

Fig.1 Effect of different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on HepG2 cells

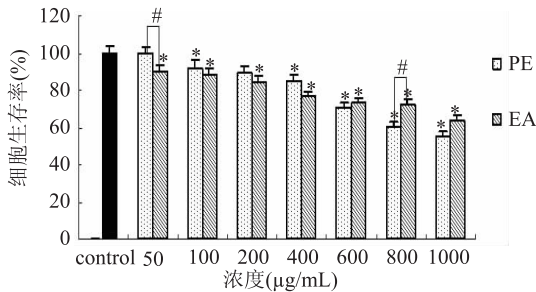


图2 不同浓度的 PE、EA 对细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm SE, n=4$ )

Fig.2 Effect of different concentration of PE,EA on HepG2 cells

注: \*  $p < 0.05$ , 与对照组相比; #  $p < 0.05$ , PE 与 EA 组相比。

如图3所示,当 PE、EA 浓度分别大于 400µg/mL 能显著的提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞的生存率,并显示明显的剂量依赖关系,表明 PE、EA 均对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞具有显著的保护作用。在同一剂量水平下(以多酚计),PE 对细胞损伤的保护作用显著优于 EA。这可能与细胞对不同的多酚具有不同的生物利用度有关。从抗氧化活性而言,其它多酚发挥了同等甚至更为重要的作用。

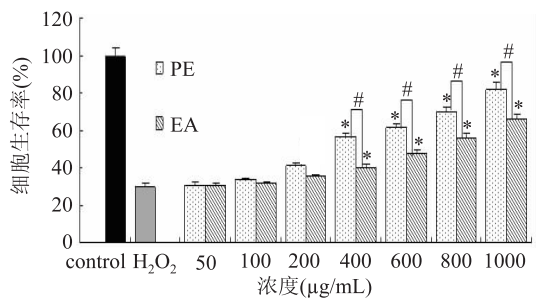


图3 PE、EA 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HepG2

细胞的保护作用 ( $\bar{x} \pm SE, n=4$ )

Fig.3 Effect of PE,EA on the survival rate of HepG2 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm SE, n=4$ )

注: \*  $p < 0.05$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对照组相比;

#  $p < 0.05$ , PE 组与 EA 组相比。

## 2.6 PE、EA 对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 法是一种快速、灵敏、简便、直接的体外抗氧化方法。PE、EA 对 DPPH 自由基的清除能力如图4所示。PE、EA 浓度在 5~80µg/mL 时,PE、EA 均具有很强的自由基清除能力,且随着浓度的增加清除率也随之增加,呈明显的剂量依赖性。PE 和 EA 的

抗氧化活性基本相当,EA 略优于 PE。

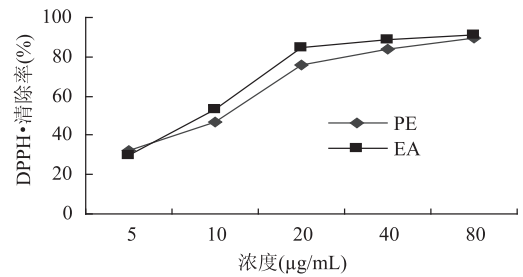


图4 PE、EA 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.4 The scavenging effect of PE,EA on DPPH free radical

## 2.7 PE、EA 对 ·OH 的清除作用

·OH 是危害最大的一种活性氧自由基,因此清除羟自由基是机体预防各种疾病的有效途径。由图5可以看出,PE、EA 对 ·OH 有明显的清除作用,在浓度 5~80µg/mL 的浓度范围内,PE、EA 清除能力分别为 11.4%~77.29%、13.5%~81.68%,随着浓度的增加,其对 ·OH 的清除能力增强。但在相同剂量下,EA 略优于 PE。

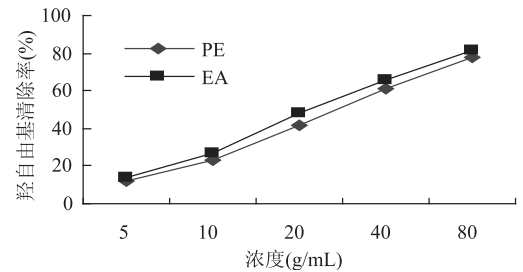


图5 PE、EA 对羟自由基的清除作用

Fig.5 The scavenging effect of PE,EA on hydroxyl free radical

## 3 结论

通过 HPLC 分析,EA 中鞣花酸含量达到 93%,因此其抗氧化成分的主体是鞣花酸,而 PE 中鞣花酸含量 2.1%,安石榴苷含量 1.3%,石榴皮鞣素仅 3.8%,大量的多酚成分是鞣花酸以外的成分,因此其抗氧化作用是不同的多酚共同作用的结果。

研究结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞后,细胞存活率明显下降;而 PE、EA 给药处理后,细胞活性明显提高并呈一定浓度依赖关系,表明 PE、EA 对细胞氧化损伤有明显的保护作用。

鞣花酸和石榴皮多酚对 DPPH· 和 ·OH 的清除能力均较为显著,有很好的抗氧化作用。因此,进一步研究石榴皮中不同多酚的各种药理活性的差异,对于石榴皮多酚的研究和开发具有重要意义。

### 参考文献

[1] Jurenka J S. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): A review [J]. *Altern Med Rev*, 2008, 13 (2): 128.  
 [2] Negi P S, Jayaprakasha G K, Jena B S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts [J]. *Food Chemistry*, 2003, 80: 393-397.  
 [3] 张茜, 贾东英, 姚开, 等. 石榴皮提取物的抗氧化作用研究 [J]. *中国油脂*, 2006, 31 (8): 51-54.  
 [4] Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate

(下转第 117 页)

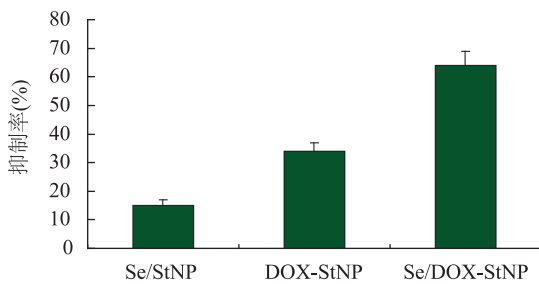


图5 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒的癌细胞生长抑制效果比较

Fig.5 Scavenging effect comparing between anti-drugs

### 3 结论

将高价硒通过氧化还原反应得到具有抗氧化性的红色单质硒,并使之结合到装载有抗肿瘤药物DOX的淀粉纳米颗粒表面,首次成功制备了具有明显核壳结构的红色单质硒-淀粉复合纳米药物载体。该复合载药颗粒作用于肝癌细胞,肝癌细胞生长抑制作用明显增强,红色单质硒与抗肿瘤药物之间出现了明显的协同效果。分析其原因,一方面是硒壳层增强了载药颗粒的稳定性,减缓了药物的释放,延长了药物与细胞的作用时间,另一方面可能为红色单质硒的抗氧化作用和表面的大量游离电子改善了肝癌细胞膜的通透性<sup>[9-11]</sup>,使更多的载药颗粒进入到细胞内部,增加了细胞内药物的浓度,从而增强了药物的疗效。利用淀粉纳米颗粒作为载体,将对肿瘤细胞作用机制完全不同的抗肿瘤药物结合到同一个药物载体上,实现不同药物的同时给药,并获得了抗肿瘤药物之间的协同效果。这将为抗肿瘤药物的药剂学研究提供新的思路。但是Se与DOX之间以多大的比例结合才能达到最好的协同效果,以及将复合颗粒作用于活体肿瘤能否起到同样的效果,这些工作还有待于我们更进一步研究探讨。

#### 参考文献

- [1] Martínez-Peinado M, Noguerras-López F, Arcos-Cebrián A, et al. Serum selenium levels in cirrhotic patients are not Influenced by the disease severity index [J]. Nutrition Research, 2010, 30 (8): 574-578.
- [2] Zhong W X, Oberley T D. Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line [J]. Cancer Research, 2001, 61 (10): 7071-7078.
- [3] Dong Y, Lisk D, Block E. Characterization of the biological activity of (- Glutamyl - Se - methylselenocysteine; a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic [J]. Cancer Research, 2001, 61 (4): 2923-2928.

(上接第 113 页)

- cancer—a mini review [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60 (2): 139-144.
- [5] Singh R P, Chidambara Murthy K N, Jayaprakash G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models [J]. Ginkgo Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50: 81-86.
- [6] Lourdes Massieu, Julio Moran, Yves Christen. Effect of ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and

[4] Chen T F, Wong Y S, Zheng W J, et al. Selenium nanoparticles fabricated in undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 67 (1): 26-31.

- [5] 陈义朗, 李新生, 钟三子, 等. 两种新型有机硒化合物的合成及其抗癌活性的研究 [J]. 化学试剂, 2004, 26 (5): 261-262.
- [6] Clark L C, Combs G F, Turnbull B W, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial [J]. JAMA, 1996, 276 (24): 1957-1963.
- [7] Nuttall K L. Elemental selenium and glutathione reductase [J]. Med Hypotheses, 1985, 16 (2): 155-159.
- [8] Gao X Y, Zhang J S, Zhang L D. Hollow sphere selenium nanoparticle: their in-vitro anti hydroxyl radical effect [J]. Advanced Materials, 2002, 14 (4): 290-292.
- [9] 高学云, 张劲松, 张立德, 等. 纳米红色元素硒抑制肿瘤和提高免疫功能的作用 [J]. 中国公共卫生, 2003, 25 (19): 309-310.
- [10] Zadrožna M, Gawlik M, Nowak B, et al. Antioxidants activities and concentration of selenium, zinc and copper in preterm and IUGR human placentas [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2009, 23 (2): 144-148.
- [11] Zhang H X, Zhang P. Synthesis of Vitamin - selenium complex and its effects on proteins and tumor cells [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 83 (1): 406-410.
- [12] Vonnahme K A, Wienhold C M, Borowicz P P, et al. Supranutritional selenium increases mammary gland vascularity in postpartum ewe lambs [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94 (6): 2850-2858.
- [13] Shiobara Y, Ogra Y, Suzuki K T. Exchange of endogenous selenium for dietary selenium as 82 Se-enriched selenite in brain, liver, kidneys and testes [J]. Life Science, 2000, 67 (14): 3041-3049.
- [14] Sanchez V, Camarero J, O'Shea E. Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats [J]. Neuropharmacology, 2003, 44 (3): 449-461.
- [15] Xiao S Y, Liu X M, Tong C Y, et al. Studies of poly-l-lysine-starch nanoparticle preparation and its application as gene carrier [J]. Science in China Ser B Chemistry, 2005, 48 (2): 162-166.
- [16] 童春义, 薛昌刚, 刘选明, 等. 荧光法-MTT法检测红色纳米硒的抗氧化活性 [J]. 分析化学, 2006 (12): 1752-1754.

caspase activity in cortical cultured neurons [J]. Brain Research, 2004, 1002: 76-85.

- [7] Kumaran A, Karunakaran R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of coleus aromaticus [J]. Food Chemistry, 2007, 100 (1): 356-361.
- [8] 苗利利, 仇农学, 鹿福科. 石榴籽油的理化性质及清除自由基能力研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31 (1): 155-157.