

医药与日化原料

咖啡酰氨基酸乙酯的合成及其抗氧化活性

王东, 马金凤, 蔡明旭, 祝钧*

(北京工商大学理学院, 北京 100048)

摘要: 以 L-氨基酸乙酯盐酸盐和咖啡酸为原料, 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 及 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 为催化剂, 合成咖啡酰缬氨酸乙酯、咖啡酰亮氨酸乙酯、咖啡酰蛋氨酸乙酯、咖啡酰酪氨酸乙酯 4 种产物。利用 ¹HNMR、质谱及红外对产物进行了表征; 通过清除 DPPH 自由基、羟基自由基及红细胞溶血等实验分别对咖啡酰氨基酸乙酯类物质的体外抗氧化活性及刺激性进行了初步评价。结果表明, 以该法合成 4 种咖啡酰氨基酸乙酯, 收率在 75%~82%。咖啡酸与氨基酸结合后, 4 种产物均呈现较好的抑制 DPPH 自由基、羟基自由基活性的效果; 咖啡酰缬氨酸乙酯 (III a) 清除 DPPH 自由基能力最强, 其 IC₅₀ 为 (11.23±0.24) μmol/L; 咖啡酰蛋氨酸乙酯 (III c) 清除羟基自由基能力最强, 其 IC₅₀ 为 (0.24±0.002) mmol/L; 3 种咖啡酰氨基酸乙酯相对于咖啡酸单体对于红细胞膜具有更弱的刺激性。咖啡酰氨基酸乙酯类物质抗氧化活性明显强于 L-抗坏血酸 (V_C), 可作为潜在的抗氧化剂。

关键词: 咖啡酰氨基酸乙酯; 咖啡酸; 抗氧化性; 红细胞溶血; 医药与日化原料

中图分类号: TQ245 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2019) 03-0494-05

Synthesis and Anti-oxidation Activity of Caffeic Acid Amino Acid Ethyl Ester Derivatives

WANG Dong, MA Jin-feng, CAI Ming-xu, ZHU Jun*

(School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Caffeoylvaline ethyl ester, caffeoylleucine ethyl ester, caffeoyl methionine ethyl ester, and caffeoyl tyrosine ethyl ester were synthesized from L-amino acid ethyl ester hydrochloride with caffeic acid in the presence of a catalytic amount of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). Their structures were identified by mass spectroscopy (MS), proton nuclear magnetic resonance (¹HNMR) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Then, their antioxidant activities and irritation were measured by the scavenging capability to DPPH and hydroxyl free radicals, as well as erythrocyte hemolysis experiment. The results showed that four *N*-caffeoyl amino acid ethyl esters were synthesized with yields between 75% and 82%. After the combination of caffeic acid and amino acid, all products exhibited good inhibition effects against DPPH free radical and hydroxyl radical. Among them, caffeoylvaline ethyl ester (III a) had the strongest ability to scavenge DPPH free radical, and its IC₅₀ value was (11.23±0.24) μmol/L. Caffeoylmethionine ethyl ester (III c) had the strongest ability to scavenge hydroxyl free radical with an IC₅₀ value of (0.24±0.002) mmol/L. Three synthesized caffeoyl amino acid ethyl esters were less irritating to the erythrocyte membrane than caffeic acid monomer. The antioxidant activities of *N*-caffeoyl amino acid ethyl esters derivatives were more effective than Vitamin C and could be used as a new potent antioxidant.

Key words: caffeic acid amino acid ethyl ester; caffeic acid; antioxidation; hemolysis of erythrocytes; drug and cosmetic materials

Foundation items: Outstanding Teachers of Beijing Colleges and Universities Supported Program (19005753005); Graduate Research Capacity Improvement Program in 2018 (19008001491)

收稿日期: 2018-08-12; 定用日期: 2018-11-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180592

基金项目: 北京市高等学校教学名师支持项目 (19005753005); 2018 年研究生科研能力提升计划项目资助 (19008001491)

作者简介: 王东 (1993—), 男, 硕士生。联系人: 祝钧 (1966—), 男, 教授, E-mail: zhujun@btbu.edu.cn。

咖啡酸(CA)又名3,4-二羟基肉桂酸^[1]。咖啡酸是一种结构简单的酚酸类化合物,是次生植物代谢产物,在很多植物中都存在^[2-3],其具有抗氧化、抗菌、抗病毒等多方面生物活性^[4]。咖啡酸在常见溶剂体系中配伍性差,因而限制了其应用范围^[5]。

咖啡酸酰胺是咖啡酸的重要衍生物,既保有生物活性,又可以增强咖啡酸单体的亲脂性,从而其应用范围更广。由于自然界中咖啡酸酰胺衍生物提取纯化条件复杂,故限制了其应用^[6]。Rajan^[7]等利用CA与3-甲基-2-烯胺在苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)耦合剂下生成咖啡酰-3-甲基-2-烯胺,通过抗氧化实验,证明咖啡酸酰胺是非常有潜力的抗氧化剂。Yoo^[8]等利用乙酰化的咖啡酸与苯磺酰胺在缩合试剂1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、1-羟基苯并三唑(HOBt)的作用下生成乙酰化保护的咖啡酰苯磺酰胺,脱乙酰化后生成咖啡酰苯磺酰胺,实验发现,合成的化合物对DPPH自由基和超氧阴离子自由基有抑制作用。氨基酸是维持人类生命活动的重要物质基础,不仅发挥营养作用,也常具有其他功能,缬氨酸、酪氨酸具有抗菌^[9-10]、改善免疫机能等功能。曲酸作为酪氨酸酶抑制剂,存在一些缺陷,如活性不高、性质不稳定等。为此,Noh^[11]等设计合成了一类曲酸-氨基酸结合体,实验发现,与氨基酸结合后的曲酸对酪氨酸酶的抑制率明显强于曲酸单体。Wei^[6]等通过EDC/HOBt法成功合成咖啡酰甘氨酸乙酯与咖啡酰苯丙氨酸乙酯。

受此启发,本文以咖啡酸和4种氨基酸乙酯盐酸盐为原料,通过HOBt/EDC法合成了4种咖啡酰氨基酸乙酯,4种物质均未见文献报道。运用核磁共振氢谱(¹HNMR)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)表征确定4种化合物的结构。通过体外清除DPPH自由基、羟基自由基实验和红细胞溶血实验测定了目标产物的抗氧化活性及刺激性。以期咖啡酰氨基酸乙酯类物质作为化妆品原料、食品防腐剂提供参考价值,并为咖啡酰氨基酸乙酯类物质的医学研究提供重要理论依据。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

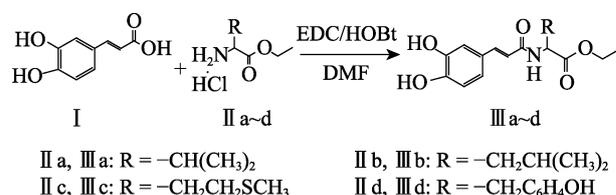
咖啡酸、L-缬氨酸乙酯盐酸盐、L-亮氨酸乙酯盐酸盐、L-酪氨酸乙酯盐酸盐、L-蛋氨酸乙酯盐酸盐、1-羟基苯并三唑(HOBt)、1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),北京伊诺凯科技有限公司,均为AR;新鲜兔血,北京海淀区兴隆实验动物养殖厂;十二烷基硫酸钠

(SDS),美国Amresco Biotechnology Grade。

傅里叶变换红外光谱仪(IS10),美国Nicolet公司;核磁共振波谱仪,瑞士Bruker公司(运行条件:AV300 MHz,溶剂:CDCl₃/DMSO-*d*₆);质谱仪(Xevo G2 Q-TOF),美国Waters公司(质谱条件:ESI离子源,*m/z*范围:50~500 amu;电喷雾电压:4500 V);酶标仪(infinite M200 PRO),瑞士TECAN公司;台式离心机(5810R),德国Eppendorf Centrifuge公司。

1.2 咖啡酰氨基酸乙酯的合成

合成路线如下所示。



采用L-缬氨酸乙酯盐酸盐、L-亮氨酸乙酯盐酸盐、L-蛋氨酸乙酯盐酸盐、L-酪氨酸乙酯盐酸盐在EDC作用下分别与咖啡酸进行反应,生成相应的咖啡酰氨基酸乙酯。实验步骤参考文献^[6],并做部分改动,以咖啡酰酪氨酸乙酯的合成作为示例。具体步骤为:取L-酪氨酸乙酯盐酸盐(2.03 g, 8.25 mmol)、咖啡酸(1.5 g, 8.25 mmol)、1-羟基苯并三唑(1.15 g, 8.5 mmol)完全溶解于装有DMF(25 mL)的圆底烧瓶中,冰浴下电磁搅拌,并缓慢滴加三乙胺(3.45 mL, 24.75 mmol)。反应10 min后,加入EDC(1.6 g, 8.35 mmol),撤去冰浴,自然升温至室温,搅拌18~24 h。用薄层层析法〔*V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚)=1:1〕检测是否反应完全,反应完全后在反应液中倒入50×2 mL水,用(4×100 mL)乙酸乙酯萃取并用(50×2 mL)饱和食盐水冲洗,回收有机相,无水硫酸钠干燥(24 h)、过滤、(200~300目)硅胶色谱柱分离〔洗脱剂为*V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚)=1:2〕,减压回收溶剂,真空干燥得到白色粉末状固体咖啡酰酪氨酸乙酯(III d) 2.4 g,产率78.4%。

1.3 清除DPPH自由基实验

参考文献^[12]方法测定DPPH自由基清除活性,咖啡酰缬氨酸乙酯(III a)、咖啡酰亮氨酸乙酯(III b)、咖啡酰蛋氨酸乙酯(III c)、III d、V_C均用无水乙醇溶解,配制一系列浓度,将1 mL不同浓度的样品溶液与1 mL DPPH·(2×10⁻⁴ mol/L)的乙醇溶液混合,摇匀,暗处放置30 min,517 nm处测定吸光度,以等量的无水乙醇作为空白对照,V_C作为阳性对照。以样品浓度为自变量,自由基清除率为因变量作

图进行线性拟合, 计算 IC_{50} 值 (清除率为 50% 时所需抗氧化剂的浓度)。 IC_{50} 越小, 该物质抗氧化性越强^[13]。

1.4 清除羟基自由基实验

采用 Fenton 反应体系参考文献[14]方法测定羟基自由基清除活性。用 DMSO 溶液将待测物配制成不同浓度: 2.0×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 3.5×10^{-4} 、 4.0×10^{-4} 、 4.5×10^{-4} mol/L。取菲罗啉的乙醇溶液 (0.75 mmol/L)、磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH=7.4)、样品溶液、FeSO₄ 水溶液 (0.75 mmol/L) 各 1 mL 加入试管中, 再加入 1 mL H₂O₂ 水溶液 (H₂O₂ 体积分数 0.01%), 混匀。37 °C 孵育 1 h, 536 nm 下测定混合物吸光度, 计算 IC_{50} 值。羟基自由基抑制率按下式计算。

$$I/\% = [(c - b)/(a - b)] \times 100$$

式中: I 为羟基自由基抑制率; b 为空白组吸光度; c 为实验组吸光度; a 为对照组吸光度。

1.5 红细胞溶血 (RBC) 实验

配制 pH=7.4 磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (添加葡萄糖, 1.8 g/L) 及抗凝剂柠檬酸缓冲液 [柠檬酸三钠 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (0.02 kg/L), 柠檬酸 C₆H₈O₇ (0.008 kg/L)]。用无菌离心管分装采集的新鲜血液 [新鲜兔血盛装于无菌离心管中, 按 $V(\text{血液}) : V(\text{抗凝剂}) = 1 : 9$ 加入抗凝剂柠檬酸缓冲液, 混匀], 1500 r/min 离心 15 min 后弃去上清液, 加入 PBS 轻轻混洗后再次离心, 至上清液为无色透明状。沉淀部分用 PBS 溶液稀释为体积分数 2% 红细胞悬液, 摇晃均匀, 即得 RBC 悬液。样品均用 PBS 缓冲液稀释至 1 mmol/L (DMSO 助溶); 十二烷基硫酸钠 (SDS) (1.3 g/L) 作为阳性对照。溶血测定: 各浓度样品溶液与 RBC 悬液按 $V(\text{样品}) : V(\text{RBC}) = 3 : 1$ 添加于离心管中, 混匀。用去离子水和 PBS 分别替代样品按相同体积比添加, 作为完全溶血和阴性对照, 然后室温摇床孵育 1 h。受试物-RBC 混合液在 10000 r/min 下离心 1 min。540 nm 处测定其 OD 值。溶血率计算公式如下所示。

$$\text{溶血率}/\% = \frac{\text{样品OD} - \text{阴性OD}}{\text{完全溶血OD} - \text{阴性OD}} \times 100$$

式中: 阴性 OD 为 PBS 与红细胞悬液作用后吸光度值; 完全溶血 OD 为去离子水与红细胞悬液作用后吸光度值。

1.6 数据分析

实验重复测定 3 次, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。测量数据均以 Mean±S.D. 表示, 通过方差分析和多组样本间差异显著性进行分析。概率 $P < 0.05$ 时, 该组数据被认为具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 咖啡酰氨基酸乙酯的合成

以 EDC 为脱水剂, 具有反应速度快, 收率高, 产物消旋小, 选择性好等优点; HOBt 为酰胺缩合剂用于抑制外消旋作用, 但其微溶于水, 故采用 DMF 作溶剂。Fan^[14]等采用文献[6]合成方法, 以肉桂酸与甘氨酸乙酯盐酸盐为原料合成了肉桂酰甘氨酸乙酯, 产率为 89.5%。本文以咖啡酸及不同氨基酸乙酯盐酸盐为原料合成 4 种咖啡酰氨基酸乙酯: 咖啡酰缬氨酸乙酯 (III a): 浅黄色固体, 产率: 79%, m.p.136~138 °C; 咖啡酰亮氨酸乙酯 (III b): 浅黄色固体, 产率 82.0%, m.p.64~66 °C; 咖啡酰蛋氨酸乙酯 (III c): 白色粉末状固体, 产率: 75.3%, m.p.160~162 °C; 咖啡酰酪氨酸乙酯 (III d): 白色粉末状固体, 产率: 78.4%, m.p.102~104 °C。产率大小顺序为: III b > III a > III d > III c。

2.2 咖啡酰氨基酸乙酯的结构表征

III a: IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3341.21 (N—H), 1738.10 (C=O), 1260.30 (C—O), 1153.27 (C—O)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 9.37 (s, 1H, OH), 9.12 (s, 1H, OH), 8.18 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, NH), 7.23 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, HC=C), 6.94 (s, 1H, ArH), 6.84 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 6.74 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, ArH), 6.53 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, C=CH), 4.29~4.22 (m, 1H, CH), 4.09 (dd, $J=6.9$ 、7.0 Hz, 2H, OCH₂), 2.09~2.03 (m, 1H, CH), 1.18 (d, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃), 0.91~0.86 (m, 6H)。ESI-MS $[M+H]^+$, m/Z : 实测值 (计算值): 308.0713 (307)。

III b: IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3347.59 (N—H), 2959.35 (—CH₃), 2917.89 (—CH₂), 1720.74 (C=O), 1271.39 (C—O), 1191.36 (C—O)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 9.35 (s, 1H, OH), 9.15 (s, 1H, OH), 8.29 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, NH), 7.24 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, HC=C), 6.94 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, ArH), 6.84 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, ArH), 6.74 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, ArH), 6.39 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, C=CH), 4.36 (d, $J=5.3$ Hz, 1H, CH), 4.08 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH₂), 1.66~1.50 (m, 3H, CH₂+CH), 1.17 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃), 0.88 (dd, $J=19.6$ 、6.5 Hz, 6H, CH₃+CH₃)。ESI-MS $[M+H]^+$, m/Z : 实测值 (计算值): 322.0833 (321)。

III c: IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3324 (N—H), 2980 (—CH₃), 2913 (—CH₂), 1653 (C=O), 1303 (C—O)。¹HNMR (400 Hz, C₃D₆O), δ : 7.33~7.22 (m, 1H, OH), 6.95 (s, 1H, OH), 6.82 (s, 1H, NH), 6.70 (s, 1H, HC=C), 6.40 (d, $J=15.6$ Hz, 1H,

C=CH), 4.57 (s, 1H, ArH), 4.50 (s, 1H, ArH), 4.36 (s, 1H, ArH), 4.02 (s, 2H, OCH₂), 2.70 (s, 1H, CH), 2.46 (d, $J=13.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.91~1.84 (m, 3H, SCH₃), 1.12 (s, 4H, CH₂+CH₂)。ESI-MS [M+H]⁺, m/Z : 实测值 (计算值): 340.28 (339)。

III d: IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3302 (N—H), 1721 (C=O), 1197 (C—O)。¹HNMR (400 Hz, C₃D₆O), δ : 7.40 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, OH), 7.40 (d, $J=12.9$ Hz, 1H, OH), 6.83 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, OH), 6.75 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, NH), 6.64 (s, 1H, CH=C), 6.57 (t, $J=14.4$ Hz, 1H, C=CH), 5.01 (s, 1H, ArH), 4.76 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, ArH), 4.70 (s, 1H, ArH), 4.65 (m, $J=28.6$ Hz, 2H, ArH), 4.45 (dd, $J=8.6$ Hz, 2H, ArH), 4.10 (t, $J=25.7$ Hz, 1H, CH), 3.14~2.89

(m, 2H, OCH₂), 1.97 (s, 2H, CH₂), 1.19 (t, $J=11.1$ Hz, 3H, CH₃)。ESI-MS [M+H]⁺, m/Z : 实测值 (计算值): 372.0484 (371)。

2.3 DPPH 自由基清除活性测定

咖啡酰氨基酸乙酯清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 见表 1。清除 DPPH 自由基能力由强到弱的顺序为: III a > III d > III c > III b > CA > V_C。各物质间均存在显著性差异 ($P<0.05$)。由此可见, 咖啡酰氨基酸乙酯类物质清除 DPPH 自由基的作用强于咖啡酸单体, 且明显高于常用抗氧化剂 V_C。咖啡酸与不同氨基酸反应生成酰胺后清除自由基活性强弱明显不同, 表明侧链氨基酸基团对于咖啡酰胺酯类物质的抗氧化性影响显著, 氨基酸基团对 DPPH 自由基清除活性影响的强弱顺序为: 缬氨酸 > 酪氨酸 > 蛋氨酸 > 亮氨酸。

表 1 不同合成产物对 DPPH 自由基的清除效应

Table 1 Effects of different synthetic products on DPPH free radical scavenging

	III a	III b	III c	III d	CA	V _C
IC ₅₀ / (μmol/L)	11.23±0.24*	20.86±0.04*	19.50±0.04*	15.62±0.03*	27.54±0.06*	76.21±0.04

* $P<0.05$ (与 V_C 组比较)。

2.4 羟基自由基清除活性测定

氧化应激是引发多种疾病的病理生理机制的基础。当活性氧的产生超过细胞防御系统的能力时, 氧化应激就会发生。羟基自由基是一种活性氧, 通常在体内形成, 对生物分子如脂质、蛋白质和核酸造成严重损害^[15]。咖啡酰氨基酸酯衍生物清除羟基自由基的 IC₅₀ 如表 2 所示。除 III c 与 III d 物质之间无显著性差异外, 其他各物质间清除能力差异显著

($P<0.05$)。各物质清除羟基自由基能力强弱顺序为: III c > III d > CA > III a > III b > V_C。可知, 咖啡酰氨基酸乙酯类衍生物清除羟基自由基能力均强于常用抗氧化剂 V_C。不同咖啡酰氨基酸乙酯类物质清除羟基自由基能力的不同, 与其侧链氨基酸基团有关。羟基自由基的清除能力与 DPPH 自由基的清除能力强弱顺序不一致, 说明实验体系不同, 对于被测物质的抗氧化能力反应存在差异性。

表 2 不同合成产物对 OH 自由基的清除效应

Table 2 Effects of different synthetic products on the elimination of OH radicals

	III a	III b	III c	III d	CA	V _C
IC ₅₀ / (mmol/L)	0.35±0.001*	0.39±0.002*	0.24±0.002*	0.25±0.001*	0.29±0.001*	1.62±0.004

* $P<0.05$ (与 V_C 组比较)。

2.5 红细胞溶血率测定

RBC 是 Draize 眼刺激实验的替代方法之一^[16]。基本原理是通过测定血红蛋白漏出量及蛋白变性程度来评价化学品对眼组织细胞的损伤, 国际上主要将 RBC 实验用于化妆品产品及原料等化学品的眼刺激性研究。

前期研究发现, 样品浓度越大, 溶血率越高, 对红细胞膜的刺激性越强。咖啡酰氨基酸乙酯衍生物红细胞溶血率见表 3。被测物质 III c 对红细胞膜的刺激性与 III a、溶剂 (DMSO) 之间无显著性差异,

其他各被测物质间均存在显著性 ($P<0.05$)。表 3 中各被测样品浓度为 1 mmol/L 时 (SDS 质量浓度为 1.3 g/L), 样品溶血率 (均值) 由大到小排序为: SDS (74%) > III b (40%) > CA (1.5%) > III a、III c、III d、DMSO (<1%)。由溶血率大小推知, 咖啡酸与氨基酸乙酯盐酸盐成酰胺后刺激性普遍降低。前人研究发现, 亮氨酸可通过抑制腺苷酸环化酶活性实现膜电位去极化, 使细胞膜长时间处于受刺激状态^[17]。咖啡酰亮氨酸乙酯可能由于亮氨酸基团的存在, 从而对红细胞膜表现出高于咖啡酸单体的刺激性。

表 3 不同化合物作用下的红细胞溶血率

Table 3 Effects of different compounds on red blood cell hemolysis rate

	III a	III b	III c	III d	CA	DMSO	SDS
溶血率/%	0.42±0.004*	40±0.074*	-0.40±0.175*	0.62±0.142*	1.5±0.195*	0.84±0.102*	74±0.048

* $P<0.05$ (与 SDS 组比较)。

3 结论

合成了Ⅲa、Ⅲb、Ⅲc、Ⅲd 4 种咖啡酰氨基酸乙酯。实验结果显示, 4 种咖啡酸酰胺类衍生物功效性均有提高, 均呈现较好的抑制 DPPH 自由基、羟基自由基活性的效果, 且Ⅲa 清除 DPPH 自由基能力最强, 其 IC_{50} 为 $(11.23 \pm 0.24) \mu\text{mol/L}$; Ⅲc 清除羟基自由基能力最强, 其 IC_{50} 为 $(0.24 \pm 0.002) \text{mmol/L}$ 。4 种合成产物抗氧化性存在差异, 这主要是由于氨基酸的结构不同而导致的差异性。4 种咖啡酰氨基酸乙酯类衍生物中的 3 种相对于咖啡酸单体, 对红细胞膜具有更弱的刺激性, 表明与氨基酸乙酯结合后的咖啡酸具有更高的安全性。

在后续研究中, 可以用咖啡酸与更多不同种类的氨基酸结合进行生物活性比较, 揭示相关的分子机理, 阐明生物活性与结构之间的联系, 在原料安全性方面可以增加鸡胚绒毛尿囊膜实验进行多方面论证来证明原料的安全性。

参考文献:

- [1] Silva T, Oliveira C, Borges F. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009 -2013)[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 52(9): 1257-1270.
- [2] Chochkova M, Stoykova B, Ivanova G, *et al.* *N*-hydroxycinnamoyl amides of fluorinated amino acids: synthesis, anti-tyrosinase and dpph scavenging activities[J]. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2013, 156(12): 203-208.
- [3] Mattila P, Hellstr M J, Trnén R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(19): 7193-7199.
- [4] Sun Y, Yu Y Y, Cao S W. Antioxidant capacity of caffeic acid, phloretin and glutathione mixtures and formula optimization[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2013, 25(7): 3971-3978.
- [5] Jiang R W, Lau K M, Hon P M, *et al.* Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *salvia miltiorrhiza*[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12(2): 237-246.
- [6] Wei Q Y, Jiang H, Zhang J X, *et al.* Synthesis of *N*-hydroxycinnamoyl amino acid ester analogues and their free radical scavenging and antioxidative activities[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, 21(8): 1905-1911.
- [7] Rajan P, Vedernikova I, Cos P, *et al.* Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11(2): 215-217.
- [8] Yoo Y J, Nam D H, Jung S Y, *et al.* Synthesis of cinnamoyl ketoamides as hybrid structures of antioxidants and calpain inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(10): 2850-2854.
- [9] Karau A, Grayson I. Amino acids in human and animal nutrition[J]. *Advances in Biochemical Engineering*, 2014, 143: 189-228.
- [10] Fumeri P M, Piperno A, Sajia A, *et al.* Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2004, 48(12): 4892-4894.
- [11] Noh J M, Kwak S Y, Seo H S, *et al.* Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(19): 5586-5589.
- [12] Anselmi C, Centini M, Andreassi M, *et al.* Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2004, 35(5): 1241-1249.
- [13] Boath A S, Stewart D, McDougall G J. Berry components inhibit α -glucosidase *in vitro*: synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 929-936.
- [14] Fan Q, Jiang H, Yuan E D, *et al.* Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of novel cinnamoyl amides with amino acid ester moiety[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(2): 1081-1087.
- [15] Trembl J, Šmejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 2016, 15(4): 720-738.
- [16] Zhang Wengai (张文改), Yang Xingfen (杨杏芬), Yang Ying (杨颖), *et al.* Preliminary study on red blood cell haemolysis assay as an alternative method for eye irritation test[J]. *Chin Prev Med (中国预防医学杂志)*, 2010, 11(6): 544-547.
- [17] Wang Yufeng (王羽峰), Cheng Jun (成军). Effect of leucine on membrane potential of sputum oocytes and its mechanism[J]. *Heilongjiang Medical Science (黑龙江医药科学)*, 1989, 12(1): 1-4.