

槲皮素及其糖苷对缺氧缺糖损伤的 HEK293 细胞保护作用及其构效关系研究

金越¹, 吕勇¹, 韩国柱^{1*}, 鱼红闪², 金凤燮²

(1. 大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116044; 2. 大连轻工学院 食品与生物工程系, 辽宁 大连 116034)

摘要:目的 采用缺氧缺糖损伤的模型对槲皮素 (quercetin) 及其单糖苷异槲皮素 (isoquercetin) 和双糖苷芦丁 (rutin) 的细胞保护作用进行比较性研究, 并探讨其构效关系。方法 HEK293 细胞用含连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液培养, 建立缺氧缺糖细胞损伤模型; 通过测定细胞活力, 总抗氧化能力, SOD、LDH 水平并计算 IC₅₀, 用以比较 3 种黄酮类化合物的细胞保护作用。结果 3 种黄酮类药物均剂量依赖性提高细胞存活率、总抗氧化能力、SOD 活性, 降低 LDH 的释放。其 IC₅₀ 在不同测定指标均为槲皮素 > 异槲皮素 > 双糖苷芦丁, 即细胞保护作用强度均为槲皮素 > 异槲皮素 > 双糖苷芦丁。结论 3 种结构相似的黄酮类化合物对缺氧缺糖损伤细胞具有保护作用, 其作用强度为苷元 > 单糖苷 > 双糖苷。表明随着黄酮类化合物分子中 C-3 位糖基的增加, 细胞保护作用减弱, 即分子中糖基数目与其作用呈负相关。

关键词: 槲皮素; 异槲皮素; 芦丁; 缺氧缺糖损伤; 自由基

中图分类号: R285.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)04-0618-03

黄酮类化合物作为一种高效低毒的多酚类抗氧化剂, 其抗自由基作用和细胞保护作用以及保健医疗功能已为众多实验所证实。为了阐明黄酮类药物的抗自由基活性及其构效关系, 近年, 本研究组选用槲皮素 (quercetin)、异槲皮素 (isoquercetin) 和芦丁 (rutin) 分别作为苷元、单糖苷、双糖苷的代表性天然黄酮化合物, 比较研究它们的抗氧自由基能力, 从而阐明 C-3 位糖基取代的黄酮类化合物构效关系, 得出了有价值的实验资料^[1,2]。本实验采用 HEK293 细胞体外培养, 通过测定槲皮素、异槲皮素、芦丁预处理后的细胞存活率、总抗氧化能力 (TAC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活力, 比较性研究 3 者的抗自由基作用和细胞保护作用, 进而从体外细胞培养水平探讨 C-3 位糖基的存在与数目对该类化合物作用的影响, 阐明其构效关系。

1 材料与方 法

1.1 材料: 槲皮素、异槲皮素、芦丁均由大连轻工学院食品与生物工程系提供, 质量分数 > 98%。RPMI 1640 培养液购自 Hyclone 公司, 胎牛血清为杭州四季青生物制品研究所产品; 噻唑蓝 (MTT) 购自 Genetime Technology Inc, HEPES、十二烷基磺酸钠 (SDS)、浓盐酸、异丁醇、连二亚硫酸钠等化学试剂均购自中国医药公司北京分公司, 总抗氧化能

力试剂盒、SOD 试剂盒、LDH 试剂盒均购自南京建成试剂公司。HEK293 细胞由大连医科大学附属二院分子生物学实验室国家三级实验室惠赠。3366 型 CO₂ 培养箱, Thermo —354 酶标仪, XD —101 倒置显微镜, 80 —1 型低速离心机。

1.2 缺氧缺糖损伤模型的建立及实验分组^[3,4]: 实验分为对照组, 缺氧缺糖损伤模型组和药物组。取前培养 24 h 的 HEK293 细胞, 吸去原培养液, 细胞用含糖 Earle's 液 (pH 7.4) 洗涤 2 次, 调整细胞数目至 1.5 × 10⁵ 个/mL, 接种在 96 孔培养板上液 (配置方法同上, 但不加糖) 以同样方法洗涤并调整数目至 1.5 × 10⁵ 个/mL, 接种于同一块 96 孔培养板上 (0.1 mL/孔), 作为模型组。给药组加不同浓度黄酮类化合物 10 μL; 对照组加 10 μL 含糖 Earle's 液; 模型组加 10 μL 连二亚硫酸钠的无糖的 Earle's 液补充体积。将培养板置于在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后观察并测定有关指标。

1.3 MTT 法测定细胞存活率: 取经过上述处理的 96 孔板, 每孔加 5 mg/mL MTT 10 μL, 4 h 后镜下观察结晶情况并每孔加入 100 μL 三联液 (含 10% SDS, 5% 异丁醇, 0.012 mmol/L HCl), 继续培养 10 h 左右后取出, 在酶标仪上以 640 nm 为参考波长 570 nm 波长测定吸光度 (A)。加入药物后抑制细胞存活百分率 $IR = (A_{药物} - A_{模型}) / (A_{对照} -$

* 收稿日期: 2008-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (30371744, 30470055, 20476017)

作者简介: 金越 (1979—), 女, 博士。E-mail: rutin@sina.com

* 通讯作者 韩国柱 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com

$A_{\text{模型}} \times 100\%$ 。将 $IR(Y)$ 对药物浓度的对数 (X) 做图,求其线性方程,根据该线性方程求出 IC_{50} 。

1.4 细胞培养上清液中 SOD 及 LDH 总抗氧化能力 (TAC) 的测定:吸取各组细胞培养孔内的上清液进行测定,具体操作按试剂盒说明进行。

1.5 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计采用方差分析、线性相关和回归分析。

2 实验结果

2.1 对缺氧缺糖细胞存活率的影响:由表 1 可见,槲皮素、异槲皮素和芦丁细胞保护作用呈现明显量效关系。线性回归方程,槲皮素: $Y = 0.6134 X - 0.3813$ ($r = 0.9945$);异槲皮素: $Y = 0.5417 X - 0.4121$ ($r = 0.9963$);芦丁: $Y = 0.4477 X - 0.3399$ ($r = 0.9959$)。计算 IC_{50} ,槲皮素、异槲皮素和芦丁分别为 27.34、48.28、75.17 $\mu\text{mol/L}$ 。表明其作用顺序为槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁。

表 1 对缺氧缺糖细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of quercetin, isoquercetin, and rutin on survival rate of cells injured by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{560}	细胞存活率/ %	IR/ %	IC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	-	0.119 \pm 0.001	100.00 \pm 1.24	-	-
模型组	-	0.022 \pm 0.002	18.49 \pm 1.52	-	-
槲皮素	10	0.041 \pm 0.001**	34.45 \pm 0.82**	24.8	27.34
	20	0.051 \pm 0.003**	42.86 \pm 2.91**	38.2	
	40	0.070 \pm 0.004**	58.82 \pm 3.71**	62.2	
	80	0.082 \pm 0.005**	68.91 \pm 4.61**	78.4	
异槲皮素	10	0.033 \pm 0.003**	27.73 \pm 2.83**	14.5	48.28
	20	0.043 \pm 0.003**	36.13 \pm 2.91**	27.8	
	40	0.055 \pm 0.004**	46.22 \pm 4.07**	43.8	
	80	0.071 \pm 0.003**	59.66 \pm 3.26**	63.5	
芦丁	10	0.031 \pm 0.001*	26.05 \pm 1.39*	11.7	75.17
	20	0.040 \pm 0.002**	33.61 \pm 1.78**	23.9	
	40	0.049 \pm 0.004**	41.18 \pm 4.33**	35.6	
	80	0.062 \pm 0.004**	52.13 \pm 4.12**	52.7	

与对照组比较: $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$ (下同)

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group (following tables are same)

2.2 对缺氧缺糖细胞 SOD 活力的影响:由表 2 可知,槲皮素、异槲皮素和芦丁剂量依赖性增强 SOD 活力,可抗缺氧缺糖所致 SOD 活力的下降,以药物对 SOD 活力的增强率 [$E = (\text{药物组 SOD 活性} - \text{模型组 SOD 活性}) / (\text{对照组 SOD 活性} - \text{模型组 SOD 活性}) \times 100\%$] 对药物浓度的对数做图,并计算 EC_{50} 。得线性回归方程,槲皮素: $Y = 0.7701 X - 1.0874$ ($r = 0.9913$);异槲皮素: $Y = 0.6369 X - 0.9259$ ($r = 0.9930$);芦丁: $Y = 0.542 X - 0.809$

9 ($r = 0.9942$)。计算各药物的 EC_{50} ,槲皮素、异槲皮素和芦丁分别为 115.16、173.31、261.09 $\mu\text{mol/L}$ 。即对 SOD 的作用强度顺序为槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁。

2.3 对缺氧缺糖细胞 LDH 水平的影响:由表 3 可知,3 种药物清除自由基作用呈现明显量效关系,以药物对 LDH 水平的抑制率 [$IR = (\text{药物组 LDH 水平} - \text{模型组 LDH 水平}) / (\text{对照组 LDH 水平} - \text{模型组 LDH 水平}) \times 100\%$] 对药物浓度的对数做图,并计算 IC_{50} 。得线性回归方程,槲皮素: $Y = 0.6317 X - 0.616$ ($r = 0.9923$);异槲皮素: $Y = 0.6024$

表 2 槲皮素、异槲皮素和芦丁对缺氧缺糖细胞中 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of quercetin, isoquercetin, and rutin on SOD activity in cells injured by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E/ %	EC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	-	29.12 \pm 1.76	-	-
模型组	-	5.59 \pm 1.34	-	-
槲皮素	40	9.81 \pm 0.94*	18.0	115.16
	80	13.75 \pm 1.37**	34.7	
	160	19.03 \pm 1.31**	57.2	
	320	26.21 \pm 0.75**	84.7	
异槲皮素	40	8.34 \pm 2.22	11.7	173.31
	80	11.88 \pm 1.21**	26.8	
	160	16.08 \pm 1.09**	44.6	
	320	21.97 \pm 1.73**	69.7	
芦丁	40	7.21 \pm 0.42	6.9	261.09
	80	10.79 \pm 1.51**	22.1	
	160	13.88 \pm 0.53**	35.3	
	320	18.96 \pm 1.02**	56.9	

表 3 槲皮素、异槲皮素和芦丁对缺氧缺糖损伤细胞 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of quercetin, isoquercetin, and rutin on LDH level in cells injured by oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDH/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	IR/ %	IC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	-	810.67 \pm 132.23	-	-
模型组	-	1448.22 \pm 296.15	-	-
槲皮素	20	1301.85 \pm 77.66	23.4	58.43
	40	1227.26 \pm 116.72	35.3	
	80	1079.48 \pm 91.17*	58.9	
	160	954.22 \pm 83.42**	78.9	
异槲皮素	20	1338.44 \pm 162.41	17.5	73.99
	40	1255.41 \pm 172.95	30.8	
	80	1116.47 \pm 163.34*	53.1	
	160	1006.20 \pm 136.73**	70.6	
芦丁	20	1370.82 \pm 108.23	10.9	96.47
	40	1272.29 \pm 123.15	28.3	
	80	1186.44 \pm 101.16	41.5	
	160	1041.48 \pm 108.36**	52.0	

X - 0.626 (r = 0.9958); 芦丁: Y = 0.5696 X - 0.6303 (r = 0.9932)。若将其作用强度以 IC₅₀ 表示,槲皮素、异槲皮素和芦丁分别为 58.43、73.99、96.47 μmol/L。表明其作用强度顺序为槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁。

2.4 对缺氧缺糖细胞 TAC 的影响:由表 4 可知,3 种药物均可剂量依赖性提高 TAC。数据处理方法同 SOD 活性处理方法,得线性回归方程,槲皮素: Y = 0.6763 X - 0.4697 (r = 0.9882); 异槲皮素: Y = 0.6172 X - 0.4499 (r = 0.9928); 芦丁: Y = 0.5634 X - 0.4553 (r = 0.9939)。若将其作用强度以 IC₅₀ 表示,槲皮素、异槲皮素和芦丁分别为 27.15、34.59、49.6 μmol/L。即作用强度顺序为槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁。

表 4 槲皮素、异槲皮素和芦丁对缺氧缺糖细胞 TAC 的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Table 4 Effect of quercetin, isoquercetin, and rutin on TAC of cells injured by oxygen-glucose deprivation (x̄ ± s, n = 6)

组别	浓度(μmol·L ⁻¹)	TAC/(U·mL ⁻¹)	E/%	EC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
对照组	-	21.51 ± 0.41	-	-
模型组	-	2.59 ± 0.51	-	-
槲皮素	10	7.23 ± 0.52 **	24.5	27.15
	20	9.43 ± 0.49 **	36.1	
	40	13.88 ± 1.93 **	59.7	
	80	18.57 ± 0.89 **	84.4	
异槲皮素	10	5.97 ± 0.91 **	17.9	34.59
	20	8.63 ± 1.03 **	31.9	
	40	13.42 ± 1.38 **	57.2	
	80	16.10 ± 0.85 **	71.4	
芦丁	10	5.04 ± 1.34 **	12.9	49.61
	20	7.47 ± 1.16 **	25.8	
	40	10.62 ± 1.41 **	42.4	
	80	14.70 ± 1.49 **	63.9	

3 讨论

HEK293 细胞为人胚胎肾脏细胞,因其稳定、无抗原性、易于培养,对实验环境要求较低,已常被用于药物的细胞保护作用的研究。故本研究亦采用该细胞系以研究槲皮素、异槲皮素和芦丁的构效关系^[5,6]。

缺氧缺糖可产生大量自由基从而诱导细胞损伤。传统的方法是通入 95% N₂、5% CO₂ 造成缺氧状态,继之以 95% O₂、5% CO₂、无糖/低糖培养基孵育模拟脑缺血模型。但是由于基层实验室的条件有限,限制了该模型的普及。本实验采用改良的缺氧缺糖模型,即利用离体培养的细胞,以 0.45 mmol/L 连二亚硫酸钠消除培养基中的氧,合并培养基缺糖,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,模拟缺血缺氧环境中细胞的损伤,这种损伤类似脑缺

血损伤模型,方法又比较简单、易行^[7]。

本实验通过测定细胞存活率以及细胞培养上清液中 SOD、LDH、TAC 水平等多项指标,并比较 3 种药物的 IC₅₀,充分证明了其抗自由基强弱顺序为:槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁,即苷元作用最强,单糖苷次之,双糖苷最弱。

黄酮类化合物为公认的自由基清除剂,其 B 环上邻二酚羟基以及 5、7 位酚羟基的存在被认为是黄酮醇类化合物具有强大自由基清除功效的结构基础^[8-11]。3 种黄酮类单体在化学结构上的不同之处在于 C-3 位羟基糖基的取代。槲皮素作为苷元,其 C-3 位羟基无糖基及其他基团取代;异槲皮素为槲皮素在 C-3 位被一分子葡萄糖取代的单糖苷;芦丁为槲皮素的 C-3 位被芸香糖(葡萄糖 + 鼠李糖)取代的双糖苷。随着糖取代基的增多,黄酮类化合物的水溶性逐渐增强,而脂溶性减弱。本实验发现 3 种化合物的细胞保护作用强度为槲皮素 > 异槲皮素 > 芦丁,可能的机制为^[8-11]: (1) 由于脂溶性的下降,不利于药物进入细胞发挥其保护作用; (2) 糖取代使可参与抽氢反应的羟基减少,从而导致了清除自由基能力的下降; (3) 黄酮的 3 位羟基成苷后,原来的分子失去了络合过渡金属离子的能力,使一些与金属离子有关的氧化反应得以顺利引发; (4) 单糖或多糖是一个比较大的基团,而自由基反应必须在一定的距离内才能进行,糖的空间位阻效应使其无法与活泼自由基接近。

对黄酮类化合物抗自由基作用构效关系的研究已有许多报道,但多数研究集中于分子中羟基的位置及数目对活性的影响,对其糖基取代影响的研究甚少,仅有少数报道采用将槲皮素和异槲皮素进行比较,且方法简单。本实验采用了 3 种结构相关的同系化合物,针对分子中 C-3 糖基取代进行的多指标的比较研究迄今未见报道。本研究首次揭示了黄酮类化合物抗氧自由基和细胞保护作用与其分子中糖基呈负相关,其确切机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 金越,吕勇,韩国柱,等. 槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较性研究 [J]. 中草药, 207, 38(3): 408-412.
- [2] Jin Y, Lü Y, Han G Z, et al. Structure-effect study of quercetin and its sugar-containing analogues as antioxidants in *in vitro* H₂O₂-induced cell injury model [J]. *Asian J Pharmacol Pharmacok*, 2007, 7(4): 295-301.
- [3] Salvaterra C G, Goldman W F. Direct effect of hypoxia on apparent intracellular calcium levels in cultured pulmonary vascular smooth muscle cells [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 143(25): 373-390.
- [4] Zheng J J, Chen Q, Hu D M, et al. Influence of ODQ for

过,每次精密量取续滤液 15 mL,合并续滤液,低温蒸干,残渣加甲醇水浴加热使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察:分别精密吸取对羟基苯乙酮对照品溶液 1、2、4、6、8 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,取上述对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。以对羟基苯乙酮的量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 6 \times 10^7 M + 340\ 141$ ($r = 0.999\ 3$),结果表明,在 0.098~0.786 μ g 有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取对羟基苯乙酮对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,测定,结果表明 6 次测定的 RSD 为 1.66%。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、2、6、12、24 h 进样 10 μ L,依法测定峰面积。结果表明,样品中对羟基苯乙酮 RSD 为 0.71%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取同一批滨蒿药材 6 份,每份约 2 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,依法测定,计算样品中对羟基苯乙酮的量,结果表明 RSD 为 1.66%。

2.8 加样回收试验:取已测定的滨蒿药材约 1 g,精密称定,分别加入 80%、100%、120% 的对羟基苯乙酮对照品,按供试品溶液的制备方法制备,依法测定,计算回收率。结果,对羟基苯乙酮的平均回收率为 99.80%,RSD 为 1.32% ($n = 9$)。

2.9 样品的测定:取各产地滨蒿药材,按供试品制备方法制备,依法测定对羟基苯乙酮质量分数。结果见表 1。

3 讨论

对羟基苯乙酮是滨蒿利胆的药效物质基础之

表 1 不同产地滨蒿中对羟基苯乙酮的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of *p*-hydroxyacetophenone in *A. scoparia* from different habitats ($n = 3$)

药材来源	对羟基苯乙酮/ %	药材来源	对羟基苯乙酮/ %
四川	0.033	新疆	0.021
广西	0.022	辽宁	0.032
陕西	0.036	贵州	0.020
河南	0.016	云南	0.025
安徽	0.028	山东	0.027

一,易溶于甲醇、乙醚、丙酮等溶剂,在制备供试品溶液时分别对不同的提取溶剂(甲醇、乙醇)、提取方法(超声、回流)、提取时间(1、1.5、2 h)以及提取次数(1、2、3 次)进行了考察,最后确定甲醇回流 2 次,每次 1 h 提取最为完全。

对甲醇-水、甲醇-磷酸、甲醇-醋酸不同流动相系统进行了比较,结果发现用甲醇-2% 醋酸溶液(30:70)为流动相时,对羟基苯乙酮的保留时间、峰型以及分离效果较好,可用于滨蒿中对羟基苯乙酮的定量测定。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 张廷模. 中药学[M]. 北京:高等教育出版社,2002.
- [3] 湖南医药工业研究所. 茵陈蒿(滨蒿)利胆有效成分对羟基苯乙酮的初步药理实验[J]. 中华医学杂志,1974(2):101-103.
- [4] 楼之岑,秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编)[M]. 第1册. 北京:北京大学医学出版社,1995.
- [5] 曾美怡,张启伟,姚三桃,等. 茵陈的化学成分和质量评价研究[J]. 国外医学:中医中药分册,1987,9(6):1-4.
- [6] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志() [M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [7] 刘影,于治国,袁璐,等. 茵陈药材中绿原酸的含量测定[J]. 西北药学杂志,2006,21(5):207-209.
- [8] 孙秀燕,邢山岗,李明慧,等. 用液相色谱-质谱联用法测定滨蒿中的茵陈色原酮[J]. 沈阳药科大学学报,2003,17(2):110-113.
- [9] 江纪武. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.

(上接第 620 页)

the synthesis of Guanosine cyclic monophosphate and Glialfibrillary acidic protein in hippocampus after cerebral ischemia reperfusion [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2001, 17(9): 861-862.

- [5] 汪长华,张友云,董传仁,等. 大豆磷脂脂质体对培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤的影响[J]. 中国循环杂志,1995,10(5):293-295.
- [6] Smith E F, Lefer A M, Aharow Y D, et al. Carbocyclic thromboxane A₂: aggravation of myocardial ischemia by a new synthetic thromboxane A₂ analog [J]. *Prostaglandins*, 1981, 21(3): 443-456.
- [7] Maricha N P, George K W Y, Gary S E I. Blockade of *N*-

methyl-*D*-aspartate receptors cyanide-induced neuronal injury in primary hippocampal cultures [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992, 115(1): 124-129.

- [8] 陈时宏. 黄酮类化合物的抗氧化作用及其构效关系[J]. 海峡药学,1998,10(4):4-6.
- [9] Husain S R. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26: 2489-2491.
- [10] Younes M, Siegers C P. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion [J]. *Planta Med*, 1981, 43: 240-244.
- [11] Cholbi M R, Paya M, Alcarazu J. Inhibitory effect of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation [J]. *Experientia*, 1991, 47: 195-199.