

芦丁-锆配合物的合成及清除 氧自由基活性的研究

王俊杰 姚胜昆 赫春香

(辽宁师范大学化学化工学院 辽宁省大连市黄河路 850 号 116029)

摘 要 合成了芦丁-锆(IV)配合物(Ru-Ge), 采用红外光谱、紫外光谱法表征了配合物。试验了配合物清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)和 DPPH $\cdot$ 自由基的能力。结果表明: 芦丁-锆(IV)配合物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力与芦丁相当, 但清除 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH $\cdot$ 自由基的能力明显优于芦丁。

关键词 芦丁; 锆; 配位化学; 氧自由基

中图分类号: O 657. 32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)02-0501-04

1 引言

有机锆具有调节人体免疫和造血机能、消除自由基、抗突变、抗癌、消炎、抗菌等多重功效^[1]。因而, 有机锆化合物成为新一类人类生物效应调节剂和体内平衡调节的药物, 其应用前景不可低估。研究和开发新的无毒的有机锆化合物是十分必要的。其中, 选择合适的有机配体是首要工作。芦丁(Rutin, $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{16}$, 简称 Ru) 是中药的有效成分, 对心血管系统具有多种生物活性。有报道指出, Ru 本身的药效并不强, 但 Ru 盐的药效大于 Ru。例如 Ru 对癌细胞并无杀伤能力, CuSO_4 溶液对癌细胞仅有轻微的杀伤能力, 但 Cu(II)-Ru 配合物杀伤癌细胞的作用较大^[2], 保志娟等研究了芦丁与锆(IV)混合溶液清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 DPPH $\cdot$ 自由基的作用^[3]。基于此, 本文合成了芦丁-锆配合物, 并研究了配合物对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 DPPH $\cdot$ 自由基的清除作用。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-240 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); RF-540 型荧光分光光度计(日本岛津公司); WGH-30 型双光束红外分光光度计(天津市港东科技发展有限公司); pH S-3C 数字酸度计(杭州万利达科学仪器厂); ZNHW 型电子节能控温仪(河南爱博特科技发展有限公司)。

芦丁(中国医药集团上海化学试剂公司, 生化试剂); 二氧化锆; DPPH $\cdot$ (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free radical, 美国 Sigma 公司) 乙醇水溶液; 邻苯三酚(除氧水配制); 以上 2 种溶液均于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.2); 芦丁、合成的芦丁-锆配合物均用二甲亚砜(中国医药公司北京采购供应站)作溶剂配制贮备液。除标明外, 其余试剂均为分析纯, 按常规法配制标准溶液。实验用水为二次石英亚沸蒸馏水, 高纯氮气除氧。

联系人, E-mail: hcx0224@sina.com

作者简介: 王俊杰(1983—), 女, 山西省大同市人, 硕士研究生, 主要从事分析化学方面的研究工作。

收稿日期: 2009-07-13; 接受日期: 2009-08-24

2.2 实验部分

2.2.1 配合物的合成

将 0.0500g 二氧化锆用氢氧化钠溶解, 加入到含 0.9970g 芦丁的无水乙醇溶液中, 用稀硝酸溶液调节 pH 为 6.0。恒温水浴加热搅拌回流 10h。冷却至室温后, 加适量水, 陈化 48h, 抽滤。用乙醇和水分别将沉淀洗涤数次后, 真空干燥 48h, 得亮黄色粉末状固体产物。

2.2.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基试验

向 1cm 石英比色皿中加入 0.20mL 3.8mmol/L EGTA (乙二醇二乙醚二胺四乙酸)、0.10mL 0.0100mol/L 苯甲酸钠溶液、1.60mL 水、1.00mL 3.8mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液, 摇匀, 再加入 0.10mL 0.588mmol/L H_2O_2 , 快速摇匀。以 394nm 为激发波长, 495nm 为发射波长, 立即测定荧光动力学曲线, 该曲线 0—6min 部分的斜率为 ν_0 。另取一个 1cm 石英液池, 加入上述 4 种试剂不变, 仅在加 H_2O_2 前加入适量的抑制剂溶液, 保持总体积为 3.00mL, 按同样的方法测定, 该曲线 0—6min 部分的斜率为 ν_i 。按下式计算抑制剂对羟基自由基的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\nu_0 - \nu_i}{\nu_0} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.3 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基试验

向 1cm 的石英比色皿中加入 2.00mL Tris-HCl 缓冲溶液、0.50mL 水、0.30mL 邻苯三酚, 快速摇匀, 立即记录 $E_x = 433.0\text{nm}$, $E_m = 494.5\text{nm}$ 光谱条件下的荧光动力学曲线, 该曲线 0—6min 部分的斜率为 ν_0 。在另一洁净的石英比色皿中加入上述试剂, 并在加入邻苯三酚前加入适量的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除剂(微升级)和水, 保持总体积为 2.80mL, 按相同的方法实验, 该曲线 0—6min 部分的斜率为 ν_i 。按公式(1)计算抑制剂对超氧自由基的抑制率。

2.2.4 清除 DPPH $\cdot$ 自由基试验

参照文献[4]方法, 取 4.0mL DPPH $\cdot$ 标准溶液, 加水定容至 10mL。放置 30min, 以二次石英亚沸蒸馏水为空白, 测定 517.0nm 波长处对应的吸光度, 此为 A_0 。另取一容量瓶, 加入 4.0mL DPPH $\cdot$ 标准溶液和不同量的样品溶液, 加水定容。按相同的方法测定吸光度, 此为 A_i 。按下式计算抑制剂对 DPPH $\cdot$ 自由基的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%.$$

3 结果与讨论

3.1 配合物结构的表征

3.1.1 配合物的红外光谱

对 Ru-Ge 和 Ru 分别进行红外光谱分析, 与 Ru 比较, 发现 Ru-Ge 的 O—H 键 C=C 键 C—OH 键 C—O—C 键 C=O 键均有红移或紫移现象, 并于远红外区 808cm^{-1} 处出现了 Ge—O 的特征振动频率^[5], 从而确认了 Ru-Ge 配合物的形成。

3.1.2 配合物的紫外光谱

图 1 为配合物以及芦丁标准试剂的吸收曲线。由图 1 可见芦丁最大吸收波长分别为 261nm 和 359nm, 形成配合物后 2 个峰带均向长波方向移动, 最大吸收波长分别为 266nm 和 410nm。参照红

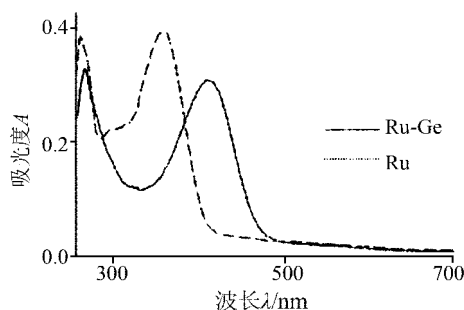


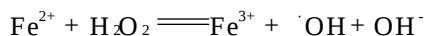
图 1 芦丁-锆配合物和芦丁的紫外-可见吸收光谱图

外光谱分析结果, 可知确实有芦丁-锆配合物生成。

3.2 芦丁及其配合物清除氧自由基活性比较

3.2.1 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性

本实验采用 Fenton 反应生成 $\cdot\text{OH}$:



$\cdot\text{OH}$ 可以使苯甲酸氧化成羟基苯甲酸。羟基苯甲酸具有较强的荧光效率, 可以通过测定羟基苯甲酸的生成速率间接测定 $\cdot\text{OH}$ 的生成速率, 并据此测定抑制剂清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力。按实验方法分别测定配合物和芦丁清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力, 抑制曲线如图 2(a) 所示。实验结果表明: 配合物和芦丁都具有清除 $\cdot\text{OH}$ 的活性, 随着浓度的增大, 两者清除 $\cdot\text{OH}$ 的活性均增大, 且配合物的清除活性明显强于芦丁。抑制率为 50% 时, 配合物浓度为 $1.48\mu\text{g}/\text{L}$, 芦丁的浓度为 $2.52\mu\text{g}/\text{L}$ 。

3.2.2 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性

实验室中获得 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的经典方法是利用邻苯三酚在 Tris-HCl 缓冲溶液中 (pH 8.2) 的自氧化产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 以及研究自由基清除剂抗氧活性的方法有直接法和间接法^[6-8]。我们采用简化的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 检测方法: 利用分光光度法测定邻苯三酚自氧化产物在 320nm 波长处的吸光度随时间的变化曲线代表 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的生成速率。按实验方法分别测定芦丁-锆配合物和芦丁清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力, 抑制曲线如图 2(b) 所示。实验结果表明在相同浓度下配合物与芦丁对超氧自由基抑制率基本相同。当抑制率为 50% 时, 配合物的浓度为 $20.5\text{mg}/\text{L}$ 。

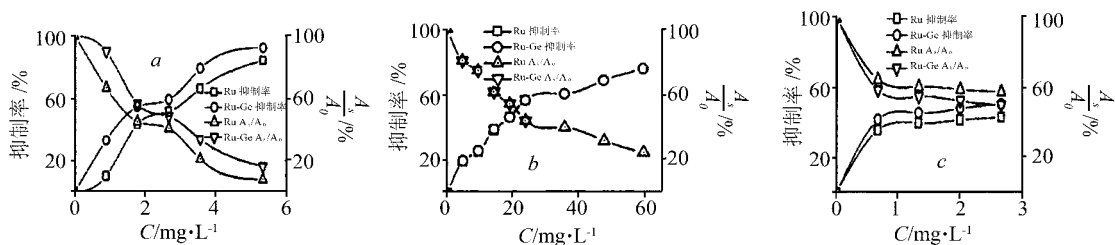


图 2 芦丁及其配合物清除

a—— $\cdot\text{OH}$; b—— $\text{O}_2^{\cdot-}$; c—— $\text{DPPH}\cdot$ 自由基活性比较。

3.2.3 清除 $\text{DPPH}\cdot$ 活性

$\text{DPPH}\cdot$ 是一种稳定的自由基, 其乙醇溶液显紫色, 在 517nm 处有最大吸收。当有自由基清除剂存在时, $\text{DPPH}\cdot$ 的单电子被配对, $\text{DPPH}\cdot$ 浓度减小而使其颜色变浅, 在 517nm 波长处的吸光度会减小。按实验方法分别测定配合物和芦丁对 $\text{DPPH}\cdot$ 自由基的抑制作用, 抑制曲线如图 2(c) 所示。可以看出, 配合物对 $\text{DPPH}\cdot$ 自由基的清除能力高于芦丁。芦丁对 $\text{DPPH}\cdot$ 自由基的清除能力最高仅达到 40%, 而芦丁-锆配合物却达到了 50%。对 $\text{DPPH}\cdot$ 自由基抑制率为 50% 时, 芦丁-锆配合物浓度为 $2.62\text{mg}/\text{L}$ 。

参考文献

- [1] 徐承水, 毕思玮, 张向峰. 微量元素锆与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 1996, 13(2): 62—63
- [2] 朱旭祥, 茅涵斌. 中药研究前沿-中药配位化学[J]. 中草药, 1997, 28(6): 373—375
- [3] 保志娟, 丁中涛, 曹秋娥等. 芦丁-锆配合物及其自由基清除活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 263—266
- [4] Sang SM, Cheng F, Stark R E et al. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Tea Catechins: A Analysis of Radical Reaction

- Products of Catechin and Epicatechin with 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl[J]. *Bioorganic & Med. Chem.*, 2002, **10**: 2233—2237.
- [5] 胡璧, 周则卫, 叶云鹏等. 有机锗倍半氧化物类化合物的合成[J]. *药学报*, 1999, **34**(11): 818—821.
- [6] Marklund S, Marklund G. Involvement of Superoxide Anion Radicals in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase[J]. *Eur. J. Biochem.*, 1974, **47**: 469—473.
- [7] Luc M, Emile M G, Jean C H. Spectrophotometric Measurement of Antioxidant Properties of Flavones and Flavonols Against Superoxide Anion Anion[J]. *J. Chin. Acta*, 2000, **411**: 209—216.
- [8] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌等. 一种 SOD 的测活方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1986, **13**(4): 71—73.

Study on Synthesis of Complex Germanium (IV)-Rutin and Its Scavenging Activity of Oxygen Free Radical

WANG Jun-Jie YAO Sheng-Kun HE Chun-Xiang

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, P. R. China)

Abstract The complex Ge(IV)-rutin was synthesized and characterized by IR spectra, UV spectra. The scavenging effects of complex Ge(IV)-rutin and rutin on superoxide free radical ($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl free radical ($\cdot OH$) and DPPH $\cdot$ free radical have been studied. The results show that the scavenging activities of complex on $\cdot OH$ and DPPH $\cdot$ are stronger than that of the rutin, and on $O_2^{\cdot -}$ approximately equal.

Key words Rutin; Germanium (IV); Coordination Chemistry; Oxygen Free Radical

本刊编辑部再次忠告: 请作者勿将联系地址省略! 尽管你单位的名称和你的姓名大名鼎鼎, 但并非人人皆知

某作者只告诉了本编辑部他所在单位的所在城市, 未告知街道名称和门牌号数。确实, 他单位是该城市鼎鼎有名的大单位, 所以编辑部发给他的信每次都能收到, 但是后来给他寄样刊时, 印刷品却被退回了, 邮局在上盖了个戳: 地址不详, 退! 可见, 虽然你单位大名鼎鼎, 但还并不是邮局人人皆知。 “退”! 这还是一个好运。因为“退”! 毕竟你还遇上一个邮局负责任的人, 他还要花费人力物力来“退”! 也好让邮件寄出者清楚“退”的缘故。若碰上一个不负责任的, 将邮件丢进了垃圾箱, 你到哪儿去叫苦呢! 有的作者联系地址只写上他单位的大名, 好像他在本单位也是大名鼎鼎, 本单位人人皆知的, 但情况往往并非如此。这种邮件, 单位的收发室, 也通常予以退回, 甚至丢进垃圾箱。所以, 请各位作者勿将你单位的地址(县、区、街道名称, 门牌号)和你自己的地址(院、部、系、室、组)省略, 举手之劳, 何乐不为? 邮件丢失才是一件大事, 请勿因小失大。

以上意见也是邮局对我们的要求。

若作者对我们的再次忠告和邮局的要求置之不理(甚至还同我们辩论), 本刊不得不停发邮件, 直到作者补齐详细地址后恢复。因此而延误出版的责任, 只好由您自己负责。

《光谱实验室》编辑部