

黄酮配合物抗自由基活性的亚甲基蓝光谱测定体系的研究

李方¹, 郑怀礼²

1 四川大学化学学院, 四川 成都 610064

2 重庆大学化学化工学院, 重庆 400044

摘要 亚甲基蓝(MB)可捕获 Fenton 反应产生的羟自由基生成无色加合物, 选用亚甲基蓝为槲皮素(Que)及其配合物抗羟自由基活性测定体系的指示剂。实验优化测试条件为: 体系 pH 8.0, 加入 H₂O₂ 溶液(0.3%) 0.50 mL, FeSO₄ 溶液(5 mmol·L⁻¹) 0.50 mL 和 MB 溶液(2.56×10⁻⁵ mol·L⁻¹) 1.0 mL。由此建立了测定槲皮素配合物抗·OH 活性的光谱测定方法。方法简便, 尤其适合于配合物体系抗自由基活性的分析。测定了槲皮素及 Que-Zn(), Que-Cu(), Que-Fe() 配合物的抗·OH 活性。结果表明 3 种槲皮素配合物的抗羟自由基活性均比槲皮素高, 配合物活性 Que-Cu() > Que-Zn() > Que-Fe(), 表现出金属离子与有机活性配体协同作用可提高其抗氧化活性的能力。

主题词 亚甲基蓝光谱法; 槲皮素配合物; 羟自由基

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)12-2294-04

引言

黄酮类化合物(Flavonoids)是多酚类物质, 是许多中草药的有效成分。黄酮类化合物由于结构上的特点, 是一类天然的抗氧化活性的物质^[1,2], 对超氧阴离子自由基(O₂⁻)、羟自由基(·OH)和单线态氧(¹O₂)有良好的清除作用。黄酮类化合物又是一类有机配体, 可与植物中的金属元素形成配合物。已有的研究表明, 中草药中的有机配体与金属离子形成配合物后, 可改善其有机成分的生理药理活性。为了探索黄酮类化合物(以槲皮素为代表)与金属元素形成配合物后抗氧化能力的变化, 本文根据槲皮素配合物 Que-Zn(), Que-Cu() 和 Que-Fe() 自身的特点, 通过比较研究和优化选择, 建立了 Fenton 反应-亚甲基蓝光谱测定方法, 并用该方法对槲皮素及其金属配合物的抗羟自由基(·OH)作用以及抗氧化活性的差异进行了分析, 对槲皮素配合物抗羟自由基的机制也进行了初步探讨。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-240 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); pHs-

3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂); TB-85 型恒温水浴装置(日本岛津公司)。

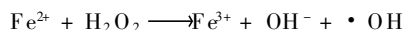
槲皮素-金属配合物(本实验室合成); Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0); 亚甲基蓝(MB)溶液(2.56×10⁻⁵ mol·L⁻¹); H₂O₂: 0.3% (Φ); FeSO₄ 溶液: 5 mmol·L⁻¹; HCl: 6 mol·L⁻¹。所用试剂除 Tris 为生化试剂外, 其余均为分析纯。所用人为石英亚沸二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中加 Tris-HCl 缓冲液 1.0 mL, 槲皮素溶液或槲皮素-金属配合物溶液, MB 溶液 1.0 mL, H₂O₂ 溶液 0.50 mL, FeSO₄ 溶液 0.50 mL, 用蒸馏水稀释至刻度。37℃ 水浴中加热反应 30 min 后, 于分光光度计上用 1 cm 比色皿, 测定 663 nm 波长处的吸光度 A, 再由公式(1)计算其清除率。

2 实验原理及理论分析

羟自由基(·OH)非常活泼, 在含氧自由基中其氧化活性最强。但·OH 存在时间短, 除了电子自旋共振法(ESR)外, 一般难于直接测定, 故常用间接法测定^[3,4]。最常用的间接测定方法是利用 Fenton 反应产生羟自由基



收稿日期: 2005-10-16, 修订日期: 2006-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(20375026), 四川省科技厅基金项目(02GY029-038)和重庆市自然科学基金重点项目(CSTG-2004DA7019)资助

作者简介: 李方, 女, 1956年生, 四川大学化学学院教授

上述反应也是通常认为的生物体内羟自由基产生的过程。

产生的·OH 与指示剂发生反应,测定指示剂的变化可间接得·OH 浓度的变化^[5]。若测试体系中存在·OH 自由基清除剂时,则清除剂与·OH 作用,使·OH 对指示剂的作用降低,从而使指示剂反应产物生成量减少,检测指示剂的信号值发生变化,与空白液比较后即可得出清除剂清除·OH 的作用能力(用清除率表示)。清除率计算公式为

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{损}}}{A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_{\text{样}}$ 为加入清除剂后测得的反应体系吸光度值;

$A_{\text{未损}}$ 为指示剂本身的吸光度值;

$A_{\text{损}}$ 为未加清除剂时反应体系吸光度值。

该测试体系中常用的指示剂有邻二氮菲- Fe^{2+} 法^[6]、水杨酸法^[7]、 Ce^{3+} 氧化法^[8] 等。但这些体系多适用于测定单纯的有机物的活性,且多为酸性测试体系,不适宜用于槲皮素-金属配合物的抗·OH 活性的测定。本文所选用的 MB 是自由基聚合反应的高效阻聚剂,MB 分子对·OH 自由基有高度的亲合力和猝灭作用,因其可捕获 Fenton 反应产生的·OH 而由蓝色变为无色加合氧化产物—羟化亚甲基蓝(MB-OH)。MB-OH 难以再被氧化或还原显色,具有好的稳定性,并且该反应的 pH 范围适合于槲皮素配合物的稳定存在。因此,本文以 MB 作为测定体系的指示剂,优化选择了测定条件,建立了 Fenton 反应-亚甲基蓝分光光度检测方法。用此法测定了槲皮素(Quercetin, Que)和槲皮素-金属配合物的抗·OH 自由基的活性。

3 结果与讨论

3.1 亚甲基蓝、槲皮素和配合物的吸收曲线

在 200~700 nm 波长范围内,MB、槲皮素和配合物溶液的光谱吸收曲线见图 1。由图中各曲线可知,MB 的最大吸收峰位于 663 nm,在此波长处,槲皮素及槲皮素-金属配合物无吸收,不干扰 MB 吸光度 A 的测定。故实验选用 663 nm 为测试波长。

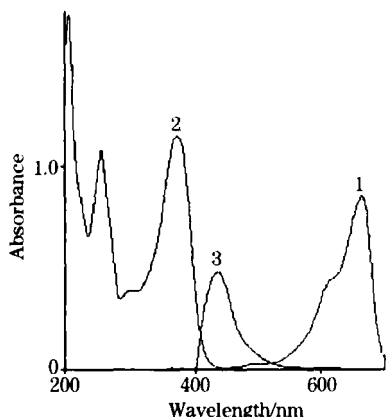


Fig 1 The absorption spectra of MB, Quercetin and metal-complex

1: MB; 2: Que; 3: Complex

3.2 测定条件的优化选择

3.2.1 体系酸度的影响

测试体系酸度的选择需同时考虑清除率的高低以及配合物自身的稳定性。对于本体系,在 pH 7.0~8.9 范围内,均适于测定(见图 2)。兼顾 Que-Zn(), Que-Cu() 和 Que-Fe() 三种配合物自身稳定性的 pH 范围,故本文采用 pH 8.0。

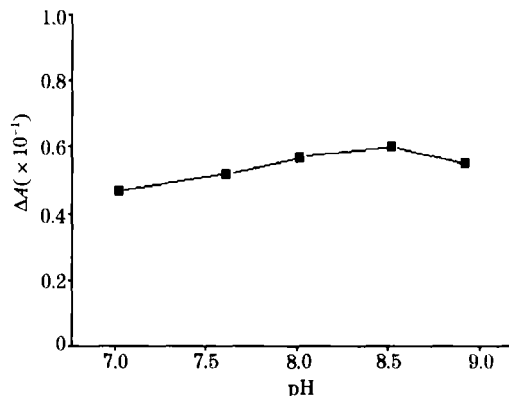


Fig 2 The effect of pH in testing solution

Note: $\Delta A = (A_{\text{损}} - A_{\text{样}})$

3.2.2 H_2O_2 用量和 Fe^{2+} 用量的影响

当 H_2O_2 及 Fe^{2+} 浓度较低时,Fenton 反应产生的·OH 的量随 H_2O_2 或 Fe^{2+} 的浓度增加而增加。此 2 种试剂的用量需要综合选择,主要考虑测试对象的清除效率。本文选择加入 H_2O_2 溶液(0.3%) 0.50 mL 及 FeSO_4 溶液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.50 mL,此条件下,槲皮素及其配合物对·OH 的清除效率最高(见图 3)。

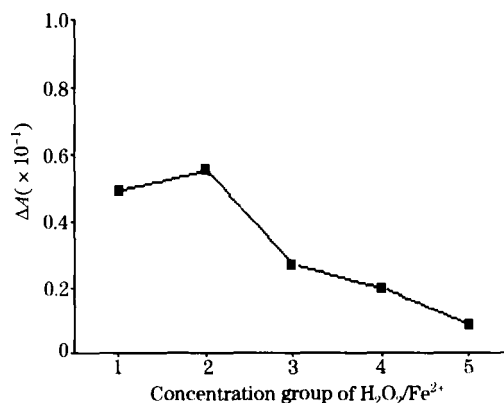


Fig 3 The effect of concentrations of H_2O_2 and Fe^{2+}

图 3 中 H_2O_2 溶液和 Fe^{2+} 溶液取用量的比例见表 1。

Table 1 The ratio of concentration of H_2O_2 and Fe^{2+}

浓度比组数	1	2	3	4	5
H_2O_2 (0.3%), mL	0.30	0.50	1.0	1.0	1.5
Fe^{2+} ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), mL	0.30	0.50	0.50	1.0	1.0

3.2.3 亚甲基蓝用量的影响

测试体系中 MB 的浓度不宜过高, 在 MB 溶液 ($2.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 用量 0.50~3.0 mL 范围内, 体系的 $\Delta A = (A_{\text{测}} - A_{\text{损}})$ 值比较稳定 (见图 4), 本实验采用 MB 溶液 1.0 mL。

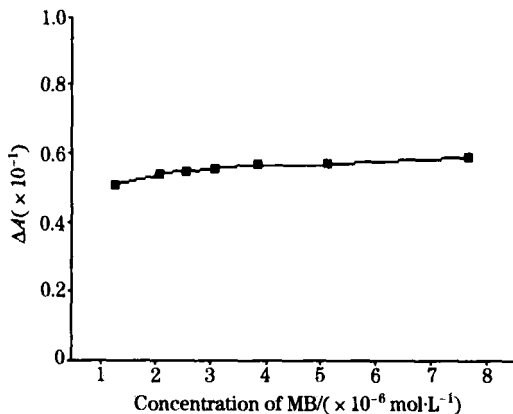


Fig 4 The effect of concentration of MB

3.2.4 体系反应时间的选择

试验了反应体系在 37 °C 水浴中加热反应时间对 ΔA 的影响。加热时间在 20~50 min 范围内时, ΔA 随加热时间的增加而略有提高, 本文选择 37 °C 水浴中加热反应 30 min。

3.3 槲皮素及其配合物抗 $\cdot\text{OH}$ 活性的测定

利用本文建立的 $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{MB}$ 光谱测定体系, 在所选的最佳反应条件下, 于 37 °C 时对槲皮素 (Que) 和 Que-Zn(), Que-Cu(), Que-Fe() 配合物抗 $\cdot\text{OH}$ 的活性进行了测定, 结果见图 5。

由图 5 可见, 槲皮素-Zn(), 槲皮素-Cu() 和槲皮素-Fe() 均具有较高的抗 $\cdot\text{OH}$ 的活性, 并且其活性明显比相同量的槲皮素的活性高, 表现出金属离子与有机活性配体协同作用提高其抗氧化活性的能力。3 种配合物对 $\cdot\text{OH}$ 自

由基清除率高低的顺序为: 槲皮素-Cu() > 槲皮素-Zn() > 槲皮素-Fe()。

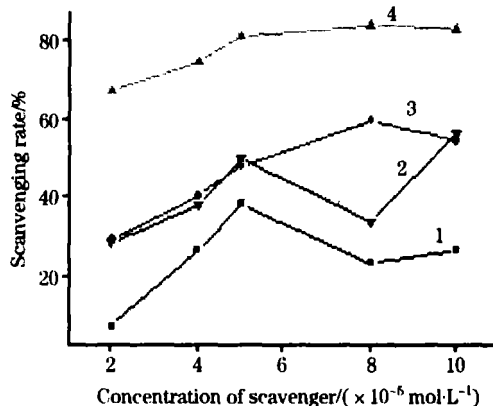


Fig 5 The scavenging rates of Quercetin and its complexes on $\cdot\text{OH}$ radical

1: Que; 2: Que-Fe(); 3: Que-Zn(); 4: Que-Cu()

3.4 槲皮素配合物抗活性氧机制的分析

在生物体系中, 对于由各种物理和化学因素引发的自由基链反应, 天然抗氧化剂的一个重要作用机制就是 阻断自由基的传链过程。当抗氧化剂与自由基发生反应后, 抗氧化剂本身变成了自由基, 这个新自由基的毒性或活泼性应该小于原来自由基的毒性或活泼性才能起保护作用^[9]。槲皮素具有 2 个互为邻位的酚羟基, 在作为抗氧化剂的作用中, 槲皮素通过酚羟基与自由基反应, 失去电子或供氢, 产生一种新的基团酚基自由基 (半醌式自由基, 图 6 中), 此基团通过芳香核的自旋作用以及邻位酚羟基供氢后形成分子内氢键 (图 6 中) 被稳定下来, 从而使自由基氧化链式反应的传导过程被中断, 起到了抑制脂质进一步被氧化的作用。因此, 槲皮素化合物抗氧化活性的高低与酚基自由基的稳定性有密切的关系, 凡是能提高酚基自由基稳定性的结构或因素, 都能增强槲皮素的抗氧化活性。

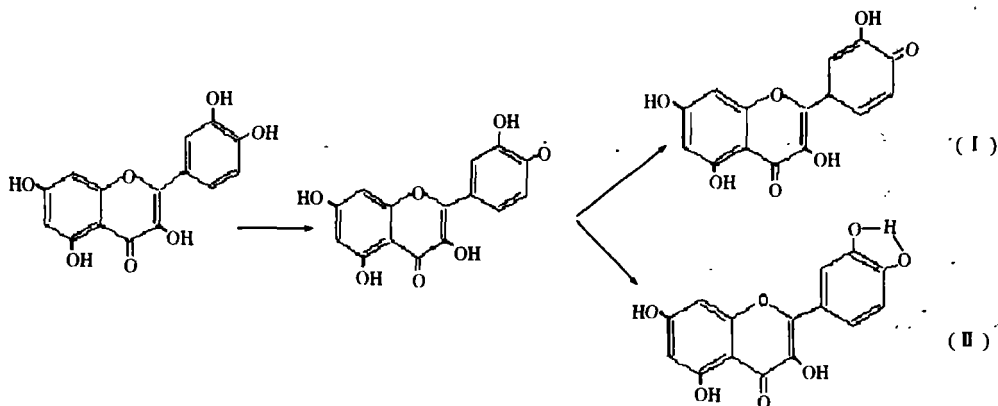


Fig 6 The process diagram of scavenging free radical by Que

当槲皮素与金属元素形成配合物后, 必然导致整个分子中电子构型的变化, 并通过共轭体系使邻位羟基氧上的电子云密度变小, 则氧对共价键的电子吸引力增强, 故羟基越易

脱氢。同时, 金属元素与槲皮素分子通过配位键形成稳定的配合物后, 进一步使整个配合物分子的电子云分布离域, 有助于黄酮体化合物在捕获自由基后自身形成更加稳定的自由

基中间体。这一酚基自由基越稳定,说明 O—H 键越弱,故清除自由基的活性越强。因此,槲皮素-金属配合物显示出具有比槲皮素更高的抗羟自由基的活性。

4 结 论

MB 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基有高度的亲和力,可捕获 Fenton 反应产生的羟自由基而导致其颜色发生显著的改变。利用 MB 的这一特点,建立了 Fenton 反应-亚甲基蓝分光光度法检测

黄酮类配合物抗羟自由基活性的方法。通过测定体系中加入槲皮素配合物或槲皮素后,663 nm 波长处吸光度值的改变,即可求得黄酮类抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率。实验结果说明,由于槲皮素配合物分子的电子云分布离域,使配合物与 $\cdot\text{OH}$ 作用后形成的酚基自由基更加稳定,因而配合物抗 $\cdot\text{OH}$ 自由基的活性高于槲皮素。本文所建立的测定体系以及分析结果有助于对中草药或天然产物抗氧化活性成分的更深入研究和应用。

参 考 文 献

- [1] HUI Ru-hua, HOU Dong-yan, GUAN Chong-xin, et al(回瑞华,侯冬岩,关崇新,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 266.
- [2] Craig W J. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 70(3): 491.
- [3] LIN Jin-ming, QU Feng, SHAN Xiao-quan(林金明,屈锋,单孝全). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2002, 30(12): 1507.
- [4] CHENG Guan-hua, TIAN Yi-ling, YANG Geng-liang, et al(陈冠华,田益玲,杨更亮,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 634.
- [5] Tawa R, Sakurai H. Anal Lett., 1997, 30(15): 2811.
- [6] ZENG Xiao-ling(曾小玲). China Journal of Modern Medicine(中国现代医学杂志), 1999, 9(11): 22.
- [7] LI Gui-rong, YANG Sheng-yuan(李贵荣,杨胜圆). Chemical World(化学世界), 2001, (8): 421.
- [8] LU O Zong-ming, FANG Yan-xiong, ZHANG Kun, et al(罗宗铭,方岩雄,张,等). China Oils and Fats(中国油脂), 2003, 28(3): 58.
- [9] ZHENG Rong-liang(郑荣梁). Radical Biochemistry(自由基生物化学). Beijing: Higher Education Press(北京:高等教育出版社), 1992.

Study on Fenton-Methylene Blue Spectral Analysis Method for Determining the Inhibitory Effect of Quercetin Complexes on Hydroxyl Free Radical

LI Fang¹, ZHENG Hua-li²

1. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract In the present, Fenton-Methylene Blue spectral measurement was established, and the new analytical method was applied successfully to determine the inhibitory effect of quercetin (Que) and its complexes on hydroxyl free radical. Methylene Blue (MB) can capture the $\cdot\text{OH}$ produced by Fenton reaction, turning its color from blue to achromatic. Therefore, MB was selected as the indicator of the spectral measure study. The testing conditions optimized were pH 8.0, H_2O_2 solution (0.3%) 0.50 mL, FeSO_4 solution ($5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.50 mL and MB solution ($2.56 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 mL. The experiment results showed that Que-Zn(), Que-Cu() and Que-Fe() complexes held significant effects of scavenging action on $\cdot\text{OH}$ radical and were more effective in scavenging $\cdot\text{OH}$ than quercetin itself, showing the good cooperative action between quercetin and trace metal elements. The structure-bioactivity relationship of the coordination complexes was also discussed through analyzing the antioxygenic activity of quercetin-metal complexes.

Keywords MB spectral analysis method; Quercetin complex; Hydroxyl free radical

(Received Oct. 16, 2005; accepted Jan. 18, 2006)