

硒杂环化合物 SPO 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究

张逸波¹, 郑文杰², 黄 峙¹, 杨 芳², 刘 杰², 陈填烽^{2,3*}

1. 暨南大学生物系, 广东 广州 510632

2. 暨南大学化学系, 广东 广州 510632

3. 香港中文大学生物系, 香港 新界 沙田

摘 要 研究了一种新型硒杂环化合物 1,2,5-硒二唑并[3,4-d]噻啉-5,7-(4H,6H)-二酮(SPO)清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力及其光谱学特征。采用分光光度法进行检测, DPPH 自由基体系的测定波长为 515 nm, 稳定时间为 30 min, 而 ABTS 自由基的测定波长为 734 nm, 体系在 6 min 内达到稳定。SPO 具有良好的抗氧化活性, 能有效、快速地抑制溶液中 DPPH 和 ABTS 自由基的形成及其特征吸收峰。在优化的反应体系中, SPO 对 DPPH 和 ABTS 自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 85.2 和 36.5 μmol·L⁻¹, 该活性可与标准抗氧化剂 Trolox 相比拟, 且明显优于作为阳性对照的 BHA 和 BHT。实验的结果显示硒杂环化合物在抗氧化方面的广阔应用前景和潜力。

关键词 硒; 硒杂环化合物; 抗氧化活性; DPPH; ABTS

中图分类号: O627.6+1 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)07-1866-06

引 言

硒是人和动物体内必需的一种重要微量元素, 具有广泛的生物学功能和广泛的药理作用, 如抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗高血压、降血糖等活性^[1,2]。目前认为生物体内发挥生理功能的硒形态主要是以硒半胱氨酸为活性中心的硒蛋白。已在人体内发现 15 种硒蛋白, 其中 4 种谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和 3 种硫氧还蛋白酶均被证明主要执行抗氧化酶功能, 提示硒化合物在生物体内的抗氧化损伤作用^[3]。此外, 大量的流行病学、临床前和临床干预研究的结果都确证了硒化合物在肿瘤的防治上所扮演的重要角色^[4]。因此利用硒独特的化学和生物化学性质来开发新型药物是当今化学、生物及相关交叉学科的研究热点。迄今, 研究者合成了大量具有生物活性的有机硒化合物, 如含硒芳香杂环化合物、二硒醚、有机硒烷化剂、氨基硒脲及硒氰等几类。其中, 具有抗氧化活性的药物依布硒啉(Ebselen)已进入三期临床研究^[5]。我们在前期的研究中设计合成了一系列不同结构的具

生物活性及特殊理化性质的硒芳香杂环化合物^[6-9], 并进行了体内外抗肿瘤活性研究。结果发现化合物 SPO 及 ASDO 能高效、选择性地抑制多种肿瘤细胞的增殖, 其机制主要与诱发线粒体介导的细胞凋亡有关^[10,11]。但是, 关于硒芳香杂环化合物的抗氧化活性则有待深入研究。

自由基是生物体新陈代谢过程中产生的一类具有氧化活性的带负电的物质, 由于具有未配对的电子, 其化学性质相当活跃, 易对机体产生迅速而强烈的损伤, 与机体的许多功能障碍和疾病的发生密切相关, 因此, 研究自由基的检测方法是迫切需要的。迄今为止, 国内外报道的用于清除自由基的检测方法有许多, 如电子顺磁共振法(EPR)、电子自旋共振法(ESR)、比色法, 化学发光法, 荧光法等, 但目前的检测方法一般需要昂贵的设备和复杂的自由基捕集技术, 难以广泛推广应用。DPPH 和 ABTS 法是基于分光光度法来测定样品的抗氧化活性, 具有操作简单、快速、高通量等优点^[12-16]。但其准确性、灵敏度和可行性还需进一步系统的优化。本试验用 DPPH 和 ABTS 自由基清除法研究硒芳香杂环化合物 SPO 的抗氧化活性, 为其进一步开发应用提供科学依据。

收稿日期: 2009-08-09, 修订日期: 2009-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20771044), 广东省科技计划项目(2007B030703007, 2008A030201020)和广东省自然科学基金项目(9451063201002077)资助

作者简介: 陈填烽, 1981 年生, 暨南大学化学系副教授

* 通讯联系人 e-mail: ctf12343@yahoo.com.cn, tchentf@jnu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

UV-3600 紫外-可见分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; BP301S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), Na_2SeO_3 和芳香邻二胺类化合物均购自 Sigma 公司。

1.2 SPO 的合成

按照前期建立的方法^[6,9], Na_2SeO_3 与芳香邻二胺类化合物在 pH 为 2.50 的甲酸-甲酸铵缓冲溶液中反应制取 SDZs 化合物, 产物经分离、提纯和干燥, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。制备反应及 SDZs 的保存均在避光条件下进行。SDZs 化合物可溶解于 DMSO 中, 配制 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液。本研究所合成的 SDZs 化合物为 1,2,5-硒唑并[3,4-d]嘧啶-5,7-(4H,6H)-二酮 (SPO), 结构如图 1 所示。

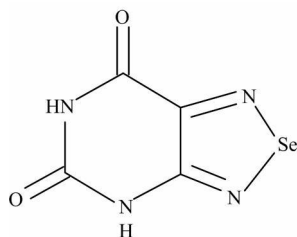


Fig 1 Chemical structure of 1,2,5-selenadiazolo[3,4-d]pyrimidine 5,7-(4H,6H)-dione (SPO)

1.3 DPPH 自由基清除实验

参照文献^[16]方法。准确称取 DPPH 粉末, 用甲醇溶解制备 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 临用前用甲醇稀释至 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在反应体系中, 于 10 mL 比色管中加入 50 μL 不同浓度的样品或参比溶液 (DMSO), 再加入 3 mL $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH 甲醇溶液, 振荡摇匀, 于室温下避光静置 30 min, 然后测定溶液在 515 nm 处的吸光值, 并扫描 UV-Vis 光谱。

DPPH 自由基清除率($I\%$) = $(1 - A_s/A_0) \times 100\%$, 其中 A_s 为样品管的吸光值; A_0 为对照管的吸光值。

1.4 ABTS 自由基清除实验

参照文献^[16]方法。用 pH 7.4 的 PBS 配制 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 储备液, 与 MnO_2 反应后用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的 PVDF 膜过滤, 再用 PBS (pH 7.4) 稀释到 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。在反应体系中, 于 10 mL 比色管中加入 50 μL 不同浓度的样品或参比溶液 (DMSO), 再加入 3 mL 的 ABTS 反应溶液, 振荡摇匀, 于室温下避光静置 6 min, 测定溶液在 734 nm 处的吸光值, 并扫描 UV-Vis 光谱。

ABTS 自由基清除率($I\%$) = $(1 - A_s/A_0) \times 100\%$, 其中 A_s 为样品管的吸光值; A_0 为对照管的吸光值。

1.5 半数抑制率 (IC_{50}) 的计算

以样品的浓度对自由基清除率作图并进行线性拟合, 并

计算 IC_{50} 值, 其中, IC_{50} 值定义为清除率为 50% 时所需抗氧化剂的浓度。

1.6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 并采用 SPSS 13.0 软件系统进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DPPH 和 ABTS 反应体系的吸收光谱及测定波长的确定

由于 DPPH 自由基清除法因具有快速、简单、灵敏和直接等优点, 被广泛应用于物质总抗氧化能力的测定。在有机溶剂中, DPPH 可形成一种稳定的自由基, 呈紫红色, 都具有典型的特征吸收峰。当反应体系中存在抗氧化剂时, 抗氧化剂提供氢原子和电子给 DPPH 自由基, 使其生成无色产物, 导致溶液的特征吸收峰下降, 吸光值变小。在此反应中, 体系颜色变得越浅表明所检测物质的抗氧化能力越强。本研究对 DPPH 自由基溶液和 SPO 甲醇溶液进行 UV-Vis 光谱扫描。结果如图 2 所示, DPPH 溶液在 515 nm 处出现特征吸收峰, 而 SPO 在 450 nm 以上范围没有吸收峰, 说明 SPO 本身不会对反应测定造成干扰。加入 SPO 后[图 3(a)], DPPH 在 515 nm 处的吸收峰呈剂量效应的降低, 且线性关系良好, 因此本实验选择 515 nm 作为 DPPH 自由基清除实验的检测波长。

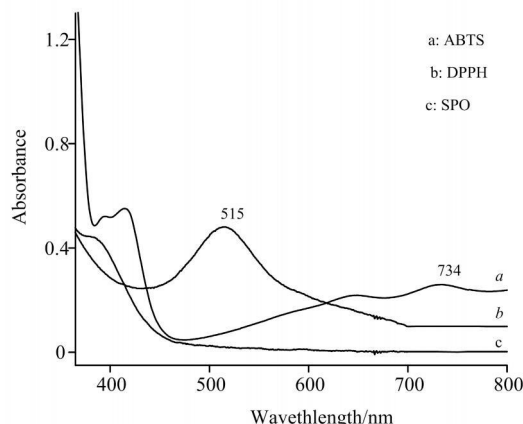


Fig 2 Absorption spectra of DPPH, ABTS and SPO

a: ABTS; b: DPPH; c: SPO

ABTS 自由基清除法是由 Miller 等建立的^[17]。目前已被广泛应用于生物样品的总抗氧化能力的测定。ABTS 经氧化后生成相对稳定的蓝绿色的 ABTS 水溶性自由基。抗氧化剂与 ABTS 自由基反应后使其溶液褪色, 特征吸光值降低。在该反应体系中, 溶液褪色越明显则表明所检测物质的总抗氧化能力越强。对 ABTS 溶液进行 UV-Vis 光谱扫描, 结果如图 2 所示, ABTS 溶液在 734 和 415 nm 处出现特征吸收峰。加入 SPO 后[图 3(b)], 415 nm 处的吸收峰受到 SPO 本身吸收峰的干扰, 而 734 nm 处的吸收峰则呈剂量效应的降低, 且线性关系良好, 这些结果提示 734 nm 处吸收峰的变化可以用于反映 SPO 清除自由基的情况, 因此本实验选用 734

nm 作为 ABTS 自由基清除实验的检测波长。

2.2 DPPH 和 ABTS 体系的反应动力学研究

在 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验中, 对于不同的待测抗氧化剂, 体系的反应时间是一个关键的影响因素^[18]。为了了解所采用的 DPPH 和 ABTS 体系的反应动力学特性, 研究了 DPPH 和 ABTS 自由基溶液在加入不同抗氧化剂(包括 SPO, BHA, BHT 和 Trolox) 后吸光值随时间变化的规律。如图 4 所示, 在 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液中分别加入 SPO(终浓度为 40 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、BHA(终浓度为 125 和 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Trolox(终浓度为 20 和 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后, 体系的特征吸收峰 A_{515} 在 5 min 内显著下降, 在 5

min 后, 体系基本趋于平衡, 至 30 min 时, A_{515} 达到稳定状态, 说明对于不同的抗氧化剂, 30 min 是一个合适的、稳定的反应时间点, 故可用于进一步的剂量效应的研究。对于 ABTS 反应体系, 我们同样观察到, 在 ABTS 自由基溶液中分别加入 SPO(终浓度为 20 和 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、BHA(终浓度为 40 和 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Trolox(终浓度为 60 和 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后, 体系的特征吸收峰 A_{734} 在 60 s 内显著下降, 在 6 min 后, 体系基本趋于平衡, 达到稳定状态, 说明对于不同的抗氧化剂, 6 min 这个时间点适用于进一步的剂量效应的研究(图 5)。

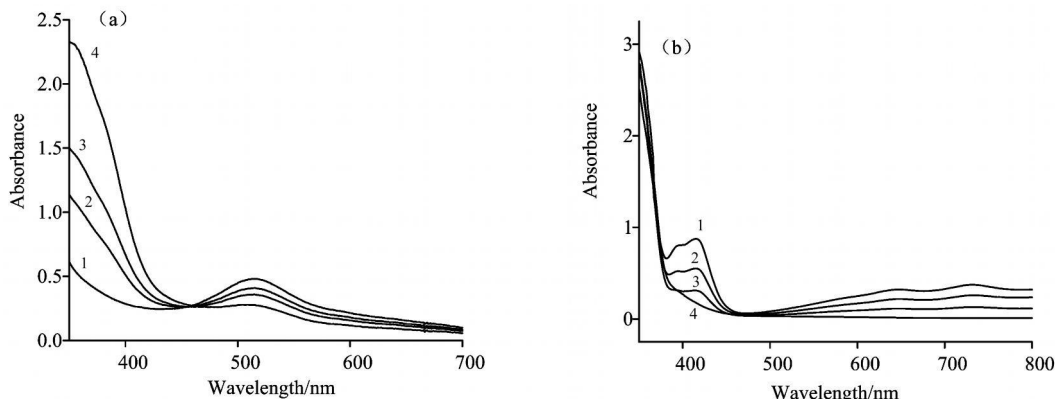


Fig 3 Changes in absorbance spectra of DPPH (a) and ABTS (b) with addition of SPO

1: Control; 2: $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

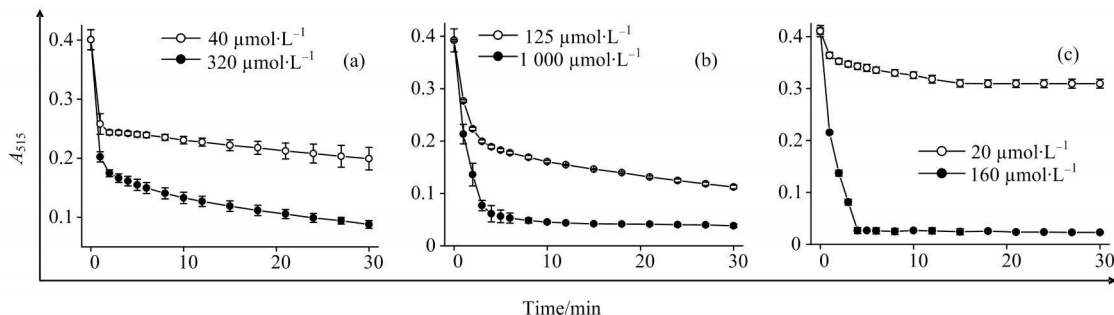


Fig 4 Changes in absorbance of DPPH (A_{515}) after addition of SPO (a), BHA (b) and Trolox (c)

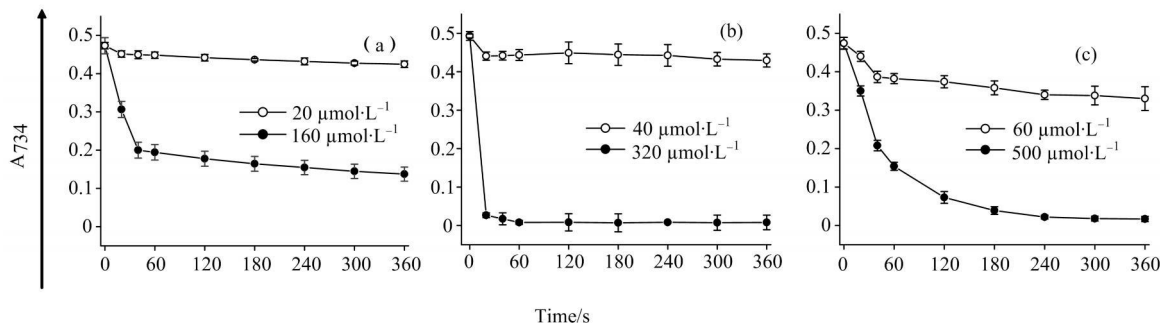


Fig 5 Changes in absorption of ABTS (A_{734}) after addition of SPO (a), BHA (b) and BHT (c)

2.3 抗氧化剂清除 DPPH 和 ABTS 自由基的剂量效应及其对比评价

根据以上优化的测定波长和反应时间, 测定一系列浓度

(倍比稀释)的 SPO, BHA, BHT 和 Trolox 对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率, 计算不同抗氧化剂的 IC_{50} 值, 并对其抗氧化活性进行对比评价。如图 6(a) 所示, 在浓度低于

$160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SPO 对 DPPH 自由基的清除率呈剂量效应的增加; 当浓度超过 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 自由基清除率不再随浓度上升, 基本稳定在一个水平, 导致其线性关系不好, 此时 SPO 对自由基的清除率很难客观的反映其抗氧化活性, 因此不能很好的比较 SPO 与其他抗氧化剂之间活性的差异。所以, 我们选取 $0 \sim 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SPO 对其自由基清除率进行线性拟合, 发现其线性关系良好[图 6(b)], $R^2=0.9769$ 。同样地, 如图 6(c)~(f) 所示, 在 BHA 和 Trolox 的 DPPH 自由基清除实验中也观察到类似的现象。对于 ABTS 反应体系, 如图 7 所示, 我们同样观察到, 在抗氧化剂(SPO, BHA 和 BHT) 浓度较高时, 其浓度与 ABTS 自由基清除率不成线性关系。缩小抗氧化剂浓度范围时, 获得了线性关系良好的拟合曲线, 并据此计算其 IC_{50} 值。

如图 8 所示, 在 DPPH 自由基清除实验中, SPO 的 IC_{50} 值为 $(85.2 \pm 13.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BHA 为 $(1200 \pm 55) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Trolox 为 $(51.3 \pm 17.0) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ABTS 法测得 SPO 的 IC_{50} 值 $(36.5 \pm 7.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BHA 为 $(84.8 \pm 15.9) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BHT 为 $(246.9 \pm 10.5) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这些

结果提示, 所合成硒杂环化合物 SPO 具有良好的抗氧化活性, 可与标准抗氧化剂 Trolox 相比拟, 且明显优于作为阳性对照的 BHA 和 BHT, 显示 SPO 在抗氧化方面具有广阔的应用前景和潜力。

3 结 论

研究了一种新型硒杂环化合物 1, 2, 5 硒二唑并[3, 4-d]噻啉-5, 7-(4H, 6H)-二酮(SPO)清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力及其光谱学特征。结果表明, 采用分光光度法测抗氧化剂 SPO 清除 DPPH 自由基的测定波长为 515 nm , 清除 ABTS 自由基的测定波长为 734 nm 。DPPH 体系的稳定时间为 30 min , 而 ABTS 体系则可在 6 min 内达到稳定。在优化的反应体系中, SPO 对 DPPH 和 ABTS 自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 85.2 和 $36.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该活性可与标准抗氧化剂 Trolox 相比拟, 且明显优于作为阳性对照的 BHA 和 BHT, 显示硒杂环化合物在抗氧化方面的广阔应用前景和潜力。

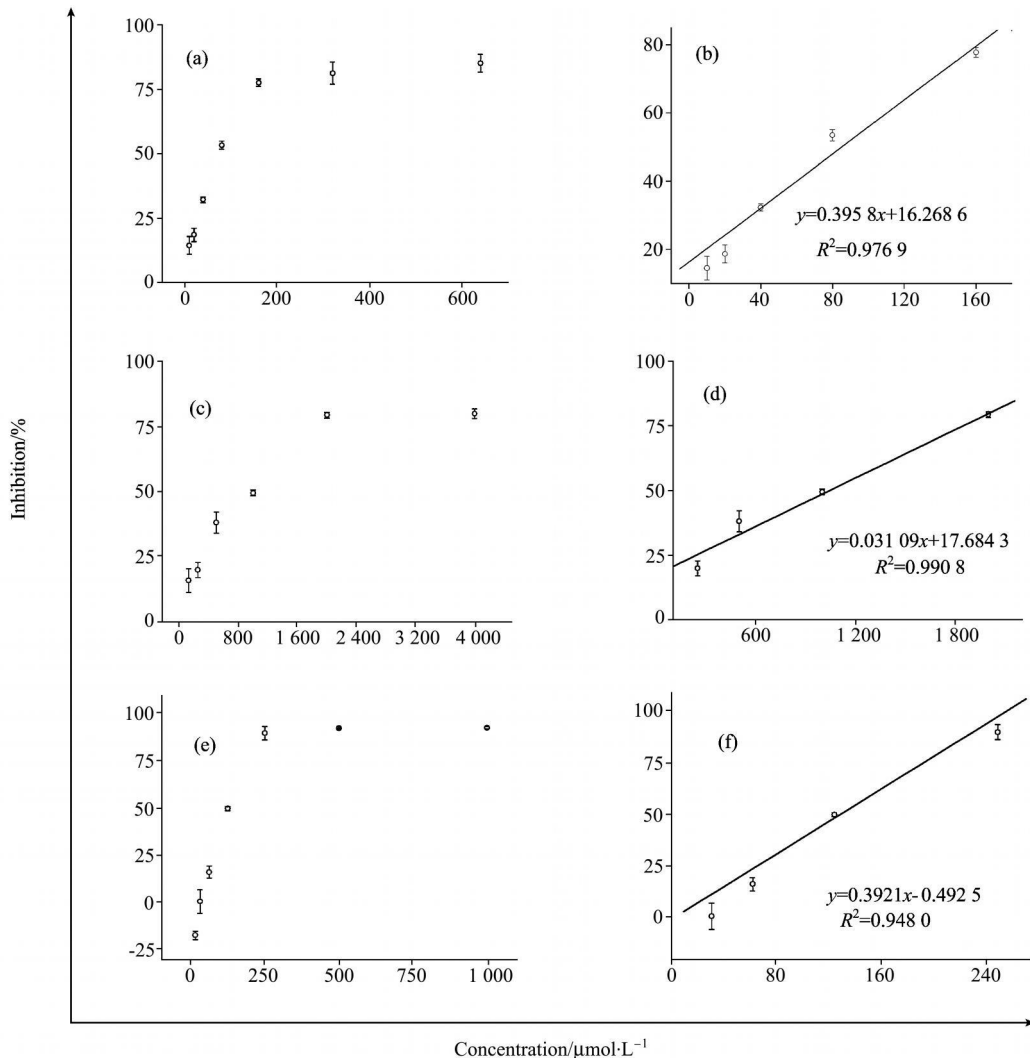


Fig 6 Dose dependent inhibitions of SPO (a, b), BHA (c, d) and Trolox (e, f) on DPPH free radicals and their linearity correlation

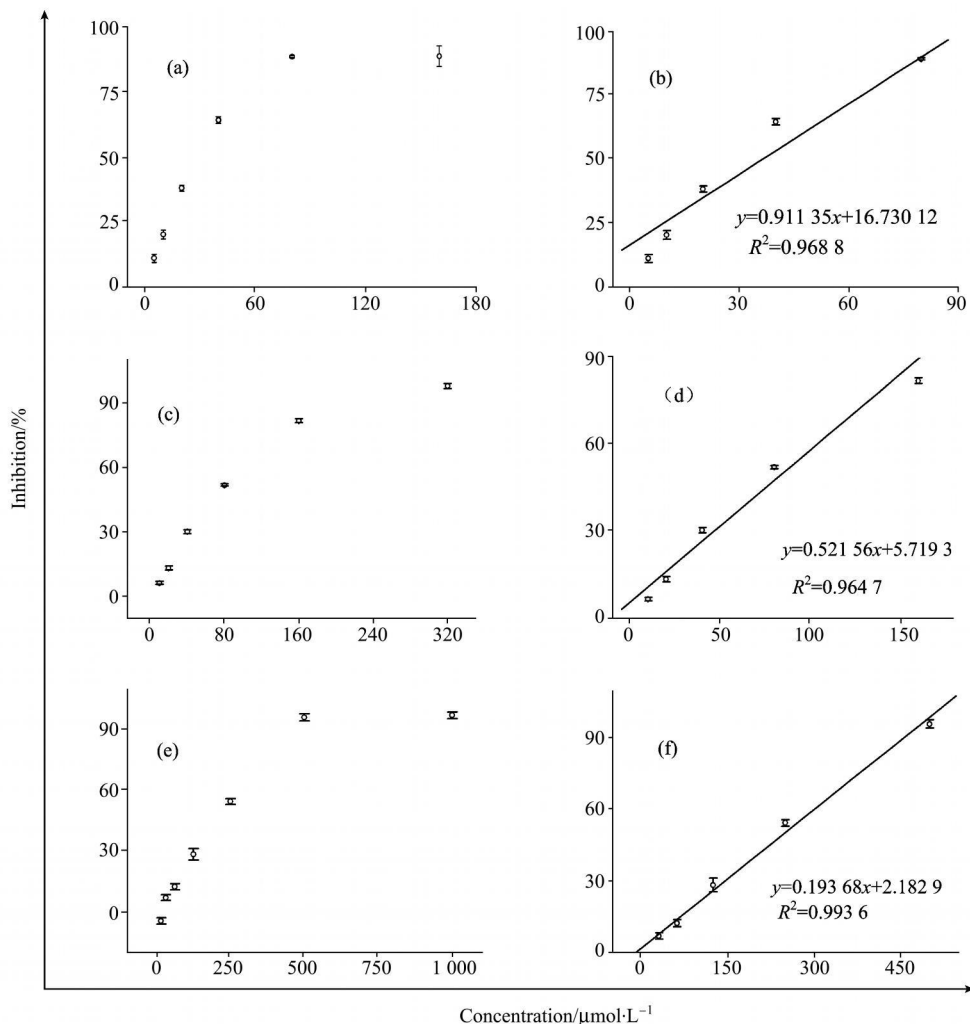


Fig 7 Dose dependent inhibitions of SPO (a, b), BHA (c, d) and BHT (e, f) on ABTS free radicals and their linearity correlation

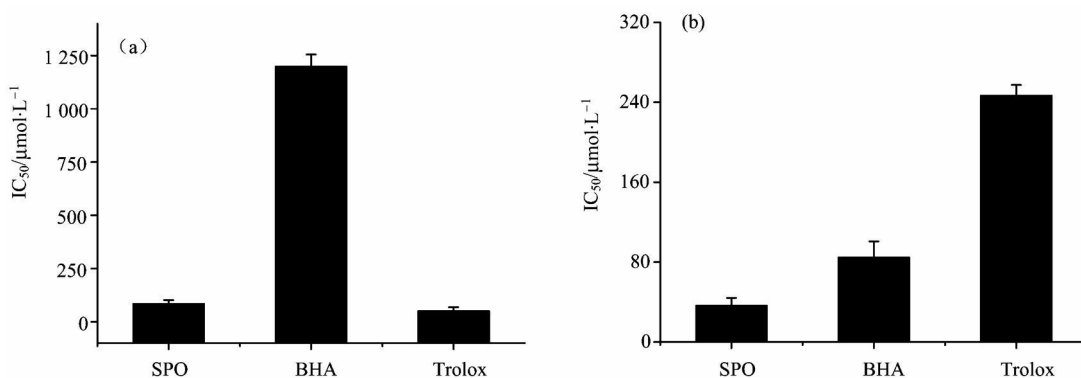


Fig 8 IC_{50} values of different antioxidants determined by DPPH assay (a) and ABTS assay (b)

参 考 文 献

- [1] Surh Y J. Nat. Rev. Cancer, 2003, 3: 768.
- [2] Rayman M P. Lancet, 2000, 356: 233.
- [3] El-Bayoumy K, Sinha R. Mutation Res., 2004, 551: 181.

- [4] Tapiero H, Townsend D M, Tew K D. *Biomed. Pharmacother.*, 2003, 57: 134.
- [5] Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, et al. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 2005, 19: 141.
- [6] ZHENG Wei jie, ZENG Xir hua, YANG Fang, et al(郑文杰, 曾鑫华, 杨芳, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2003, 19(1): 36.
- [7] ZOU Jia hao, ZHENG Wei jie, YANG Fang, et al(邹家浩, 郑文杰, 杨芳, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2005, 21(4): 381.
- [8] ZHANG Jun ling, ZOU Jia hao, ZHENG Wei jie, et al(张俊苓, 邹家浩, 郑文杰, 等). *Chemical Research and Application(化学研究与应用)*, 2004, 16(4): 561.
- [9] Zhang J L, Zheng W J, Zou J H, et al. *Chem. J. Int.*, 2004, 6: 97.
- [10] Chen T F, Wong Y S, Zheng W J, et al. *Chemico Biological Interact.*, 2009, 180: 54.
- [11] Chen T F, Zheng W J, Wong Y S, et al. *Biomed. Pharmacother.*, 2008, 62: 77.
- [12] Shyu Y S, Lin J T, Chang Y T, et al. *Food Chem.*, 2009, 115: 515.
- [13] GUO Xue feng, YUE Yong de, TANG Feng, et al(郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(7): 1578.
- [14] Sharma O P, Bhat T K. *Food Chem.*, 2009, 113: 1202.
- [15] Marghitas L A, Oltica G S, Daniel S D, et al. *Food Chem.*, 2009, 115: 878.
- [16] Chen T F, Wong Y S. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56: 4352.
- [17] Miller N J, Sampson J, Candias L P, et al. *FEBS Lett.*, 1996, 384: 240.
- [18] De Beer D, Joubert E, Gelderblom W C A, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(4): 902.

Spectrometric Investigation of the Antioxidant Activity of a Novel Synthetic Selenadiazole Derivative SPO Against DPPH and ABTS Free Radicals

ZHANG Yi bo¹, ZHENG Wei jie², HUANG Zhi¹, YANG Fang², LIU Jie², CHEN Tiar feng^{2,3*}

1. Department of Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Abstract The antioxidant activity of a novel synthetic selenadiazole derivative SPO against DPPH and ABTS free radicals was evaluated using spectrometric methods. The results show that the detection wavelength and stable time for DPPH system were 515 nm and 30 min respectively, while those for ABTS system were 734 nm and 6 min, respectively. SPO could effectively and rapidly inhibited the formation of ABTS and DPPH free radicals in a dose and time dependent manner, indicating the potent antioxidant activity of SPO under both hydrophilic and hydrophobic conditions. In the optimized systems, the IC₅₀ values of SPO were 85.2 μmol·L⁻¹ (DPPH assay) and 36.5 μmol·L⁻¹ (ABTS assay), respectively, which were comparable with the standard antioxidant Trolox, and significantly better than the positive controls BHA and BHT. Taken together, our results suggest the potential applications of selenadiazole derivatives as antioxidative agents.

Keywords Selenium; Selenadiazole derivative; Antioxidant activity; DPPH; ABTS

(Received Aug. 9, 2009; accepted Nov. 12, 2009)

* Corresponding author