

木犀草素-Cr(Ⅲ)配合物的合成及其清除DPPH自由基活性的研究^Δ

滕 杨^{1*}, 侯丽然², 侯 巍¹, 楚 婧¹, 高金波^{1#}(1.黑龙江省教育厅生物药制剂重点实验室/佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2.佳木斯大学基础医学院, 黑龙江佳木斯 154007)

中图分类号 R285;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3666-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.06

摘 要 目的:合成木犀草素-Cr(Ⅲ)配合物并确定其分子结构。方法:以无水乙醇为溶剂,在pH9.76、温度为80℃条件下,合成木犀草素-Cr(Ⅲ)配合物;用紫外光谱、红外光谱、热重差热结合元素分析确定其结构后,用高效液相色谱法和分光光度法考察木犀草素与其Cr(Ⅲ)配合物对DPPH自由基的清除作用。结果:木犀草素-Cr(Ⅲ)配合物的组成为C₁₅H₉O₆Cr(COOCH₃)₂(H₂O)₂·2H₂O;木犀草素-Cr(Ⅲ)配合物对DPPH自由基的清除作用强于木犀草素本身。结论:木犀草素与Cr³⁺结合后,增强了木犀草素抗DPPH自由基的生物活性。

关键词 木犀草素;铬(Ⅲ)配合物;DPPH

Study on Synthesis and Activity of Scavenging DPPH Free Radical of Luteolin-Cr(Ⅲ) Complex

TENG Yang¹, HOU Li-ran², HOU Wei¹, CHU Jing¹, GAO Jin-bo¹(1.Key Laboratory of Biological Drugs, Education Department of Heilongjiang Province, Pharmacy College of Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China; 2.Basic Medical College of Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize the complex of Luteolin-Cr(Ⅲ) complex and determine its molecular structure. METHODS: Using absolute ethanol as solvent, the Luteolin-Cr(Ⅲ) complex was synthesized under the condition of pH=9.76 at 80℃. After determining the structure of Luteolin-Cr(Ⅲ) complex by complex IR, UV, TG-DTA combined with element analysis method, the ability of luteolin and Luteolin-Cr(Ⅲ) complex of scavenging DPPH free radical was investigated by HPLC and spectrophotometry. RESULTS: The composition of the complex was C₁₅H₉O₆Cr(COOCH₃)₂(H₂O)₂·2H₂O; the ability of scavenging DPPH free radical of Luteolin-Cr(Ⅲ) complex was stronger than that of luteolin itself. CONCLUSIONS: The activity of scavenging DPPH free radical of luteolin has been enhanced after combined with Cr³⁺.

KEY WORDS Luteolin; Cr(Ⅲ)-complex; DPPH

鼠体内的 $t_{1/2\alpha}$ 分别为16.7、21.5、13.2 min,表明其在体内分布迅速; $t_{1/2\beta}$ 分别为50.2、23.3、21.2 min,表明其在体内消除较快。马鞭草提取物高、中、低剂量组马鞭草苷在大鼠体内的 $t_{1/2\alpha}$ 分别为15.0、28.2、18.2 min, $t_{1/2\beta}$ 分别为63.2、28.2、30.8 min,与戟叶马鞭草苷具有相似的分布及消除特征。马鞭草提取物低剂量组戟叶马鞭草苷由中央室到周边室的速率常数与周边室到中央室的速率常数相近($K_{12}=0.070 \text{ min}^{-1}$, $K_{21}=0.068 \text{ min}^{-1}$),马鞭草苷的也非常相近($K_{12}=0.019 \text{ min}^{-1}$, $K_{21}=0.021 \text{ min}^{-1}$)。但是,在马鞭草提取物高剂量组,戟叶马鞭草苷由中央室到周边室的速率常数为周边室到中央室速率常数的2.4倍($K_{12}=0.107 \text{ min}^{-1}$, $K_{21}=0.045 \text{ min}^{-1}$),马鞭草苷的为2.8倍($K_{12}=0.116 \text{ min}^{-1}$, $K_{21}=0.042 \text{ min}^{-1}$),提示马鞭草提取物在高剂量时可能出现非线性动力学过程。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010

^Δ 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.D201211);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12511576);佳木斯大学科研项目(No.S22010-012)

* 讲师。研究方向:天然药物活性分析。E-mail:tengyang19820405@163.com

通信作者:教授。研究方向:天然药物活性分析。E-mail:gaojinbo2001@163.com

年版.北京:中国医药科技出版社,2010:49.

- [2] 张涛,阮金兰,吕子敏.马鞭草环醚萜苷类成分的研究[J].中草药,2000,31(10):721.
- [3] 桂承会,唐人九.马鞭草镇咳成分的研究[J].中药通报,1985,10(10):35.
- [4] 田菁,赵毅民.马鞭草化学成分的研究[J].中国中药杂志,2005,30(4):268.
- [5] 金伟军,张志东.马鞭草的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(3):693.
- [6] 聂继红,王萍.中药药理学研究进展[J].中国药房,2007,18(6):470.
- [7] 易成文,朱培霞.中药药物代谢动力学研究现状及问题分析[J].中国药物与临床,2009,9(8):733.
- [8] 曹露晔,谢黛,杜敏.天然植物中萜类药物的代谢动力学研究进展[J].云南中医中药杂志,2008,29(5):56.
- [9] 程雪龙.中药药物代谢动力学研究现状及问题分析[J].黑龙江医药,2011,40(5):712.
- [10] 段坤峰,袁志芳,张兰桐,等.马鞭草苷在不同血浆中蛋白结合率的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2009,40(8):606.

(收稿日期:2012-12-06 修回日期:2013-01-15)

木犀草素(Luteolin)是3',4',5,7-四羟基黄酮类化合物,主要存在于菊花、透骨草、络石藤、金银花等植物中^[1-2]。近年来研究表明,其具有抗炎^[3]、抗肿瘤^[4-6]活性,对心脏^[7]、呼吸系统具有一定保护作用^[8],对免疫系统有一定调节作用^[9]。众所周知,木犀草素的金属配合物可增强原配体的生物活性^[10-11];而金属Cr(III)是哺乳动物生命与健康所需的微量元素^[12],是葡萄糖耐受因子(GTF)的重要组成成分,缺乏Cr(III)可引发动脉粥样硬化^[13]等疾病。为此,本研究以木犀草素为原料,合成木犀草素-Cr(III)配合物^[14-15],并利用高效液相色谱(HPLC)法对木犀草素与木犀草素-Cr(III)配合物抗DPPH自由基的活性进行研究。

1 材料

1.1 仪器

UV7501型紫外-可见分光光度计(无锡分析仪器有限公司);VERTEX70型傅里叶变换红外光谱仪、ADVANCE III型400 MHz核磁共振仪(德国Bruker公司);1100型HPLC仪(美国Agilent公司);Vario El型元素分析仪(德国Elementar公司)。

1.2 试剂

木犀草素对照品(南京苏朗医药有限公司,纯度:98%);1,1-苯基-2-苦味苯肼(DPPH,美国Sigma公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 木犀草素-Cr(III)配合物的合成

在无水乙醇溶液中加入等摩尔的木犀草素和Cr(Ac)₃固体,在60℃下搅拌溶解至澄清时,用1 mol/L的NaOH溶液调pH值至9.76,再升高温度至80℃,磁力搅拌的同时以水浴回流反应4 h,产生的沉淀静置离心,用少量的乙醇与水分别洗涤数次,40℃真空干燥,得配合物,产率为78.76%。

2.2 木犀草素-Cr(III)配合物的结构表征

对所合成的木犀草素-Cr(III)配合物,通过紫外光谱、红外光谱、热重差热、元素分析与核磁共振氢谱(¹H-NMR)确定其组成为C₁₅H₉O₆Cr(COOCH₃)₂(H₂O)₂·2H₂O。木犀草素-Cr(III)配合物的结构见图1。

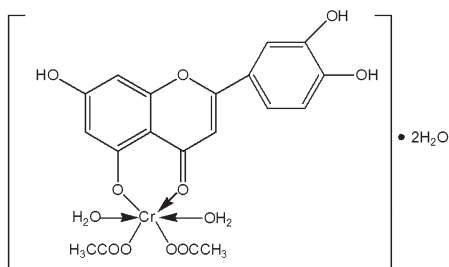


图1 木犀草素-Cr(III)配合物的结构

Fig 1 Possible structure of Luteolin-Cr(III) complex

2.2.1 紫外光谱分析 配体木犀草素与其Cr配合物在紫外光谱图中均出现了2个吸收带(带I、带II),根据有关文献报道^[14-15],当配合物形成后这两个吸收带均发生了不同程度的红移。A环5-OH氧取代可同时引起带I和带II发生红移,这说明木犀草素分子中5-OH上的氧与Cr(III)发生了络合反应。木犀草素与其Cr配合物的紫外吸收峰及归属见表1。

2.2.2 红外光谱分析 采用KBr压片法测得木犀草素与其Cr配合物的红外特征吸收峰基本相似。木犀草素在1 656 cm⁻¹

表1 木犀草素与其Cr配合物的紫外吸收峰及归属(nm)

Tab 1 UV absorption frequency and adscription of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex(nm)

化合物	带I	带II
木犀草素	349	254
木犀草素-Cr(III)配合物	424	273

处羰基峰与金属离子发生配位效应后,移至1 629 cm⁻¹处,这表明羰基氧参与了配位,使得羰基成键电子云更加偏离键的几何中心而移向氧原子,导致羰基键电子云密度变低,从而降低了羰基的双键性;苯环骨架振动体系(C=C)由木犀草素的1 610 cm⁻¹处降至形成配合物后的1 516 cm⁻¹处,这是由于木犀草素-Cr(III)配合物的形成使得苯环的共扼效应增强所致;木犀草素与其Cr配合物中C—OH键和C—O—C键吸收峰的位置则变化不大。木犀草素与其Cr配合物的主要红外吸收频率及归属见表2。

表2 木犀草素与其Cr配合物的主要红外吸收频率及归属(cm⁻¹)

Tab 2 IR absorption frequency and adscription of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex(cm⁻¹)

化合物	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{OH})$	(C—O—C)	(O—H)
木犀草素	1656	1610	1367	1266	3421
木犀草素-Cr(III)配合物	1629	1516	1353	1252	3431

2.2.3 热重差热分析 对木犀草素-Cr(III)配合物进行热重差热分析,其测定结果表明,在低于100℃时有一失水吸热峰,失重率约6.98%,与2个水分子的量相对应(理论失重为6.83%);在120~190℃之间,失重率约7.05%,相当于2个水分子的量(理论失重为6.83%),这说明该配合物含2个结晶水、2个配位水。木犀草素-Cr(III)配合物的热重差热分析结果见图2。

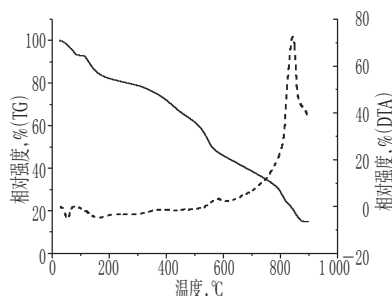


图2 木犀草素-Cr(III)配合物的热重差热分析结果

Fig 2 TG-DTA analysis of Luteolin-Cr(III) complex

2.2.4 元素分析 原子发射光谱(ICP)法测定木犀草素-Cr(III)配合物中C、H、Cr的所得值/理论值(%)分别为:C 44.08/43.27、H 4.31/4.40、Cr 9.98/9.86,可见所测得的实际值与理论值基本相符,故可确定分子式为:C₁₅H₉O₆Cr(COOCH₃)₂(H₂O)₂·2H₂O。

2.2.5 ¹H-NMR分析 以d₆-DMSO作为溶剂,测定了木犀草素-Cr(III)配合物的¹H-NMR谱。氢的各归属峰为:δ10.72(1H, OH-7), δ10.51(1H, OH-4'), δ9.36(1H, OH-3'), δ7.95(1H, H-2'), δ7.92(1H, H-6'), δ6.78(1H, H-5'), δ6.52(1H, H-8), δ6.31(1H, H-6), δ6.15(1H, H-3), δ3.0~3.6(宽峰H₂O);5-OH的质子峰在配合物中消失,由此表明在配位时5-OH失去质子并通过氧原子与金属离子配位。

2.3 分光光度法评价木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由

基的清除能力

2.3.1 溶液的制备 (1)样品溶液的制备:准确称取4.0 mg木犀草素-Cr(III)配合物,用碱水溶解,调pH值至7,用蒸馏水定容至100 ml量瓶中,得质量浓度为0.04 g/L的样品溶液,再分别将其稀释成0.04、0.03、0.02、0.008、0.004、0.002 g/L系列质量浓度的样品溶液。(2)对照品溶液的制备:准确称取4.0 mg木犀草素对照品,用甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中,得质量浓度为0.04 g/L的木犀草素溶液,再将其稀释成0.04、0.03、0.02、0.008、0.004、0.002 g/L系列质量浓度的对照品溶液。(3)DPPH溶液的制备:精密称取DPPH 0.157 7 g,用甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中,从中精密量取5.00 ml,用甲醇定容至100 ml量瓶中,得浓度为0.2 mmol/L的DPPH溶液。

2.3.2 木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力考察 准确吸取浓度为0.2 mmol/L的DPPH溶液或甲醇(空白溶剂)2 ml,置于试管中,再分别吸取不同质量浓度的对照品、样品溶液2 ml,迅速混匀,于37 ℃避光反应30 min,在517 nm波长处测定各溶液的吸光度(A),按下列公式计算清除率。

$$\text{清除率 } P(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0$$

式中: A_i 为加样溶液与DPPH溶液的吸光度; A_j 为样品溶液与空白溶剂的吸光度; A_0 为DPPH溶液与空白溶剂的吸光度。

分光光度法测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力见表3和图3。

表3 分光光度法测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力(%)

Tab 3 The ability of scavenging DPPH free radical of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex by spectrophotometry (%)

化合物	质量浓度, g/L					
	0.002	0.004	0.008	0.02	0.03	0.04
木犀草素	17.39	43.56	61.90	63.11	63.41	63.36
木犀草素-Cr(III)配合物	26.39	44.01	69.03	81.74	81.20	81.18

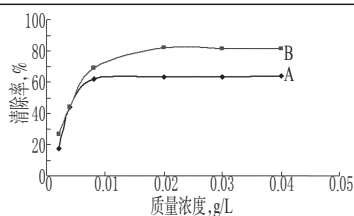


图3 分光光度法测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力

A. 木犀草素; B. 木犀草素-Cr(III)配合物

Fig 3 The abilities of scavenging DPPH free radical of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex by spectrophotometry

A. luteolin; B. Luteolin-Cr(III) complex

2.4 HPLC法评价木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力

2.4.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(80:20, V/V); 柱温: 25 ℃; 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 517 nm。在该色谱条件下, DPPH自由基的出峰时间为9.87 min, 而木犀草素与其Cr配合物均无色谱峰出现。色谱见图4。

2.4.2 标准曲线的制备 按“2.3.1(3)”项下方法制得浓度为2、4、8、16、32、64 mmol/L的系列DPPH溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 每个浓度平行进样3次。以DPPH浓度(x)

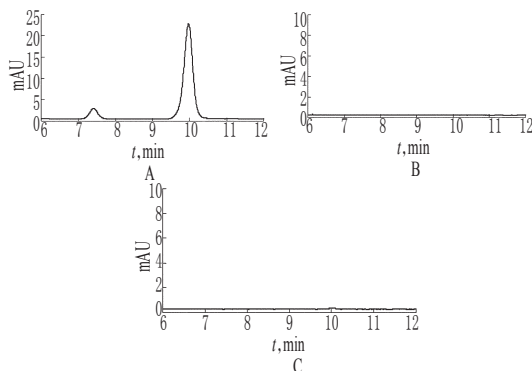


图4 高效液相色谱图

A. DPPH溶液; B. 木犀草素溶液; C. 木犀草素-Cr(III)配合物

Fig 4 HPLC chromatograms

A. DPPH solution; B. luteolin solution; C. Luteolin-Cr(III) complex 为横坐标, 平均峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 0.0587x + 0.0540$ ($r = 0.9996, n = 6$)。结果表明, DPPH浓度在2~40 mmol/L范围内与其平均峰面积积分值呈良好线性关系。DPPH的标准曲线见图5。

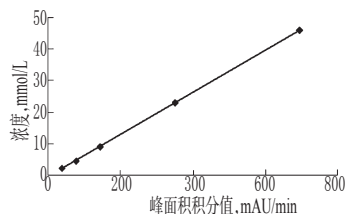


图5 DPPH的标准曲线

Fig 5 Standard curve of DPPH

2.4.3 重复性和稳定性试验 取“2.4.2”项下系列浓度的DPPH溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 重复进样5次。结果, $RSD = 0.92\%$ ($n = 5$), 表明本方法重复性良好。取“2.4.2”项下系列浓度的DPPH溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 每隔2 h进样1次, 连续5次。结果, $RSD = 0.87\%$ ($n = 5$), 表明DPPH在试验条件下8 h内稳定, 无明显变化。

2.4.4 木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除率 准确吸取浓度为0.2 mmol/L的DPPH溶液2 ml, 置于试管中, 再取不同质量浓度的样品溶液2 ml, 与之迅速混匀, 于37 ℃下避光反应30 min, 立刻用0.45 μm有机滤膜滤过, 取20 μl进样, 测定DPPH峰面积; 对照不加样品溶液。按下列公式计算清除率:

$$P(\%) = [A_0 - A_1] / A_0$$

式中, A_0 为体系中DPPH自由基的原始浓度; A_1 为加入样品溶液后的DPPH自由基浓度。

测得木犀草素与其Cr配合物的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为0.014、0.008 g/L。HPLC法测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力见表4、图6。

2.5 分光光度法与HPLC法测定清除率的结果比较

比较两种方法所测的结果发现, 分光光度法检测的结果总是比HPLC法检测的结果偏高, 其原因之一是分光光度法在一定的波长下检测, 检测的是吸光物质的总吸收, 而HPLC法具有分离及分析两种功能, 能较好地避免体系中其他吸光物质的干扰, 准确地测定体系中真实的DPPH自由基的浓度。因此, HPLC法能够准确评价物质对DPPH自由基的清除作用。分光光度法和HPLC法测定清除率的结果比较见表5。

表4 HPLC测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力(%)

Tab 4 The abilities of scavenging DPPH free radical of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex by HPLC(%)

化合物	质量浓度,g/L					
	0.002	0.004	0.008	0.02	0.03	0.04
木犀草素	7.85	31.29	56.39	61.89	62.89	62.51
木犀草素-Cr(III)配合物	15.81	43.45	63.36	69.45	73.02	73.36

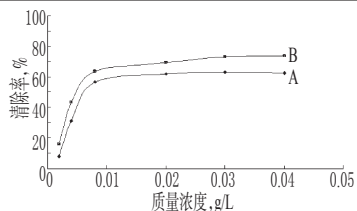


图6 HPLC法测定木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基的清除能力

A.木犀草素;B.木犀草素-Cr(III)配合物

Fig 6 The abilities of scavenging DPPH free radical of luteolin and Luteolin-Cr(III) complex by HPLC

A. luteolin; B. Luteolin-Cr(III) complex

表5 分光光度法和HPLC法测定清除率的结果比较(%)

Tab 5 Comparison of scavenging rate by spectrophotometry and HPLC(%)

化合物	方法	质量浓度,g/L					
		0.002	0.004	0.008	0.02	0.03	0.04
木犀草素	分光光度法	17.39	43.56	61.90	63.11	63.41	63.36
	HPLC法	7.85	31.29	56.39	61.89	62.89	62.51
木犀草素-Cr(III)配合物	分光光度法	26.39	44.01	69.03	87.74	81.20	81.18
	HPLC法	15.81	43.45	63.36	69.45	73.02	73.36

3 讨论

木犀草素与其Cr配合物对DPPH自由基均有清除作用,且随着质量浓度的增大清除作用也随之增加,当质量浓度达到一定程度时,清除率也趋于平衡状态。木犀草素、木犀草素-Cr(III)配合物对DPPH自由基的最大清除率分别为62.51%、73.36%,IC₅₀值分别为0.014、0.008 g/L,说明木犀草素-Cr(III)配合物对DPPH自由基的清除作用要强于配体本身。由此可见,木犀草素-Cr(III)配合物与DPPH自由基单电子结合的能力较强,是一种较强的清除DPPH自由基的抗氧化剂,具有较好的研究及开发前景。

木犀草素与木犀草素-Cr(III)配合物均以供氢的方式来终止自由基链式反应,故木犀草素与木犀草素-Cr(III)配合物在与DPPH自由基反应后所形成的苯氧自由基的稳定性决定了其抗氧化活性的大小。木犀草素与Cr³⁺配合后,其分子的电子云分布发生,更有利于B环上羟基的供氢,从而使得木犀草素-Cr(III)配合物与DPPH自由基作用后,形成了更加稳定的自由基中间体,因此木犀草素-Cr(III)配合物抗DPPH自由基

的活性要比配体木犀草素本身高。

参考文献

- [1] 祝德秋,刘皋林.木犀草素的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(19):1807.
- [2] 韩炜,邢燕,康廷国.木犀草素生物活性研究进展[J].云南中医中药杂志,2010,31(4):60.
- [3] 祝德秋,刘康,宋军娜,等.木犀草素通过抑制血管内膜炎症反应改善溶血性磷脂酰胆碱所致大鼠主动脉内膜依赖性血管舒张功能性紊乱[J].中国新药与临床杂志,2011,30(2):141.
- [4] 肖大凯,覃燕梅,莫丽儿,等.木犀草素对卵巢癌细胞株转移能力的影响[J].中国病理生理杂志,2006,22(6):1199.
- [5] Horinaka M, Yoshida T, Shiraiishi T, et al. The combination of TRAIL and luteolin enhances apoptosis in human cervical cancer HeLa cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3):833.
- [6] 李星霞,郭澄.木犀草素的药理活性研究[J].中国药房,2007,18(18):1421.
- [7] 魏敏,王君,宋旭艳,等.卷烟烟气中木犀草素和黄芩苷混合物对呼吸系统作用的研究[J].中国现代应用药学,2011,28(3):197.
- [8] Zhao J, Wang LF. Synthesis, characterization, antioxidant and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complex [J]. *J Inorg Biochem*, 2001, 83(1):41.
- [9] 龚过清,钱之玉,周曙.木犀草素对实验性肺纤维化大鼠组织中TGF-β₁ mRNA表达的影响[J].中国药理学通报,2005,21(12):1466.
- [10] 马国刚,王建中,黄建东.槐米芦丁的提取、纯化及铬(Cr³⁺)配合物光谱表征[J].北京林业大学学报,2011,33(1):144.
- [11] Masood N, Baloch GH, Ghori RA, et al. Serum zinc and magnesium in type-2 diabetic patients[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2009, 19(8):483.
- [12] 杨光,刘学君.糖尿病与微量元素[J].中国实用医药,2009,4(12):113.
- [13] Brender JR, Hartman K, Nanga RP, et al. Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(26):8973.
- [14] 郭进宝.天然药物配合物的研究进展[J].中医研究,2005,18(4):56.
- [15] 邓毅,赵爱华,尹龙萍,等.黄芩苷-铬(III)配合物的合成与表征[J].中国天然药物,2007,5(1):38.

(收稿日期:2012-12-10 修回日期:2013-02-04)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅