

3 种大黄素金属配合物的抗氧化活性研究

向晖, 潘晓丽, 谢运飞, 章从恩, 董小萍*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的: 对比配体大黄素和其 3 种金属配合物的体外抗氧化活性。方法: 以天然大黄素和相应的金属盐为原料, 在无水乙醇中合成了大黄素-锌、大黄素-锰、大黄素-铁(Ⅲ)等 3 种配合物, 并对其结构进行表征。采用紫外可见分光光度法, 分别考察了配体和配合物对二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、超氧自由基(O₂⁻·)、羟基自由基(·OH)等 3 种自由基的清除率。结果: 配体及配合物对 3 种自由基均有一定清除作用。其中大黄素-铁(Ⅲ)清除羟基自由基活性最强, 其半数有效浓度(EC₅₀)值达 19.96 mg·L⁻¹ 小于大黄素(EC₅₀ 147.87 mg·L⁻¹)、大黄素-锌(EC₅₀ 30.76 mg·L⁻¹)、大黄素-锰(EC₅₀ 100.04 mg·L⁻¹); 大黄素-铁(Ⅲ)清除超氧自由基活性也为最强, 其 EC₅₀ 达 60.832 mg·L⁻¹, 小于大黄素(EC₅₀ 853.152 mg·L⁻¹)、大黄素-锌(EC₅₀ 436.296 mg·L⁻¹)、大黄素锰(EC₅₀ 161.949 mg·L⁻¹); 实验范围内(1 × 10⁻⁴ mmol·L⁻¹ ≤ C ≤ 4 × 10⁻³ mmol·L⁻¹) 配合物和配体对 DPPH 自由基清除活性总体不强, 均小于 25%, 但配合物活性稍高于配体。结论: 大黄素与 Fe³⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ 离子形成配合物后抗氧化活性增强, 其中以大黄素-铁(Ⅲ)配合物抗氧化活性最高。

[关键词] 大黄素; 金属配合物; 抗氧化活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0236-04

[doi] 10.11653/syfyj2013140236

Concentration for 50% of Maximum Effect Study of Antioxidant Activity of 3 Emodin Metal Complex

XIANG Hui, PAN Xiao-li, XIE Yun-fei, ZHANG Cong-en, DONG Xiao-ping*

[收稿日期] 20121210(039)

[基金项目] 成都中医药大学校基金项目(ZRMS201236)

[第一作者] 向晖, 在读研究生, E-mail: xianghui12688@126.com

[通讯作者] * 董小萍, 教授, 博士生导师, 从事中药及其复方物质基础与质量标准研究, E-mail: dongxiaoping11@126.com

[2] Gerashchenko D, Kohls M D, Greco M, et al. Hypocretin-2 saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat[J]. J Neurosci, 2001, 21(18): 7273.

[3] 张全鹏, 王慧, 陈旦, 等. 水合氯醛、乌拉坦及其 1:1 混合液在 SD 大鼠麻醉中的效果比较及应用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1208.

[4] 王金韬, 罗爱林, 万丽. 周-特氏联合指数法研究丙泊酚和咪唑安定致小鼠翻正反射消失的相互作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2005, 21(7): 484.

[5] Berridge C W, Espana R A, Vittoz N M. Hypocretin/Orexin in arousal and stress[J]. Brain Res, 2010, 1314: 91.

[6] Nishino S, Ripley B, Overeem S, et al. Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy [J]. Ann Neurol, 2001, 50(3): 381.

[7] 朱蕾, 张茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 219.

[8] 孔梅, 邢长永, 舒晓春. 逍遥散干预抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马 5-HT_{1A} 受体、5-HT_{2A} 受体的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 157.

[9] Samson W K, Taylor M M, Follwell M, et al. Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates[J]. Regul Pept, 2002, 104(1/3): 97.

[10] Mieda M, Sakurai T. Orexin (hypocretin) receptor agonists and antagonists for treatment of sleep disorders: rationale for development and current status[J]. CNS Drugs, 2013, 27(2): 83.

[责任编辑 聂淑琴]

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the antioxidant activity of emodin and 3 emodin metal complex. **Method:** Compound the 3 emodin metal complex, then use the UV spectrum, study the clearance rate of emodin and 3 emodin metal complex to DPPH free radical, O_2^- ·free radicals and ·OH free radical. **Result:** For ·OH free radical, the Concentration for 50% of Maximum Effect (EC_{50}) of emodin-ferrum reaches $19.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, this numerical value is the smallest one of all, So emodin-Ferrum the best one. For the same reason, the antioxidant activity for O_2^- ·free radicals of emodin-Ferrum is the best. **Conclusion:** The antioxidant activity enhance after forming metal complex, and emodin-Ferrum is the best one.

[Key words] emodin; metal complex; antioxidant activity

据研究,自由基对机体的氧化是许多疾病的根源,也是人体衰老的重要原因。因此寻找新型强效抗氧化剂具有十分重要的意义。大黄素是中药决明子,大黄,虎杖,蒺藜中的一种有效成分,它来源广泛,易于提纯^[1]。大黄素是一种含有 α -酚羟基的蒽醌化合物,其中1,8位羟基和9位羰基适于同各种金属离子配位,故可以和镁,铜,铁,锰,锌等金属离子形成大黄素-金属配合物。而本文所选择的金属元素均作为人体所必需的微量元素,在机体生长发育、生命生理健康的维持方面发挥着重要作用^[2]。其中铁是人必需,体内含量最高的微量元素^[3],而微量元素锰可参与多种酶的合成与激活,调节糖代谢,提高机体免疫力^[4],而锌元素锌可以作为多种酶功能成分或激活剂,促进核酸生长发育及蛋白质生物的合成^[5]。许多金属配合物,例如铂类抗癌药物,有机锗化合物、钡配合物、钆配合物、铜配位化合物、等都是很好的抗癌药物^[6]。研究显示,大黄素具有很好的抗氧化作用^[7]。据文献报道,一些中药中的有效成分,如木犀草素,在与金属锌形成配合物后,其抗DPPH自由基的活性明显增强并高于配体^[8]。本文采用用二苯代苦味肼基自由基(DPPH)法,氯化硝基四氮唑蓝法(NBT法), Fe^{2+} - H^2O^{2-} 亚甲蓝法对其抗氧化活性进行了研究,比较了配体大黄素和它的3种金属配合物之间抗氧化活性,从而对其抗氧化活性进行了排序,筛选出了其中抗氧化活性最高的配合物。

1 材料

1.1 仪器 UV-1700型紫外-可见分光光度仪(日本,岛津株式会社分析仪器部);BSA124S型电子天平(德国赛多利斯公司);PHB-8型pH计(上海隆拓仪器设备有限公司)。

1.2 试剂 大黄素(成都康邦生物生物科技有限公司,纯度>98%,批号20121001);大黄素金属配

合物自制并表征;二苯代苦味肼基自由基(DPPH·, Sigma公司,批号D9132),羟甲基氨基甲烷(Tris,天津市博迪化工有限公司,批号20121011),*N*-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS, Sigma公司,批号P9625);还原性辅酶I二钠盐($NADHNa_2$, Sigma公司,批号N8129);氯化硝基四氮唑蓝(NBT, Sigma公司,批号N6876);其余试剂均为国产分析纯,实验用水为离子交换蒸馏水。

2 方法

2.1 大黄素锰,铁,锌配合物的合成 称取0.5 mmol大黄素(135 mg),以30 mL无水乙醇溶解,加入0.25 mmol $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$ 的10 mL无水乙醇溶液,逐滴加入氨水的乙醇溶液(1:1),调节配体溶液的pH 8~9,溶液有橘红色沉淀生成,以38℃搅拌反应12 h,将溶液静置后离心取沉淀,依次用无水乙醇,乙醚分别将沉淀洗涤数次后,在40℃下真空干燥72 h,得粉末状固体产物。以 $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ 或 $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ 盐替代 $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$,以相同方法合成大黄素-铁,大黄素-锰配合物。采用紫外光谱法、红外光谱法、元素分析法,配位滴定,碘量法等对其结构进行表征^[9],证实有配合物生成。

2.2 配合物的抗氧化活性实验

2.2.1 配合物对DPPH·自由基的清除作用 将3种金属配合物及配体均配制成 $10^{-1} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液,全部以甲醇依次稀释为20, 15, 10, 5, 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等5个浓度,分别吸取上述稀释后的样品溶液1, 3 mL $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH无水甲醇溶液混匀,以容量瓶定容至5 mL,暗室条件下反应10 min后,在518 nm^[10]处测定吸光度($A_{\text{样}}$),以1 mL纯甲醇为空白代替试样测定吸光度(A_0),每个样品平行测定3次,取其平均值。

2.2.2 配合物对 O_2^- ·自由基的清除作用 将3种金

属配合物及配体均配制成 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液,全部以蒸馏水依次稀释为 $200, 100, 50, 25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 个质量浓度。以 Tris-HCl ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8) 作为反应体系,其中含有 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMS, $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADHNa₂, $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT, 其中 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基由 NADH/PMS 体系产生。取 4 mL 含有自由基的 Tris-HCl 溶液与 1 mL 样品溶液混匀,室温反应 5 min 后,在 386 nm 波长处测定吸光度 ($A_{\text{样}}$), 1.0 mL 蒸馏水代替试样测定空白吸光度 (A_0), 每个样品平行测定 3 次,取其平均值。

2.2.3 配合物对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用 实验采用 Fe^{2+} - H_2O_2 -亚甲蓝体系^[11], 将 3 种金属配合物及配体分别配制成 $200, 100, 50, 25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 个质量浓度的水溶液。取 1 mL Tris-HCl 缓冲溶液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8), 1.5 mL 亚甲蓝 ($0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 mL FeSO_4 溶液 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 mL

的 0.5% H_2O_2 溶液,与 1 mL 样品混匀,以蒸馏水稀释至 5 mL, $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热反应 60 min, 1.0 mL 蒸馏水代替试样在 664 nm 处测定空白吸光度 (A_0), 每个样品平行测定 3 次,取其平均值。以上自由基清除率计算公式为:

$$\text{清除率} = [(A_0 - A_{\text{样}}) / A_0] \times 100\%$$

3 结果

3.1 配合物对 DPPH 自由基的清除 配体和配合物对 DPPH 自由基的清除结果见表 1 及图 1, 由图 1 可知, 大黄素, 大黄素-铁(III), 大黄素-锌, 大黄素-锰配合物对 DPPH 自由基清除作用不强。可能因 DPPH 为醇溶性, 而大黄素配合物在醇溶液中不易形成稳定的自由基中间体, 从而降低清除率。由图 1 可知, 实验范围内配合物清除 DPPH 自由基能力稍强于配体, 但总体较低, 最高不超过 25%。

表 1 大黄素金属配合物和配体对 DPPH 自由基清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	DPPH 自由基清除率			
	大黄素	大黄素-铁(III)	大黄素-锌	大黄素-锰
0.1	3.6 ± 0.09	8.4 ± 0.07	7.3 ± 0.04	6.6 ± 0.09
1	5.2 ± 0.04	11.5 ± 0.02	18.3 ± 0.03	17.3 ± 0.06
2	7.8 ± 0.08	18.8 ± 0.01	12.3 ± 0.07	9.7 ± 0.03
3	3.5 ± 0.03	23.0 ± 0.08	8.6 ± 0.08	7.8 ± 0.02
4	3.6 ± 0.05	6.8 ± 0.04	17.3 ± 0.02	3.9 ± 0.04

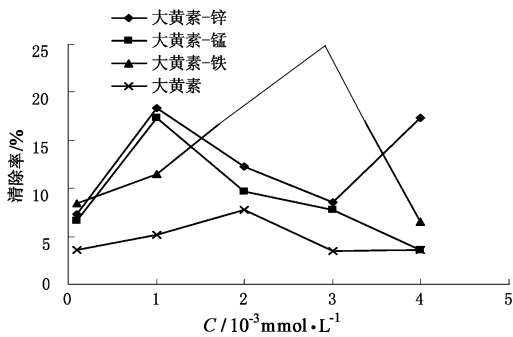


图 1 配合物对 DPPH 自由基的清除作用

3.2 配合物对 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基的清除作用 配体和配合物对 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基的清除作用结果见表 2, 其 EC_{50} 见表 4。由表 2 可知配体和配合物均具有抗 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基的能力。由其 EC_{50} 比较得出, 配合物的活性高于配体, 以大黄素-铁(III)最高, 配体和金属离子呈现协同抗氧化作用。由实验范围内配合物清除 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基能力大小顺序为:

大黄素-铁(III) ($\text{EC}_{50} 60.832 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 大黄素-锰 ($\text{EC}_{50} 161.949 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 大黄素-锌 ($\text{EC}_{50} 436.296 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 大黄素 ($\text{EC}_{50} 853.152 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

表 2 大黄素金属配合物和配体对 $\text{O}_2^- \cdot$ 自由基清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{O}_2^- \cdot$ 自由基清除率			
	大黄素	大黄素-铁(III)	大黄素-锌	大黄素-锰
2.5	12.6 ± 0.07	33.3 ± 0.03	22.9 ± 0.01	10.0 ± 0.05
5	18.8 ± 0.01	36.8 ± 0.04	29.6 ± 0.02	12.7 ± 0.02
10	20.9 ± 0.04	43.5 ± 0.08	32.1 ± 0.04	22 ± 0.04
20	24.2 ± 0.02	41.8 ± 0.06	34.0 ± 0.06	26.9 ± 0.09
40	28.0 ± 0.03	48.3 ± 0.04	36.7 ± 0.02	32 ± 0.04

表3 大黄素金属配合物和配体对·OH自由基清除作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

质量浓度 /mg·L ⁻¹	·OH自由基清除率			
	大黄素	大黄素-铁(Ⅲ)	大黄素-锌	大黄素-锰
2.5	7.4 ± 0.02	16 ± 0.05	15.8 ± 0.04	16.8 ± 0.06
5	25.8 ± 0.04	33.3 ± 0.02	29.5 ± 0.03	28.2 ± 0.05
10	30.0 ± 0.09	38 ± 0.03	25.7 ± 0.09	36.6 ± 0.01
20	32.1 ± 0.06	56.0 ± 0.08	49.0 ± 0.04	35.7 ± 0.03
40	30.8 ± 0.02	52.8 ± 0.02	52.2 ± 0.02	39.0 ± 0.06

表4 大黄素金属配合物和配体清除2种自由基的EC₅₀

样品	EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	
	·OH自由基	O ₂ ⁻ ·自由基
大黄素	147.87	853.152
大黄素-锰	100.04	161.949
大黄素-铁(Ⅲ)	19.96	60.832
大黄素-锌	30.76	436.296

3.3 配合物对·OH自由基的清除作用 3种配合物和配体清除·OH自由基的结果见表3,其EC₅₀见表4。由表3可知,配体和配合物均具有抗·OH自由基活性。由其EC₅₀比较得出,配合物的活性高于配体,表明配体和金属离子具有协同抗·OH自由基的作用。由配合物及配体的EC₅₀(表4)可知,实验范围内配合物清除·OH自由基能力大小顺序为:大黄素-铁(Ⅲ)(EC₅₀ 19.96 mg·L⁻¹) > 大黄素-锌(EC₅₀ 30.76 mg·L⁻¹) > 大黄素-锰(EC₅₀ 100.04 mg·L⁻¹) > 大黄素(EC₅₀ 147.87 mg·L⁻¹)。

4 结论

运用紫外可见-分光光度法,确定了大黄素与三氯化铁,醋酸锌,醋酸锰所形成的金属配合物均具有抗氧化作用。在实验范围内,配合物抗氧化活性高于配体,其中以大黄素铁配合物的抗氧化活性最高,它有作为新型的抗氧化剂的潜质,运用于食品,药品及化妆品中。

[参考文献]

- [1] 刘志刚,方怀刚. 大黄素-铜(Ⅱ)配合物与核酸的相互作用[J]. 光谱实验室, 2009, 26(2): 306.
- [2] 张纯清,关华,张莽. 成人骨松质金属微量元素的检测与比较分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(1): 87.
- [3] 孙长峰,郭娜. 微量元素铁的生理功能及对人体健康的影响[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 222.
- [4] 吴现芳 赵成爱 孙辉. 微量元素锰在新疆6种红景天中的含量及其与人体健康[J]. 世界元素医学, 2011, 18(3): 21.
- [5] 桂晓巍,张晓槟. 微量元素锌、铜、硒缺乏与临床疾病[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(5): 601.
- [6] 徐新华,张国刚,王林. 金属类抗癌药物的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2012, 34(5): 511.
- [7] 朱小康. 大黄素衍生物的合成与生物活性研究[D]. 重庆:西南大学, 2011.
- [8] 侯魏,楚婧,侯丽然,等. 木犀草素与锌配合物的合成及其DPPH自由基清除活性的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(4): 16.
- [9] 蒋柳云. 槲皮素金属配合物的合成、生物活性及其量子化学研究[D]. 成都:四川大学, 2005.
- [10] 文镜,贺素华,杨育颖,等. 保健食品清除自由基作用的体外测定方法和原理[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 190.
- [11] 李方,郑怀礼. 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[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2294.

[责任编辑 聂淑琴]