

## 黄酮化合物与 Fe( ) 络合反应的动力学研究

李化<sup>1</sup>, 于艳秋<sup>2</sup>, 杨滨<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的: 以光谱动力学法建立评价黄酮化合物与 Fe( ) 络合反应能力的方法。方法: 采用紫外-可见分光光度法研究了 20 时 9 种黄酮化合物在乙醇溶液中与 Fe( ) 发生络合反应的光谱变化。结果: 除儿茶素和白杨素在该条件下不能与 Fe( ) 络合反应, 其他 7 种黄酮化合物均能络合 Fe( ), 其形成的络合物的光谱吸收带较游离黄酮化合物发生了红移, 且其络合反应符合零级反应的特征, 速率常数大小依次为: 杨梅素 > 槲皮素 > 黄芩素 > 山奈酚 > 黄芩苷 > 芦丁 > 木犀草素。结论: 黄酮化合物的 B 环上具有邻三酚羟基(3, 4, 5 -OH) 与 Fe( ) 络合能力较强, 邻二酚羟基(3, 4 -OH) 次之, 单个酚羟基(4 -OH) 较弱。黄酮苷元成苷后, 由于糖基体积较大, 产生空间位阻效应而导致黄酮苷络合能力下降。该方法简单易操作, 可用于评价黄酮化合物络合 Fe( ) 反应的能力。

[关键词] 关键词: 黄酮; 亚铁离子; 紫外可见光谱; 络合反应; 动力学

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0099-04

## Study on Reaction Kinetics between Flavonoids and Fe( )

LI Hua<sup>1</sup>, YU Yan-qiu<sup>2</sup>, YANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Dongfang College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish a method of evaluating reaction abilities of flavonoids with Fe( ) with 9 flavonoids have been investigated in ethanol solution at 20 by UV-Visible spectroscopy. **Result:** Based on the changes of the UV-Vis spectra, we could determine that 7 flavonoids ( quercetin, myricetin, rutin, kaempferol, baicalin, baicalein and luteolin) occurred complex reaction, due to the bathochromic shift of the wavelength band. On the other hand, no bathochromic shift as indication for complexation of catechin and chrysin could be observed under the conditions we had chosen. The kinetics of complex formation were investigated with the ligand in zero-order by the presence of Fe( ). The reaction rate constants in turn were as follows: myricetin > quercetin > baicalein > kaempferol > baicalin > rutin > luteolin. **Conclusion:** The strongest chelating power is the pyrogallol hydroxyl in ring B, and the pyrocatechol hydroxyl ranks second, a single phenolic hydroxyl relatively weak. When flavonoid aglycones transform into glycosides, their complex capacity will decrease significantly. The system investigated can be considered as a simplified method to evaluate the complex ability between flavonoids and Fe( ).

**[ Key words ]** flavonoids; Fe( ); UV-Vis spectroscopy; complexation; kinetics

不良饮食习惯或疾病状态会导致铁在人体内的 超载, 过量的铁离子是体内许多自由基产生过程的

[收稿日期] 20100802(012)

[基金项目] 科技部国际合作项目(2006DFB31720); 中国中医科学院自主选题研究项目(Z55)

[第一作者] 李化, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药与中药复方的质量控制, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: lihua621@ hotmail. com

[通讯作者] \* 杨滨, 博士, 研究员, 研究方向: 中药与中药复方的质量控制, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: ybinmm@ hotmail. com

催化剂,引发脂质过氧化<sup>[1]</sup>。现代研究已表明脂质过氧化反应与心脑血管疾病、衰老和癌症等疾病密切相关。因此,天然抗氧化剂的作用受到了人们的关注。黄酮类化合物是广泛存在于中草药、水果和蔬菜中的多酚类成分,大多数黄酮化合物具有很强的抗氧化活性,除直接清除自由基外,还可以通过结合过渡金属离子如 Fe( ),抑制其诱导的脂质过氧化链式反应<sup>[2]</sup>,减少因脂质过氧化反应产物带来的有害影响。鉴于此,本文选择不同亚型的黄酮化合物作为研究对象,采用紫外-可见分光光度法研究黄酮化合物与 Fe( )在络合反应过程中的动力学变化,以期阐述不同亚型的黄酮化合物的结构特征与其络合 Fe( )能力之间的关系。

## 1 仪器与试剂

UV-Vis 分光光度计(北京普析通用有限责任公司, T<sub>6</sub> 新世纪); Professional Meter PP-15 型电子 pH 测定仪( Sartorius, 德国); BT 125D 型 1/10 万天平( Sartorius, 德国); KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

二氯化铁( FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)和白杨素购自 Sigma 公司,山奈酚、芦丁和槲皮素购自和光纯药工业株式会社,儿茶素、木犀草素、黄芩苷和黄芩素购自中国药品生物制品检定所,杨梅素购自 Fluka 公司。以上黄酮化合物均具有较高的纯度( 98%)。不同亚型黄酮化合物的取代情况见表 1。水为 Millipore 纯化水( Millipore, 法国),其他试剂均为分析纯。

表 1 不同亚型黄酮化合物的取代基位置

不同亚型	化合物	取代基位置
黄酮	黄芩素	5, 6, 7-OH
	黄芩苷	7-glu, 5, 6-OH
	木犀草素	5, 7, 3, 4 -OH
	白杨素	5, 7-OH
黄酮醇	杨梅素	3, 5, 7, 3, 4, 5 -OH
	槲皮素	3, 5, 7, 3, 4 -OH
	山奈酚	3, 5, 7, 4 -OH
	芦丁	3-rut, 5, 7, 3, 4 -OH
黄烷醇	儿茶素	3, 5, 7, 3, 4 -OH

## 2 方法与结果

**2.1 黄酮化合物溶液制备** 1 mmol·L<sup>-1</sup>黄酮化合物溶液的配制:分别取上述黄酮化合物(槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷、木犀草素、儿茶素和白杨素)适量加乙醇溶解,即得。1 mmol·L<sup>-1</sup>二

氯化铁溶液的配制:取二氯化铁适量加乙醇溶解,即得。临用前新鲜配制。

## 2.2 黄酮化合物和二氯化铁络合反应的光谱动力学研究

**2.2.1 黄酮化合物和二氯化铁的光谱研究** 分别精密移取槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷、木犀草素、儿茶素、白杨素溶液 1 mL 和二氯化铁溶液 2 mL,于 10 mL 的具塞刻度试管中,以乙醇定容至刻度,摇匀,置石英比色皿中进行测定。以相应溶剂为空白,分别在 240 ~600 nm 进行扫描,记录光谱图。上述黄酮化合物的最大吸收波长见表 2。二氯化铁在 240 ~600 nm 没有吸收。

表 2 黄酮化合物、络合物的最大吸收波长 nm

化合物	黄酮		络合物	
	带	带	带	带
槲皮素	379	256	426( +47)	266( +10)
芦丁	362	258	399( +37)	271( +13)
杨梅素	380	255	444( +64)	270( +15)
山奈酚	370	267	420( +50)	268( +1)
黄芩素	325	276	352( +27)	276(0)
黄芩苷	315	278	-	299( +21)
木犀草素	352	254	386( +34)	271( +17)
白杨素	315	268	315(0)	268(0)
儿茶素	-	280	-	280(0)

**2.2.2 黄酮化合物标准曲线的绘制** 分别配制浓度为 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷、木犀草素、儿茶素和白杨素的系列梯度溶液。以相应溶剂为空白,照 UV-Vis 分光光度法(2010 年版《中国药典》附录 V A),在上述黄酮化合物的最大吸收波长(带)处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,浓度为横坐标,计算回归方程和相关系数,见表 3。

表 3 9 种黄酮化合物的回归方程和相关系数

化合物	回归方程	r
槲皮素	A = 2.076 × 10 <sup>-2</sup> C + 5.040 × 10 <sup>-2</sup>	0.998
杨梅素	A = 2.144 × 10 <sup>-2</sup> C + 9.10 × 10 <sup>-3</sup>	0.999
黄芩素	A = 1.425 × 10 <sup>-2</sup> C - 4.44 × 10 <sup>-2</sup>	0.999
山奈酚	A = 2.046 × 10 <sup>-2</sup> C + 1.31 × 10 <sup>-1</sup>	0.997
芦丁	A = 1.711 × 10 <sup>-2</sup> C - 2.70 × 10 <sup>-2</sup>	0.999
黄芩苷	A = 2.384 × 10 <sup>-2</sup> C + 1.70 × 10 <sup>-1</sup>	0.997
木犀草素	A = 1.610 × 10 <sup>-2</sup> C + 4.10 × 10 <sup>-3</sup>	0.999
白杨素	A = 2.496 × 10 <sup>-2</sup> C + 2.01 × 10 <sup>-1</sup>	0.997
儿茶素	A = 3.92 C + 1.64 × 10 <sup>-1</sup>	0.999

**2.2.3 络合反应过程中的光谱动力学** 分别精密移取槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷、木犀草素、儿茶素和白杨素溶液 1 mL 和二氯化铁溶液 2 mL, 于 10 mL 的具塞刻度试管中, 然后以乙醇定容至刻度, 摇匀, 在 20 °C 恒温反应。根据预试验, 我们确定了考察各黄酮化合物在络合反应中光谱变化的时间, 其中, 槲皮素、杨梅素和黄芩素与二氯化铁反应速度很快, 设定其时间为 120 min, 时间间隔为 10 min; 山奈酚、芦丁、黄芩苷和木犀草素的反应速度较慢, 故在 12 h 内每隔 1 h 考察 1 次, 芦丁、黄芩苷和木犀草素在 12 h 以后, 每隔 1 d 扫描 1 次光谱; 对儿茶素和白杨素与二氯化铁的光谱吸收变化连续研究了 12 d, 时间间隔为 1 d 1 次。以相应溶剂为空白, 记录在 240 ~600 nm 的光谱变化(图 1)。

图 1 显示了黄酮化合物与二氯化铁的反应液在不同时间点光谱的变化情况。我们发现当加入二氯化铁溶液, 槲皮素、杨梅素、山奈酚、芦丁和木犀草素的带  $\pi$  和带  $\pi'$  均有不同程度的红移; 黄芩苷仅带  $\pi$  发生红移, 同时带  $\pi'$  的吸收峰在反应终点消失; 黄芩素仅带  $\pi$  发生红移; 儿茶素和白杨素的带  $\pi$  和带  $\pi'$  均未红移。Sekhon 等<sup>[3]</sup> 和 Kaushal 等<sup>[4]</sup> 研究发现, 黄酮化合物在过渡金属离子存在的条件下, 如果发生络合反应其紫外可见光谱会发生红移。据此我们认为槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷和木犀草素这 7 种黄酮化合物与二氯化铁发生了络合反应。而儿茶素和白杨素在相同条件下不能络合 Fe(III), 但导致这两种黄酮化合物在其最大吸收波长处吸光度随时间而递增的原因, 有待于以后的进一步考察。络合反应到达终点时, 各络合物的最大吸收波长及红移范围见表 3。由图 1 光谱曲线的变化趋势还可知, 在反应过程中, 槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷和木犀草素分别在其最大吸收波长 379, 380, 325, 370, 362, 278, 352 nm 处的吸光度随时间推移而递减, 与此同时生成的络合物分别在其最大吸收波长 426, 444, 352, 420, 399, 299, 386 nm 处的吸光度则逐渐增加。

在动力学研究中, 常测定反应物(或产物)在不同时刻的浓度, 绘制浓度随时间的变化曲线, 由曲线的斜率获得反应速率常数或生成速率常数, 以此评价反应速度的快慢。常见的动力学反应机制有零级反应、一级反应和二级反应等, 其中一级反应特征是速率与反应物(或产物)浓度的一次方成正比, 二级

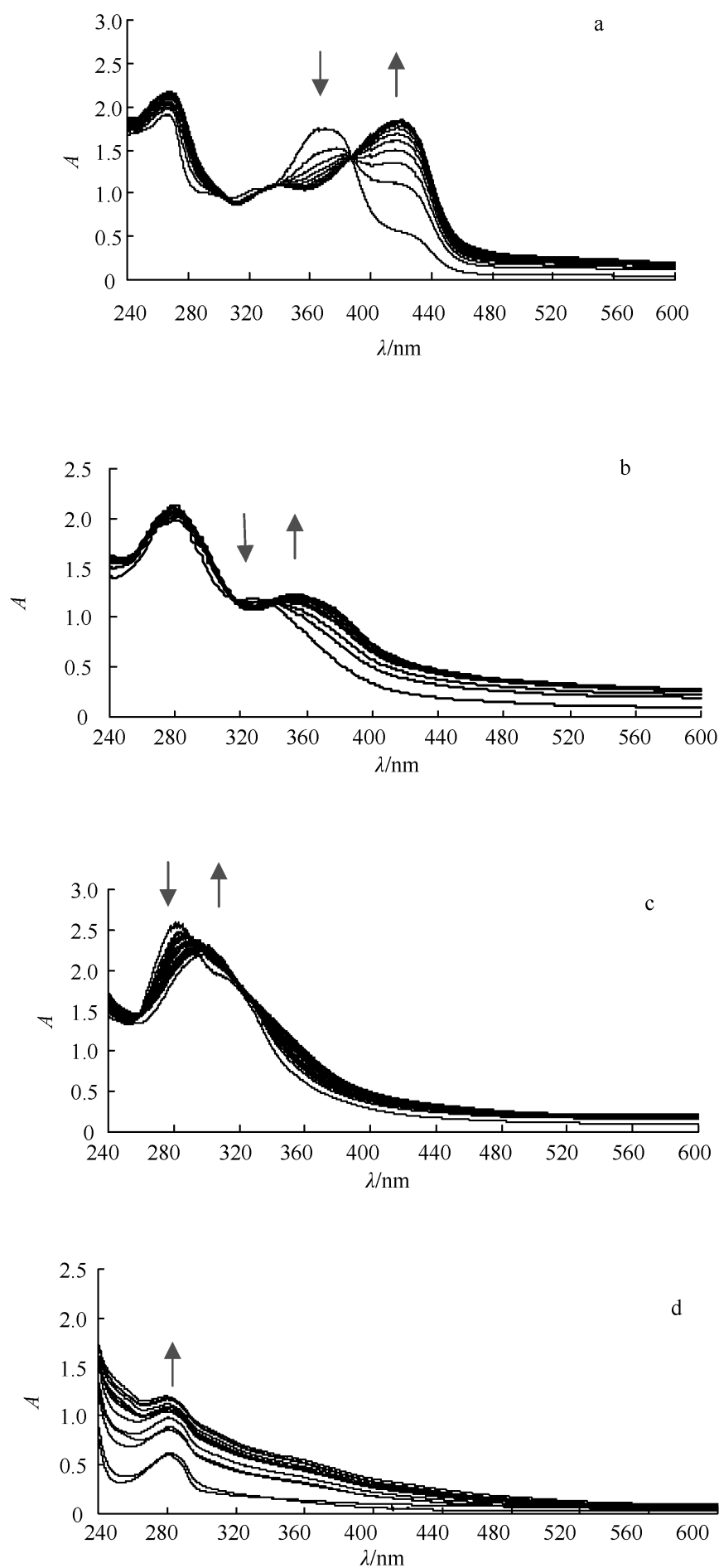


图 1 9 种黄酮化合物与 Fe(III) 在乙醇中随时间变化的光谱图  
a. 山奈酚带  $\pi$  和带  $\pi'$  均发生红移; b. 黄芩素带  $\pi$  发生红移;  
c. 黄芩苷带  $\pi$  发生红移; d. 儿茶素带  $\pi$  和带  $\pi'$  均不发生红移;  
d. 黄酮配体浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup>, Fe(III) 浓度为 2 mmol·L<sup>-1</sup>

反应则是速率与反应物(或产物)浓度的二次方成正比, 零级反应速率与反应物(或产物)浓度无关。在本研究中我们选择反应速率常数来衡量黄酮化合物络合二氯化铁的能力。分别测定槲皮素、杨梅素、黄芩素、山奈酚、芦丁、黄芩苷和木犀草素在其最大吸收波长 379, 380, 325, 370, 362, 278, 352 nm 处的 A, 其中槲皮素、杨梅素和黄芩素在 120 min 内, 每隔

1 min 测定 1 次  $A_t$  其余 4 种黄酮化合物在 12 h 内, 每隔 20 min 进行测定, 12 h 以后, 间隔 1 d 测定 1 次  $A_t$ 。根据回归方程计算 7 种黄酮化合物在相应时刻的浓度。按照文献方法<sup>[5]</sup>, 采用 origin 8.0 软件对浓度和时间数据进行拟合, 研究发现 7 种黄酮化合物与二氯化铁在反应的第 1 个阶段速度较快, 可认为是络合反应的限速步骤, 而在第 2 个阶段反应趋于终点, 速度变化较为平缓。在快反应阶段中, 上述 7 种黄酮化合物的反应浓度的动力学轨迹符合线性递减的规律, 且线性相关系数均在 0.92 以上。由此表明上述黄酮化合物与二氯化铁的络合反应符合零级反应的特征。以槲皮素为例, 对其动力学数据进行拟合, 见图 2。由直线的斜率得到零级反应的速率常数, 见表 4。

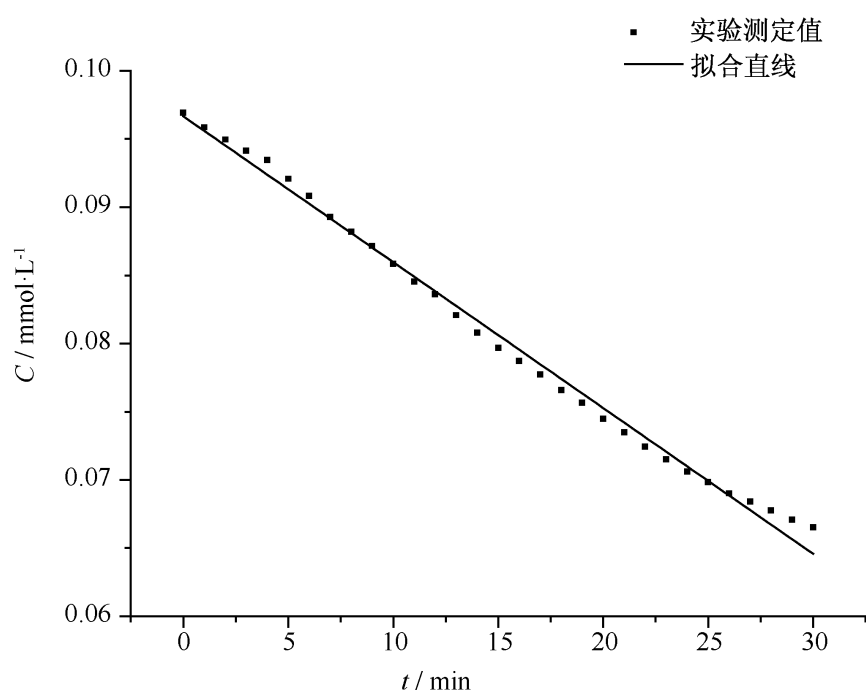


图 2 槲皮素与  $Fe(II)$  在快反应阶段的拟合

表 4 7 种黄酮化合物与  $Fe(II)$  络合反应的速率常数

化合物	反应速率常数 / $mol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$	$r$
杨梅素	$2.36 \times 10^{-6}$	0.960
槲皮素	$1.07 \times 10^{-6}$	0.997
黄芩素	$8.03 \times 10^{-7}$	0.962
山奈酚	$1.22 \times 10^{-7}$	0.955
黄芩苷	$7.31 \times 10^{-8}$	0.924
芦丁	$4.35 \times 10^{-8}$	0.964
木犀草素	$2.69 \times 10^{-8}$	0.958

### 3 结论与讨论

研究发现不同亚型黄酮化合物与  $Fe(II)$  在乙醇溶液中的反应能力存在明显差异, 其络合  $Fe(II)$  的能力与配体结构中羟基位置、数目和存在状态密切相关。黄酮化合物与  $Fe(II)$  在乙醇溶液中络合反应的速率常数依次为: 杨梅素 > 槲皮素 > 黄芩素 > 山奈酚 > 黄芩苷 > 芦丁 > 木犀草素。结合对黄酮化合物的结构解析, 可以得到以下结论: (1) 黄酮化合物的 B 环上具有邻三酚羟基 (3, 4, 5-OH) 与  $Fe(II)$  络合能力较强, 邻二酚羟基 (3, 4-OH) 次之, 单个酚羟基 (4-OH) 较弱, 如杨梅素 > 槲皮素 > 山奈酚; (2) 黄酮苷元成苷后, 由于糖基体积较大, 产生空间位阻效应而导致黄酮苷络合能力下降, 如槲皮素 > 芦丁, 黄芩素 > 黄芩苷。

比较了黄酮配体和  $Fe(II)$  (1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1) 在络合反应过程光谱数据的变化, 研究发现当比例为 1:2 时络合物的吸光度可达到较高值; 比较了在 pH 2.0, 4.5, 6.0 和 7.4 缓冲溶液中黄酮配体和  $Fe(II)$  生成的络合物的稳定性, 结果表明在上述含水缓冲溶液中, 络合物均不稳定, 而在乙醇溶液中络合物较稳定, 故本试验选择在乙醇溶液中进行。

### [参考文献]

- [1] Svingen B A, Buege J A, O'Neal F O, et al. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation [J]. J Biol Chem, 1979, 254 (13): 5892.
- [2] Valko M, Rhodes C J, Moncola J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. Chem Biol Inter, 2006, 160(1): 1.
- [3] Sekhon B S, Kausha G P, Bhatia I S. Use of zirconium (IV) and antimony(III) for structural investigation of flavonoids [J]. Micro Acta, 1983, 80(9): 421.
- [4] Kausha G P, Sekhon B S, Bhatia I S. Spectrophotometric determination of quercetin with  $VO^{2+}$  [J]. Micro Acta, 1979, 71(9): 365.
- [5] Hergovich B, Kaizer J, Speier G. Kinetics and mechanism of the  $Cu(II)$  and  $Cu(I)$  flavonolate-catalyzed oxygenation of flavonol. Functional quercetin 2, 3-dioxygenase models [J]. J Mol Catal A: Chem, 2000, 159 (2): 215.

[责任编辑 邹晓翠]