

· 论 著 ·

槲皮素与锌离子结合性质及抗氧化活性研究

邱丽娟^a, 孟欣^b, 侯升书^b, 杨根金^b, 仲维清^b (第二军医大学; a. 基础医学院; b. 药学院, 上海 200433)

[摘要] **目的** 研究槲皮素与其锌离子(Zn^{2+})配合物的抗氧化性能。**方法** 通过紫外/可见分光光度法测定槲皮素与 Zn^{2+} 的结合比例及结合常数,结合核磁共振技术确定其结合位点,以1,1-二苯基苯肼(DPPH)为探针,比较研究槲皮素与其 Zn^{2+} 配合物的抗氧化性能。**结果** 当槲皮素中低于2个酚羟基被中和时,槲皮素与 Zn^{2+} 的饱和结合比为2:1;当超过3个酚羟基被中和时,槲皮素与 Zn^{2+} 的结合比为1:1,此时槲皮素- Zn^{2+} 的表观结合常数为 $2.42 \times 10^6 M^{-1}$ 。槲皮素的3'-O、4'-O参与了与 Zn^{2+} 的配位。槲皮素- Zn^{2+} 配合物清除DPPH自由基的活性比槲皮素本身高出2.3倍。**结论** Zn^{2+} 可与槲皮素形成稳定的配合物,且其比槲皮素本身具有更高效的抗氧化性能,这为传统中药槲皮素的应用提供了新思路。

[关键词] 槲皮素; 锌离子; 结合常数; 抗氧化

[中图分类号] O657 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)01-0050-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.010

Studies on the binding properties of Zn^{2+} ion to quercetin and the antioxidant activities

QIU Lijuan^a, MENG Xin^b, HOU Shengshu^b, YANG Genjin^b, ZHONG Weiqing^b (a. School of Basic Medical Sciences, b. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the anti-oxidation properties of Zn^{2+} -quercetin complexes. **Methods** The binding stoichiometric ratios and the binding constant of Zn^{2+} to quercetin were measured with UV-Vis spectroscopy. The binding sites on quercetin were determined *via* 1H NMR spectroscopy. The antioxidant activities of Zn^{2+} -quercetin complexes were compared to quercetin by scavenging DPPH radical method. The binding ratio of Zn^{2+} to quercetin depends on neutralization of phenol groups of quercetin. **Results** The binding ratio of Zn^{2+} to quercetin is 1:2 when less than two OH groups were deprotonated. The binding ratio is 1:1 when more than three OH groups were deprotonated. The apparent binding constant is $2.42 \times 10^6 M^{-1}$ for the 1:1 Zn^{2+} -quercetin complex. The 3'-OH and 4'-OH of quercetin are involved in the Zn^{2+} binding. The scavenging DPPH radical activity of Zn^{2+} -quercetin complex is 2.3 times of quercetin. **Conclusion** These results provide a new insight to expand applications of this traditional Chinese medicine.

[Key words] quercetin; Zn^{2+} ion; binding constant; antioxidant activity

槲皮素(quercetin, Que)是一种天然药物的活性成分,具有降血压、抗炎等多种生物活性^[1-3]。槲皮素含有5个酚羟基和1个酮基,A、C环(图1)构成稳定的共轭体系,槲皮素分子中B环上的3'-OH、4'-OH对抗氧化活性的贡献更大^[1,2,4,5]。据文献报道,槲皮素可与 Zn^{2+} 形成配合物,而槲皮素分子上的5个酚羟基以及酮基都有可能是 Zn^{2+} 的结合位点^[6-9]。鉴于槲皮素与 Zn^{2+} 形成配合物的组成及结构都未明确,我们对槲皮素与 Zn^{2+} 整合的性

质进行了研究,以期明确 Zn^{2+} 与槲皮素配合物的组成及结合位点,以及对其抗氧化性能的影响,为进一步阐明槲皮素-金属配合物的生物活性机制提供参考。

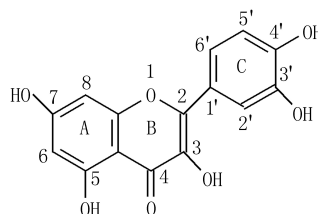


图1 槲皮素的结构

[基金项目] 国家自然科学基金(21273283)

[作者简介] 邱丽娟, 硕士研究生, Email: 253867468@qq.com

[通讯作者] 仲维清, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 金属蛋白与药物研究, Email: wqzhong2002@sohu.com

1 实验仪器与材料

1.1 仪器

Lambda 25 型紫外/可见分光光度计(Perkin Elmer), AVANCE II 600 Hz NMR(德国 BRUKER 公司)。

1.2 材料

槲皮素(含量>97%,上海紫一试剂厂),其他试剂为市售分析纯。

2 实验方法

2.1 紫外-可见光谱

取 12.5 μl 的槲皮素乙醇溶液(4 mmol/L)于测量池中,加入 NH_3 的乙醇溶液(4 mmol/L)12.5 μl ($[\text{NH}_3] : [\text{Que}] = 1 : 1$)调节 pH 值,以无水乙醇作参比,在 Lambda 25 型紫外-可见分光光度计上测其 250 ~ 600 nm 的紫外-可见吸收光谱,再按 $[\text{ZnCl}_2] : [\text{Que}] = 0.2 : 1, 0.4 : 1, 0.6 : 1, 0.8 : 1, 1.0 : 1, 1.2 : 1, 1.4 : 1, 1.6 : 1, 1.8 : 1, 2.0 : 1$ 分别加入 ZnCl_2 的乙醇溶液,测反应混合物的紫外-可见吸收光谱。按照 $[\text{NH}_3] : [\text{Que}] = 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1$ 改变 NH_3 与 Que 的比例,分别按上述相同比例滴加 ZnCl_2 乙醇溶液,同法测其紫外-可见吸收光谱。实验温度控制在 25 $^\circ\text{C}$ 。

2.2 NMR 实验

^1H NMR 实验在德国 BRUKER AVANCE II 600 Hz NMR 仪上完成,溶剂为 CD_3OD ;谱宽 SW = 15 ppm,温度为 27 $^\circ\text{C}$,数据点 SI = 64 k。

2.3 槲皮素及其与锌配合物抗氧化性能实验

为比较槲皮素与槲皮素-锌配合物的抗氧化性能,以无水乙醇作参比,在 517 nm 处测定 1,1-二苯基苯肼(DPPH)溶液(50 mg/L,乙醇溶剂)的紫外-可见吸收峰值 A_0 ,以及 DPPH 分别与不同量的槲皮素、槲皮素-锌配合物的混合液(室温下静置 30 min)的吸收峰值 A 。

取 500 μl 上述 DPPH 溶液于石英比色池中,加入 16 μl 的槲皮素乙醇溶液,以 0.1 s 间隔测 517 nm 的吸收峰值 A 。按照下列公式计算槲皮素清除 DPPH 的反应速率常数 k 值:

$$\ln(A - A_\infty) = -kt + \ln(A_0 - A_\infty)$$

其中 A_∞ 为反应完成时(30 min)的吸光值。以槲皮素-锌配合物代替槲皮素,同法测其清除反应的速率常数。

3 结果与讨论

3.1 槲皮素与 Zn^{2+} 结合性质

槲皮素的紫外-可见吸收光谱示于图 2 ($[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 4$),其中 257 nm 附近的吸

收峰归属于 A 环电子 $\pi-\pi^*$ 跃迁,379 nm 附近的峰归属于 B 环电子 $\pi-\pi^*$ 跃迁^[7]。逐渐加入 ZnCl_2 后,257 nm 和 379 nm 附近的峰的强度均逐渐减弱,而在 272 nm 附近和 437 nm 附近峰的强度逐渐增强。当 ZnCl_2 与槲皮素的浓度比为 1.4 : 1 时,各吸收峰的强度基本不再变化。

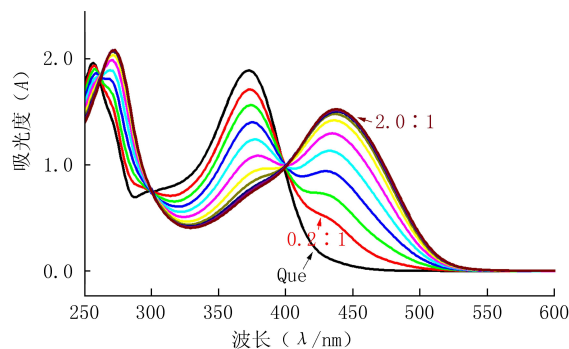


图 2 槲皮素及其与 ZnCl_2 在乙醇中反应的紫外-可见光谱图

注: $[\text{ZnCl}_2] : [\text{Que}]_0 = 0 : 1, 0.2 : 1, 0.4 : 1, 0.6 : 1, 0.8 : 1, 1.0 : 1, 1.2 : 1, 1.4 : 1, 1.6 : 1, 1.8 : 1, 2.0 : 1$ 。实验温度 25 $^\circ\text{C}$, $[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 4$,槲皮素的终浓度为 0.10 mmol/L

将槲皮素-锌配合物的吸收光谱对槲皮素本身的吸收光谱作差谱处理,取 437 nm 左右吸收峰的吸光度差值 ΔA 与 $[\text{Que}]_0$ 之比对 $[\text{ZnCl}_2] : [\text{Que}]_0$ 作图(图 3),从图 3 可以看出,当向槲皮素中加入 ZnCl_2 后,在反应前期阶段,吸光度随 ZnCl_2 的浓度线性增加,到 $[\text{ZnCl}_2] : [\text{Que}] = 1.4 : 1$ 后,吸光度几乎不再增加,前后两段曲线的线性拟合直线的交点对应 $[\text{ZnCl}_2] : [\text{Que}] \approx 1.0 : 1$,表明 Zn^{2+} 与槲皮素的饱和结合比约为 1 : 1。

当 $[\text{Que}] : [\text{NH}_3]$ 逐渐降为 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1

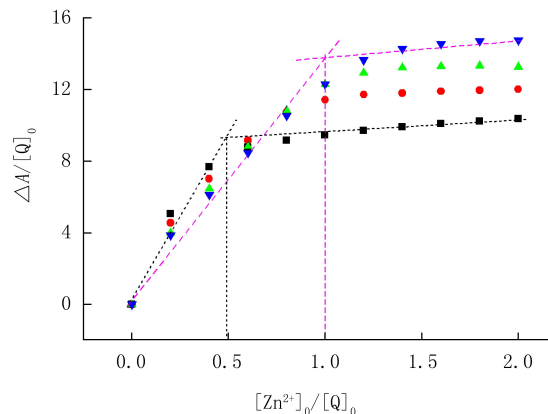
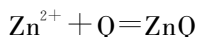


图 3 $(\Delta A / [\text{Que}]_0) \sim ([\text{ZnCl}_2] / [\text{Que}]_0)$ 曲线图

■ $[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 1$, ● $[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 2$,
▲ $[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 3$, ▼ $[\text{Que}] : [\text{NH}_3] = 1 : 4$
注:槲皮素的终浓度为 0.10 mmol/L,实验温度 25 $^\circ\text{C}$

时,与[Que]:[NH₃]=1:4时相比,虽然槲皮素与ZnCl₂反应液的紫外-可见光谱图的总体变化情况相似,但达到滴定饱和时所需的ZnCl₂的量不完全相同,当[Que]:[NH₃]=1:3时,槲皮素与Zn²⁺的饱和结合比仍为1:1,但当[Que]:[NH₃]=1:1时,槲皮素与Zn²⁺的结合比变为约2:1(图3)。

对槲皮素-Zn²⁺形成的1:1型配合物,按下列公式(Q代表槲皮素,忽略电荷)计算其表观结合常数K:



$$K = \frac{[ZnQ]}{[Zn^{2+}][Q]}$$

$$[Zn^{2+}]_0 = [Zn^{2+}] + [ZnQ]$$

$$[Q]_0 = [Q] + [ZnQ]$$

$$\frac{[Q]_0}{[ZnQ]} = 1 + \frac{1}{K[Zn^{2+}]}$$

以 $\frac{[Q]_0}{[ZnQ]}$ 对 $\frac{1}{[Zn^{2+}]}$ 作图(Hill-Plot^[10],见图4),斜率为1/K。

不同条件下测定的表观结合常数K值列于表1中。

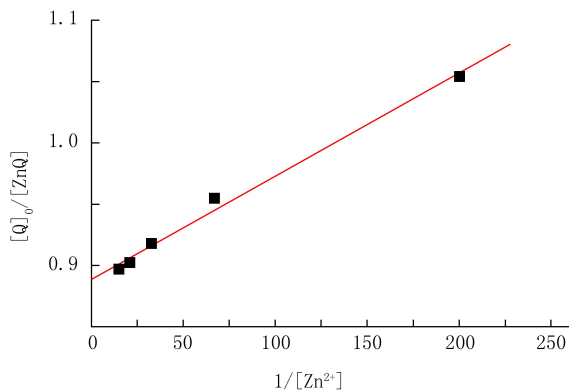


图4 ([Q]₀/[ZnQ])~(1/[Zn²⁺])及线性拟合图

表1 槲皮素与ZnCl₂的反应结合常数

[NH ₃]:[Que]	K(M ⁻¹)
3:1	(2.50±0.23)×10 ⁶
4:1	(2.33±0.22)×10 ⁶

本研究选用的Zn²⁺试剂是ZnCl₂,需采用氨水预先部分中和掉槲皮素酚羟基中的H⁺。实验发现,槲皮素与Zn²⁺的结合比例取决于槲皮素上去质子的酚羟基的数目(即溶液的酸碱度)。当NH₃与槲皮素的浓度比小于2:1时(只有2个以下酚羟基被中和掉),槲皮素与Zn²⁺形成2:1型配合物;当NH₃与槲皮素的浓度比大于3:1时(超过3个酚羟

基被中和掉),槲皮素与Zn²⁺形成1:1型配合物,此时,槲皮素-锌配合物的平均表观结合常数为2.42×10⁶M⁻¹。

槲皮素与金属离子的常见结合形式如图5所示^[12]。为确定Zn²⁺与槲皮素的结合位点及结合方式,我们测定了槲皮素与ZnCl₂反应液的¹H NMR图谱。核磁共振数据显示,随着ZnCl₂的加入,槲皮素中只有B环的2'-H和6'-H的谱线增宽(图6),而UV-Vis实验发现,Zn²⁺的加入,主要影响B环的π→π*的能级跃迁,两者的结果一致。因此,我们认为Zn²⁺结合于3'-O、4'-O,即由于Zn²⁺结合于3'-OH、4'-OH使其脱质子,将影响其邻位(2'-H)和对位(6'-H)的电荷密度,引起谱线变宽。从图2可以看到,257 nm附近的吸收峰也发生了约10 nm红移,说明Zn²⁺的配位也影响到A环中电子的能级,但NMR实验没有发现A环上¹H谱峰有明显变化,因此,我们认为主要是B环上的3'-OH、4'-OH参与了与Zn²⁺的配位作用。

3.2 槲皮素及其锌配合物的抗氧化性能

用DPPH清除法,按公式^[11]计算槲皮素及其配合物清除DPPH的百分率作为衡量其抗氧化性能指标。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

从图7可以看出,在一定的浓度范围内,DPPH清除率与槲皮素及其配合物的浓度呈正相关;相同浓度下,槲皮素-锌配合物的清除率大于槲皮素本身。对图7初始线性部分进行拟合,并计算清除率达到50%时的浓度EC₅₀,数据列于表2中。

由EC₅₀可以算出,清除相同量的DPPH自由基,槲皮素所需浓度是槲皮素-锌配合物所需浓度的1.2倍。这与铜-槲皮素配合物的情况类似^[11]。而在槲皮素及其配合物清除DPPH的动力学实验(图8)中发现,槲皮素-锌配合物的清除反应的速率常数k=(0.352±0.014)s⁻¹,槲皮素本身的k=(0.150±0.017)s⁻¹,由此可以推算出,槲皮素-锌配合物清除相同浓度的DPPH的初始反应速率比槲皮素的初始反应速率快约2.3倍。

4 讨论

槲皮素与Zn²⁺形成的配合物的结合比取决于溶液的酸碱度,当用来中和槲皮素上的酚羟基的氨的比例[NH₃]:[Que]=1:1时,Zn²⁺与槲皮素形成配比为1:2型的配合物;当[NH₃]:[Que]=2:1时,Zn²⁺与槲皮素形成配比为1:2和1:1的

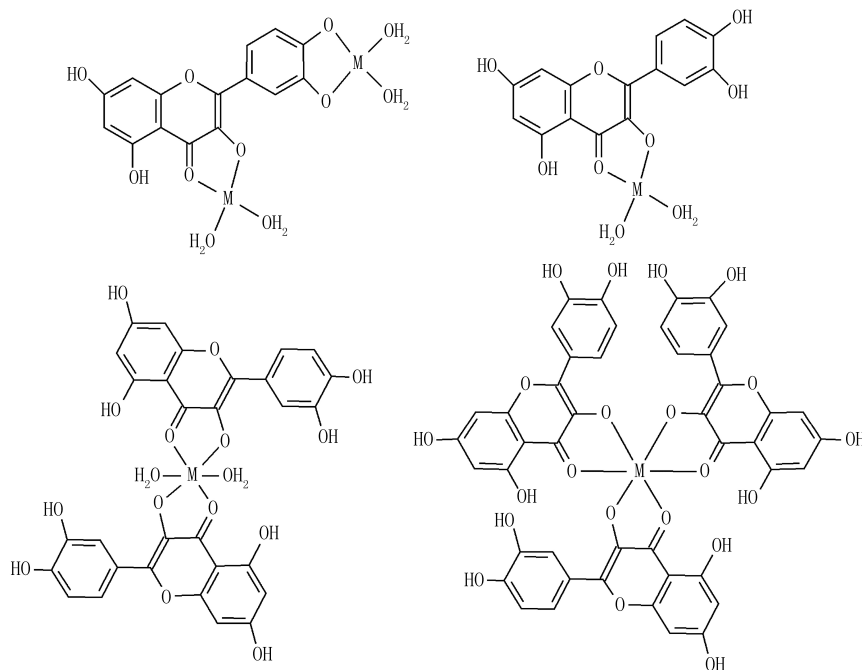


图5 槲皮素与金属离子的配位结合模型

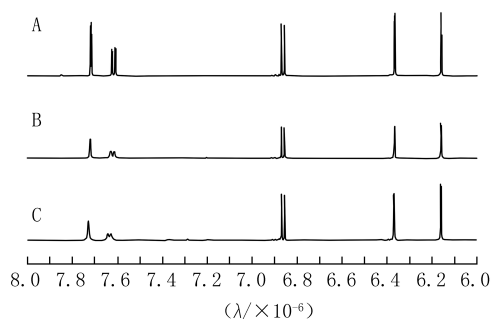


图6 槲皮素与 $ZnCl_2$ 反应液的 1H NMR 图谱

A. 槲皮素; B. $[ZnCl_2]:[Que] = 1:1$ 的混合液;

C. $[ZnCl_2]:[Que] = 5:1$ 的混合液

注: 5个芳香质子的化学位移分别为: $\delta(8-H)$ 6.16 ppm (d, $J = 2.05$), $\delta(6-H)$ 6.37 ppm (d, $J = 2.05$), $\delta(6'-H)$ 7.62 ppm (dd, $J = 8.5, 2.3$), $\delta(5'-H)$ 6.88 ppm (d, $J = 8.5$), $\delta(2'-H)$ 7.72 ppm (d, $J = 2.3$)。槲皮素的终浓度为 $106 \mu\text{mol/L}$, $[NH_3]:[Que] = 25:1$, 溶剂为 CD_3OD , 实验温度 27°C

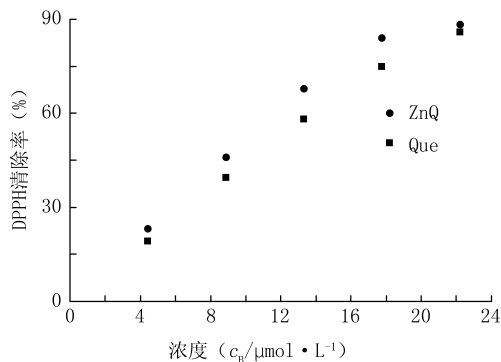


图7 DPPH的清除率与槲皮素及其锌配合物的浓度关系图

注: DPPH 的浓度为 42 mg/L , 乙醇溶剂, 实验温度 25°C

表2 槲皮素及其与锌配合物在 DPPH 清除率为 50% 时的浓度 ($\bar{x} \pm s$)

溶液	$EC_{50} (c_B / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Que	11.22 ± 0.19
ZnQ	9.60 ± 0.29

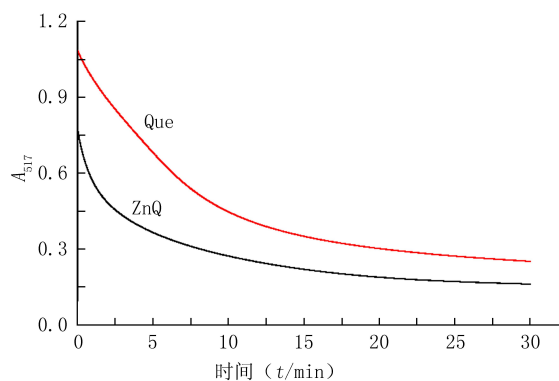


图8 槲皮素及其锌配合物清除 DPPH 的时间曲线

注: DPPH 的浓度为 42 mg/L , 槲皮素及其锌配合物与 DPPH 的浓度比为 $1:1$, 乙醇溶剂, 实验温度 25°C

混合物; $[NH_3]:[Que] = 3:1$ 或 $4:1$ 时, 形成 $1:1$ 型 Zn^{2+} -槲皮素配合物, 此时结合常数约为 $2.42 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 。结合 NMR 结果可确定槲皮素 B 环上 $3'-O, 4'-O$ 是 Zn^{2+} 的结合位点。槲皮素-锌配合物的清除自由基的能力约为槲皮素的 1.2 倍, 其初始清除速率比槲皮素本身高 2.3 倍, 说明槲皮素与 Zn^{2+} 螯合, 可增强其抗氧化能力。槲皮素形成金

属配合物后,可增强其抗氧化能力,而槲皮素-金属离子配合物的抗肿瘤等其他活性作用及药理作用机制,都是值得进一步探究的有趣课题。

【参考文献】

- [1] Miles SL, McFarland M, Niles RM. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease[J]. *Nutr Rev*, 2014, 72(11): 720-734.
- [2] Rani N, Velan LPT, Vijaykumar S, *et al.* An insight into the potentially old-wonder molecule-quercetin: the perspectives in foresee[J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 1:1-16.
- [3] Nabavi SF, Russo GL, Daglia M. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat! [J]. *Food Chem*, 2015, 179:305-310.
- [4] Gormaz JG, Quintremil S, Rodrigo R. Cardiovascular disease: A target for the pharmacological effects of quercetin [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(17): 1735-1742.
- [5] Xiao ZP, Wang XD, Peng ZY, *et al.* Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(42): 10572-10577.
- [6] 夏玉明, 朴惠善, 许妍姬, 等. 槲皮素过渡金属锌配合物的合成[J]. *延边大学学报(自然科学版)*, 1999, 25(1): 37-39.
- [7] de Souza RF, De Giovanni WF. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2005, 61(9): 1985-1990.
- [8] Tan J, Wang B, Zhu L. DNA binding, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, and molecular modeling study of quercetin zinc(II) complex[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(2): 614-620.
- [9] Primikyri A, Mazzone G, Lekka C, *et al.* Understanding zinc(II) chelation with quercetin and luteolin: a combined NMR and theoretical study[J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(1): 83-95.
- [10] 曾旭, 叶丹荣, 林德昌, 等. 含铋配合物与奈瑟氏菌铁结合蛋白的反应性质研究[J]. *无机化学学报*, 2011, 27(11): 2179-2184.
- [11] 王海燕, 曾秀, 张成平, 等. 槲皮素金属螯合物的研究与应用[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 361-364.
- [12] de Souza RF, De Giovanni WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions [J]. *Redox Rep*, 2004, 9(2): 97-104.
- [收稿日期] 2016-12-08 [修回日期] 2017-04-25
[本文编辑] 李睿旻
-
- (上接第33页)
- [7] 中华人民共和国卫生部. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[M]. 中华人民共和国卫生部药政局, 1993.
- [8] Forouzanfar F, Hosseini A, Amiri M S, *et al.* Potentiating effects of *Perovskia abrotanoides* Karel. on pentobarbital-induced sleep[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7(3): 214-222.
- [9] Koga N, Yamaguchi T, Lee KK, *et al.* Kososan, a standardized traditional Japanese herbal medicine, reverses sleep disturbance in socially isolated mice via GABA_A-benzodiazepine receptor complex activation [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5): 697-703.
- [10] Roncari G, Ziegler WH, Guentert TW. Pharmacokinetics of the new benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in man following intravenous and oral administration [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1986, 22(4): 421-428.
- [11] Klotz U, Kanto J. Pharmacokinetics and clinical use of flumazenil (Ro 15-1788)[J]. *ClinPharmacokinet*, 1988, 14(1): 1-12.
- [12] Kasteleijn-Nolst Trenite DG, Groenwold RH, Schmidt B, *et al.* Single dose efficacy evaluation of two partial benzodiazepine receptor agonists in photosensitive epilepsy patients: A placebo-controlled pilot study[J]. *Epilepsy Res*, 2016, 122: 30-36.
- [收稿日期] 2017-09-28 [修回日期] 2017-10-23
[本文编辑] 李睿旻