

文章编号: 1000-4556(2008)03-0331-06

α -生育酚与自由基 DPPH \cdot 的反应机理研究

杨 盈, 严宝珍¹, 聂 舟², 王 梅¹, 田 秋², 刘 扬^{2*}

(1. 北京化工大学 理学院, 北京 100029;

2. 中国科学院 化学研究所, 分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100080)

摘 要: 通过 NMR 产物分析方法确认 α -生育酚与 DPPH \cdot 在 DMSO 中的反应最终产物结构为醌式。此外, 对该反应过程的 ESR 实验证实 α -生育酚与 DPPH \cdot 反应的计量比为 1:2。由此可以进一步推断: α -生育酚与 DPPH \cdot 反应的分子机制为两步过程。

关键词: NMR; ESR; 反应机理; α -生育酚; DPPH \cdot

中图分类号: O482.53 **文献标识码:** A

α -生育酚(α -tocopherol, 维生素 E, 结构见图 1)作为人类最早发现的维生素之一, 是一种公认的最有效的脂溶性天然抗氧化剂。它作为一种链阻断自由基清除剂构成了抵御生物膜内脂质过氧化的第一道防线^[1]。维生素 E 对于预防和治疗氧化应激相关疾病的功效受到了广泛的关注, 并且得到了越来越多的临床和流行病学研究结果的支持^[2]。由于其有效的抗氧化作用, α -生育酚也是一个新型高效抗氧化剂开发的理想初始结构。比如在酚羟基的邻位或对位进行烷基化或芳基化取代^[3, 4], 或者在酚环上进行羟基化形成邻苯二酚结构^[5]。尤其是作者等在近期^[6]又将维生素 E 直接修饰在纳米金颗粒的表面, 大大提高了其抗氧化效率。这一结果刚刚发表就随即受到了读者的关注与好评^[7]。

α -生育酚也经常作为一种参照物, 来衡量其他抗氧化剂的抗氧化性。DPPH \cdot (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 图 1)检测方法是一种广泛应用的稳定自由基清除方法, 但是目前还没有关于 α -生育酚与 DPPH \cdot 的反应产物的报道。本文通过 NMR 分析了 α -生育酚与 DPPH \cdot 在 DMSO 中的反应产物结构, 用 ESR 验证了 α -生育酚及其类似物 Trolox 与 DPPH \cdot 的反应计量比, 研究了 α -生育酚与 DPPH \cdot 的反应机理。

收稿日期: 2008-01-21; 收修改稿日期: 2008-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570446)。

作者简介: 杨盈(1982-), 女, 山西太原人, 硕士研究生, 从事纳米材料、抗氧化剂方向研究。 * 通讯联系人: 刘扬, 电话: 010-62571074, E-mail: yliu@iccas.ac.cn.

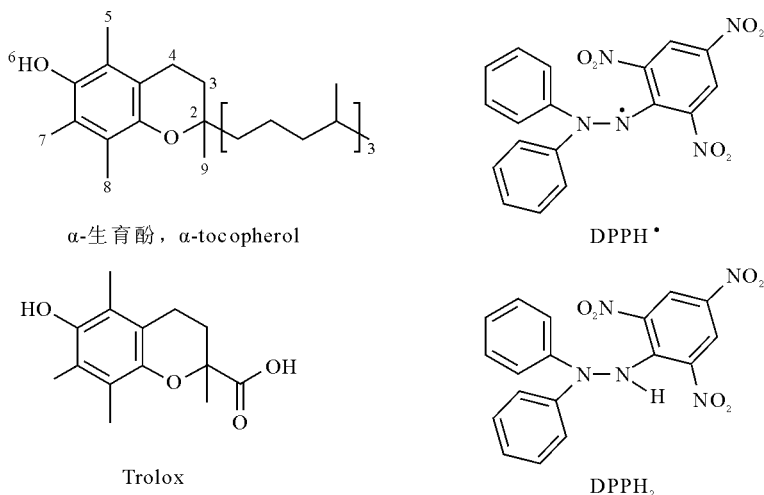


图 1 α -生育酚、Trolox、DPPH \cdot 和 DPPH $_2$ 的结构

Fig. 1 The structures of α -tocopherol, Trolox, DPPH \cdot and DPPH $_2$

1 实验部分

1.1 药品

DPPH \cdot 购于 Alfa Aesar; 氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)购于 CIL; α -生育酚购于 Sigma; DMSO 为色谱纯, 使用前重蒸.

1.2 NMR 实验条件

α -生育酚与 2 倍的 DPPH \cdot 反应 1 h, 以 DMSO- d_6 为溶剂, TMS 为内标. ^1H NMR 数据在 Bruker AVANCE 400 和 600 上采集.

1.3 ESR 实验条件

抗氧化剂浓度为 $62.5 \mu\text{mol}$, DPPH \cdot 浓度为 $250 \mu\text{mol}$, 溶剂为 DMSO. 抗氧化剂与 DPPH \cdot 混匀后加入扁平池, 用 ESR 检测相对清除百分比随时间的变化, 检测时间 20 min. ESR 谱图在 Bruker ESP-300 谱仪上采集, 参数为: 微波频率, 9.78 GHz; 微波功率, 12.9 mW; 扫场宽度, 8.0 mT; 调制强度, 0.1 mT; 调制频率, 100 kHz; 增益, 5×10^4 .

相对清除百分比计算公式:

$$\text{Relative Scavenging Percent} = (H_0 - H_x) / H_0 \times 100\% \quad (1)$$

H_0 : $250 \mu\text{mol}$ DPPH \cdot 的信号强度; H_x : 反应中的信号强度.

抗氧化剂与 DPPH \cdot 反应的计量比计算公式:

$$\text{抗氧化剂与 DPPH}\cdot \text{反应的摩尔比} = ([\text{抗氧化剂}]_0 - [\text{抗氧化剂}]) : (\omega\% \times [\text{DPPH}\cdot]_0) \quad (2)$$

$[\text{DPPH}\cdot]_0$: DPPH \cdot 初始浓度, 本实验中为 $250 \mu\text{mol}$; $[\text{抗氧化剂}]$: 抗氧化剂实际浓度; $[\text{抗氧化剂}]_0$: 抗氧化剂初始浓度 ($62.5 \mu\text{mol}$); $\omega\%$: 相对清除百分比.

2 结果与讨论

2.1 α -生育酚与 DPPH \cdot 在 DMSO 中的反应产物结构

α -生育酚的 ^1H NMR 见图 2(a), 局部放大见图 2(c). 具体数据为: ^1H NMR(DMSO- d_6) δ : 0.79~0.83 (12H, m), 1.64~1.73 (2H, m), 1.95~2.02 (9H, t), 7.36 (1H, s). 参考维生素 E 的核磁报道^[8, 9], 对数据进行指认: δ 0.79~0.83 为长碳链上的 4 个甲基氢; δ 1.14 为与含氧六元环相连的甲基氢 H9; δ 1.64~1.73 为含氧六元环上的亚甲基氢 H3; δ 1.95~2.02 为含羟基环上的 3 个甲基氢; δ 7.36 为酚羟基氢.

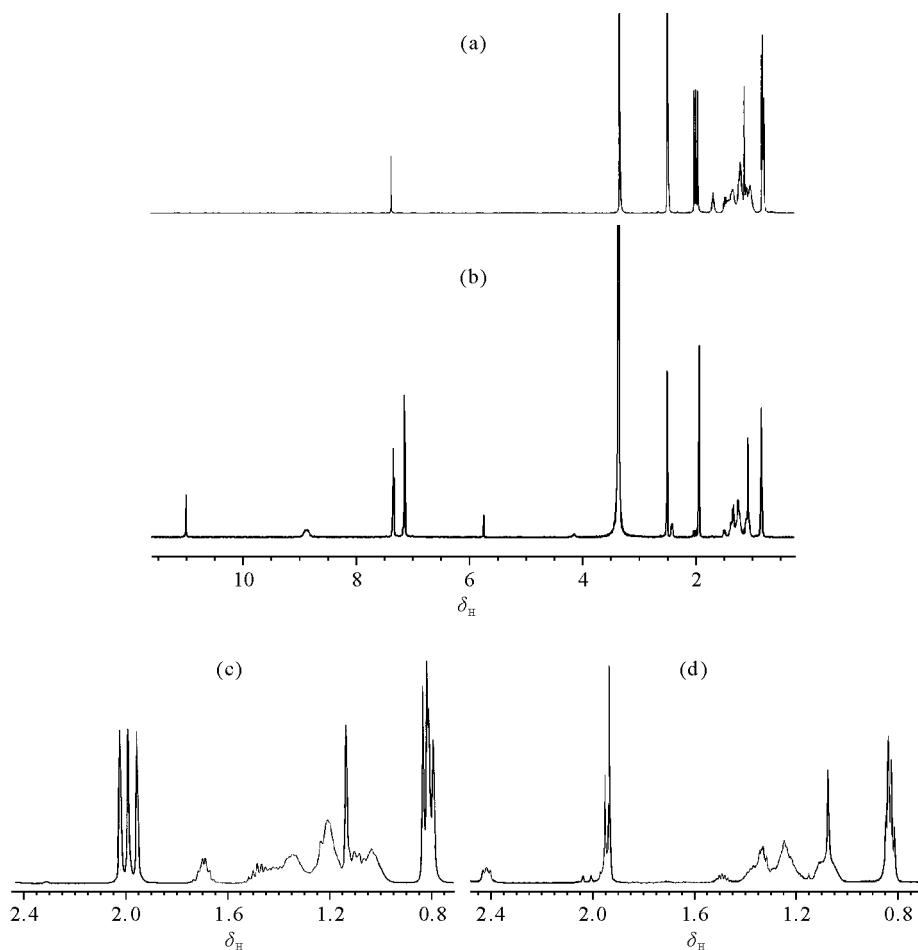


图2 (a) α -生育酚的 ^1H NMR; (b) α -生育酚与 DPPH \cdot 反应后产物的 ^1H NMR; (c)与(d)分别为(a)与(b)的局部放大图.

Fig.2 (a) ^1H NMR spectrum of α -tocopherol; (b) ^1H NMR spectrum after α -tocopherol reacted with DPPH \cdot ; (c) and (d) are partially amplified spectra of (a) and (b), respectively.

α -生育酚与 DPPH \cdot 反应后产物的 ^1H NMR 可见图 2(b). 两者反应后源自 DPPH \cdot 的产物 DPPH $_2$ 的分子结构参见图 1. 根据文献[10]指认图 2(b)中 DPPH $_2$ 的 NMR 数据: δ 7.13~7.35 为 DPPH $_2$ 两个苯环上的氢; δ 8.87 为 DPPH $_2$ 硝基取代的苯环上的氢; δ 11 为氮原子上的氢. δ 5.7 为来自 DPPH \cdot 中的杂质. 显然, 该图中惟有 DPPH $_2$ 的

信号位于低场($\delta > 6$)。考虑到分析反应机理的关键是确认 α -生育酚反应后的产物分子结构, 故而将高场部分($\delta < 2.5$)的谱图加以局部放大(参见图 2(d))。为直观比较反应前、后的高场区信号变化, α -生育酚(即反应前 NMR 谱图)在高场处的局部放大谱图平行展示在图 2(c)。

对比图 2(c)与图 2(d)可知, 当 α -生育酚与 DPPH \cdot 反应后, δ 1.14 单峰、 δ 1.64~1.73 多重峰和 δ 1.95~2.02 三个峰全部消失; 相比之下, 图中新出现了四组新峰: δ 1.07 (s), δ 2.41 (2H, m), δ 1.93 (6H, s)与 δ 1.95(3H, s)。此外还剩余一组化学位移改变很小的多重谱峰: δ 0.81~0.85 (12H, m)。将上述化学位移数据与文献[11]中提及的醌式中间体(参见图 3)的核磁数据对照后可知: δ 1.07 为甲基氢 H1; δ 1.93 和 1.95 属醌环上甲基氢 H4, 5, 6; δ 2.41 是亚甲基氢 H3。

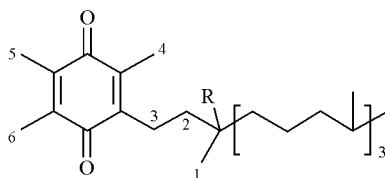


图 3 α -生育酚与 DPPH \cdot 反应的产物结构

Fig. 3 The reaction product of α -tocopherol reacted with DPPH \cdot

另据文献报道, 图 3 中所示的醌式结构也是 α -生育酚与超氧阴离子反应的主要产物^[12]。除此之外, 该文献还认为 α -生育酚与超氧反应共可生成连接有双环氧基团的环己酮结构等九种氧化产物。由此我们推断超氧阴离子的氧化性比 DPPH \cdot 更强, 它与 α -生育酚的反应产物也更为复杂。

2.2 α -生育酚和 Trolox 对 DPPH \cdot 的清除效果的 ESR 检测

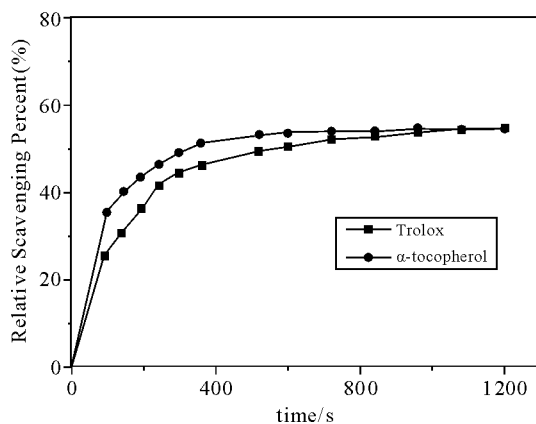


图 4 α -生育酚(●)和 Trolox(■)对 DPPH \cdot 的相对清除百分比/时间曲线

Fig. 4 Time-dependent scavenging effects of α -tocopherol (●) and Trolox (■)

为验证 α -生育酚对 DPPH \cdot 反应的抗氧化清除效果, 采用 ESR 方法对比检验了 α -生育酚与它的水溶性类似物 Trolox 对 DPPH \cdot 的清除作用。正如图 4 所示, 在反应初期, α -生育酚对 DPPH \cdot 的相对清除百分比略高于 Trolox, 随着时间推移二者逐渐接近, 20 min 时变化已经很小, 反应基本达到平衡, 此时 α -生育酚的相对清除百分比达到 54.3%, Trolox 的相对清除百分比达到 54.6%, 两者数值非常接近。将最终的相对清除百分比代入公式(2), 并确认抗氧化剂完全反应时, 可计算 α -生育酚和 Trolox 对 DPPH \cdot 的摩尔反应比都是 1:2, 并且两者的反应速率也十分接近。

3 结论

总之, 通过 NMR 检测确认 α -生育酚与 DPPH \cdot 在 DMSO 中的产物结构为图 3 所示的醌式结构. 虽然 α -生育酚和 Trolox 都能够以 1 : 2 的摩尔比清除 DPPH \cdot 自由基, 但是二者的反应分子机制与产物结构都有所不同, Trolox 反应最终产物是环式结构的半醌^[13]. 参照 α -生育酚与自由基反应的光谱研究结果^[14], 可认为 α -生育酚与 DPPH \cdot 在 DMSO 中的两步反应是: (a) DPPH \cdot 自由基单电子氧化 α -生育酚上色满醇基团, 生成色满醇半醌自由基中间产物; (b) 而后两个色满醇自由基进一步发生自岐化生成一分子色满醇和一分子醌式结构. 反应路径见图 5.

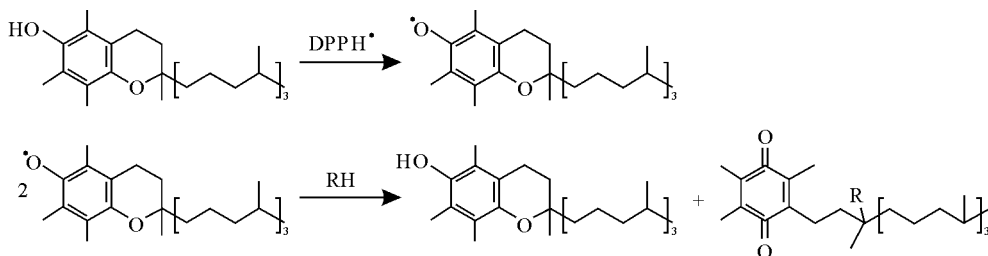


图 5 α -生育酚与 DPPH \cdot 的反应历程

Fig. 5 The reaction pathway of α -tocopherol with DPPH \cdot radical

参考文献:

- [1] Brigelius-Flohe R, Traber M G. Vitamin E: function and metabolism[J]. *Faseb J*, 1999, 13(10): 1 145—1 155.
- [2] Tucker J M, Townsend D M. Alpha-tocopherol: Roles in prevention and therapy of human disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59: 380—387.
- [3] Mukai K, Okabe K, Hosose H. Synthesis and stopped-flow investigation of antioxidant activity of tocopherols. Finding of new tocopherol derivatives having the highest antioxidant activity among phenolic antioxidants[J]. *J Org Chem*, 1989, 54: 557—560.
- [4] Barclay L R C, Vinqvist M R, Mukai K, *et al.* Chain-breaking phenolic antioxidants: steric and electronic effects in polyalkylchromanols, tocopherol analogs, hydroquinones, and superior antioxidants of the polyalkylbenzochromanol and naphthofuran class[J]. *J Org Chem*, 1993, 58: 7 416—7 420.
- [5] Hussain H H, Babic G, Durst T, *et al.* Development of novel antioxidants: Design, synthesis, and reactivity [J]. *J Org Chem*, 2003, 68: 7 023—7 032.
- [6] Zhou Nie, Ke Jian Liu, Chuan-Jian Zhong, *et al.* Enhanced radical-scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: A novel inspiration for development of new artificial antioxidant[J]. *Free Radic Bio Med*, 2007, 43: 1 243—1 254.
- [7] Yin Huiyong. Quest for better antioxidants: a commentary on “Enhanced radical-scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: A novel inspiration for development of new artificial antioxidant”[J]. *Free Radic Bio Med*, 2007, 43: 1 229—1 230.
- [8] Strohschein S, Pursch M, Lubda D, *et al.* Shape selectivity of C₃₀ phases for RP-HPLC separation of tocopherol isomers and correlation with MAS NMR data from suspended stationary phases[J]. *Anal Chem*, 1998, 70(1): 13—18.

- [9] Hua Yu-xin(华玉新), Zhang Jian-jin(张建晋), Ning Yong-cheng(宁永成). Two dimensional INADEQUATE spectrum applied to δ -vitamin E(二维 INADEQUATE 谱在 δ -维生素 E 上的应用)[J]. Chinese J Magn Reson (波谱学杂志), 1989, 6(3): 294-298.
- [10] Luca C, Ionita P, Caproiu T, *et al.* Interphase processes involving hydrazine derivatives IV [J]. Rev Roum Chim, 1998, 43(1): 25-30.
- [11] Chang Ming-huey, Wang Guei-jane, Kuo Yueh-hsiung, *et al.* The low polar constituents from *bidens pilosa* L. var. minor (blime) sherff[J]. J Chinese Chem Soc, 2000, 47: 1 131-1 136.
- [12] Matsuo M, Matsumoto S. Oxygenations of vitamin E (α -Tocopherol) and its model compound 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol in the presence of the superoxide radical solubilized in aprotic solvents: Unique epoxidations and recyclizations[J]. J Org Chem, 1987, 52: 3 514-3 520.
- [13] Thomas M J, Bielski B H J. Oxidation and reaction of Trolox, a tocopherol analogue, in aqueous solution. A pulse-radiolysis study[J]. J Am Chem Soc, 1989, 111: 3 315-3 319.
- [14] Musialik M, Litwinienko G. Scavenging of dppho radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer[J]. Org Lett, 2005, 7(22): 4 951-4 954.

The Mechanism of a Reaction between α -Tocopherol and DPPH \cdot Studied by NMR and ESR Spectroscopy

YANG Ying¹, YAN Bao-zhen¹, NIE Zhou², WANG Mei¹,
TIAN Qiu², LIU Yang^{2*}

(1. School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. State Key Lab for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: In this paper the reaction product of α -tocopherol and DPPH \cdot radical in DM-SO was analyzed by NMR spectroscopy, and found to have a tetraalkylbenzoquinonoid group. The reactive ratio of α -tocopherol to DPPH \cdot was confirmed to be 1 : 2 with ESR spectroscopy. Based on these two results, it is proposed that the reaction pathway of α -tocopherol and DPPH \cdot has two steps.

Key words: NMR, ESR, reaction mechanism, α -tocopherol, DPPH \cdot