

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下橙皮苷的极谱催化波机理及其应用

过 玮\*, 何盈盈, 张清春, 宋俊峰

(西北大学化学系, 陕西 西安 710069)

**摘要:** 目的 研究在过氧化氢存在下橙皮苷极谱催化波产生机理, 建立测定橙皮苷的极谱催化波新方法。方法 用线性变位极谱法、循环伏安法等技术。结果 橙皮苷 C-4 位上的羰基 C=O 首先经单电子单质子还原为自由基, 产生第 1 个还原波; 该自由基的一部分由于共轭作用使其能量降低, 并进一步还原, 产生第 2 个还原波, 另一部分发生二聚化反应。当氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化橙皮苷羰基还原中间体自由基, 阻断了该自由基进一步还原和二聚化反应, 并使橙皮苷再生, 产生橙皮苷的极谱催化波。在 0.12 mol·L<sup>-1</sup> HAc-0.40 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH 5.3)-1.0×10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 支持电解质中, 该催化波的一阶导数峰电流与橙皮苷浓度在 1.0×10<sup>-7</sup> - 1.8×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> 有良好线性关系, 相关系数  $r = 0.9954$ 。检测限为 8.0×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>。结论 该催化波有较高的灵敏度, 可用于药物分析。

**关键词:** 橙皮苷; 过氧化氢; 极谱催化波; 自由基

中图分类号: R917; TQ460.72

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)11 - 0844 - 05

橙皮苷属双氢黄酮糖苷类化合物, 存在于多种天然中草药如枳实、橙皮中, 有祛痰、驱风、健胃、止泻、镇吐等作用, 是羟基自由基和超氧自由基等人体有害自由基的清除剂, 有重要的生理学意义<sup>[1,2]</sup>。目前用于检测橙皮苷的电化学方法有伏安法<sup>[3,4]</sup>和极谱法<sup>[5,6]</sup>等。以上方法均基于橙皮苷的还原波, 且未对其还原过程进行详细讨论。本文报道 0.12 mol·L<sup>-1</sup> HAc-0.40 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH 5.3)-1.0×10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介质中橙皮苷在 -1.35 V 产生极谱催化波, 研究了该催化波的产生机理, 拟定了测定橙皮苷的极谱催化波方法。该方法的检测限可达 8.0×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>, 其灵敏度比已有电化学方法高一个数量级。用该方法测定桔皮中橙皮苷的含量, 结果令人满意。

## 材 料 与 方 法

**仪器与试剂** CH660 电化学工作站(CH 公司, 美国); 303A 电极系统(EG & GARA 公司, 美国); 悬汞工作电极、铂丝辅助电极和饱和甘汞参比电极。整个系统由 CH660 软件控制, 在 Windows 环境下工作。JP-2 型示波极谱仪(成都仪器厂); 三电极系统,

滴汞工作电极、铂丝辅助电极和饱和甘汞参比电极。

1.0×10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 橙皮苷标准储备溶液: 准确称取橙皮苷(中国药品生物制品检定所), 用适量稀 NaOH 溶液溶解, 水稀释并用稀盐酸中和后定容。0.1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (北京化工厂, 分析纯) 溶液, 用 KMnO<sub>4</sub> 标准溶液标定。实验所用其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

**实验方法** 分取一系列橙皮苷标准溶液于 25 mL 量瓶中, 依次加入 1.0 mol·L<sup>-1</sup> HAc 3 mL, 2.0 mol·L<sup>-1</sup> NaAc 5 mL 和 0.1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mL 溶液, 定容。在 JP-2 型示波极谱仪上作阴极化扫描, 起始电位为 -1.10 V, 测量橙皮苷极谱催化波的一阶导数峰峰电位和峰电流。或通高纯氮气 10 min 除氧, 用 CH660 电化学工作站记录循环伏安图。

**样品制备与测定** 桔皮约 3 g 剪碎后用水 100 mL 浸泡 12 h, 转入 250 mL 量瓶中定容。分取适量上清液用工作曲线法测定橙皮苷含量。

## 结 果 与 讨 论

### 1 极谱还原波

在 0.12 mol·L<sup>-1</sup> HAc-0.40 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH 5.3) 缓冲液中对橙皮苷溶液通 N<sub>2</sub> 除氧 10 min 后进行循环伏安扫描。在 -0.9 至 -1.9 V 电位扫描时, 所得循环伏安图见图 1 曲线 1。在阴极支上有两个还原波, 波 p<sub>c,1</sub> 和波 p<sub>c,2</sub>, 其峰电位分别为 -1.35 V 和

收稿日期: 2001-03-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29875017)。

作者简介: 过 玮(1945-), 女, 教授。

\* Tel: (029) 8302572, Fax: (029) 841 4733,

E-mail: Songguo@nwu.edu.cn

-1.70 V, 阳极支上无氧化峰出现。另外, 电位扫描速率  $v$  对波  $p_{c,1}$  的影响结果表明, 提高电位扫描速率  $v$ , 还原波  $p_{c,1}$  峰电流  $i_{pc,1}$  随  $v$  增大而增大, 峰电位  $E_{pc,1}$  随  $v$  增大而线性负移, 线性方程为:  $-E_{pc,1} = 1.38 + 0.0431g v$  ( $\gamma = 0.9999$ )。以上实验说明橙皮苷第 1 个还原波  $p_{c,1}$  为不可逆波。记录橙皮苷还原波  $p_{c,1}$  的直流极谱图, 作对数分析。在低电位 ( $E < -1.32$  V) 处,  $E - \lg \frac{i_1 - i}{i}$  关系呈直线, 斜率为 0.0711, 线性相关系数  $\gamma = 0.9987$ , 可按可逆波作近似处理, 求得波  $p_{c,1}$  的电子转移数  $n = 0.83 \approx 1$ 。在 pH 4.0 - 5.8 考察 pH 对橙皮苷还原波  $p_{c,1}$  峰电流和峰电位的影响。实验表明, 该波峰电流  $i_{pc,1}$  在 pH < 5.27 时随 pH 的增高而逐渐增大, 在 pH > 5.27 时随 pH 增高而逐渐降低。峰电位  $E_{pc,1}$  随 pH 增高而负移, 且有线性关系:  $-E_{pc,1} = 1.08 + 0.059pH$  ( $\gamma = 0.9997$ )。由于该还原波电子转移数  $n = 1$ , 因此参与电极反应的质子数  $m = 1$ 。橙皮苷是双氢黄酮糖苷类化合物, 与其他双氢黄酮和黄酮类化合物一样, C-4 位的羰基 C=O 有极谱活性, 因此, 橙皮苷 C-4 位羰基 C=O 经单电子单质子还原生成了中间体自由基, 与 Geissman<sup>[7]</sup> 在水-有机介质中得到的结果一致。Rapta 等<sup>[8]</sup> 在惰性质子条件下用 EPR 跟踪研究了类黄酮类化合物羰基 C=O 的单电子还原中间体自由基的结构, 认为该自由基位于 C-4 位, 结构如 (I) 所示。按照分子轨道理论, 橙皮苷自由基处于不稳定的高能态, 由于共轭作用, 充填有电子的 P 轨道可能和其他氧原子和 A 环上的  $SP^2$  杂化轨道相互重叠, 使自由基能量降低<sup>[9]</sup>, 如 (II) 所示。由于该中间体自由基的能量较低, 还原需要较多能量, 因此该自由基进一步还原产生的还原波  $p_{c,2}$  其还原电位位于较负的 -1.70 V 处, 与橙皮苷  $p_{c,1}$  波出现的电位相距较远。

为进一步得到橙皮苷还原中间体自由基后续反应的有关信息, 本文还作了以下实验。当电位负扫至  $p_{c,1}$  后的 -1.6 V 处停留 5 s, 再继续负扫至 -1.9 V, 此时无  $p_{c,2}$  波出现 (图 1 曲线 2), 阳极支上也无氧化峰。该自由基还原波  $p_{c,2}$  的消失, 说明橙皮苷 C-4 位羰基 C=O 单电子还原中间体自由基有后续反应发生。若在电位负扫至  $p_{c,1}$  后的 -1.6 V 处立即进行正向反扫, 阳极支上出现一氧化波  $p_a$ , 峰电位  $E_{pa} = -1.17$  V。改变正向反扫前在 -1.6 V 处的停留时间, 该氧化波峰电流  $i_{pa}$  随在 -1.6 V 处

的停留时间延长而增大 (图 2)。波  $p_a$  与波  $p_{c,1}$  的峰电流之比  $i_{pa}/i_{pc} = 0.17$ , 峰电位差  $\Delta E_p = 0.18$  V。以上实验表明, 波  $p_a$  不是自由基在电极上直接氧化产生的氧化波, 可能是该自由基后续二聚化反应产物二聚体在较正电位 -1.17 V 处被氧化产生的。随着电位扫描速率  $v$  增加, 波  $p_a$  峰电流  $i_{pa}$  逐渐降低, 峰电位  $E_{pa}$  稍有负移, 甚至当  $v = 5$   $V \cdot s^{-1}$  时就观察不到该氧化峰, 说明该自由基的后续二聚化反应速率较慢。

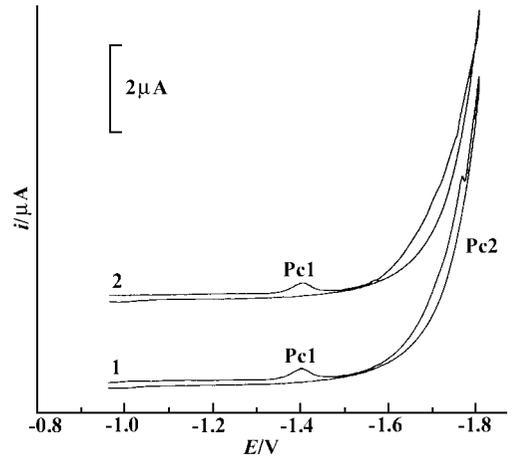


Figure 1 Cyclic voltammograms of  $1.32 \times 10^{-6}$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hesperidin in  $0.12$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAc -  $0.40$   $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc (pH 5.3) solution

Scan rate  $v = 0.25$   $V \cdot s^{-1}$ ; Rest time at -1.6 V potential: curve 1, 0 s; curve 2, 5 s

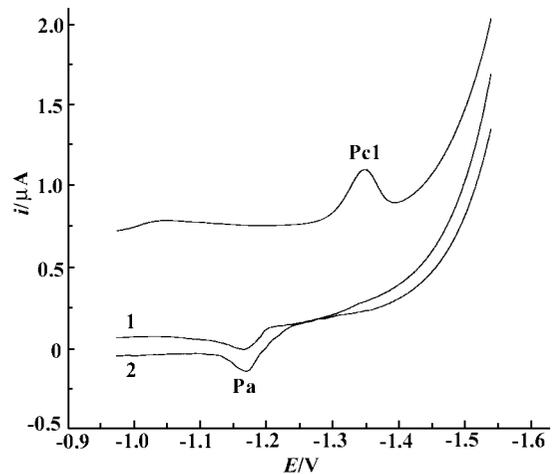
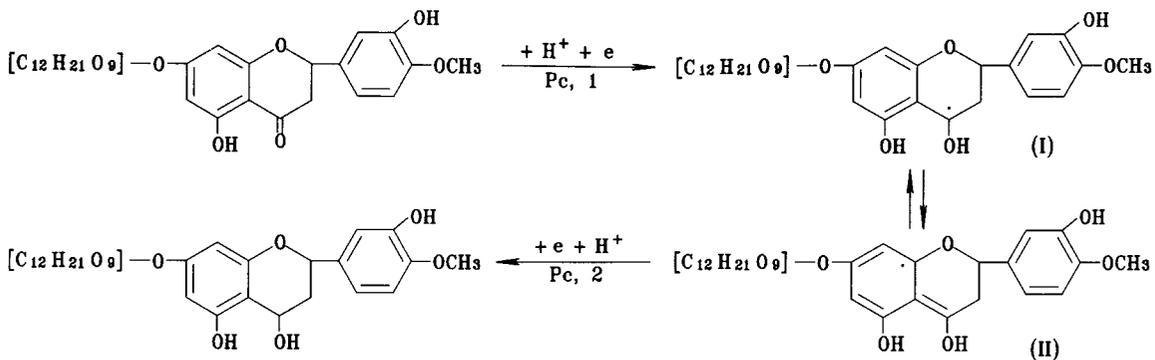


Figure 2 Cyclic voltammograms of hesperidin Rest time before reverse scan: curve 1, 0 s; curve 2, 5 s. Other conditions as in Figure 1, curve 1

综上所述, 橙皮苷还原过程可表示如下:



2 极谱催化波

在  $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HAc} - 0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$  (pH 5.3) 介质中,加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液后,波  $p_{c,1}$  的还原电流急剧增加,峰电位基本不变,并且波  $p_{c,2}$  和氧化波  $p_a$  消失(图 3)。由于氧化剂  $\text{H}_2\text{O}_2$  不但可在  $-1.1 \text{ V}$  附近产生还原波,影响对低浓度橙皮苷催化波的测量,而

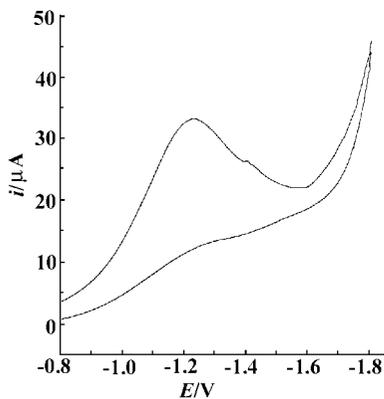


Figure 3 Cyclic voltammograms of hesperidin in the presence of  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$

Other conditions as in Figure 1, curve 1

且使底电流较大。用一阶导数技术进行测量,可抑制底电流,且橙皮苷催化波与底液氢波和  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原波分离良好,如图 4 所示,适于用单扫描示波极谱法进行快速分析。 $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对橙皮苷峰电流的影响结果表明,一阶导数峰电流  $i'_{p,1}$  随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加而增大,且与原还原波一阶导数峰电流  $i'_p$  的比值  $i'_{p,1}/i'_p$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的平方根成正比,线性相关系数 0.995。由于用一阶导数技术测量峰电流,电流函数定义为  $i'_{p,1} \cdot v^{-3/2}$  [10]。图 5 为加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  前、后电流函数  $i'_{p,1} \cdot v^{-3/2}$  与电位扫描速率  $v$  的关系图。由图可见,在无  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在时,电流函数  $i'_{p,1} \cdot v^{-3/2}$  基本不随  $v$  变化。当有  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在时,电流函数  $i'_{p,1} \cdot v^{-3/2}$  随  $v$  提高而降低;当  $v > 2.5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  时,基本不随

之变化。以上实验事实表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起了橙皮苷的平行催化波。

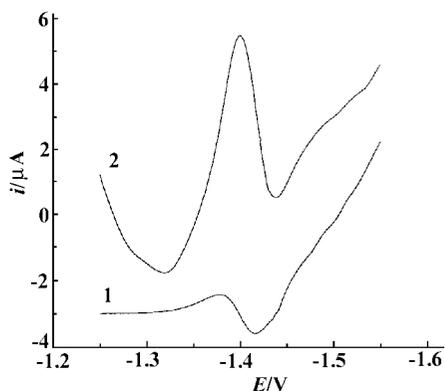


Figure 4 First-order derivative polarograms of hesperidin in the absence (curve 1) and presence (curve 2) of  $\text{H}_2\text{O}_2$

Other conditions as in Figure 1, curve 1

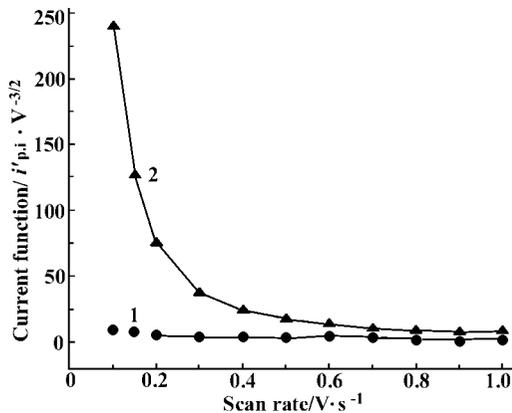
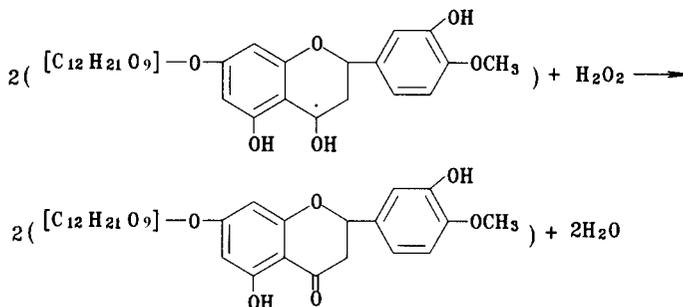


Figure 5 Relation of current function and scan rate  
Curve 1: current function in the absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Curve 2: current function in the presence of  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ . Other conditions as in Figure 1, curve 1

作为氧化剂的  $\text{H}_2\text{O}_2$  能够氧化橙皮苷还原产生的中间体自由基为原反应物,使自由基的进一步还原和二聚化反应不再进行,从而产生了极谱催化波。

结合还原波机理及以上实验事实, 极谱催化机理可表示如下:



### 3 分析应用

实验结果表明, 在  $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HAc} - 0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  (pH 5.3) 介质中, 橙皮苷一阶导数扫描极谱催化波峰电流与其浓度在  $1.0 \times 10^{-7} - 1.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  有良好的线性关系, 线性方程为  $i'_{p,1} (\mu\text{A}) = 0.47 + 9.42 \times 10^7 C$  ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 线性相关系数 0.9954。检测限可达  $8.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

该催化波有较高的灵敏度, 比相应还原波的灵敏度高一个数量级。用本方法测定桔皮中橙皮苷的含量, 样品可用水稀释后直接测量, 而且未发现其他共存物有干扰。测得桔皮中橙皮苷的含量为 0.15% ( $n = 7$ )。相对标准偏差为 6.0%。在试样中作回收实验, 回收率为 95.9% - 111.1%, 结果如表 1。

Table 1 Recovery results in sample

Added/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} (\times 10^7)$	Found/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} (\times 10^7)$	Recovery/ %
2.8	3.11	111.1
3.5	3.68	105.1
4.1	3.93	95.9
4.8	4.67	97.3
6.0	5.92	98.7

### REFERENCES:

- [1] Qin DA, Su D, Wang XL. Scavenging action to hydroxyl free radical of hesperidin [J]. *Chin Pharm J* (in Chinese), 1996, **31**(7): 396 - 398.
- [2] Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, et al. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals [J]. *J Chem Soc, Perkin Trans*, 1996, **11**(2): 2497 - 2504.
- [3] Zoulis NE. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination of rutin and other flavonoids by adsorptive-stripping voltammetry [J]. *Anal Chim Acta*, 1996, **320**(2 - 3): 255 - 261.
- [4] Obendorf D, Reichart E. Determination of hesperidin by cathodic stripping voltammetry in orange juice and helopyrin [J]. *Electroanalysis*, 1995, **7**(11): 1075 - 1081.
- [5] Hu JB, Fan YF, Gong LX, et al. Single-sweep oscillography study of hesperidin [J]. *J Instrum Anal* (in Chinese), 1997, **16**(2): 10 - 13.
- [6] Temizer A, Sayin F, Ergun F, et al. Determination of total flavonoids in various *Galium* species by differential pulse polarography [J]. *J Fac Pharm Gazi Univ*, 1996, **13**(1): 97 - 103.
- [7] Geissman TA, Friess SL. Flavanones and related compounds (VI). The polarographic reduction of some substituted chalcones, flavones and flavanones [J]. *J Am Chem Soc*, 1949, **71**(12): 3893 - 3902.
- [8] Rapta P, Misik V, Stasko A, et al. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study [J]. *Fre Rad Biol Med*, 1995, **18**(5): 901 - 908.
- [9] Li NQ, Xu YX. Study on the polarographic behaviors of morin [J]. *Acta Phys Chim Sin* (in Chinese), 1993, **9**(2): 175 - 180.
- [10] Zhang ZX, Tu YF. Investigation of second derivative oscillography with linearly changing potential [J]. *Chem J Chin Univ* (in Chinese), 1985, **6**(5): 403 - 408.

# MECHANISM OF THE POLAROGRAPHIC CATALYTIC WAVE OF HESPERIDIN IN THE PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE AND ITS APPLICATION

GUO Wei, HE Ying-ying, ZHANG Qing-chun, SONG Jun-feng

(Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the mechanism of a polarographic catalytic wave of hesperidin in the presence of hydrogen peroxide, and to propose a new catalytic wave method for the determination of hesperidin. **METHODS** Linear potential scan polarography, cyclic voltammetry and DC polarography were used in this work. **RESULTS** In  $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HAc} - 0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$  (pH 5.3) supporting electrolyte, the carbonyl group  $\text{C}=\text{O}$  of hesperidin at the C-4 position yielded two reduction waves. The carbonyl group  $\text{C}=\text{O}$  firstly undergoes a  $1 \text{ e}, 1 \text{ H}^+$  reduction to form an intermediate free radical, producing the first reduction wave with peak potential  $-1.35 \text{ V}$  ( $\text{vs SCE}$ ). Further reduction of the radical was simultaneous with its dimerization. A part of the radical was further reduced, producing the second reduction wave with peak potential  $-1.70 \text{ V}$  ( $\text{vs SCE}$ ). Other part of the free radical was dimerized. The dimer could be oxidized at  $-1.17 \text{ V}$  ( $\text{vs SCE}$ ). When oxidant  $\text{H}_2\text{O}_2$  was present, both the further reduction and dimerization were interrupted, and a polarographic catalytic wave was produced because  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidized the intermediate free radical to regenerate the original  $\text{C}=\text{O}$  group. Based on the polarographic catalytic wave, a new method for the determination of hesperidin was proposed.  $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HAc} - 0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$  ( $\text{pH } 5.3$ ) -  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  solution was chosen as supporting electrolyte. The first-order derivative technique was used to eliminate the higher background current from  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction and to well separate the catalytic wave from  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction wave. The first-order derivative peak current of the catalytic wave is proportional to hesperidin concentration in the range of  $1.0 \times 10^{-7} - 1.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  with correlation coefficient  $r=0.9954$ . The limit of detection was  $8.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The sensitivity of the catalytic wave was higher by one order of magnitude than other electrochemical methods based on reduction wave previously reported. **CONCLUSION** The catalytic wave method has higher sensitivity and can be used for pharmaceutical analysis.

**KEY WORDS:** hesperidin; hydrogen peroxide; polarographic catalytic wave; free radical