

H₂O₂ 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 H₂O₂ 存在时, H₂O₂ 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⁻¹ HAc-0.40 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.3)-1.0 × 10⁻² mol·L⁻¹ H₂O₂ 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 × 10⁻⁷ - 1.8 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 有良好线性关系, 相关系数 $r = 0.9954$ 。检测限为 8.0 × 10⁻⁸ mol·L⁻¹。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^[1,2]。目前用于检测橙皮苷的电化学方法有伏安法^[3,4]和极谱法^[5,6]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⁻¹ HAc-0.40 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.3)-1.0 × 10⁻² mol·L⁻¹ H₂O₂ 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 × 10⁻⁸ mol·L⁻¹, 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 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 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⁻¹ H₂O₂ (北京化工厂, 分析纯) 溶液, 用 KMnO₄ 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⁻¹ HAc 3 mL, 2.0 mol·L⁻¹ NaAc 5 mL 和 0.1 mol·L⁻¹ H₂O₂ 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⁻¹ HAc-0.40 mol·L⁻¹ NaAc (pH 5.3) 缓冲液中对橙皮苷溶液通 N₂ 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_{c,1} 和波 p_{c,2}, 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^[7] 在水-有机介质中得到的结果一致。Rapta 等^[8] 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^[9], 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。

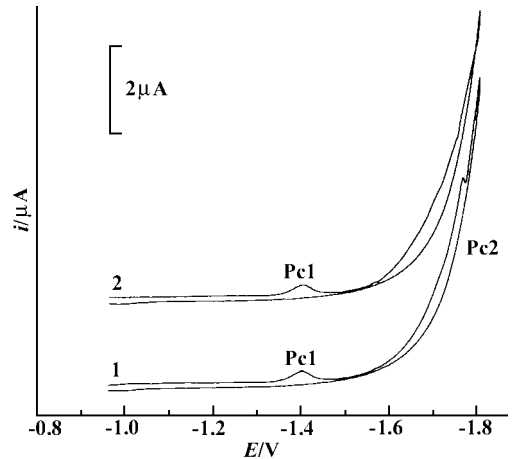


Figure 1 Cyclic voltammograms of $1.32 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hesperidin in $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc - $0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH 5.3) solution
Scan rate $v = 0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$; Rest time at -1.6 V potential: curve 1, 0 s; curve 2, 5 s

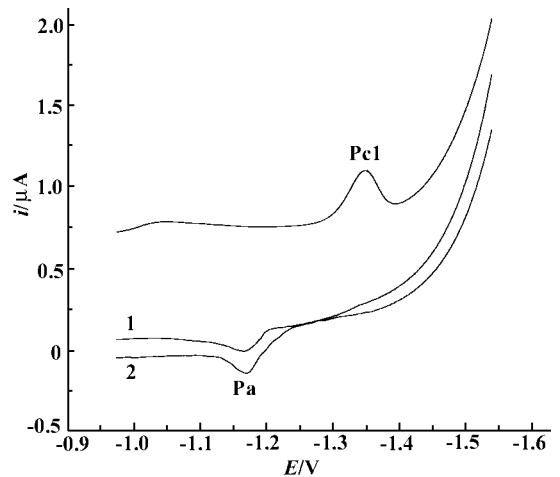
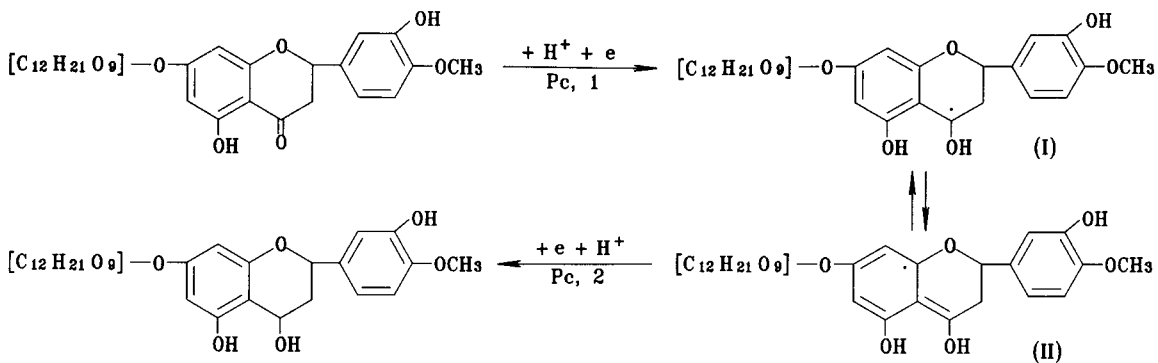


Figure 2 Cyclic voltammograms of hesperidin
Rest time before reverse scan: curve 1, 0 s; curve 2, 5 s. Other conditions as in Figure 1, curve 1

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 H_2O_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 H_2O_2 不但可在 -1.1 V 附近产生还原波,影响对低浓度橙皮苷催化波的测量,而

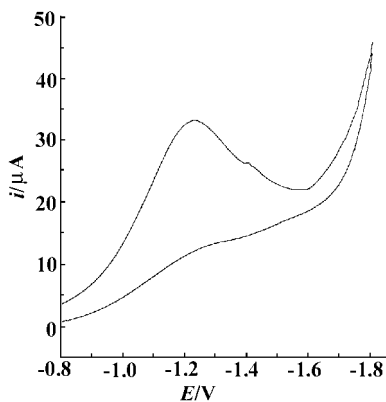


Figure 3 Cyclic voltammograms of hesperidin in the presence of $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$

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 H_2O_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。 H_2O_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 H_2O_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 H_2O_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 H_2O_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 H_2O_2 存在时,电流函数 $i'_{p,1} \cdot v^{-3/2}$ 基本不随 v 变化。当有 H_2O_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 H_2O_2 引起了橙皮苷的平行催化波。

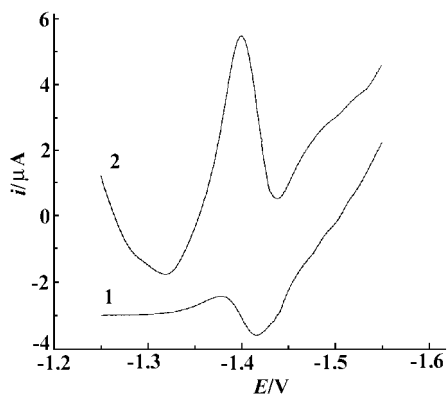


Figure 4 First-order derivative polarograms of hesperidin in the absence (curve 1) and presence (curve 2) of H_2O_2

Other conditions as in Figure 1, curve 1

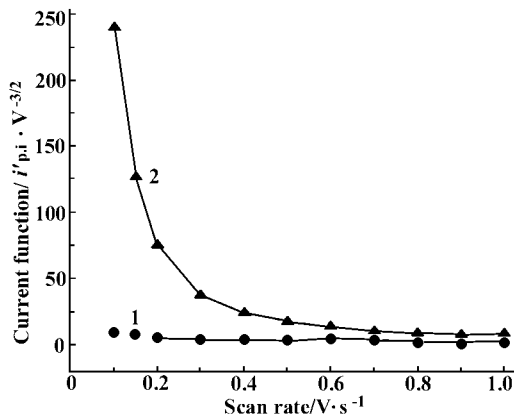
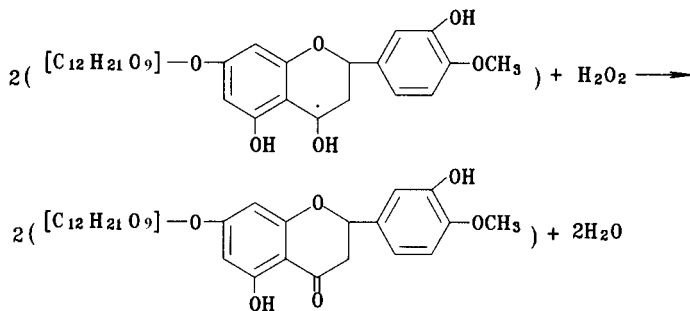


Figure 5 Relation of current function and scan rate
Curve 1: current function in the absence of H_2O_2 ; Curve 2: current function in the presence of $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. Other conditions as in Figure 1, curve 1

作为氧化剂的 H_2O_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,橙皮苷一阶导数单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 V (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 V (vs SCE). Other part of the free radical was dimerized. The dimer could be oxidized at -1.17 V (vs SCE). When oxidant H_2O_2 was present, both the further reduction and dimerization were interrupted, and a polarographic catalytic wave was produced because H_2O_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 H_2O_2 reduction and to well separate the catalytic wave from H_2O_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