

H₂O₂/Fe²⁺体系中羟基氧化行为的抑制与促进*

黎勇坤, 李 聪, 古 昆, 欧灵澄, 尹家元
(云南大学 化学系, 云南 昆明 650091)

摘要:利用邻二氮菲-Fe²⁺氧化分光光度法研究了葛根黄酮、诃子粗提物、芦丁、黄芩甙等4种天然黄酮类抗氧化剂样品对羟自由基氧化作用的影响,发现了抗氧化剂发挥抗氧化作用所需要的特定条件.在羟基自由基浓度较高的体系,抗氧化剂表现出抗氧化作用;而在羟基自由基浓度较低的体系,抗氧化剂反而表现出促氧化性.抗氧化剂的促或抗氧化作用均与其本身质量浓度呈量效关系.温度对抗氧化剂的行为也有很大影响.

关键词:羟自由基;邻二氮菲-Fe²⁺;H₂O₂;抗氧化;光度法

中图分类号:Q 625.42 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2002)04-0302-04

许多天然植物和中草药的有效成分具有抗氧化和清除自由基的作用,对其抗氧化行为的研究正越来越深入.前人已发表的对天然抗氧化剂的研究论文^[1~5]较多,然而,这些论文所报道的绝大多数是天然抗氧化剂对活性氧的清除、抑制作用,至于在一定条件下抗氧化剂能表现出促氧化效果,尚罕见报道,从而易导致一种误解:抗氧化剂的作用只是抗氧化,其相互区别仅在于抗氧化能力不同而已.本文认为,抗氧化剂对活性氧的作用是一个复杂、辨证的过程,它不但可清除或抑制活性氧,也能促进活性氧的链反应.因此,对抗氧化剂的研究、使用应采取全面、辨证的态度,并具体探讨其发挥抗或促氧化作用的特殊条件.羟基自由基是化学性质最活泼的一种活性氧,可介导许多病理变化,研究天然抗氧化剂清除羟自由基的特定条件尤显重要.目前,离体检测羟自由基有电子自旋共振法^[1]、化学发光法^[2]、色谱法^[3]、光度法^[4,5]等.其中前三类方法或因仪器昂贵,或因操作烦琐,不易为一般实验室采用,而分光光度法仪器简单、操作简便,也具有较高的可靠性和重现性.本文利用金鸣等^[5]提出的检测羟自由基的邻二氮菲-Fe²⁺氧化分光光度法,详细研究了4种天然黄酮类样品抑制或促进羟自由基氧化作用的特殊条件及其辨证关系,得出了新的结果.本法原理为:邻二氮菲-Fe²⁺水溶液被羟基自

由基氧化为邻二氮菲-Fe³⁺后,其510 nm最大吸收峰消失,从而可以用A₅₁₀变化反映羟自由基氧化作用.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 752型分光光度计(上海精密仪器有限公司分析仪器总厂).诃子乙酸乙酯提取物(有效成分主要是鞣花单宁、倍单宁和黄酮类化合物)、葛根总黄酮(主要成分为大豆甙、大豆素、葛根素)、黄芩甙及精制槐米(芦丁)按文献^[6~8]的方法提取;75 mmol/L邻二氮菲无水乙醇溶液;1.0 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲溶液 PBS;7.5 mmol/L FeSO₄溶液;体积分数=30% H₂O₂溶液;使用前按需要稀释成不同体积分数的H₂O₂应用液.所用化学试剂均为国产分析纯,实验使用2次蒸馏水.

1.2 实验方法 以蒸馏水将75 mmol/L邻二氮菲无水乙醇溶液稀释至7.5 mmol/L,依次往50 mL比色管中加入1.0 mL,7.5 mmol/L邻二氮菲溶液,5.0 mL pH 7.4 PBS,1.0 mL FeSO₄溶液,一定量的抗氧化剂溶液,1.0 mL H₂O₂应用液,以蒸馏水补充体积至25.00 mL.37℃保温反应60 min,测A₅₁₀.上面每加一次试剂均需混匀.既加抗氧化剂,又加H₂O₂的为加药管;不加抗氧化剂,只加H₂O₂的为

* 收稿日期:2002-02-21

基金项目:云南省省校合作项目(2000YK-01).

作者简介:黎勇坤(1973-),男,湖南人,硕士生,主要从事自由基分析研究.

损伤管;未损伤管两者均不加。

表观羟自由基清除率 s 计算式为

$$s = [A_{510}(\text{加药}) - A_{510}(\text{损伤})] / [A_{510}(\text{未损伤}) - A_{510}(\text{损伤})] \times 100\%$$

若 s 为负值,则表示此时表现促氧化性;若 s 为正值,则表示此时表现抗氧化性。

2 结果

2.1 H₂O₂ 体积分数 对表观羟自由基清除率 s 的影响 笔者研究发现, H₂O₂ 的体积分数 是决定抗氧化剂起抗氧化作用还是促氧化作用的关键因素。由图 1, 2 可知, 当 H₂O₂ 的体积分数 较高时, 4 种抗氧化剂均表现出抗氧化性; 而当 H₂O₂ 的体

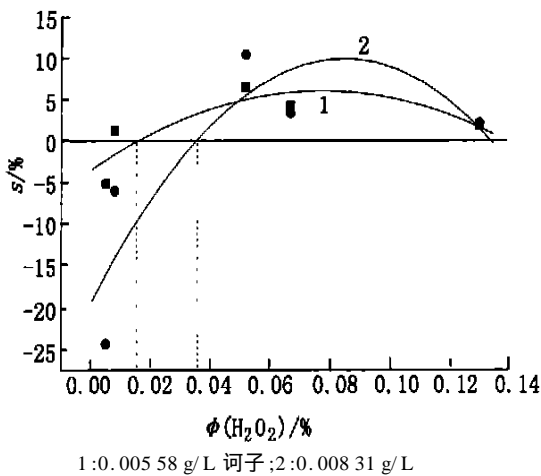


图 1 低质量浓度抗氧化剂时, H₂O₂ 对 s 的影响
Fig. 1 Effect of H₂O₂ on s under low mass concentration antioxidant

2.2 抗氧化剂质量浓度对表观羟自由基清除率 s 的影响 不同抗氧化剂的不同质量浓度对表观羟自由基清除率 s 的影响不同。由图 3 及图 4 可知, 在实验所涉及的浓度范围内, 所研究的抗氧化剂所表现出来的抗或促氧化能力均与其本身质量浓度呈量效关系。在一定的质量浓度范围内, 当其为抗氧化时, 随抗氧化剂质量浓度增大, 其抗氧化效果越明显, 当其为促氧化时, 随抗氧化剂质量浓度增大, 其促氧化效果亦越明显。还可看到, 固定体积分数 (H₂O₂) = 0.057%, 当抗氧化剂起抗氧化作用时, 对诃子粗提物、芦丁、黄芩甙而言, 抗氧化剂对表观羟自由基清除率的影响存在一个饱和质量浓度, 超出这

分数 较低时, 4 种抗氧化剂均表现出促氧化性。在其他条件不变时, 存在一个 H₂O₂ 的临界体积分数, 当 H₂O₂ 的体积分数 超出或低于这个临界体积分数时, 抗氧化剂表现出抗或促 2 种截然相反的作用, 但对于不同的抗氧化剂, H₂O₂ 的体积分数 对表观羟自由基清除率 s 的影响不同, 其临界体积分数也不同。由图 1, 2 还可知, 即使对于同一种抗氧化剂, 在不同的抗氧化剂质量浓度时, H₂O₂ 的临界体积分数也不一定相同。如: 当芦丁质量浓度分别为 0.008 31 g/L 或 0.024 98 g/L 时, H₂O₂ 的临界体积分数则分别为 0.036% 或 0.039%; 而诃子质量浓度分别为 0.005 58 g/L 或 0.016 7 g/L 时, H₂O₂ 的临界体积分数均约为 0.016%。

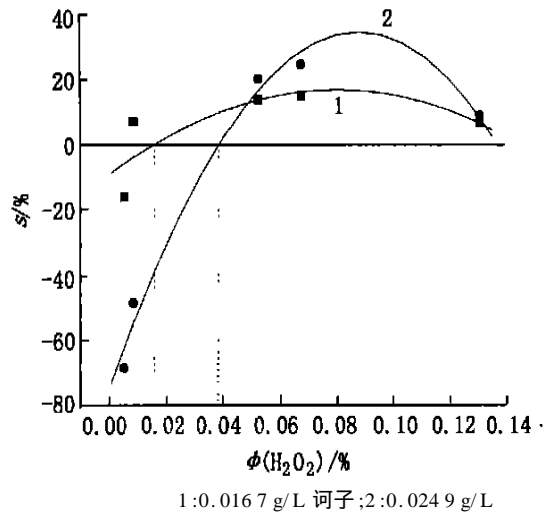
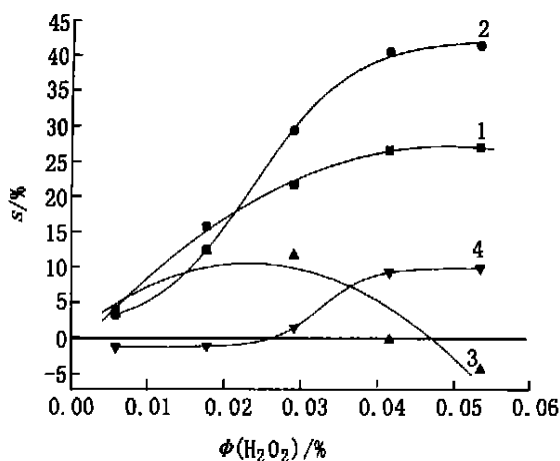


图 2 高质量浓度抗氧化剂时, H₂O₂ 对 s 的影响
Fig. 2 Effect of H₂O₂ on s under high mass concentration antioxidant

个质量浓度, 再增大抗氧化剂质量浓度对表观羟自由基清除率不再发生明显的影响。我们再设计了体积分数 (H₂O₂) = 0.08% 时不同葛根质量浓度实验, 则上面饱和质量浓度之说亦可适用, 相关数据见表 1。

表 1 葛根质量浓度 对表观羟基清除率 s 的影响
Tab. 1 Effect of concentration of pueraria lobata flavone on s

| (葛根)/(g L ⁻¹) | 0.002 | 0.005 | 0.010 | 0.020 | 0.030 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| s / % | 2.1 | 6.6 | 9.5 | 13.1 | 13.3 |

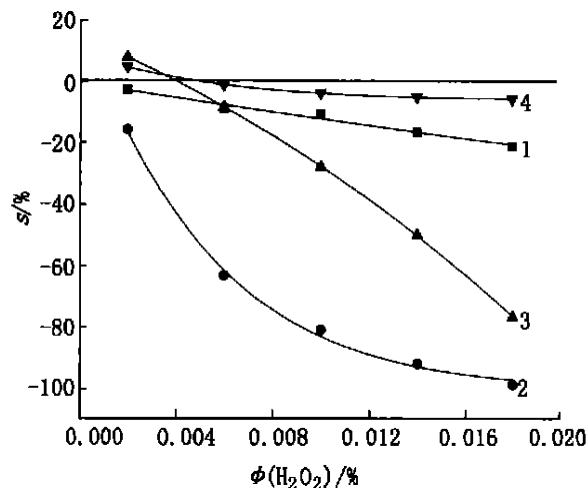


1:诃子;2:芦丁;3:葛根;4:黄芩甙

图 3 高 (H_2O_2) 时,抗氧化剂对 s 的影响

Fig. 3 Effect of antioxidant on s under high volume fraction H_2O_2

(H_2O_2) = 0.057 %



1:诃子;2:芦丁;3:葛根;4:黄芩甙

图 4 低 (H_2O_2) 时,抗氧化剂对 s 的影响

Fig. 4 Effect of antioxidant on s under low volume fraction H_2O_2

(H_2O_2) = 0.0014 %

2.3 H_2O_2 的体积分数 与抗氧化剂质量浓度的相互影响 研究发现,当 H_2O_2 处于临界体积分数附近时,随着抗氧化剂质量浓度的逐渐增大,会出现表观羟自由基清除率由正值逐渐有规律地变为负值(如图 3 中的葛根,图 4 中的葛根、黄芩甙),或由负值逐渐有规律地变为正值(如图 3 中的黄芩甙)的现象.这种现象的产生是由于自由基反应链中各相关反应相互竞争的结果.观察图 1 和图 2 还可发现,当抗氧化剂质量浓度一定时,随着 H_2O_2 的体积分数 由低至高,芦丁、诃子由促氧化变为抗氧化后,逐渐达到一个峰值,再增大 H_2O_2 的体积分数,表观羟自由基清除率又会逐步下降,但始终大于零.峰值的出现是因为 H_2O_2 的体积分数 过大时,产生的羟自由基过多,而抗氧化剂清除羟自由基的能力已基本饱和,来不及将过分过量的羟自由基清除掉,从而表观羟自由基清除率又会逐步下降.

2.4 反应温度对表观羟自由基清除率的影响 实验发现,低温有利于抗氧化,而较高的反应温度有利于促氧化.我们设计了固定反应管中 H_2O_2 起始体积分数为 0.08 %, 4 种抗氧化剂质量浓度均为 0.010 g/L 的实验,结果在 37 °C 保温反应 60 min 条件下,4 种抗氧化剂均表现出一定的抗氧化性.而当反应温度提高到 50 °C,反应时间为 15 min 时,4 种抗氧化剂均表现了促氧化性.具体结果见表 2.笔者还研究了固定 H_2O_2 起始体积分数 较低的情况,发现抗氧化剂在较高温度下对氧化作用的促进比在

较低温度下强得多.

表 2 温度对表观羟清除率 s 的影响

Tab. 2 Effects of temperature on resistance to oxidation

| s / % | 芦丁 | 诃子 | 葛根 | 黄芩 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 37 | 11.7 | 12.5 | 9.5 | 3.9 |
| 50 | - 2.3 | - 1.3 | - 0.9 | - 3.1 |

2.5 4 种天然抗氧化剂抗氧化能力的比较 从实验结果可以看出,抗氧化剂的抗氧化能力是在特定的反应环境和条件下表现出来的,在不同的反应环境和条件下其抗氧化能力是不同的,甚至还会表现出强烈的促氧化能力.因此,要比较抗氧化剂的抗氧化能力,需指明具体的条件.在 H_2O_2 的体积分数 较高,且温度较低时,对羟自由基的清除,芦丁具有很强的作用,其次为诃子粗提物 > 黄芩甙 > 葛根总黄酮;在 H_2O_2 的体积分数 较低,且温度较高时,促氧化能力次序为:芦丁 > 葛根总黄酮 > 诃子 > 黄芩甙.

3 讨论

从对本实验结果的分析可以看出,抗氧化剂的抗氧化或促氧化作用受很多因素制约,其最终表现取决于这几个因素的综合作用,取决于氧化还原链各中间反应的相互竞争及其动力学变化,在本实验所

提供的氧化环境中,这些因素主要为: H_2O_2 的体积分数。当 H_2O_2 的体积分数较高时,4种抗氧化剂均表现出抗氧化性;而当 H_2O_2 的体积分数较低时,4种抗氧化剂均表现出促氧化性。抗氧化剂质量浓度,在某个 H_2O_2 的体积分数下,抗氧化剂质量浓度较低时可起促氧化作用,质量浓度高到可以完全清除或大幅降低反应链中的羟自由基时,则起抗氧化作用(如图3中的黄芩甙)。反应温度,可能本反应体系中抗氧化途径总的热效应为放热,而促氧化途径总的热效应为吸热,故降温有利于抗氧化,而升温有利于促氧化。

参考文献:

- [1] STOKES N J, TABNER B J, HEWITT C N. Determination of hydroxyl radical concentration in environmental chambers using electron spin resonance[J]. *Chemosphere*, 1994, 28(5): 999—1008.
- [2] KANSKI J, KOPPAL T, BUTTERFIELD D A. Investigation of peroxynitrite-induced oxidative stress in red blood cell monitored by luminol dependent chemiluminescence[J]. *Analytical Letters*, 1999, 32(6): 1183—1192.
- [3] RIXHMONS R, HALLIWELL B, CHAUHAN J, et al. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds[J]. *Anal Biochem*, 1981, 118(2): 328—335.
- [4] 贾之慎, 邬建敏, 唐梦成. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(2): 184—186.
- [5] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲— Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系产生的羟自由基[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 553—555.
- [6] 孟洁, 杭瑚. 诃子抗氧化作用的研究[J]. *食品科学*, 2000, 21(2): 9—12.
- [7] 杨云, 冯卫生. 中药化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国医药出版社, 2001: 335, 296.
- [8] 冀春茹. 中药化学实验技术与实验[M]. 郑州: 河南科技出版社, 1986.

Inhibition or promotion of oxidation of hydroxyl radical in $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ system

LI Yong-kun, LI Cong, GU Kun, OU Ling-cheng, YIN Jia-yuan
(Department of Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The influence upon hydroxyl radical of four natural antioxidants: pueraria lobata flavone, extracts of Terminalia Chebula Retz, Rutin, Baicalin is studied by 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative photometric assay, the specific reaction condition where the antioxidants show antioxidant effect is also founded. In the high hydroxyl radical concentration system, these antioxidants may show antioxidant effect, but in the low hydroxyl radical concentration system, they may promote oxidation. The promoting or inhibiting effect of these antioxidants upon oxidation is dependent upon the dosage of themselves. The temperature also produces a great impact upon the effect of antioxidant.

Key words: hydroxyl radical; 10-Phenanthroline- Fe^{2+} ; H_2O_2 ; antioxidant; photometric analysis