

黄酮解离常数与活性氧清除效果的关系

初乐^{1,2}, 张迪¹, 吴薇³, 籍保平^{1,*}, 王梦倩¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 中华全国供销合作总社济南果品研究院, 山东 济南 250014; 3. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 在体外条件下, 对9种常见黄酮(槲皮素、杨梅素、高良姜素、大豆苷元、染料木素、柚皮素、橙皮素、芹菜素、木犀草素)清除活性氧基团(过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧亚硝基阴离子($ONOO^{\cdot-}$))的效果和黄酮的解离常数进行研究。结果表明: 黄酮醇类化合物清除这3种活性氧基团的能力最强, 黄烷酮和异黄酮类清除能力不明显。黄酮的一级解离常数与其清除活力存在相关性, 与其清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $ONOO^{\cdot-}$ 具有显著相关性。黄酮的一级解离常数越低, 其清除活性氧基团的能力越强。

关键词: 黄酮; 过氧化氢; 超氧阴离子自由基; 过氧亚硝基阴离子; 解离常数

Relationship between Dissociation Constants of Flavonoids and Scavenging Activities against Reactive Oxygen Species

CHU Le^{1,2}, ZHANG Di¹, WU Wei³, JI Bao-ping^{1,*}, WANG Meng-qian¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Jinan Fruit Research Institute, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Jinan 250014, China;

3. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The scavenging activities of 9 common flavonoid compounds against reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ion radicals ($O_2^{\cdot-}$) and peroxynitrite radicals ($ONOO^{\cdot-}$) were assayed *in vitro*. Also, their first-order dissociation constants were determined spectrophotometrically. Of the investigated flavonoid compounds, flavonols had the strongest scavenging activity against three kinds of ROS, and flavanones and isoflavones had no obvious scavenging effect on them. A significant negative correlation was achieved between the scavenging activities against $O_2^{\cdot-}$ and $ONOO^{\cdot-}$ and first-order dissociation constants of the investigated flavonoids.

Key words: flavonoid; hydrogen peroxide; superoxide anion ion radical; peroxynitrite radical; dissociation constant
中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)23-0069-05

近些年来, 生物体内活性氧基团(reactive oxygen species, ROS)和活性氮基团(reactive nitrogen species, RNS)以及普遍存在的氧化反应对人体的负面影响引起广泛的关注。正常情况下, 人体内的自由基是处于不断产生与清除的动态平衡, 以确保机体有效正常的生命活动。但是, 过多的氧自由基产生或自由基清除过慢会加速机体的衰老进程并诱发各种疾病如动脉粥样硬化、糖尿病、慢性炎症、神经紊乱和癌症^[1-2]。过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和过氧亚硝基阴离子($ONOO^{\cdot-}$)是体内活力较强的活性氧基团, 过量产生必然会引起机体代谢紊乱。

黄酮类化合物(flavonoids)是自然界中广泛分布而

且重要的多酚类天然产物。人体每天黄酮摄入量为100mg^[3], 远高于其他抗氧化物质如 β -胡萝卜素(2~3mg)、VC(70~100mg)、VE(70~100mg)^[4]。黄酮最重要的生物活性之一就是抗氧化能力, 通过酚羟基与体内自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 终止自由基链式反应, 从而协助细胞抵抗自由基引起的氧化损伤。从结构方面, 黄酮是由两个苯环(A-与B-环)通过中央三碳链相互联结而成。根据中央三碳链的成环、氧化程度以及B-环连接位置(2-或3-位)的差异, 可将其分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮、黄烷酮类等, 结构见图1。

收稿日期: 2011-03-22

作者简介: 初乐(1987—), 女, 硕士研究生, 主要从事功能食品研究。E-mail: luoluobx@sina.com

* 通信作者: 籍保平(1958—), 男, 教授, 硕士, 主要从事功能食品研究。E-mail: baopingji@gmail.com

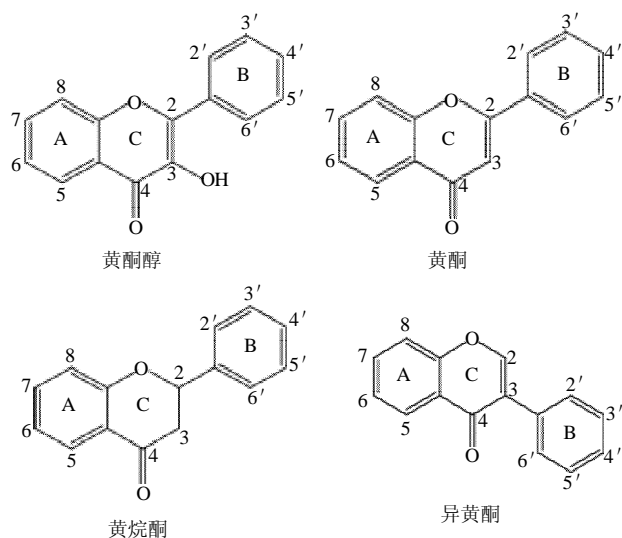


图1 不同黄酮化合物的结构式

Fig.1 Structures of 4 different classes of flavonoids

解离常数(pK_a)是水溶液中具有一定离解度的物质的极性参数,它表示弱电解质解离成离子的能力。物质的解离常数数值是影响其在体内吸收、转运、分布和反应速率的重要理化性质,其大小直接决定了物质的生物活性强弱^[5]。解离常数的主要影响因素是物质的分子结构,键的极性,共振效应,氢键的形成以及空间位阻等。常用的测定方法有分光光度法^[6-7]、电位滴定法^[7]、毛细管电泳法^[8]、高效液相色谱法^[7]等。其中,分光光度法由于其操作简单易于实现而得到广泛应用。

本研究采用化学发光法和荧光发光法测定9种常见黄酮(槲皮素、杨梅素、高良姜素、大豆苷元、染料木素、柚皮素、橙皮素、芹菜素、木犀草素)清除活性氧基团(H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $ONOO^{\cdot-}$)的活性,并选用与人体环境相近的条件: pH 7.8、50 mmol/L 磷酸缓冲液(PBS)、温度 37℃。同时用分光光度法测定黄酮的一级解离常数(pK_{a1}),并探讨黄酮解离常数与其清除活性氧自由基效力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

二氯荧光素-双乙酸酯(DCFH-DA)、鲁米诺、氮蓝四唑(NBT)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)均为色谱纯,槲皮素、杨梅素、高良姜素、大豆苷元、染料木素、柚皮素、橙皮素、芹菜素、木犀草素、水溶性 VE (纯度均为 98%) 美国 Sigma-Aldrich 公司;其他均为国药分析纯试剂。

黄酮母液用甲醇溶解, -20℃ 保存,实验时稀释至适宜浓度。

2',7'-二氯荧光素(DCFH)由 DCFH-DA 在碱性条件下

水解得到^[9]。1 mmol/L DCFH-DA 先与 0.01 mol/L NaOH 在黑暗处氧化 20 min,然后用 0.01 mol/L HCl 中和,最后用 PBS 稀释至终浓度为 5 μ mol/L,避光冻存。

1.2 仪器与设备

SpectraMax M5 酶标仪(配有 SoftMax Pro v5.4 数据处理系统) 美国 Molecular Device 公司; CHI620C 电化学工作站 上海辰华仪器公司; PB-21 pH 计 德国赛多利斯公司。

1.3 方法

1.3.1 清除 H_2O_2 的测定

采用对 H_2O_2 浓度敏感的化学发光剂鲁米诺^[10]来检测。实验时,向 96 孔酶标板中加入不同浓度的黄酮溶液 10 μ L, 0.25 mmol/L 鲁米诺 10 μ L, PBS 170 μ L,最后加入 1.5% H_2O_2 10 μ L 启动化学发光,立即测定并连续测量 6 次,取平均化学发光值。空白对照中加入等量的甲醇。所有实验均重复 3 次,结果取其平均值。

1.3.2 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的测定

$O_2^{\cdot-}$ 将 NBT 还原为甲瓚,甲瓚在波长 560 nm 处有显著吸收。黄酮与 $O_2^{\cdot-}$ 竞争 NBT,从而降低吸光度和反应速率。测定时,向 96 孔酶标板中加入不同浓度的黄酮溶液 20 μ L, 30 μ mol/L NADPH 溶液 20 μ L, 150 μ mol/L NBT 溶液 20 μ L, PBS 120 μ L,最后加入 100 μ mol/L PMS 20 μ L 立即测定。空白对照中加入等量的甲醇。每隔 30 s 测定一次吸光度,待数值达到平台后确定其终点吸光度。所有实验均重复 3 次,结果取其平均值。

1.3.3 清除 $ONOO^{\cdot-}$ 的测定

用淬灭流动反应方法合成亚硝基阴离子^[11]。0.6 mol/L HCl + 0.7 mol/L H_2O_2 与 0.6 mol/L NaNO₂ 经 Y 形玻璃管上口灌入混匀,迅速进入装有 60 mL 冷 1.5 mol/L NaOH 的反应瓶,磁力搅拌,淬灭反应。3 种溶液使用前 4℃ 预冷,其灌流量均为 30 mL,速度为 26 mL/min。反应液加入 4 g MnO₂ 搅拌混匀,处理 1~4 min,以清除残存的微量 H_2O_2 ,在负压下过滤后,置于 -20℃ 环境过夜。上层析出的亮黄色溶液即为 $ONOO^{\cdot-}$ 储备液。通过检测此储备液在波长 302 nm 处的吸光度确定其浓度。按公式(1)计算。

$$c(\text{mmol/L}) = A/1670 \times N \times 1000 \quad (1)$$

式中: c 为 $ONOO^{\cdot-}$ 储备液的浓度/(mmol/L); A 为 $ONOO^{\cdot-}$ 溶液在 302 nm 波长处的吸光度; N 为 $ONOO^{\cdot-}$ 储存液稀释倍数。

测定时,在 96 孔酶标板中先加入不同浓度的黄酮溶液 20 μ L, 5 μ mol/L DCFH 溶液 20 μ L, PBS 140 μ L,混匀后加入 1 μ mol/L $ONOO^{\cdot-}$ 20 μ L 立即进行荧光测定,以 488 nm 为激发波长、525 nm 为发射波长测定 60 min 内荧光强度变化,得到荧光强度曲线下面积。所有实验均重复 3 次,结果取其平均值。

1.3.4 解离常数的测定^[6]

KH₂PO₄ 溶于水中, 制成 0.01 mol/L 储备液, 取 100 mL 磷酸盐储备液, 先用稀盐酸或稀碱溶液调节到所需 pH 值(pH 值为 3~9), 然后用双蒸水定容至 500 mL, 最后用 KCl 调节溶液的离子强度。

分别取 9 种黄酮母液用同一离子强度的不同 pH 值磷酸缓冲液稀释至终浓度为 0.1 mmol/L, 以相应 pH 值的磷酸缓冲液为空白对照, 37℃ 条件下在 200~400 nm 波长范围内进行 OD 值扫描, 用 SoftMax Pro v5.4 软件处理数据。

1.3.5 数据分析

以不同黄酮的 EC₅₀ 值(mol/L)来评价其清除自由基的能力, EC₅₀ 值越小表明黄酮清除能力越强。按照式(2)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = (A_c - A_s)/A_c \times 100 \quad (2)$$

式中: A_c 为空白对照组的化学发光值(H₂O₂)、吸光度(O₂⁻·)或曲线下面积(ONOO⁻·); A_s 为样品组的化学发光值(H₂O₂)、吸光度(O₂⁻·)或曲线下面积(ONOO⁻·)。

以清除率为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘出曲线并计算出清除率为 50% 时的浓度 EC₅₀。

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理, 实验结果以平均值±标准差表示, 并采用组间 t 检验, P < 0.05 具有显著性差异, P < 0.01 具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 黄酮清除 H₂O₂、O₂⁻·、ONOO⁻· 的测定结果

体外检测 H₂O₂ 常采用酶体系辣根过氧化物酶(HRP)^[10], 但黄酮如槲皮素是过氧化物酶的底物, 降低酶浓度从而影响检测结果, 因此选用非酶体系用指示剂直接测定 H₂O₂ 的变化。O₂⁻· 的制备通常采用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系、邻苯三酚自氧化体系^[12], 黄酮可能与黄嘌呤氧化酶反应, 且邻苯三酚自氧化体系为强碱性环境, 黄酮易发生自氧化。因而采用非酶体系烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)/吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)产生 O₂⁻·, 并用 NBT 进行吸光值检测。测定 ONOO⁻· 主要选用酪

氨酸的硝化^[13]以及荧光指示剂如罗丹明(DHR)^[14]和二氯荧光素(DCFH)^[9]。酪氨酸经 ONOO⁻· 硝化后生成硝基酪氨酸, 然后用高相液相色谱分离紫外检测, 但此方法耗时且操作复杂。而荧光染料可直接被 ONOO⁻· 氧化, 由荧光强度来判断 ONOO⁻· 的浓度, 简单方便。

由表 1 可知, 清除 H₂O₂ 时, 杨梅素的 EC₅₀ 值最小为 7.4 μmol/L, 其次是槲皮素、高良姜素、木犀草素, 三者不存在显著性差异。芹菜素和橙皮素对 H₂O₂ 有清除作用, 但橙皮素 EC₅₀ 值(575.4 μmol/L)明显高于 VE (341.2 μmol/L)即清除 H₂O₂ 能力不及 VE。相反, 柚皮素、大豆苷元、染料木素对 H₂O₂ 没有清除作用, 反而表现出一定的促进作用。清除 O₂⁻· 自由基时, 9 种黄酮都表现出一定的清除效果, 清除能力排序依次为: 杨梅素>槲皮素>高良姜素>木犀草素>芹菜素>柚皮素>染料木素>橙皮素>大豆苷元。但黄酮 EC₅₀(最小为 57.6 μmol/L)值明显高于其他两种自由基(H₂O₂ 7.4 μmol/L, ONOO⁻· 0.92 μmol/L)。槲皮素、杨梅素、高良姜素的清除能力显著高于 VE, 芹菜素、柚皮素活力与 VE 没有显著差异, 橙皮素和大豆苷元活性明显低于 VE。

清除 ONOO⁻· 时, 仅杨梅素、槲皮素、高良姜素、木犀草素存在 EC₅₀ 值, 且 EC₅₀ 值相对较小, 均低于 VE (2.3 μmol/L), 表明这 4 种黄酮对 ONOO⁻· 比较敏感, 其竞争能力高于荧光染料 DCFH。其余黄酮(芹菜素、橙皮素、柚皮素、大豆苷元、染料木素)对 ONOO⁻· 清除效果较弱, 不存在浓度与清除率之间的线性关系, 即随浓度增加, 清除率没有明显变化。

综合比较 9 种黄酮清除 H₂O₂、O₂⁻· 和 ONOO⁻· 结果可知, 黄酮醇类化合物清除这 3 种活性氧基团的能力最强, 其次是木犀草素, 两者的清除活性显著高于 VE。黄酮酮和异黄酮类化合物对 H₂O₂ 和 ONOO⁻· 没有清除作用, 对 O₂⁻· 有一定的清除效果但活力不及 VE。该实验结果符合之前的研究。何建波等^[15]在研究木犀草素和槲皮素抗氧化能力的差异时发现, 只有 C 环上存在

表 1 黄酮清除 H₂O₂、O₂⁻·、ONOO⁻· 与一级解离常数的测定结果

Table 1 Scavenging activities against H₂O₂, O₂⁻· and ONOO⁻· of flavonoids and their first-order dissociation constants

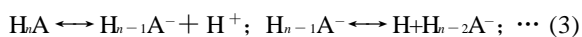
黄酮		—OH 取代位置	EC ₅₀ /(μmol/L)			pK _{a1}
			H ₂ O ₂	O ₂ ^{•-}	ONOO ⁻ •	
黄酮醇	槲皮素	3,5,7,3',4'	10.3 ± 0.4 ^d	74.9 ± 1.4 ^g	1.2 ± 0.2 ^c	6.72 ± 0.03 ^f
	杨梅素	3,5,7,3',4',5'	7.4 ± 0.6 ^d	57.6 ± 1.9 ^h	0.92 ± 0.02 ^c	6.69 ± 0.03 ^f
	高良姜素	3,5,7	12.6 ± 0.1 ^d	87.1 ± 1.5 ⁱ	1.5 ± 0.2 ^b	6.99 ± 0.06 ^c
黄酮	木犀草素	5,7,3',4'	12.8 ± 0.8 ^d	113.8 ± 3.1 ^e	2.1 ± 0.1 ^a	7.15 ± 0.05 ^d
	芹菜素	5,7,4'	118.3 ± 3.7 ^e	144.4 ± 5.5 ^d	—	7.42 ± 0.05 ^c
黄酮酮	橙皮素	5,7,3'	575.4 ± 7.8 ^a	208 ± 13.5 ^b	—	7.54 ± 0.07 ^{ab}
	柚皮素	5,7,4'	—	155.4 ± 5.4 ^{cd}	—	7.62 ± 0.05 ^a
异黄酮	大豆苷元	7,4'	—	293 ± 11.5 ^a	—	7.61 ± 0.06 ^a
	染料木素	5,7,4'	—	165.5 ± 5.9 ^c	—	7.49 ± 0.07 ^{bc}
VE			341.2 ± 8.9 ^b	124.4 ± 5.4 ^{de}	2.3 ± 0.3 ^a	

注: 同列肩标字母不同表示数据间有显著性差异(P < 0.05); —, 黄酮没有 EC₅₀ 值, 对自由基的清除能力不存在浓度与清除率的线性关系。

3 位羟基, 槲皮素邻醌才能进一步转化为更稳定的共轭结构, 从而增强了槲皮素的抗氧化活性。因此黄酮醇清除自由基的能力强于黄酮。徐欣荣等^[16]研究发现黄烷酮中 C 环 2,3 位 C—C 饱和键则完全阻断了随后转化步骤的进行, 从而导致抗氧化性大幅度减弱。

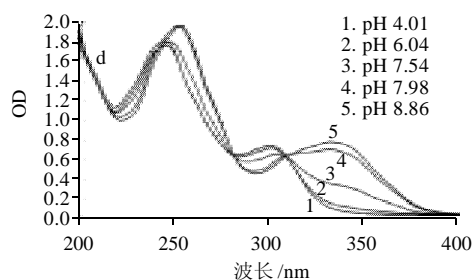
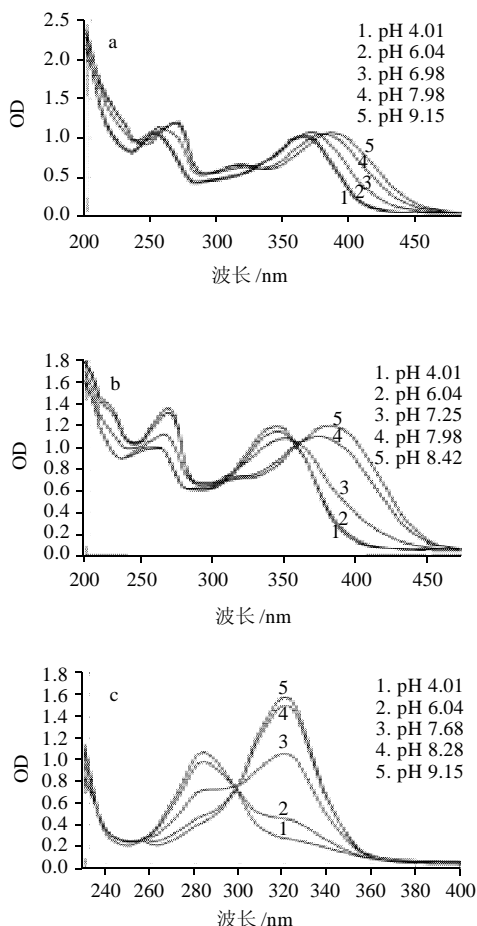
2.2 黄酮一级解离常数的测定结果

黄酮为有机弱酸, 具有多个羟基取代基, 其在溶液中的电离过程如式(3)所示。由于黄酮各个位点解离能力的强弱不同, 在不同 pH 值磷酸缓冲液中, 分子状态与离子状态的物质的量比发生变化, 导致黄酮随溶液 pH 值紫外吸收光谱产生差异。因此, 测定波长的选择对结果的准确性极为重要, 通常选择离子型与分子型吸光度差异较大的, 吸收曲线比较平坦的波长作为测定波长。按照式(4)计算黄酮的解离常数:



$$\text{pK}_{\text{a}} = \text{pH} + \lg \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_1} (4)$$

式中: A_1 是溶液中分子型与离子型共存时的吸光度; A_2 是溶液中只存在离子型时的吸光度; A_3 是溶液中只存在分子型时的吸光度。



a. 槲皮素; b. 木犀草素; c. 橙皮素; d. 大豆苷元。

图2 槲皮素、木犀草素、橙皮素和大豆苷元在不同 pH 值的光谱吸收图

Fig.2 Absorption spectra of quercetin, luteolin, hesperitin and daidzein under various pH conditions

图2为槲皮素、木犀草素、橙皮素和大豆苷元在 pH4~9 的光谱吸收图。黄酮类化合物主要存在两个紫外吸收带: B 环的肉桂酰基形成峰带 I (300~400nm) 及 A 环的苯甲酰基形成峰带 II (240~280nm)。随着 pH 值的变化, 黄酮峰形发生明显变化, 即酸碱平衡状态对黄酮的紫外吸收光谱有重要影响。

槲皮素和木犀草素的紫外光谱图相似, 随 pH 值升高, 两者的峰带 I 和 II 发生不同程度红移。因为槲皮素和木犀草素都具有多个羟基取代基, 在同一 pH 值条件下黄酮可能存在多种解离形式, 因此较难观察到明显的等吸光点。橙皮素和大豆苷元由于肉桂酰基被破坏, 导致峰带 I 吸收弱而常作为峰带 II 的肩峰出现, 但带 I 的强度随着 pH 值升高而显著增强, 在 pH 值为 7.68 时橙皮素峰带 I 强于峰带 II, 但 pH 值大于 8.28 后峰带 I 消失。大豆苷元峰带 I 的强度始终高于峰带 II。两者在 B 环上仅有一个羟基取代基, 可观察到明显的等吸光点。

9 种黄酮的一级解离常数结果如表 1 所示, 排序依次为: 柚皮素~大豆苷元~橙皮素>染料木素>芹菜素>木犀草素>高良姜素>槲皮素~杨梅素。这与 Tsujimoto 等^[17]报道的结果相近, 但报道中芹菜素和染料木素的 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 均为 7.08, 比实验的测定值(7.42、7.49)偏小。

黄酮醇类化合物由于结构中 A 环和 B 环存在共轭效应导致电子离域使羟基基团更容易去质子化, 因此 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 值偏酸化。杨梅素和槲皮素 B 环上的邻位羟基使其 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 值明显低于高良姜素。Sauerwald 等^[18]曾指出黄酮首次离子化发生在 B 环的 4' 位, 第二次离子化在 A 环的 7 位。这与本次实验结果相符。高良姜素 4' 位没有羟基, $\text{pK}_{\text{a}1}$ 值碱化。而杨梅素 B 环上存在多个邻位羟基, 使 4' 位羟基的离子化相对槲皮素容易。黄烷酮和异黄酮类化合物因不存在共轭结构, $\text{pK}_{\text{a}1}$ 值均大于 7, 偏于碱性。

2.3 黄酮解离常数与其清除活性氧能力相关性分析

陈秀敏等^[19]研究表明黄酮化合物上 O—H 解离焓和电离势越低, 则该化合物越容易抽氢解离, 其抗氧化活性越强, 即其解离常数 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 值越小, 清除活性氧能

力越强, EC_{50} 值越小。此外, 具有多个酚羟基的化合物, 其清除自由基活性主要取决于其最低的 O—H 解离焓。因此采用 Pearson 相关性分析黄酮清除活性氧活力与其一级解离常数的相关性。从图 3 可以看出, 黄酮清除 $O_2^{\cdot-}$ ($r = 0.911$, $P < 0.01$) 和 $ONOO^{\cdot-}$ ($r = 0.866$, $P < 0.01$) 的能力与一级解离常数呈极显著性相关($P < 0.01$); 黄酮清除 H_2O_2 的能力与其解离常数不相关($r = 0.720$)。黄酮清除 $ONOO^{\cdot-}$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 的机理与清除 H_2O_2 的机理可能是由于溶剂环境、自由基性质以及指示剂的不同而存在差异。 H_2O_2 采用化学发光剂鲁米诺检测, 而 $ONOO^{\cdot-}$ 采用荧光染料 DCFH, $O_2^{\cdot-}$ 利用 NBT 间接检测。同时, $ONOO^{\cdot-}$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 均为体内自由基, 而 H_2O_2 是非自由基属于活性氧基团。

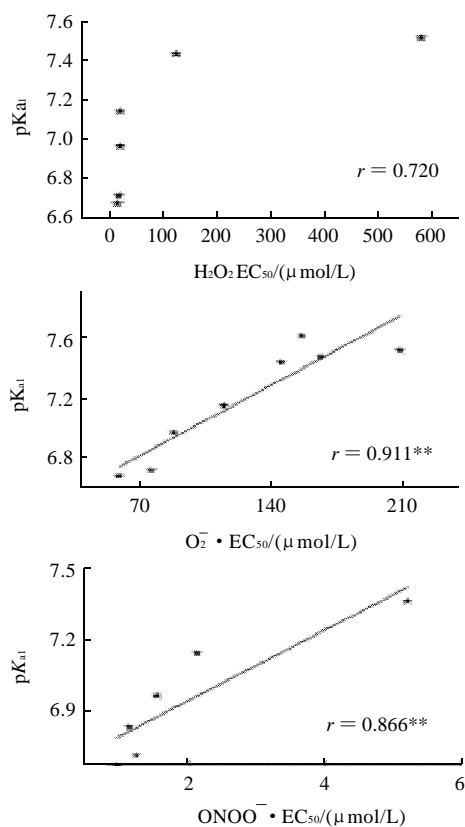


图 3 黄酮清除 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $ONOO^{\cdot-}$ 活性与其一级解离常数的相关性分析

Fig. 3 Correlation between the first-order dissociation constants and the scavenging activities of flavonoids against H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and $ONOO^{\cdot-}$

3 结 论

本实验采用 3 种不同的活性氧(H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $ONOO^{\cdot-}$) 对黄酮类化合物的体外抗氧化能力进行全面研究, 并分析与黄酮解离常数的相关性。从结果可看出, 黄酮醇类化合物清除活性氧能力最强, 明显高于 VE; 黄酮醇和异黄酮类化合物对 H_2O_2 和 $ONOO^{\cdot-}$ 没有清除作用, 且对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活力不及 VE。黄酮清除 $O_2^{\cdot-}$ ($r = 0.911$)

和 $ONOO^{\cdot-}$ ($r = 0.866$) 的能力与一级解离常数有极显著相关性($P < 0.01$), 清除 H_2O_2 与一级解离常数不相关($r = 0.720$)。因此, 黄酮的一级解离常数越低, 其清除活性氧(H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $ONOO^{\cdot-}$) 的能力越强。黄酮上 2,3 位双键和 3 位羟基增强了黄酮的共轭效应, pK_{a1} 值酸化, 且 B 环上多个邻位羟基的存在使 4' 位羟基更容易离子化。除一级解离常数之外, 黄酮还存在二级、三级解离常数, 可进一步探讨黄酮二三级解离常数对其抗氧化能力的影响。

参考文献:

- [1] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.
- [2] MEDINA I, TERESA M, GERMAN J, et al. Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidants in tuna lipids during thermal oxidation[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(12): 4873-4879.
- [3] DRAGSTED L O, STRUBE M, LETH T. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? [J]. Eur J Cancer Pre V, 1997, 6: 522-528.
- [4] PACKER L, HIRAMATSU M, YOSHIKAWA T. Antioxidant food supplements in human health[M]. New York: Academic Press, 1999: 103-112.
- [5] QIANG Z, ADAMS C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics[J]. Water Res, 2004, 38(12): 2874-2878.
- [6] ALLEN R I, BOX K J, COMER J E A, et al. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs[J]. Pharm Biomed Anal, 1998, 17(4/5): 699-705.
- [7] BELTRAN J L, SANLI N, FONRODONA G, et al. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media[J]. Anal Chim Acta, 2003, 484(2): 25-30.
- [8] GLUCK S J, CLEVELAND J A. Capillary zone electrophoresis for the determination of dissociation constants[J]. J Chromatogr A, 1994, 680(1): 43-46.
- [9] ALDINI G, YEUM K J, RUSSELL R M, et al. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma[J]. Free Radicals in Biology and Medicine, 2001, 31(9): 1043-1050.
- [10] MARTÍNEZ-TOMÉ M, GARCÍA-CARMONA F, MURCIA M A. Comparison of the antioxidants and pro-oxidants activities of broccoli amino acids with those of common food additives[J]. J Sci Food Agric, 2001, 81: 1019-1026.
- [11] BECKMAN J S, BECKMAN T W, CHEN J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 1620-1624.
- [12] ROBACK J, GRYGLEWAKI R. Flavonoids are scavengers of superoxide anions[J]. Biochemical Pharmacology, 1988, 37: 837-841.
- [13] PANNALA A, RAZAQR, HALLIWELL B, et al. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation?[J]. Free Radical Biol Med, 1998, 24: 594-606.
- [14] KOOY N W, ROYALL J A, BECKMAN J S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123[J]. Free Radical Biol Med, 1994, 16(2):149-156.
- [15] 何建波, 独家启, 袁圣杰, 等. 木犀草素与槲皮素抗氧化性能差异的电化学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 37-40.
- [16] 徐欣荣, 何建波, 程萍. 黄酮醇抗氧化剂构效关系的电化学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 6-9.
- [17] TSUJIMOTO M, HORIE M, HONDA H, et al. The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32: 671-676.
- [18] SAUERWALD N, SCHWENK M, POLSTER J, et al. Spectrometric pK determination of daphnetin, chlorogenic acid and quercetin[J]. Z Naturforsch, 1998, 53(B): 315-32.
- [19] 陈秀敏, 李西平. 对 15 种黄酮类化合物清除自由基活性的理论评价[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(1): 68-74.