

# 黄酮类化合物抗氧化反应性的构效关系

孙庆雷, 王 晓, 刘建华, 程传格, 江婷

(山东省科学院分析测试中心, 山东 济南 250014)

**摘 要:** 根据前线轨道理论, 应用结构化学和量子化学半经验计算方法研究了黄酮类化合物的羟基位置和数量对抗氧化性的影响, 获得反映黄酮类化合物抗氧化能力的特征结构的量化参数, 并将黄酮化合物不同位置酚羟基氧原子的  $f_r$  与酚羟基的抗氧化性相关联。结果表明: 黄酮化合物 C 环比 A 环的酚羟基氧原子有较高的  $f_r$ , 同时 C 环邻位和对位的酚羟基氧原子比间位酚羟基氧原子有较高的  $f_r$ , 反映出不同位置的酚羟基有不同的抗氧化能力。随着 C 环上酚羟基数量的增加, 不但 C 环上已有酚羟基氧原子的  $f_r$  增加, 而且 A 环上的酚羟基氧原子也大幅度增加, 说明 C 环上酚羟基的增加不但使 C 环上酚羟基的抗氧化性增加, 而且也使 A 环上酚羟基的抗氧化性增加。 $(\sum f_r)$  和  $T_r$  的线性回归结果表明,  $(\sum f_r)^2$  和  $T_r$  之间存在良好的线性关系。结论: 黄酮类化合物特征结构的量化参数  $\sum f_r$  可以作为预测黄酮类化合物抗氧化性的参数。

**关键词:** 黄酮; 抗氧化性; 量子化学; AM1

## Study on Structure-Antioxidation Relationship of Plant Flavonoids

SUN Qing-lei, WANG Xiao, LIU Jian-hua, CHENG Chuan-ge, JIANG Ting

(Center of Analysis and Test Center, Shandong Academy of Science, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Based on the frontier orbital theory, the effects of position and number of phenolic-OH on the antioxidant of plant flavonoids were systematically investigated by means of structural chemistry and semi-empirical calculation method of quantum chemistry. And the quantum parameters of characteristic structure reflecting the antioxidant of flavonoids were also obtained. And the relationship between  $f_r$  and antioxidant of flavonoids was also investigated. The results showed that the phenolic-OH in C ring had higher  $f_r$  than those in A ring, and the ortho-phenolic-OH and meta-phenolic-OH had higher  $f_r$  than para-phenolic-OH and suggested that the position of phenolic-OH in flavonoids had great effect on the antioxidant activity. With the increasing of phenolic-OH in C ring, the  $f_r$  in both C ring and A ring would all increase, which indicated the increase of antioxidant of phenolic-OH in both C ring and A ring. And there also existed good line regression between  $\sum f_r$  and  $T_r$ . The structural characteristic parameter of  $\sum f_r$  calculated by semi-empirical calculation method of quantum chemistry could be used to predict

收稿日期: 2004-04-07

作者简介: 孙庆雷(1976-), 男, 博士, 研究方向为天然产物的分离提纯与构效研究。

- |  |  |
|--|--|
| <p>[2] Wheeler T L, Koohmaraie M, Cundiff L V, et al. Effects of cooking and shearing methodology on variation in Warner-Bratzler shear force values in beef[J]. Journal of Animal Science, 1994, 72: 2325-2330.</p> <p>[3] Adams C H, Arthaud V H. Influence of sex and age differences on tenderness of beef[J]. Journal of Animal Science, 1963, 22: 1112.</p> <p>[4] Reagan J O, Carpenter Z L, Smith G C. Age-related traits affecting the tenderness of the bovine longissimus muscle[J]. Journal of Animal Science, 1976, 43: 1198.</p> | <p>[5] Harris D L, Graham P P, Kelly R F, et al. An appraisal of beef characteristics that aid in predicting acceptability[J]. Journal of Animal Science, 1965, 24: 862.</p> <p>[6] Kim C J, Lee E S. Effects of quality grade on the chemical, physical and sensory characteristics of Hanwoo (Korean native cattle) beef[J]. Meat Science, 2003, 63: 397-405.</p> <p>[7] Berry B W. Tenderness of beef loin steaks as influenced by marbling level, removal of subcutaneous fat, and cooking method[J]. Journal of Animal Science, 1993, 71: 2412.</p> |
|--|--|

theantioxidationactivityofflavonoids.

Key words: flavonoids; antioxidation; quantum chemistry; AM1

中图分类号 TS201

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)04-0069-05

黄酮类化合物是广泛分布在植物中的一类化合物。现已发现, 黄酮类化合物具有多种生理功能和药用价值, 如保护心脑血管、保肝、抗菌消炎、抗辐射和抗肿瘤等<sup>[1~5]</sup>, 其中最惹人注目的是其抗氧化作用。已经证实, 人的病理(肿瘤、炎症、动脉粥样硬化等)、生理(衰老)与自由基有密切关系。大多数自由基的氧化性很强, 在生理和生物化学中, 极少量的自由基就可能对人的身体健康造成很大的损害。防止自由基的氧化作用, 对防治疾病以及人的健康有积极意义。黄酮是具有酚羟基的一类还原性化合物, 在复杂反应体系中, 由于其自身被氧化而具有抗氧化作用。黄酮在生物体外和体内都具有较强的抗氧化性。目前对黄酮类化合物抗氧化性的研究主要侧重于功效和构效关系, 而对于从量子化学的理论角度阐述黄酮的抗氧化机理的研究还相对较少。用结构化学和量子化学的方法探讨影响黄酮类化合物抗氧化活性的结构因素, 深入研究黄酮类化合物的抗氧化机理, 对于天然抗氧化剂的筛选、改性, 以获得性能更加优良的抗氧化剂具有重要的理论和现实意义。本文利用量子化学方法对黄酮类化合物的结构性质参数进行了计算, 从理论上揭示了分子中羟基数量和位置对黄酮类化合物抗氧化性的影响。

## 1 计算方法

### 1.1 计算方法

选择合适的黄酮类模型化合物, 首先利用分子力场(MM2)对分子进行优化, 然后利用半经验量子化学程序包MOPAC中的AM1方法进行计算。

### 1.2 前线轨道理论

前线分子轨道是指分子轨道给出的分子轨道能谱序列中处于允占的最高能级的分子轨道(HOMO)和最低能级空的分子轨道(LUMO)。前线分子轨道及其内的电子是分子中最敏感的部分, 对于分子的化学性质特别是反应活性有着决定性的作用。在亲电反应中, 亲电试剂选择性地进攻HOMO中伸展最大的位置; 在亲核反应中, 亲核试剂进攻LUMO中伸展最大的位置; 在自由基反应中, 反应过程是受HOMO和LUMO电子密度总和和 $f_r$ 的大小来控制的<sup>[6,7]</sup>。

$$f_r = \sum_i (C_i^{HOMO})^2 + \sum_i (C_i^{LUMO})^2$$

其中 $r$ 是分子中的原子 $i$ 的原子轨道数(2s, 2Px, 2Py, 2Pz),  $f_r$ 越大, 反应性越强, 也就越容易被自由基攻击而和自由基反应。黄酮类化合物抗氧化性是由于

与自由基反应而阻断自由基的链传递反应, 因此该过程是一个自由基反应过程。根据前线轨道理论, 黄酮类化合物抗氧化性反应过程是受HOMO和LUMO电子密度总和的大小来控制的。首先发生反应的应该是HOMO和LUMO电子密度总和 $f_r$ 最大的位置, 同时原子HOMO和LUMO电子密度的大小也反映了该位置发生反应可能性的高低。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄酮类化合物的结构特征及模型化合物的选择

黄酮类物质是指两个苯环通过中央三碳链相互联结而成的一系列化合物, 大部分有如图1(a)所示的骨架。这类化合物的A环具有间位羟基取代, B环有不同结构, C环可以含有邻位取代或间位取代酚羟基, 一般没有对位取代。一般认为, 黄酮类化合物的抗氧化性是通过酚羟基与自由基反应, 形成共振稳定半醌式自由基结构, 从而中断自由基的链式反应<sup>[8,9]</sup>。因此对黄酮抗氧化性的贡献基本上来自分子中的酚羟基。大量实验证实, 黄酮各个环上的酚羟基有不同的抗氧化活性, C环上的酚羟基的抗氧化活性最高, A环上的抗氧化活性最弱<sup>[8~10]</sup>。对于黄酮各个环上的酚羟基抗氧化活性的差异基本上来自实验结果, 对从理论上揭示黄酮各个环上的酚羟基抗氧化活性的差异的研究还很少。为此下文以前线轨道理论为理论依据, 通过比较黄酮各个环上的不同酚羟基HOMO和LUMO电子密度的差异从理论上揭示分子中酚羟基的位置和数量对分子抗氧化性的影响。应用量子化学进行计算时, 选用Chrysin作为模型化合物, 其结构示意图如图1(b)所示, 分别考察酚羟基数量和位置对分子抗氧化性的影响, 包括C环上没有酚羟基、有1个和两个酚羟基时各酚羟基氧原子的 $f_r$ , 以及C环上的一个酚羟基在邻、间和对位时各酚羟基氧原子的 $f_r$ , 从而反映分子的抗氧化性能力的高低。

### 2.2 酚羟基位置的影响

黄酮类化合物的抗氧化性是通过酚羟基与自由基反应, 形成共振稳定的半醌式自由基结构, 从而中断自由基的链式反应, 从而表现出抗氧化性。已有的研究结果证实, 黄酮各个环上的酚羟基有不同的抗氧化活性, C环上的酚羟基的抗氧化活性最高, A环上的抗氧化活性最弱。以分子A作为模型分子, 考察了C环上的酚羟基在不同位置时酚羟基中氧原子的 $f_r$ 值, 如表1所示。

从表1中可以看出, 对于同分异构体B0、BM和

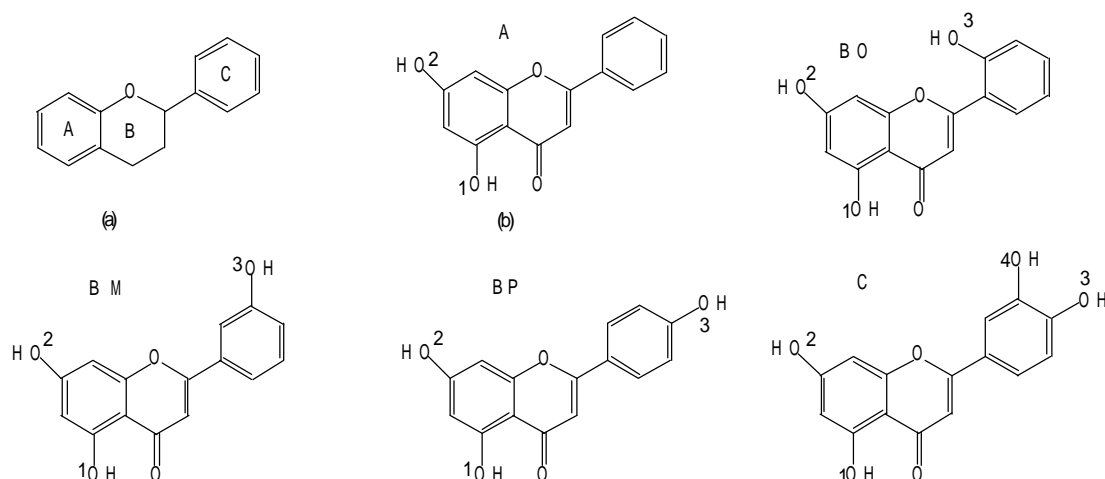


图1 黄酮类化合物的分子骨架和模型化合物  
Fig.1 The model compounds of flavonoids

表1 不同分子中不同位置酚羟基的 $f_r$   
Table 1 The  $f_r$  of oxygen atom in hydroxyl at different position in the molecule

	$f_r$		
	1	2	3
B O	0.024615	0.010225	0.091014
B M	0.038108	0.009136	0.054711
B P	0.022108	0.010638	0.089446

BP, 不同位置酚羟基中氧原子的 $f_r$ 值差别较大, 其中酚羟基在对位时氧原子的 $f_r$ 值最大, 间位最小, 说明对位的酚羟基最易与自由基反应, 其抗氧化性也最强。同时也可以看出BO和BP分子的酚羟基氧原子的 $f_r$ 非常相近, 而与BM相差较大, 这主要是因为酚羟基在临位和对位时与自由基反应, 生成的半醌式黄酮自由基比间位时有较大的共轭体系, 电荷分布也更为分散, 故而半醌式自由基也更稳定, 因此更易与自由基反应, 从而表现出较高的抗氧化性。同时从C环上酚羟基与A环上酚羟基 $f_r$ 的比较也可以看出, 虽然酚羟基在C环上不同位置的 $f_r$ 值相差较大, 但均大于A环上酚羟基的 $f_r$ 值, 说明C环上酚羟基比A环上酚羟基更易与自由基反应, 从而表现出更强的抗氧化性, 这与许多研究中报道的C环上的酚羟基的抗氧化活性较高, 而A环上的酚羟基抗氧化活性较弱的实验结果一致。

### 2.3 酚羟基数量的影响

黄酮类化合物的抗氧化性不仅与分子中羟基的位置有关, 而且与分子中酚羟基的数量密切相关, 已有的实验研究结果表明, 随着C环上酚羟基数量的增加, 黄酮类化合物表现的抗氧化性大幅度增加。为此以分子BP和C为例, 通过量子化学计算不同酚羟基氧原子的 $f_r$ 值, 从理论上进一步揭示分子中酚羟基抗氧化性的理论依据。从图1中可以看出, 分子BP和C的差别在于C

环酚羟基的邻位较BP多了一个酚羟基。利用半经验量子化学AM1方法对BP和C分子中各酚羟基氧原子的 $f_r$ 进行了计算, BP和C分子各酚羟基氧原子的 $f_r$ 值如表2所示。

表2 不同分子中不同位置酚羟基的 $f_r$   
Table 2 The  $f_r$  of oxygen atom in hydroxyl at different position in the molecule

	$f_r$			
	1	2	3	4
A	0.058281	0.012162		
B O	0.024615	0.010225	0.091014	
B M	0.038108	0.009136	0.054711	
B P	0.022108	0.010638	0.089446	
C	0.01313	0.07279	0.106261	0.073343

从表2中可以看出, 随着酚羟基的增加, C分子中对位酚羟基的 $f_r$ 较BP中酚羟基的 $f_r$ 增加, 从0.089446增加到0.10626, 说明随着其邻位酚羟基数量的增加, 对位酚羟基本身的 $f_r$ 也增加, 而且新增加的酚羟基的 $f_r$ 值也较高, 仅稍低于BP中的酚羟基, 说明新增加的酚羟基的抗氧化性也较强。同时邻位酚羟基的增加对A环上的酚羟基的抗氧化性也有较大的影响, 虽然从C环上没有酚羟基到增加到一个酚羟基时A环上的两个酚羟基氧原子的 $f_r$ 略有降低, 但C环上的酚羟基氧原子的 $f_r$ 却较高, 因而分子的总体抗氧化性增加, 当C环上的酚羟基从一个增加到两个时, 不但C环上两个酚羟基氧原子的 $f_r$ 都较高, 而且A环上的其中一个酚羟基氧原子的 $f_r$ 也大幅度增加, 并与C环上间位酚羟基的 $f_r$ 相近, 说明C环上酚羟基的增加不仅使C环上对位酚羟基的抗氧化性增加, 同时也使A环上间位酚羟基的抗氧化性增加, 从而使分子表现出的总体抗氧化性大幅度增加。

### 2.4 量化参数与抗氧化性的关系

表3 不同分子中不同位置酚羟基的  $f_r$ ,  $\Sigma f_r$ ,  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$   
Table 3 The  $f_r$ ,  $\Sigma f_r$ ,  $(\Sigma f_r)^2$  and  $T_r$  of oxygen atom in hydroxyl in the molecule

	$f_r$				$\Sigma f_r$	$(\Sigma f_r)^2$	$T_r$ [11~13]
	1	2	3	4			
A	0.058281	0.012162			0.07044	0.004962	0.089
B O	0.024615	0.010225	0.091014		0.12585	0.015838	
B M	0.038108	0.009136	0.054711		0.10196	0.010396	
B P	0.022108	0.010638	0.089446		0.12219	0.01493	0.161
C	0.01313	0.07279	0.106261	0.073343	0.26552	0.070501	1.008

通过上面的分析可以看出, 黄酮类化合物的抗氧化反应性不仅与酚羟基的位置有关, 而且与酚羟基的数量也密切相关, 通过半经验的量子化学方法可以得到反映酚羟基抗氧化反应性的参数  $f_r$ , 同时由于  $f_r$  大小也反映了酚羟基的位置和数量的影响, 因此  $f_r$  可以作为反映黄酮类化合物结构特征的量化参数, 如果能将  $f_r$  与黄酮类化合物的抗氧化能力相关联, 就可以获得黄酮类化合物的结构与其反应性之间的定量关系, 从而指导新的黄酮类抗氧化剂的合成和活性预测。现以黄酮中酚羟基的  $f_r$  之和  $\Sigma f_r$  作为反映黄酮类化合物结构的量化参数, 以黄酮类化合物的抗氧化能力  $T_r$  作为抗氧化活性的参数, 将  $\Sigma f_r$  和  $T_r$  进行相关性回归关联, 黄酮类化合物各分子的特征参数如表3所示。同时将  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  进行线性回归, 由于缺少分子 B O 和 B M 的  $T_r$  数据, 只进行了三个分子  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  的线性回归, 结果如图2所示。从图上看,  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  的线性回归结果较好, 回归系数为 0.99747, 说明  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  之间存在良好的线性关系, 因此反映黄酮类化合物结构特征的量化参数  $\Sigma f_r$  可以作为预测黄酮类化合物抗氧化性的参数,  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  的线性回归方程为:  $T_r = -0.01562 + 14.43524(\Sigma f_r)^2$ 。由于缺少部分化合物的  $T_r$  数据,  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  的关系及回归方程的有效性和应用范围还不明确, 还需要对其他大量的黄酮类化合物做进一步的研究和验证, 这将在下一步的工作中详细研究。

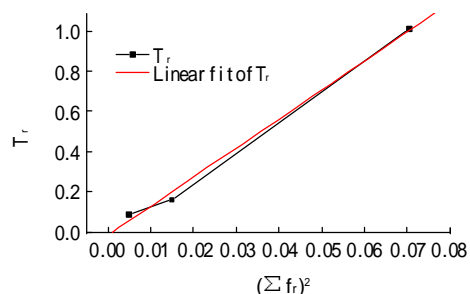


图2  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  的线性关系

Fig.2 The line regression results between  $(\Sigma f_r)^2$  and  $T_r$

### 3 结论

应用结构化学和量子化学半经验计算方法对黄酮的模型化合物进行了计算, 考察了酚羟基位置和数量对抗

氧化性的影响, 并对反映黄酮类化合物结构的量化参数  $\Sigma f_r$  和反映其抗氧化能力的  $T_r$  进行了关联, 发现黄酮化合物 C 环比 A 环的酚羟基氧原子有较高的  $f_r$ , 同时 C 环邻位和对位的酚羟基氧原子比间位酚羟基氧原子有较高的  $f_r$ , 反映出不同位置的酚羟基有不同的抗氧化能力。随着 C 环上酚羟基数量的增加, 不但 C 环上已有酚羟基氧原子的  $f_r$  增加, 而且 A 环上的酚羟基氧原子也大幅度增加, 说明 C 环上酚羟基的增加不但使 C 环上酚羟基的抗氧化性增加, 而且也使 A 环上酚羟基的抗氧化性增加。 $(\Sigma f_r)$  和  $T_r$  的线性回归结果表明,  $(\Sigma f_r)^2$  和  $T_r$  之间存在良好的线性关系, 说明反映黄酮类化合物结构特征的量化参数  $\Sigma f_r$  可以作为预测黄酮类化合物抗氧化性的参数, 对回归方程的有效性和应用范围还需要对其他大量的黄酮类化合物做进一步的验证, 这将在下一步的工作中详细研究。

### 参考文献:

- [1] 汤容, 樊瑞霞. 大豆异黄酮抗癌作用的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(7): 435.
- [2] Hou Y N, Zhu X Y, Cheng G F. Study on the anti-inflammatory mechanism of baicalin[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2000, 35(3): 161-164.
- [3] 陈季武, 胡天喜, 朱大元. 11种黄酮类化合物清除超氧阴离子的构效关系研究[J]. 中国药理学杂志, 2001, 37(1): 57.
- [4] 黄酮类化合物抗氧化活性的结构因素[J]. 北方工业大学学报, 2001, 13(1): 36.
- [5] Jankun J, Selman S H, Swiercz R, et al. Why drinking green tea could prevent cancer[J]. Nature, 1997, 387(6): 561.
- [6] 福井谦一. 化学反应与电子轨道[M]. 科学出版社, 1985. 33.
- [7] Lee B-D, Iso M, Hosomi M. Prediction of fenton oxidation positions in polycyclic aromatic hydrocarbons by frontier electron density[J]. Chemosphere, 2001, 42: 431-435.
- [8] Roginsky V A, Barsukova T K, et al. Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during per-oxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solution[J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(6): 777-786.
- [9] 胡春. 黄酮类化合物的抗氧化性质[J]. 中国油脂, 1996, 21

# 双歧杆菌免疫血清的制备及性质分析

袁耀武, 张 伟, 马 雯, 李英军, 林 杨  
(河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001)

**摘 要:** 通过动物免疫方法制备了长双歧(*B. longum*)和两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)的免疫血清, 经ELISA检测, 血清效价达到1:1280。用此血清和乳制品中常见细菌反应, 未见明显交叉反应, 这一结果为双歧杆菌发酵乳制品中双歧杆菌的血清学检测提供了参考。

**关键词:** 双歧杆菌; 免疫血清; ELISA

## Preparation and Analysis of Bifidobacterium Immune Serum

YUAN Yao-wu, ZHANG Wei, MA Wen, LI Ying-jun, LIN Yang  
(College of Food Science and Technology, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** In this experiment, we were prepared *B. Longum* and *B. Bifidum* immune serum by inoculating animals, with the titer of the serums to reach 1:1280 by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. The serums reacted highly specifically with *Bifidobacteria*, and hardly reacted with other familiar bacteria in dairy products. The result provided a base for serological detecting of *Bifidobacterium* in dairy products.

**Key words:** *Bifidobacterium*; immune serum; ELISA

中图分类号: R392.33

文献标识码: A

中图分类号: 1002-6630(2005)04-0073-03

双歧杆菌是人类及动物肠道中对机体有益的正常菌, 它与机体健康状况密切相关。目前, 双歧杆菌饮料及发酵乳制品在日本及西方国家市场颇为流行。但是双歧杆菌由于严格厌氧性, 所以按传统的食品卫生检验方法检测起来比较繁琐。血清学检测方法是一种快速、简便的检测方法, 对食品中一些细菌可以起到快速检测作用, 本文旨在探讨血清学检测方法对食品中双歧杆菌检测的可行性。试验以用于发酵乳制品的长双歧杆菌(*B. longum*)和两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)为材料, 制备出两种免疫血清, 并将它们与食品中常见的细菌反应, 均未出现明显的交叉反应, 这种结果为食品中双歧杆菌血清

学的检测提供了可行性的参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 长双歧杆菌(*B. longum*)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*), 本实验室保存。

1.1.2 实验动物 KM 小白鼠, 由河北医科大学实验动物学部提供。

1.1.3 培养基及试剂 改良 MRS 液体培养基, 卡介苗, 弗氏不完全佐剂, 酶标抗鼠抗体。

1.1.4 设备 Hungate 厌氧装置, 恒温培养箱。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 抗原制备 将长双歧杆菌及两歧双歧杆菌采用

收稿日期: 2004-02-16

作者简介: 袁耀武(1970-), 男, 讲师, 本科, 主要从事微生物及血清学检验方面研究。

(4):18-21.

- [10] Van Acker S A B E, Koymans L M H, Bast A. Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, 15: 311-328.

- [11] Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. *Journal of Nutrition*, 1998, 128: 1003-1007.

- [12] Serafini M, et al. *Journal of Nutrition*, 2000, (11): 585-590.

- [13] Skaper SD, et al. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22: 669-678.