

紫外光解法研究醌类光敏剂对亚硝酸胺合成的阻断作用

黄娟 鲍小丹 赖强 马建华

(集美大学生物工程学院 厦门 361021)

摘要 利用紫外光解法研究了醌类光敏剂—2-磺酸钠蒽醌(AQS)和2-甲基-1,4-萘醌(MQ)对亚硝酸胺合成的阻断效果,并与相同条件下抗坏血酸(Vc)进行了对照。探讨了浓度、反应时间、紫外辐射波长对AQS、MQ阻断亚硝酸胺效果的影响。研究表明,反应时间1h、反应浓度为0.96 mmol/L、紫外辐射波长365 nm时,AQS、MQ及Vc对亚硝酸胺的阻断率最高,阻断能力依次是:MQ>AQS>Vc。同时,用分光光度法测定了它们对亚硝酸盐的清除作用,发现相同条件下三者对亚硝酸钠的清除能力依次为:Vc>MQ>AQS。

关键词 磺酸钠蒽醌,萘醌,阻断亚硝酸胺合成,紫外光解法

中图分类号 O656.2, O625.46+2, O625.46+3

醌类化合物广泛存在于自然界中,许多中药中都含有醌类成分。醌类化合物因其具有氧化还原特性,在生物的氧化还原反应过程中起着重要的电子传递作用,能促进或干扰某些生化反应,具有抗心脑血管疾病、抗癌、抗菌、泻下等生理活性^[1]。近年来,醌类衍生物2-磺酸钠蒽醌(AQS)和2-甲基-1,4-萘醌(MQ)作为强光敏剂的模型化合物在光医学、光生物领域得到广泛关注,目前报道较多的是利用时间分辨研究手段研究AQS、MQ与生物大分子的相互作用^[2-4]。有关AQS、MQ对亚硝酸胺阻断作用及其清除亚硝酸盐的研究迄今尚未见报道。亚硝酸盐广泛存在于自然界环境中,是亚硝酸胺类化合物的前体物质。在酸性环境中,过量的亚硝酸盐也可以转化为亚硝酸胺,亚硝酸胺是目前所知的最强的化学致癌物质之一,亚硝酸胺能引起人和动物肝脏等多种器官的恶性肿瘤。清除体内亚硝酸盐是防止癌症的有效途径之一^[5]。为探索AQS、MQ这类醌类典型化合物是否能阻断亚硝酸胺合成,本研究首次以254 nm、365 nm紫外光为辐照源,利用稳态分析方法分别测定了AQS、MQ对亚硝酸胺合成的阻断率,并与抗坏血酸作用效果进行对照。所获研究结果不仅有助于进一步开拓醌的生物功能,而且可为进一步阐释它们光生物活性的分子机制提供重要依据。

1 实验材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂 2-磺酸钠蒽醌(AQS):上海化学试剂

分装厂;2-甲基-1,4-萘醌(MQ):Sigma公司;抗坏血酸(Vc):广东汕头西陇化工厂;其余试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

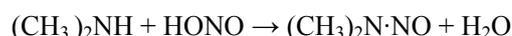
1.1.2 仪器 ZF-20C暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村光电仪器厂);CARY50紫外-可见分光光度计(东南化学仪器有限公司);UV-2000紫外-可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司);FA51001电子天平(上海精科天平有限公司);pHS-3TC(0.01级)精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对亚硝酸胺合成阻断作用的测定 控制适宜的酸性条件,用二甲胺或盐酸二甲胺与温热的亚硝酸钠反应,即可合成二甲基亚硝酸胺。其化学反应方程式为^[6]:



其实质为:



在365 nm和254 nm紫外光照射下,当往样品(AQS或MQ)溶液中加入二甲胺与亚硝酸钠时,样品优先与亚硝酸钠作用,使得二甲胺不能与亚硝酸钠反应,达到阻止亚硝酸胺生成的目的。据此可以比较,相同条件下生成亚硝酸胺的多少来反映样品阻断能力的强弱。

在紫外光照射下,二甲基亚硝酸胺可分解成二甲

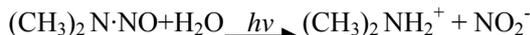
福建省自然科学基金(2009J01032)、厦门市集美区科技计划项目(350211Z20092C01)、福建省教育厅基金(JA08136)、集美大学中青年创新团队专项基金(2006A003)资助

第一作者:黄娟,女,1983年3月出生,2007年毕业于集美大学,现为集美大学食品科学专业在读研究生

通讯作者:马建华

收稿日期:初稿2009-05-18,修回2009-07-03

基仲胺和亚硝酸根, 反应式如下:



亚硝酸根与对氨基苯磺酸重氮化后, 再与 α -萘胺偶合生成红色化合物, 使用 Cary50 紫外分光光度计在 400~800 nm 波长范围内扫描该化合物的最大吸收波长, 测出该化合物的吸光度值, 即可计算上述反应液中亚硝胺含量的多少^[7]。

在空气饱和的状态下, 以 365 nm 或 254 nm 为紫外辐照波长, 采用紫外光解法, 操作及测定方法按照文献进行^[7], 同时做浓度、反应时间等影响因素实验, 并以 Vc 做对照。

$$\text{阻断率} / \% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 , 未加样品时 NaNO_2 的吸光度值 (以试剂空白溶液为参比溶液); A , 加入样品后 NaNO_2 的吸光度值 (以样品为参比溶液)。

1.2.2 对亚硝酸钠清除作用的测定 NO_2^- 在酸性条件下, 与对氨基苯磺酸发生重氮化反应, 生成的物质在显色剂盐酸萘乙二胺的作用下可显色, 从而可测定其吸光度^[8]。

操作方法按文献[9]进行。分别吸取 5 mg/L 的 NaNO_2 标准液 2.0 mL 于 25 mL 比色管中, 再分别加入样品溶液 (原始浓度均为 4 mmol/L) 0.0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.5、6.0 和 8.0 mL, 混匀, 常温下反应 30 min。加入质量分数 0.4% 对氨基苯磺酸 2.0 mL, 摇匀静置 5 min, 再加入质量分数 0.2% 盐酸萘乙二胺 1.0 mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀静置 15 min。使用 Cary50 紫外分光光度计在 400~800 nm 波长范围内扫描反应产物的最大吸收波长, 并测定吸光度。

AQS、MQ 对亚硝酸盐的清除率可用下式表示:

$$\text{清除率} / \% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad (2)$$

Table 1 The rate of the nitrosamines blocking by different concentrations of AQS and MQ exposed to 365 nm ultraviolet

Concentration / mmol · L ⁻¹	Blocking rate of AQS/%	RSD/%	Blocking rate of MQ/%	RSD/%
0	0	0	0	0
0.032	20.65	3.14	15.02	3.24
0.08	35.87	1.64	20.95	2.13
0.16	43.48	1.94	30.04	1.37
0.32	46.74	1.23	39.13	1.97
0.48	58.70	2.51	52.57	1.36
0.72	66.85	0.97	68.77	1.38
0.96	75.54	1.45	77.87	0.49
1.28	70.65	2.43	66.80	0.62

式中, A_0 , 未加样品时 NaNO_2 的吸光度值 (以试剂空白溶液为参比溶液); A , 加入样品后 NaNO_2 的吸光度值 (以样品为参比溶液)。

2 结果与分析

2.1 对亚硝胺合成阻断作用的测定

2.1.1 吸收光谱 使用 Cary50 紫外分光光度计在 400~800 nm 波长范围内扫描最大吸收波长, 结果如图 1 所表示。

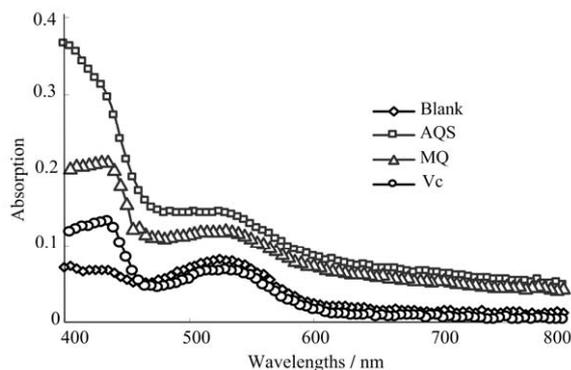


Fig.1 Absorption spectra

从图 1 中可以看出, 加样品 (AQS、MQ 或 Vc) 与不加样品时 NaNO_2 经着色反应后的产物在 525 nm 附近均有最大吸收峰, 这与文献[7]报道的一致, 故选择 525 nm 为检测波长。

2.1.2 不同浓度的 AQS、MQ 对亚硝胺合成阻断率的影响 在 25 mL 比色管中加入不同体积 4 mmol/L 的样品 (AQS 或 MQ) 溶液, 按照 1.2.1 的方法, 在缓冲液 pH=3.00, 37°C 水浴 1 h 的条件下, 分别测试反应液在 365 nm 和 254 nm 紫外波长照射下对亚硝胺的阻断率, 结果见表 1 和表 2。

Table 2 The rate of the nitrosamines blocking by different concentrations of AQS and MQ exposed to 254 nm ultraviolet

Concentration / mmol · L ⁻¹	Blocking rate of AQS/%	RSD/%	Blocking rate of MQ/%	RSD/%
0.032	21.88	3.44	11.56	3.79
0.08	27.60	2.78	18.59	1.65
0.16	42.19	1.95	25.13	1.86
0.32	50.00	1.47	43.22	3.21
0.48	52.08	2.16	51.26	1.02
0.72	61.46	1.30	64.82	1.37
0.96	67.19	0.62	73.37	0.98
1.28	56.77	2.07	58.29	1.82

从表 1 和表 2 可以看出, 在 0.032~0.96 mmol/L 范围内, 样品浓度与亚硝酸合成的阻断率呈明显的剂量关系, 再增加样品的量反而出现下降的趋势。当在 365 nm 紫外波长照射下, 体系中样品浓度为 0.96 mmol/L 时对亚硝酸的阻断率达到最大, 该条件下 AQS、MQ 对亚硝酸的阻断率最大分别可达 75.54%、77.87%。说明 AQS 和 MQ 均可有效地阻断亚硝酸的合成。同时发现, 在紫外线波长 365 nm 的照射下, AQS、MQ 对亚硝酸合成的阻断作用比紫外波长 254 nm 下的能力稍微强些, 这是因为

365 nm 紫外光可使 AQS、MQ 生成激发态, 而在 254 nm 紫外光下亚硝酸根等可能会发生光电离, 故醌类激发态阻断亚硝酸的合成有可能会受到影响。

2.1.3 反应时间对亚硝酸合成阻断率的影响 在 25 mL 比色管中均加入 6.0 mL 浓度为 4 mmol/L 的样品 (AQS 或 MQ) 溶液, 按照 1.2.1 的方法, 在缓冲液 pH=3.00, 365 nm 紫外照射, 37°C 水浴的条件下分别测试样品液反应不同时间对亚硝酸的阻断率, 结果见表 3。

Table 3 The rate of the nitrosamines blocking by AQS and MQ exposed to 365 nm ultraviolet

Concentration / mmol · L ⁻¹	Reaction time / h	Blocking rate of AQS/%	RSD/%	Blocking rate of MQ/%	RSD/%
—	0.5	67.67	2.04	68.15	1.92
—	1	75.54	1.45	77.87	0.49
0.96	2	73.28	0.87	76.60	0.82
—	3	69.14	1.30	77.91	1.09
—	4	68.22	1.07	74.59	1.74

结果表明, AQS、MQ 阻断亚硝酸的反应速度较快, 37°C 水浴下随着反应时间的延长阻断率反而减弱, 当反应时间为 1 h 时 AQS、MQ 对亚硝酸的阻断率即可分别达到 75.54%、77.87%, 延长反应时间阻断率反而下降, 再延长反应时间对亚硝酸的阻断作用意义不大。所以, 选择 1h 作为反应时间。

2.1.4 AQS、MQ 与 Vc 对亚硝酸阻断率的比较 文献[10]、[11]报道证明了 Vc 具有抗氧化作用, 还

有文献[12]报道 Vc 对亚硝酸合成的阻断率亦很强, 所以选择 Vc 为参照物, 比较 AQS、MQ 的阻断能力。

根据以上各影响因子的实验结果, 在缓冲液 pH=3.00, 37°C 水浴 1h 的条件下, 分别以 365 nm 和 254 nm 紫外线为辐射源, 用相同量的 AQS、MQ 与 Vc 进行阻断反应, 计算各自的阻断率并进行比较, 结果见表 4 和表 5。

Table 4 Comparison of the nitrosamines blocking rate by Vc exposed to 365 nm ultraviolet

Concentration / mmol · L ⁻¹	Blocking rate of Vc / %	RSD / %
0.08	18.72	1.21
0.32	43.32	1.75
0.72	59.36	1.62
0.96	68.98	2.25

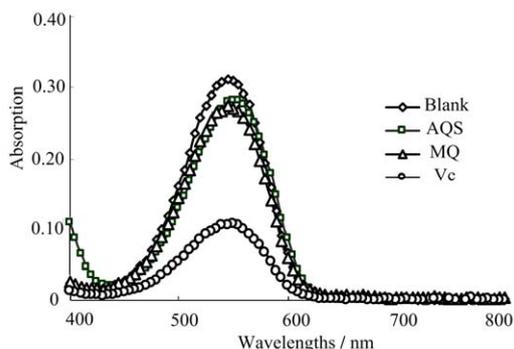
Table 5 Comparison of the nitrosamines blocking rate by Vc exposed to 254 nm ultraviolet

Concentration / mmol · L ⁻¹	Blocking rate of Vc / %	RSD / %
0.08	8.57	1.52
0.32	36.00	1.89
0.72	61.71	2.13
0.96	67.43	0.62

将以上两表与表 1、表 2 对比,发现同等条件下的 AQS、MQ 比 Vc 对亚硝酸胺的阻断能力更强,其阻断能力依次为 MQ > AQS > Vc,说明 AQS、MQ 均具有较强的阻断亚硝酸胺的能力。365 nm 紫外照射下,0.72 mmol/L 的 AQS、MQ 与 0.96 mmol/L 的 Vc 对亚硝酸胺合成的阻断效果相当;254 nm 紫外照射下,0.96 mmol/L 的 AQS、0.72 mmol/L 的 MQ 与 0.96 mmol/L 的 Vc 对亚硝酸胺合成的阻断效果相当。

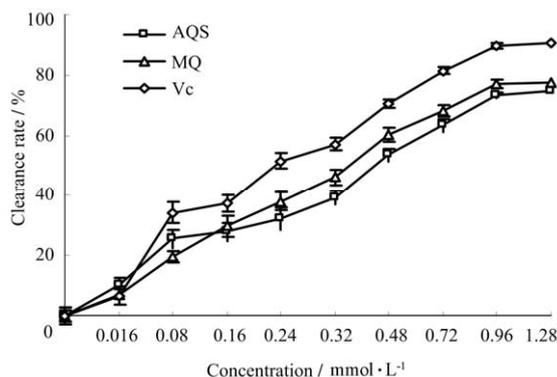
2.2 AQS、MQ 对亚硝酸钠的清除作用

2.2.1 吸收光谱 使用 Cary50 紫外分光光度计在 400~800 nm 波长范围内扫描最大吸收波长,结果如图 2 所表示。

**Fig.2 Absorption spectra**

从图 2 中可以看出,加样品(AQS、MQ 或 Vc)与不加样品时 NaNO₂ 经着色反应后的最大吸收峰在 545 nm 附近,这与文献[9]报道的一致,故选择 545 nm 为检测波长。

2.2.2 对亚硝酸钠的清除作用 按照 1.2.2 的方法,分别测试 AQS、MQ 与 Vc 对亚硝酸钠的清除率,结果见图 3。

**Fig.3 Comparison of the sodium nitrite clearance effects of AQS, MQ and Vc**

如图 3 所示, AQS、MQ 以及 Vc 对亚硝酸钠的清除效果随着其剂量的增加而增强,当加入浓度达到 0.96 mmol/L 后,再继续增加样品的量,清除率增加趋缓,此时清除率最大可分别达 74.47%, 77.26% 和 91.09%,三者对亚硝酸钠的清除能力依次为: Vc > MQ > AQS。0.48 mmol/L 的 AQS、MQ 与 0.32 mmol/L 的 Vc 对亚硝酸钠的清除效果相当。

3 结论与讨论

亚硝酸盐是亚硝酸胺合成的前体物质, AQS 和 MQ 不仅对亚硝酸盐具有清除效果,而且对亚硝酸胺合成具有显著的阻断活性。与传统抗氧化剂维生素 C (Vc) 作用效果对比,相同条件下 MQ、AQS、Vc 对亚硝酸钠的清除能力依次为: Vc > MQ > AQS; 对亚硝酸胺阻断作用依次是: MQ > AQS > Vc。

AQS 属于葱醌化合物, MQ 属于萘醌化合物,都有醌类的共同结构,即分子中含有不饱和环二酮结构,当在亚硝酸胺阻断反应体系加入醌类衍生物 AQS 或 MQ 时,一方面醌类化合物的羰基可与胺类化合物发生加成-消除反应,产生 Schiff 碱^[13],另一方面 NO₂⁻有可能进攻醌环的 α 位产生类似于醌类磺化反应产物的亲电取代硝化产物^[14]。但从醌环羰基与胺类亲核加成-消除反应产生 Schiff 碱空间位阻的局限,以及 AQS、MQ 对亚硝酸钠清除反应无需光照,其清除率是根据 NO₂⁻ 在酸性条件下与对氨基

苯磺酸发生重氮化反应, 生成的物质与盐酸萘乙二胺发生偶联反应产生有色偶氮化合物而显色, 通过加入 AQS 或 MQ 前后测定其吸光度计算确定^[8], 可以推断其反应主要是后一种途径。Vc 分子中的羟基和羰基由于相邻较近, 烯二醇基极不稳定, 易与各种金属形成盐, 解离出 H^+ ^[15], 而 H^+ 易与 NO_2^- 反应, 使体系中的亚硝酸盐含量降低, 阻止了 NO_2^- 与二甲胺反应, 从而使二甲基亚硝酸胺的生成量也相应降低。

本研究所获 AQS、MQ 对亚硝酸盐清除率与它们对亚硝酸胺的阻断率基本相当的实验事实亦证实反应体系中 AQS、MQ、Vc 清除亚硝酸根, 阻滞重氮化反应是关键环节。另一方面 AQS、MQ 都是是强光敏剂^[3,4], 亦有可能吸收紫外光产生激发态, 这一方面会削弱二甲胺与亚硝酸光化学反应, 同时醌类激发态极有可能与体系中二甲基亚硝酸胺光化学反应产物—亚硝酸根发生光氧化反应。这种可能性尚有待时间分辨进一步研究证实。

新鲜蔬菜中含有醌类特殊成分。AQS、MQ 作为醌类模型化合物对强致癌物—亚硝酸胺阻断活性功能的研究结果, 不仅进一步开拓了 AQS 和 MQ 生物活性功能, 也为醌类化合物抗癌生物活性分子机制提供了部分科学依据。

参考文献

- 1 徐飞, 黄晓楠. 广州化学, 2005, **30**(4): 44-48
XU Fei, HUANG Xiaonan. Guangzhou Chemistry, **30**(4): 44-48
- 2 Loeff I, Kan Y, Armitage B, *et al.* J Phys Chem, 1991, **95**(3): 4423-4430
- 3 马建华, 林维真, 王文锋. 分析试验室, 2002, **21**(5): 46-49
MA Jianhua, LIN Weizhen, WANG Wenfeng. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2002, **21**(5): 46-49
- 4 张连文, 林维真, 姚思德, 等. 感光科学与光化学, 2002, **21**(5): 352-357
ZHANG Lianwen, Lin Weizhen, YAO Side, *et al.* Photogr Sci Photochem, 2002, **21**(5): 352-357
- 5 许钢, 张虹, 庞洁. 郑州工程学院学报, 2001, **22**(1): 69-75
XU Gang, ZHNAG Hong, PANG Jie. J Zhengzhou Inst Technol, 2001, **22**(1): 69-75
- 6 胡荣梅, 马立珊. N-亚硝基化合物分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1980. 50-51
HU Rongmei, MA Lishan. N-nitroso compounds analysis method[M]. Beijing: Science Press, 1980. 50-51
- 7 赵二劳, 王晓妮, 张海容, 等. 食品与发酵工业, 2006, **32**(10): 29-31
ZHAO Erlao, WANG Xiaoni, ZHANG Hairong, *et al.* Food and Fermentation Industries, 2006, **32**(10): 29-31
- 8 樊明涛. 食品分析与检验[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1998. 204-207
FAN Mingtao. Food analysis and detection [M]. Xi'an: Xi'an World Publishing Corporation, 1998. 204-207
- 9 赵二劳, 梁泽, 张海容. 食品工业科技, 2006, **27**(3): 81-82
ZHAO Erlao, LIANG Ze, ZHANG Hairong. Sci Technol Food Ind, 2006, **27**(3): 81-82
- 10 刘冉, 许莹, 杨梅, 等. 鞍山师范学院学报, 2004, **6**(6): 58-59
LIU Lan, XU Ying, YANG Mei, *et al.* Journal of Anshan Normal University, 2004, **6**(6): 58-59
- 11 伍惠生. 河南水产, 2000, (3): 21-24
WU Huisheng. Henan Fisheries, 2000, (3): 21-24
- 12 张虹, 许钢, 袁建耀. 郑州粮食学院学报, 2000, **21**(1): 50-53
ZHNAG Hong, XU Gang, YUAN Jianyao. Journal of Zhengzhou Grain College, 2000, **21**(1): 50-53
- 13 余小林, 徐步前, 邓丹雯, 等. 中国食品学报, 2006, **6**(1): 273-277
YU Xiaolin, XU Buqian, DENG Danxia, *et al.* Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, **6**(1): 273-277
- 14 汪小兰. 有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 142-143
WANG Xiaolan. Organic Chemistry[M]. Beijing: Higher Education's Publishing House, 2000. 142-143
- 15 恽魁宏. 有机化学[M]. 湖北: 湖北人民出版社, 1982. 365-366
YUN Kuihong. Organic Chemistry [M]. Hubei: Hubei People's publishing house, 1982. 365-366

A study of quinones photosensitizer blocking synthesis of nitrosamines by ultraviolet photolysis

HUANG Juan BAO Xiaodan LAI Qiang MA Jianhua

(Biological Engineering College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT The effects of photosensitizer quinones -2 - sodium anthraquinone (AQS) and 2-methyl-1, 4-naphthoquinone (MQ) on blocking synthesis of nitrosamine were studied by ultraviolet photolysis and compared with the same conditions of ascorbic acid (Vc). The effects of determination conditions such as concentrations, reaction time and ultraviolet radiation wavelengths on blocking nitrosamines by AQS、MQ were investigated. The results show that when reaction time is 1h, quinone concentration is 0.96 mmol/L, ultraviolet radiation wavelengths is 365 nm, their blocking rate could reach the highest value. The blocking capability followed by MQ> AQS> Vc. In the meantime, their cleaning action of nitrite has been determined by spectrophotometer, it has been found that under the same condition, their cleaning ability of nitrite followed by Vc > MQ > AQS.

KEYWORDS Anthraquinone (AQS), Naphthoquinone (MQ), Blocking synthesis of nitrosamines, Ultraviolet photolysis

CLC O656.2, O625.46+2, O625.46+3