

黄酮类抗氧化剂结构-活性关系的理论解释*

张红雨

(山东师范大学生物系动物抗性生物学省重点实验室, 济南 250014)

摘要 用 AM1 方法对若干黄酮类抗氧化剂做了计算. 发现: (1) 黄酮化合物邻二酚羟基清除自由基的活性强于间二酚羟基. 原因一是前者半醌式自由基与邻位酚羟基形成分子内氢键, 从而更稳定; 二是前者半醌式自由基通过共振形成邻苯醌, 这使其未成对电子密度在邻位氧上有较多分布, 内能更低. (2) 色原酮类黄酮化合物 C 环的吸电子性质使它对 A 环酚羟基有钝化作用, 使其更不活泼. 由于 B 环受 C 环影响较小, 而且大多数黄酮类抗氧化剂 B 环为邻二酚羟基取代, 因此实验总结出的 B 环酚羟基活性高的规律得以解释.

关键词 黄酮类抗氧化剂 AM1 方法 结构-活性关系 理论解释

鉴于氧自由基与疾病的关系十分密切而且又是食品氧化的主要原因^[1,2], 寻找抗氧化剂的工作已在不同领域广泛展开^[3,4]. 由于人工合成的抗氧化剂存在副作用大及价格昂贵等多方面的缺陷, 因此近来人们逐渐将注意力转向植物中蕴藏的丰富的天然抗氧化剂, 其中黄酮类化合物(flavonoids)是研究较多的一类^[5,6].

以前黄酮类化合物主要是指基本母核为 2-苯基色原酮(2-phenylchromone)的化合物, 现在则是泛指 2 个苯环(A 与 B 环)通过中央三碳链相互联结而成的一系列化合物(图 1)^[7]. 它们的种类很多, 大多在各环都有酚羟基取代. 近来大量的体内和体外研究表明黄酮类化合物有较强的抗氧化活性^[8], 由于它们同时也具有各种药理作用且毒副作用很小, 因而特别引人

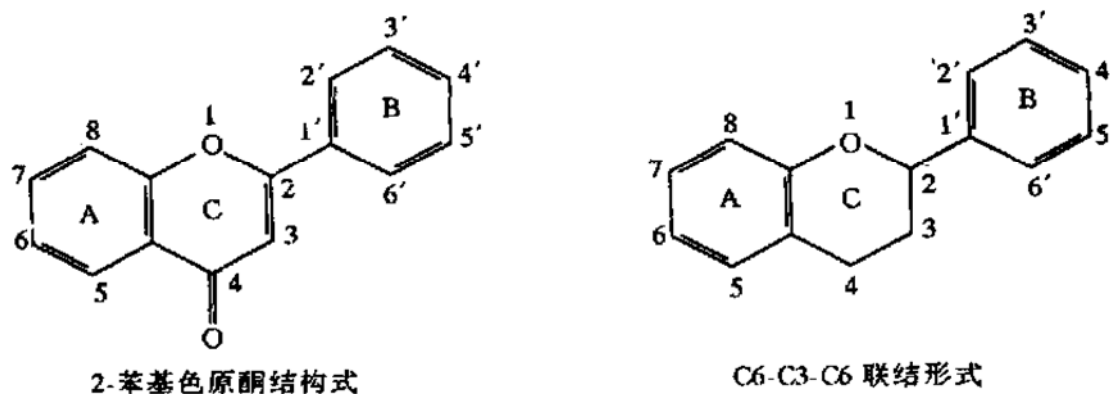


图 1 黄酮母核结构式

注目, 并且作为抗氧化药物很有发展潜力.

在黄酮类抗氧化剂的作用机制中, 通过酚羟基与氧自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 从而中止链式反应无疑是最主要的. 对这种机制的结构-活性关系(structure-activity relationships)的研究发现黄酮各个环上的酚羟基活性相差较大, B 环酚羟基活性最高, 当 C 环为色原酮时, 其上的酚羟基也有一定作用, A 环酚羟基活性最弱^[9]. 但这一经验规律尚无理论解释, 这无疑限制了今后合成、筛选性能更优良的黄酮类抗氧化剂. 为此我们用半经验量子化学方法 AM1 对几种黄酮化合物进行了计算, 希望能对实验总结出的构效关系给予理论解释.

1 方法

本文研究思路为用合适的理论参数代表抗氧化剂的活性, 然后观察各种结构因素对此理论参数的影响, 借以阐明抗氧化剂的构效关系.

由于黄酮类抗氧化剂主要是通过酚羟基与氧自由基反应, 形成共振稳定的半醌式自由基而中断链式反应的, 因此共振半醌式自由基的稳定性与抗氧化剂活性成正相关. 在比较了多种指标之后发现, 抗氧化剂形成半醌式自由基前后的生成热之差(ΔHOF)是最好的衡量其活性的理论参数^{[10], 1)}. ΔHOF 越低说明自由基越稳定, 相应的抗氧化剂活性越强.

具体计算步骤如下: 先用 PCMODEL 程序中的分子力学方法 MMX 对各分子进行结构优化^[11], 所得结果作为分子的初始结构, 然后用 MOPAC7 软件包中的 AM1 方法对分子的不同状态(基态、自由基、形成或不形成分子内氢键等)进行量子化学计算^[12]. 为了与基态进行比较, 对自由基的计算用 RHF 方法, 加入关键词 ESR.

抗氧化剂的结构式见图 2.

2 结果与讨论

从黄酮类抗氧化剂结构上分析, B 环酚羟基与 A 环酚羟基有两点差别. 首先前者的 2 个 OH 多处于邻位, 而后者则多处于间位(参见文献[9]的结构式). 显然邻位 OH 被抽氢产生自由基后可借助形成分子内氢键得以稳定(以槲皮素为例示如图 3 中 I), 因而抗氧化活性更高, 而且邻位 OH 的自由基可通过共振形成邻苯醌(图 3 中 II, IV), 这也可降低其内能从而提高自由基的稳定性, 而间位酚羟基不具备这两种稳定机制. 其次 A 环与 C 环的共轭较好, 从理论上分析色原酮类 C 环的吸电子性质将使 A 环的 OH 的 O—H 键能增大, 不利于 H 的解离^[10], 因而降低 A 环 OH 的活性, 而与 C 环共轭较差的 B 环受这种影响较小. 总起来看 A 环与 B 环的这两点差别可能是导致 B 环 OH 活性高的原因. 以下用 AM1 方法对此进行深入研究.

2.1 经验规律的验证

首先对典型的黄酮类抗氧化剂槲皮素(quercetin, 图 2 中 A)、桑色素(morin, 图 2 中 B)和儿茶素(catechin, 图 2 中 C)做了计算, 因为它们代表黄酮化合物中两类最主要的结构, 而且

1) Zhang H Y. Selection of theoretical parameter characterizing scavenging activity of antioxidants on free radicals. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(12), 待发表

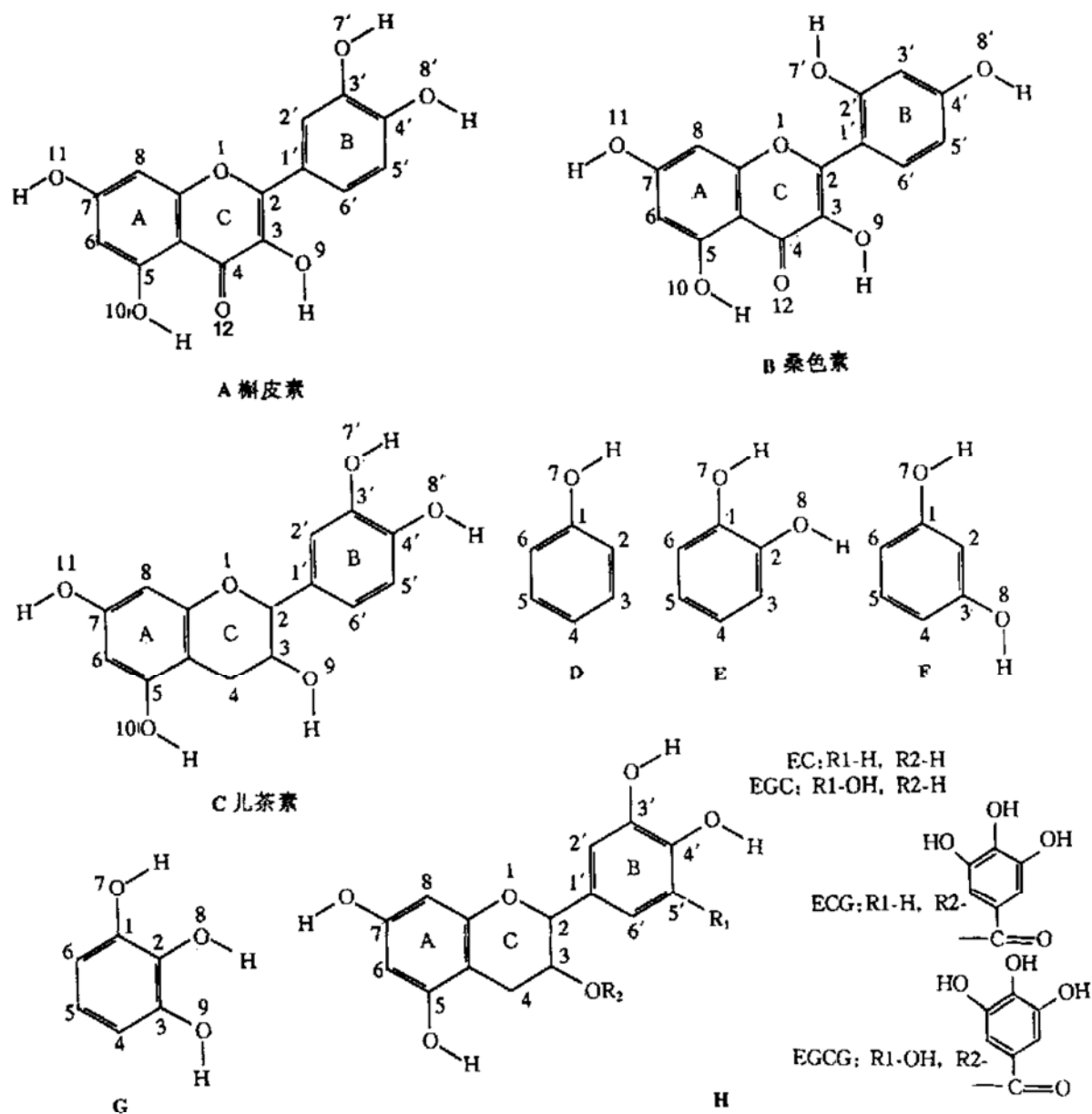


图 2 若干抗氧化剂的结构式

在 A, B, C 各环都有酚羟基取代, 实验上的资料也很丰富. 计算结果列于表 1. 由 ΔHOF 值可看出, 它们 B 环 OH 的活性强于 A 环 OH, 而具有 2-苯基色原酮结构的槲皮素、桑色素的 C 环 OH 活性也很高, 这与实验总结出的规律一致, 说明 ΔHOF 能很好地反映酚羟基清除自由基的活性. 下面对影响 ΔHOF 值的两种结构因素分别加以讨论.

2.2 邻位 OH 与间位 OH 的差别

槲皮素、儿茶素 B 环 3' 或 4' 位酚羟基与相邻半醌式自由基形成和不形成分子内氢键(图 3 中 I, II)的 ΔHOF 值表明, 形成氢键确能使半醌式自由基更稳定, 并由两种状态的 ΔHOF 差值可估算出氢键键能在 $15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 左右. 但另一方面, 即使不形成分子内氢键, 槲皮素、儿茶素 B 环邻二酚羟基的 ΔHOF 仍较桑色素 B 环间二酚羟基的 ΔHOF 低 $15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 左右. 结合表 2 键级数据可以看出这种稳定作用源于邻二酚羟基自由基共振形成邻苯醌结构, 致使内能降低. 因为当槲皮素、儿茶素形成半醌自由基时相邻酚羟基 C—O 键级在 1.15 左右, 具有

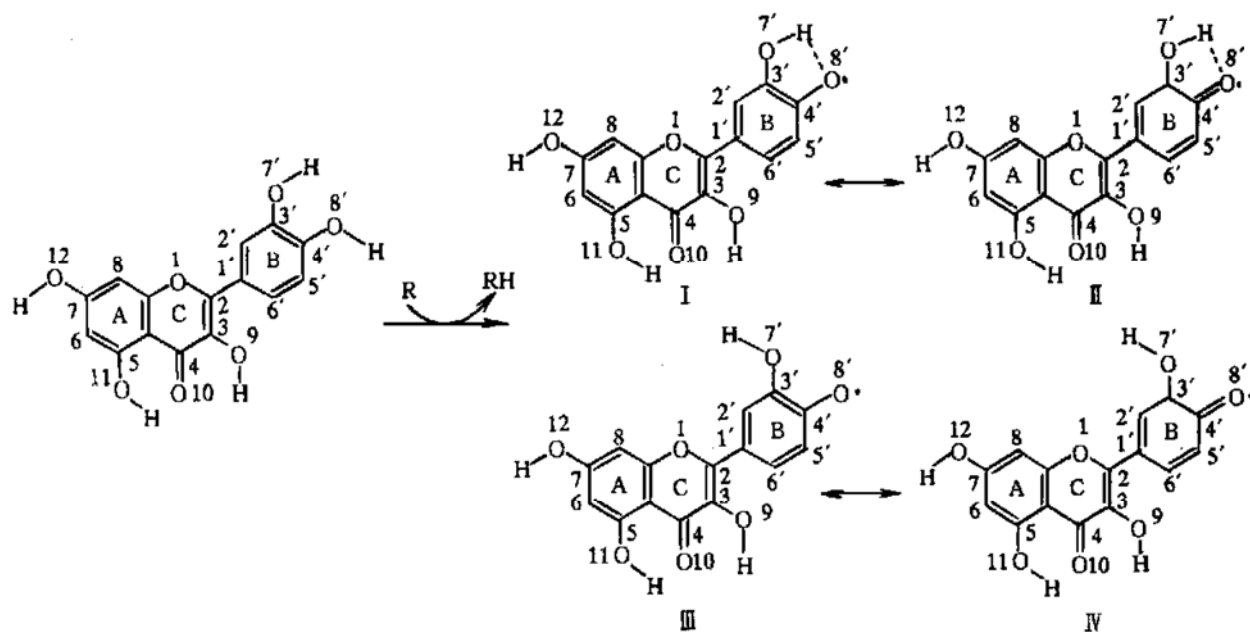


图 3 槲皮素清除自由基示意图

表 1 几种黄酮类抗氧化剂不同状态下的生成热和 ΔHOF 单位: $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

	槲皮素		儿茶素		桑色素	
	生成热	ΔHOF	生成热	ΔHOF	生成热	ΔHOF
基态	- 882. 50		- 849. 39		- 881. 22	
去 7' 位 H						
形成氢键	- 749. 22	133. 28	- 719. 30	130. 09		
不形成氢键	- 731. 33	151. 17	- 701. 57	147. 82	- 712. 84	168. 38
去 8' 位 H						
形成氢键	- 749. 47	133. 03	- 714. 47	134. 92		
不形成氢键	- 725. 16	157. 34	- 701. 35	148. 04	- 710. 92	170. 30
去 9 位 H	- 752. 82	129. 68	- 600. 97	248. 42	- 747. 50	133. 72
去 10 位 H	- 687. 26	195. 24	- 694. 33	155. 06	- 684. 15	197. 07
去 11 位 H	- 686. 81	195. 69	- 689. 05	160. 34	- 690. 00	191. 22

部分双键性质, 而桑色素的相应键级仅为 1.07 左右, 这也使得前者相邻酚羟基氧的电子自旋密度(0.08 左右)显著高于后者的相应数值(0.000 5 左右)(表 2)。至此初步验证了前述关于邻二酚羟基活性强于间二酚羟基的两种机制的推测。由 ΔHOF 值还可知, 这两种机制对自由基的稳定作用几乎相同, 都在 $15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 左右。此外由槲皮素、儿茶素的键级及电子密度分布数值与是否形成氢键关系甚微可推断, 这两种机制几乎是相互独立的。

实验发现, 槲皮素的抗氧化活性显著高于结构类似的桑色素^[13], 原因是前者自由基可借形成分子内氢键得以稳定。由上述结果可知这只是原因之一, 另一原因是前者自由基可共振形成邻苯醌, 这使其自由基更加稳定。其他实验也发现邻二酚羟基是分子保持强抗氧化活性所必需的, 而酚羟基数量的多少并不重要^[14], 这一现象也可由以上两种机制合理解释。

为了进一步验证以上结论, 必须排除 C 环的影响, 因此又对苯酚、邻苯二酚、间苯二酚(图 2 中 D, E, F)的 ΔHOF 及电子自旋密度做了计算, 结果列于表 3。可以看出与上述槲皮素、儿茶素及桑色素的结果类似, 邻苯二酚活性最高, 间苯二酚活性尚不如苯酚。注意到它们的

表 2 槲皮素、儿茶素和桑色素 B 环半醌式自由基的键级和电子自旋密度分布

槲皮素					儿茶素				桑色素		
去 7 位 H		去 8' 位 H		去 7 位 H		去 8' 位 H		去 7 位 H		去 8' 位 H	
成氢键	不成氢键	成氢键	不成氢键	成氢键	不成氢键	成氢键	不成氢键	成氢键	不成氢键	成氢键	不成氢键
C3'—O7' 键级					C2'—O7' 键级					C4'—O8' 键级	
1.700 2 1.765 9 1.142 1 1.142 5					1.713 2 1.763 1 1.136 0 1.134 0					1.786 8 1.064 7	
C4'—O8' 键级					C4'—O8' 键级					C4'—O8' 键级	
1.152 7 1.145 8 1.740 6 1.784 0					1.141 8 1.141 5 1.736 9 1.791 2					1.070 8 1.776 2	
原子编号											
电 子 自 旋 密 度	1'	0.029 6	0.021 2	0.254 0	0.265 7	0.027 3	0.019 4	0.263 9	0.277 2	0.267 9	0.331 0
	2'	0.138 9	0.155 2	0.007 2	0.008 6	0.157 3	0.169 9	0.005 4	0.005 9	0.023 5	0.000 8
	3'	0.063 6	0.046 3	0.250 2	0.246 9	0.063 6	0.046 0	0.247 0	0.264 1	0.143 4	0.169 6
	4'	0.253 5	0.263 2	0.047 8	0.034 5	0.238 8	0.248 9	0.053 8	0.039 6	0.001 1	0.022 6
	5'	0.003 4	0.003 5	0.110 6	0.121 1	0.002 8	0.002 6	0.145 8	0.146 8	0.296 9	0.196 4
	6'	0.230 1	0.251 0	0.015 9	0.011 8	0.253 3	0.261 1	0.017 7	0.012 2	0.001 7	0.000 3
	7'	0.191 6	0.176 5	0.079 0	0.074 9	0.179 4	0.177 1	0.077 6	0.076 9	0.149 1	0.000 5
	8'	0.080 5	0.076 9	0.150 7	0.148 3	0.075 6	0.073 6	0.167 5	0.155 8	0.000 6	0.142 6

表 3 几种酚类化合物的 ΔHOF 值、键级及电子自旋密度分布

苯酚		邻苯二酚		间苯二酚	联苯三酚
		去 7 位 H		去 7 位 H	去 8 位 H
		形成氢键	不形成氢键		形成氢键
基态生成热/kJ•mol ⁻¹		- 92.97	- 277.41	- 278.02	- 463.21
自由基生成热/kJ•mol ⁻¹		64.57	- 145.10	- 114.01	- 340.16
ΔHOF/kJ•mol ⁻¹		157.54	132.31	164.01	123.05
C1—O7 键级		1.787 4	1.746 0	1.788 9	1.117 3
C2—O8 键级			1.150 1	1.067 3	1.706 5
C3—O9 键级					1.117 3
原子编号					
电 子 自 旋 密 度	1	0.035 7	0.060 2	0.043 7	0.030 7
	2	0.225 0	0.275 2	0.279 1	0.211 3
	3	0.003 4	0.004 5	0.004 1	0.001 4
	4	0.336 0	0.251 5	0.270 4	0.345 7
	5	0.003 1	0.025 0	0.017 1	0.000 8
	6	0.226 0	0.130 0	0.144 5	0.240 6
	7	0.170 8	0.169 1	0.159 9	0.168 9
	8		0.084 6	0.081 1	0.000 6
	9				0.055 2

ΔHOF 值只比黄酮类抗氧化剂 B 环的相应数值低几个千焦, 可知 C 环对 B 环的抗氧化活性影响甚微.

由以上结果可推断, 联苯三酚(图 2 中 G) 应比邻苯二酚活性更高, 计算表明联苯三酚 2 位酚羟基确实比邻苯二酚活泼, ΔHOF 值低 9 kJ•mol⁻¹ 左右(表 3). 由于目前研究较多的黄

酮类抗氧化剂茶多酚具有联苯三酚型酚羟基(图 2 中 **H**), 可推测它们的抗氧化活性应强于其他黄酮化合物. 最近对茶多酚 4 种成分的研究表明, 在相同摩尔浓度下的活性依次为 EGCG > ECG > EGC > EC^[8], 参考图 2 可看出其活性顺序基本与联苯三酚型酚羟基的数目一致.

2.3 C 环对 A 环的钝化作用

由上述结果可知, 槲皮素 A 环是间位 OH 取代, 因此不如 B 环 OH 活泼. 但与表 3 间苯二酚的 ΔHOF 数据比较可看出, 它的 A 环酚羟基尚不如间苯二酚活泼(ΔHOF 值升高 $30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 左右). 这初步验证了前述色原酮类 C 环将降低 A 环 OH 活性的推测, 与以往观察到的吸电子取代基使生育酚类抗氧化剂活性降低的现象一致^[10]. 值得指出的是, 若 A 环为邻二酚羟基取代则色原酮类 C 环对 A 环的钝化作用较低, 仅使 ΔHOF 升高 $18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 左右(详细数据略), 说明 C 环对 A 环的钝化作用与 A 环 OH 取代位置有关, 深入的研究尚有待进行. 儿茶素的 C 环由于具有一定的推电子性质, 故 A 环酚羟基反而得到一定的活化, ΔHOF 比间苯二酚降低 $5 \sim 10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

前述 C 环对 B 环的钝化作用只有几个千焦, 原因是 C 环与 B 环共轭较差. 用分子力学方法进行的计算表明, B 环与 A, C 环平面几乎处于垂直的位置, 而且 B 环绕 $\text{C1}'\text{—C2}$ 键的旋转势垒仅为 $26 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而 $\text{C1}'\text{—C2}$ 的键级为 0.992 0, 接近 1.0, 这都说明 C 环与 B 环共轭程度很低, 因此 C 环对 B 环活性影响不大.

至此, 前述关于黄酮类抗氧化剂 B 环酚羟基活性高的两个原因的推测得到详尽的理论解释, 并由计算结果推断, 联苯三酚型取代将进一步提高黄酮化合物的抗氧化活性, 这对指导今后合成与筛选活性更高的抗氧化剂具有重要的意义.

致谢 在计算过程中与中国科学院研究生院颜达予教授进行了有益的讨论, 在此致以诚挚谢意.

参 考 文 献

- 1 刘文龙编. 简明生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 1995. 138
- 2 曹国锋, 翁新楚. 鱼油氧化稳定性的研究(I). 中国油脂, 1995, 20(4): 49~ 52
- 3 曹国锋, 翁新楚. 鱼油氧化稳定性的研究(II). 中国油脂, 1995, 20(5): 44~ 46
- 4 Xin W J, Zhao B L, Li X J, et al. Scavenging effects of chinese herbs and natural health products on active oxygen radicals. Res Chem Intermed, 1990, 14: 171~ 183
- 5 Harborne J B(ed). The Flavonoids: Advances in Research Since 1980. London: Chapman & Hall Press, 1988
- 6 Harborne J B(ed). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. London: Chapman & Hall Press, 1994
- 7 王宪楷编. 天然药物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 272
- 8 胡 春. 黄酮类化合物的抗氧化性质. 中国油脂, 1996, 21(4): 18~ 21
- 9 Roginsky V A, Barsukova T K, Remorova A A, et al. Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(6): 777~ 786
- 10 van Acker S A B E, Koymans L M H, Bast A. Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. Free Rad Biol Med, 1993, 15: 311~ 328
- 11 Gajewski J J, Gillbert K E, McKelvey J. MMX an enhanced version of MM2. Adv Mol Model, 1990, 2: 65~ 92
- 12 Dewar M J S, Zoebisch E G, Healy E F, et al. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. J Am Chem Soc, 1985, 107: 3 902~ 3 909
- 13 胡 春, 丁霄霖. 黄酮类化合物在不同氧化体系中的抗氧化作用研究. 食品与发酵工业, 1996, 22(3): 46~ 53
- 14 Ogata M, Hoshi M, Shimotohno K, et al. Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(5): 557~ 562