

隐丹参酮的电化学性质及其与 DNA 相互作用的研究

刘 薇^{1,2}, 吴晓苹¹, 郑国森³, 张 兰¹, 陈红青², 陈国南¹

(1. 福州大学 食品安全分析与检测技术教育部重点实验室, 福建 福州 350002;

2. 福州大学 测试中心, 福建 福州 350002; 3. 通标标准技术服务有限公司厦门分公司, 福建 厦门 361000)

摘 要: 利用循环伏安法(CV)、线性扫描伏安法(LSV)、方波伏安法(OSWV)等电化学技术研究了隐丹参酮在玻碳电极(GCE)上的电化学氧化过程,并用计时电量法和恒电位库仑电解法等对其在电极表面的吸附行为及氧化还原机理进行了探讨.此外利用自组装 DNA 修饰玻碳电极研究了隐丹参酮与 DNA 之间的相互作用.

关键词: 隐丹参酮; 电化学; 修饰电极; DNA; 相互作用

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2007)04-0246-07

隐丹参酮(cryptotanshinone, CT)是中国传统中药丹参的有效成分之一,属脂溶性菲醌类.其分子结构见图 1.

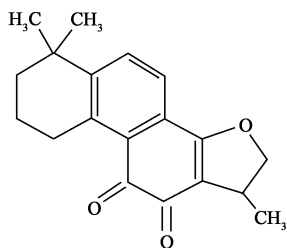


图 1 隐丹参酮的结构式

Fig.1 Structural formula of cryptotanshinone

隐丹参酮具有抗菌消炎、活血化瘀和消除自由基^[1]等作用.近年来,人们还发现隐丹参酮有显著的抗肿瘤活性^[2].但迄今为止,对隐丹参酮导致细胞的分化与凋亡的作用方式尚不明确.

目前已有报道用高效液相色谱法^[3]、磷光法^[4]等对隐丹参酮的研究.张静^[5]等人也利用电化学法对隐丹参酮的测定方法进行了研究,另外还对其电化学机理进行了初步探讨.

本实验采用各种电化学方法对隐丹参酮在玻碳

电极(GCE)上的电化学氧化过程及其吸附行为和电化学动力学参数进行了较为详细的探讨,并利用嵌有 DNA 的双层磷脂膜修饰玻碳电极,直接检测与 DNA 作用的隐丹参酮的电化学响应,其结果能初步证实隐丹参酮与 DNA 的相互作用,也为进一步探讨隐丹参酮抗肿瘤作用提供了依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660 电化学工作站(上海辰华仪器公司):采用三电极系统,玻碳电极($S = 0.0707 \text{ cm}^2$)为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极,铂丝为辅助电极. pH3-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司). Milli-Q 超纯水系统(Millipore, Bedford, USA). R200D 型电子天平(德国 Sartorius 公司).

隐丹参酮(CT, 中国药检所),小牛胸腺 DNA (CT-DNA, 上海华美生物公司),双肉豆蔻磷脂酰胆碱(1, 2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine, DMPC, Sigma 公司),其余均为分析纯.

准确称取 0.00148 g 的隐丹参酮溶于 5 mL 丙酮溶液中,制得隐丹参酮母液($1.00 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$).将 2.00 mg 的 DMPC 溶于 1.00 mL 氯仿中并摇匀

收稿日期: 2007-09-10; 修订日期: 2007-10-24.

基金项目:福建省自然科学基金项目(2007J0279)、福州大学育苗基金项目(2006-XY-07)资助.

作者简介:刘薇(1980-),女,硕士,主要从事电化学及气相色谱-质谱相关领域的研究工作.

定容, 得到支撑磷脂膜溶液(2.00 mg/ mL). 将 2.50 mg CT-DNA, 用 pH 4.50 乙酸盐溶液溶解定容, 可得到 dsDNA 溶液(2.50 mg/ mL). 以上溶液均在 7 d 内用完. 实验过程中配制溶液与冲洗电极均使用去离子水. 实验均在室温约 25 ℃下进行.

1.2 实验方法

1.2.1 磷脂膜修饰电极的制备

参考文献[6]所述的磷脂膜修饰电极制备方法, 将 DMPC 溶解于氯仿中使其浓度为 2.00 mg/mL. 在制备支持磷脂膜以前, 在抛光布上用 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光粉将玻碳电极仔细抛光, 并在去离子水中超声后, 放入 0.1 mol/L 的 KCl 溶液中, 在 1500 mV 的电位下极化电极 3 min. 电极极化后, N_2 吹干表面, 然后将电极放入制膜液中浸泡 1 min 之后迅速将电极浸入 0.1 mol/L 的 KCL 溶液中, 磷脂膜便可在电极表面自发形成从而制备出支撑磷脂膜. 将成膜电极浸入 2.5 mg/mL DNA 溶液 10 min 中, 则固定了

DNA 的支撑磷脂膜在电极表面形成.

1.2.2 隐丹参酮电化学性质的研究

以 GCE 电极作工作电极, 采用三电极体系, 循环伏安法(CV)、方波伏安法(OSWV)、线性扫描伏安法(LSV)、计时库仑法(CC)、电解法、计时电流法(CA)、常规脉冲伏安法(NPV)对隐丹参酮进行实验.

1.2.3 隐丹参酮与 DNA 相互作用的研究

用 GCE 及 BLM-DNA-GCE 电极, OSWV 法(扫速 100 mV/s, 振幅 25 mV, 频率 15 Hz, 灵敏度 5×10^{-6} A/V.)进行实验.

2 结果与讨论

2.1 隐丹参酮的电化学性质

2.1.1 隐丹参酮的循环伏安实验

pH 4.50 时隐丹参酮溶液为橙黄色. 循环伏安法研究发现(图 2), 隐丹参酮在不同 pH 条件下, 均

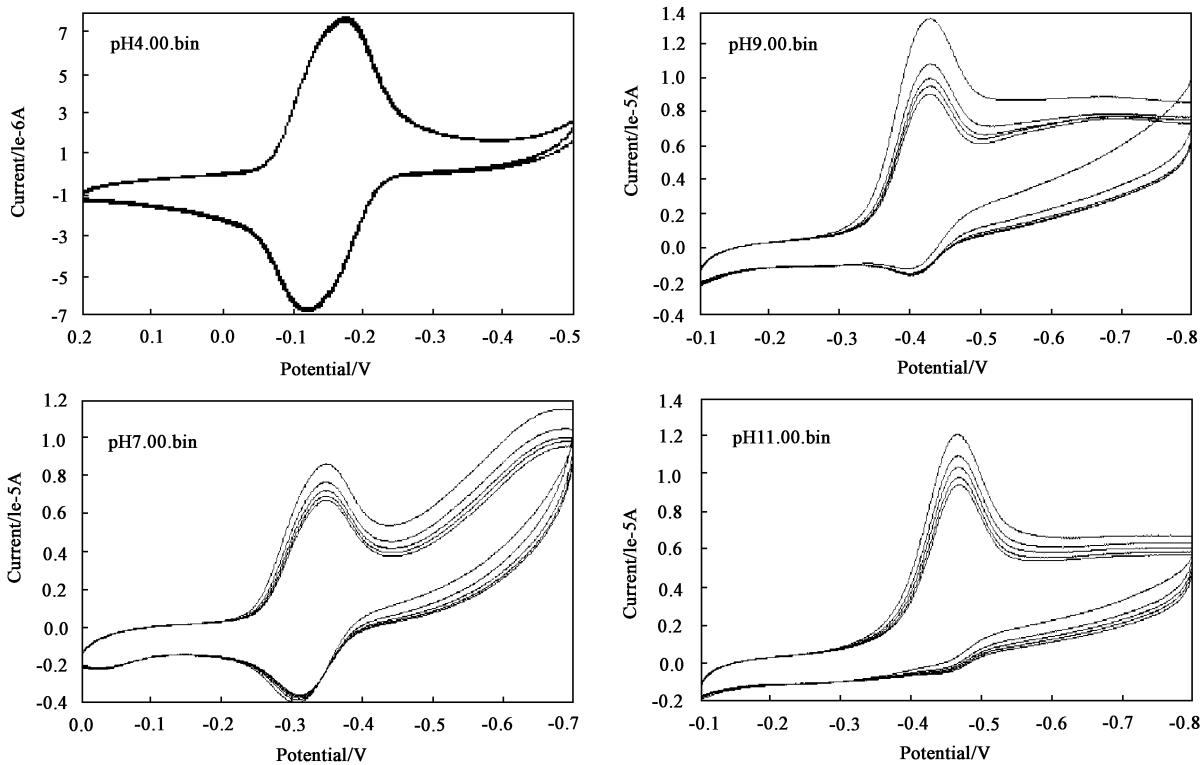


图 2 隐丹参酮的循环伏安图

Fig. 2 CV response of cryptotanshinone

扫速 100 mV/s, 静止时间 2 s, 扫描次数 5, [隐丹参酮] = 1.00×10^{-4} mol/L, pH 分别为 4.00、7.00、9.00、11.00

在玻碳电极上有电化学响应, 在酸性条件下(pH 2.00)表现为一对可逆的氧化还原峰, 峰电流响应大且峰形尖锐. 随着 pH 的增大, 氧化峰逐渐变小而

还原峰逐渐变大, 这可能是由于 pH 影响了其结构上醌与氢醌的转化. 在低 pH 条件下, 主要是以醌的形式存在, 随着 pH 的逐渐增加, 醌向氢醌形式转变.

2.1.2 酸度对隐丹参酮氧化峰电流的影响

隐丹参酮 ($6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 在 BR 缓冲介质中的方波伏安 (OSWV) 实验表明, pH 由 2.00 增加至 12.00, 隐丹参酮均出现氧化峰响应, 峰电流在酸性条件下变化不大, 其中以酸度在 pH 为 5.00 左右时响应最好, 而在碱性条件下响应则逐渐降低 (见图 3), 这可能是由于隐丹参酮对碱敏感, 结构发生了变化^[7,8].

2.1.3 线性扫描伏安法与隐丹参酮在电极上的吸附

线性扫描伏安法 (LSV) 实验发现隐丹参酮峰电流 I_p 与电位扫速二次方根 $v^{1/2}$ 不成直线而与电位扫速 v 之间具有较好的简单线性关系 (图 4), 说明

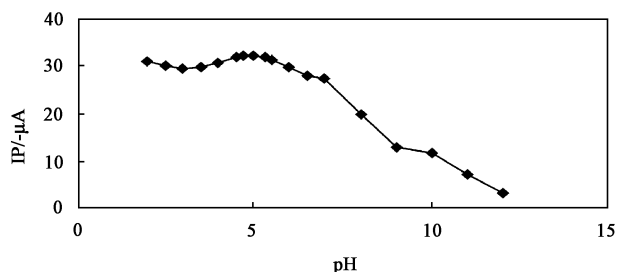


图 3 隐丹参酮峰电流与酸度的关系

Fig. 3 Relationship of I_p with pH

OSWV 法, BR 介质,

扫速 100 mV/s, 静止 2 s, [隐丹参酮] = $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

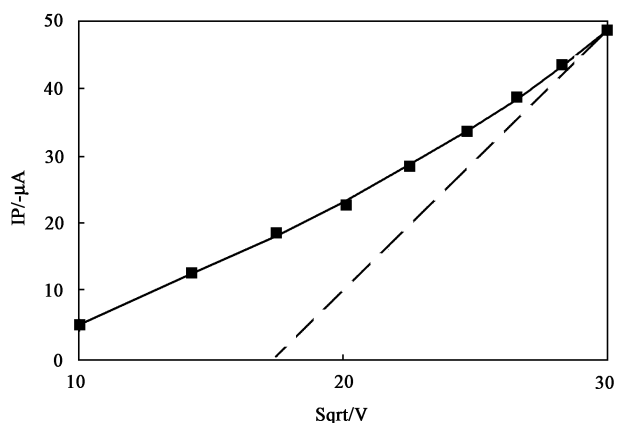


图 4 隐丹参酮氧化峰 I_p 与 $v^{1/2}$ 关系

Fig. 4 Relationship of I_p with $v^{1/2}$

LSV, 扫速 (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mV/s)

[隐丹参酮] = $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, pH = 4.50 乙酸盐溶液

了隐丹参酮的电化学氧化反应的电极过程主要是受吸附控制。

多次连续循环伏安扫描发现隐丹参酮 (pH

7.00 时) 的第一次扫描在约 -0.30 V 处出现一对明显的氧化还原峰, 连续环扫第 2 周峰电流明显降低, 到第 3 周时峰电流基本稳定, 表明其氧化还原产物在电极表面有一定的吸附性并在第 3 周时达到吸附饱和 (见图 2)。

隐丹参酮的循环伏安图出现一对氧化还原峰, 但在线性扫描中发现 E_p 随 v 移动, 这说明隐丹参酮的氧化还原反应为准可逆反应。

2.1.4 双阶跃计时库仑法 (CC)

对空白 pH 4.50 乙酸盐缓冲液及含有浓度从 $1.25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 到 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的隐丹参酮溶液进行 CC 测量, 阶跃电位从 -0.4 V $\rightarrow$ -0.1 V, 脉冲宽度 250 ms, 静止时间 2 s, 结果见图 5。实验发现隐丹参酮浓度增大, 正反方向阶跃的截距均随之增加, 而斜率比空白溶液的有所增加。这说明该反应的反应物及产物在电极表面均有吸附, 且其吸附量也随着增加。而斜率在 [隐丹参酮] 从 0.0 ~ $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的范围内逐渐增加, 之后则增加不多, 说明电极表面的吸附量在隐丹参酮浓度在 $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时达到饱和。

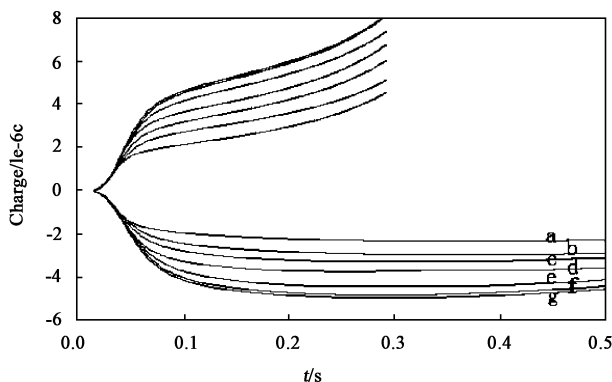


图 5 双阶跃计时库仑法 $Q \sim t^{1/2}$ 关系图

Fig. 5 Chronocoulometry of CT

pH = 4.5 乙酸盐缓冲液, 隐丹参酮溶液浓度分别为:

(a) 0; (b) $1.25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; (c) $2.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;

(d) $3.75 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; (e) $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;

(f) $7.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; (g) $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

2.1.5 电子转移数 n 的测定

电子转移数是电极反应的重要参数之一, 本实验分别用恒电位电解法和常规脉冲伏安法测定隐丹参酮在石墨电极上的电子转移数 n 。

在隐丹参酮的峰电位 -0.25 V 附近的电位处, 对 100 mL 含 $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的隐丹参酮溶液和

100 mL 的空白底液做恒电位电解. 根据法拉第定律可求得电子转移数 $n = 1.82 \approx 2$.

此外, 利用常规脉冲伏安法对 $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的隐丹参酮溶液做常规脉冲伏安分析, 在曲线的直线部分取点, 做对数分析曲线. 根据文献[9], 由其斜率求得电子转移数 $n = 2.28 \approx 2$, 由其截距求得半波电位 $E_{1/2} = -0.1608 \text{ V}$.

2. 1. 6 参与电极反应的质子数

利用方波伏安法(OSWV), 根据能斯特方程做 $E_p \sim \text{pH}$ 关系曲线, 由斜率求得 ∂/n 值, 从而求得参加电极反应的质子数.

测定隐丹参酮的氧化峰峰电位 E_p 随酸度 pH 值变化的影响. 发现隐丹参酮的氧化峰电位随着 pH 的增大向负方向移动(图 6), 而且峰电位与 pH 存在着线性关系:

$$E_p = -0.0558\text{pH} + 0.0964(\text{V}) \quad (1)$$

$(R^2 = 0.9993)$

其斜率为负值, 表明了隐丹参酮在玻碳电极上的电化学过程为是一个失质子的过程, 曲线斜率为 0.0558, 表明了隐丹参酮的电化学氧化过程中, 质子的转移数与电子的转移数相同均为 2.

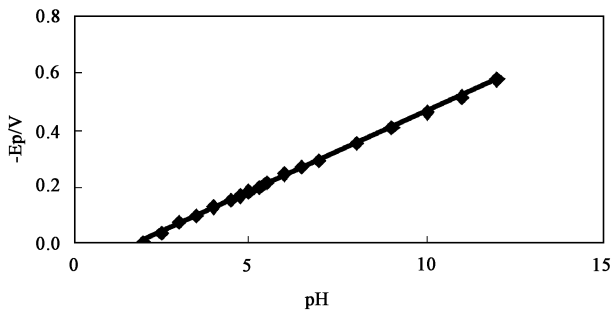
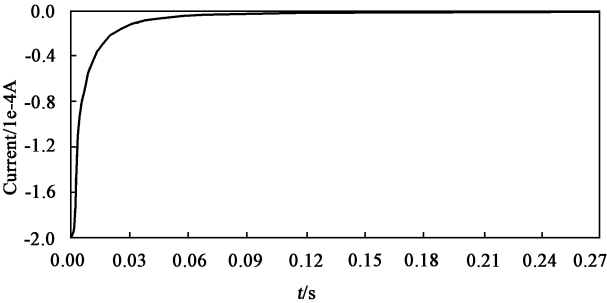


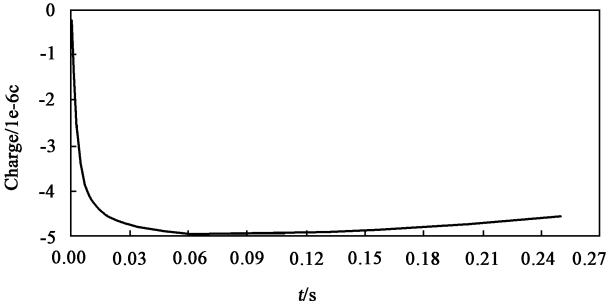
图 6 隐丹参酮氧化峰 E_p 与 pH 的关系
Fig. 6 Relationship of E_p with pH
OSWV 法, 扫速 100 mV/s ,
BR 介质, 静止时间 2 s , [隐丹参酮] = $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

2. 1. 7 隐丹参酮在电极表面的扩散系数 D

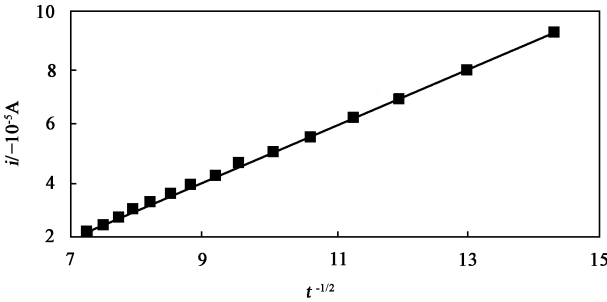
分别用计时电流法(CA)和计时电量法(CC)考察了隐丹参酮在玻碳电极过程的扩散系数(图 7), 施加一阶跃电位(CA 法为 $-0.45 \sim -0.15 \text{ V}$, 药物浓度 $C = 6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; CC 法为 $-0.4 \sim -0.1 \text{ V}$, 药物浓度 $C = 6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)于电极上, 分别做 $i \sim t^{-1/2}$ 和 $Q \sim t^{1/2}$ 关系曲线, 求得其曲线斜率, 由 Cottrell(柯泰尔)方程^[10]:



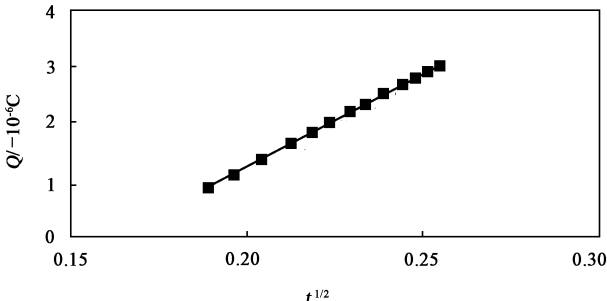
(a) CA 曲线



(b) CC 曲线



(c) $i \sim t^{-1/2}$ 关系曲线



(d) $Q \sim t^{1/2}$ 关系曲线

图 7 隐丹参酮的扩散系数
Fig. 7 Diffusion coefficient of CT

$$Q(t) = \frac{2nFAD^{1/2}Ct^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (2)$$

$$i(t) = \frac{nFAD^{1/2}C}{(\pi t)^{1/2}} \quad (3)$$

分别求得隐丹参酮的扩散系数 D 为:

$4.47 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ 和 $4.52 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, 两者非常接近, 其平均值为 $4.50 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$.

2.1.8 电子传递系数 α 的测定

转移系数是电极反应能量势垒的量度, 是动力学参数之一, 对于准可逆反应有关系式:

$$E_p = k + \frac{RT}{\alpha n F} \ln v \quad (4)$$

作 $E_p \sim \ln v$ 关系曲线(见图 8), 得到曲线斜率为 1.72×10^{-2} , 求得 $\alpha = 0.74$.

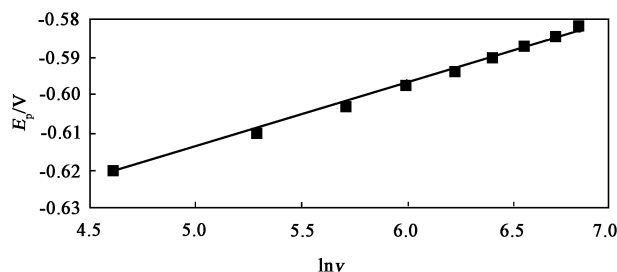


图 8 $E_p \sim \ln v$ 关系图

Fig. 8 Relationship of E_p with $\ln v$

LSV, 扫速(100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mV/s)

pH 4.50 乙酸盐溶液, [隐丹参酮] = $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

2.1.9 表观速率常数 K_b 的计算

对准可逆电极反应, 作单电位阶跃, 当 $t \rightarrow 0$, 且电位阶跃前不存在氧化剂 O_x , 在平板电极上满足关系式^[11]:

$$i(t) = nFAK_b C_{Red}^* \left(1 - \frac{2H\sqrt{t}}{\sqrt{\pi}} \right) \quad (5)$$

此式表明, 在 $t \rightarrow 0$ 的情况下, $i(t)$ 与 $\sqrt{t}$ 有线性关系, 由线性部分的截距和斜率可以求出速率常数 K_b .

以 $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的隐丹参酮做 CA 图, 并作 $i(t) \sim t^{1/2}$ 关系曲线(见图 9), 由得到的曲线斜率为 1.66×10^{-4} , 从而计算得 $K_b = 4.06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

2.1.10 隐丹参酮在玻碳电极上的反应机理

根据以上实验可以推断出隐丹参酮在 pH 4.50 的乙酸盐缓冲液中的发生的是准可逆受吸附控制有两电子两质子参与的准可逆电化学反应, 由此可推测其机理如图 10 所示.

2.2 隐丹参酮与 DNA 的相互作用

2.2.1 循环伏安曲线

在 pH 4.50 的乙酸盐缓冲液条件下, 分别用 BLM-GCE 电极, 和 BLM-DNA-GCE 电极对 $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的隐丹参酮进行循环伏安扫描, 见图 11.

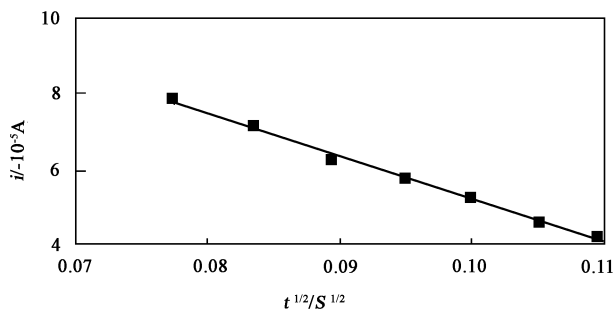


图 9 $i(t) \sim t^{1/2}$ 关系曲线

Fig. 9 Relationship of $i(t) \sim t^{1/2}$

阶跃电位: $-0.45 \sim -0.15 \text{ V}$,

[CT] = $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, pH 4.50 乙酸盐溶液.

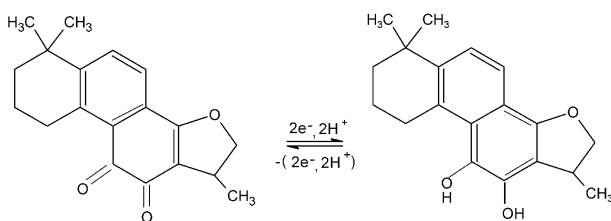


图 10 隐丹参酮在玻碳电极上的反应机理

Fig. 10 Reaction mechanism of CT on GCE

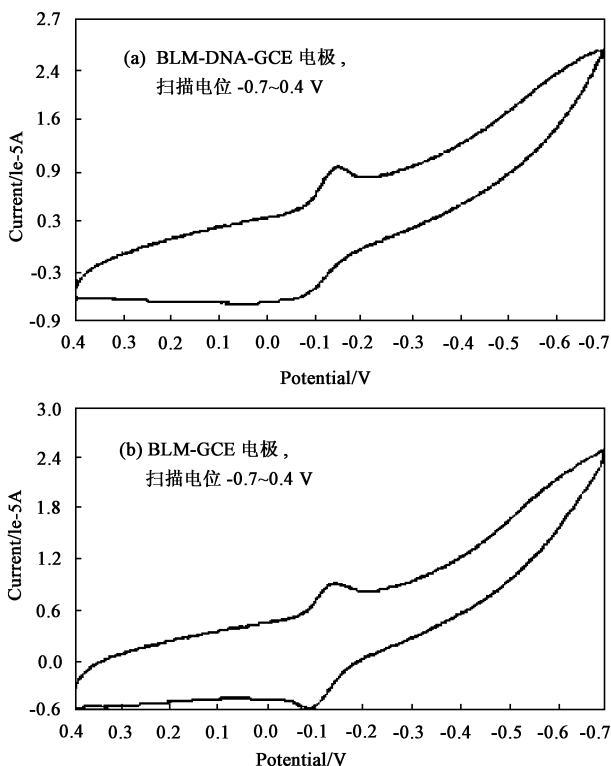


图 11 循环伏安对比图

Fig. 11 Comparison of CV

[隐丹参酮] = $6.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 扫速 100 mV/s, 静止时间 2 s.

从图 11 中可以看到, 使用 BLM-DNA 修饰的玻碳电极所测得的隐丹参酮两氧化还原峰的可逆性变差, 氧化峰峰电位往正方向偏移, 说明隐丹参酮与 DNA 形成了一种新的配合物. 这一配合物需要更正的电位才能被氧化, 氧化还原峰电流降低则说明该配合物显示相对较弱的电流响应.

2. 2. 2 方波伏安法

以 GCE、BLM-GCE、BLM-DNA-GCE 电极分别做 6×10^{-5} mol/L 隐丹参酮的方波伏安曲线(见图 12), 发现 3 种电极所测得的隐丹参酮峰电流值依次减小, 且电位不断正移. 这说明 BLM 膜阻碍了隐丹参酮的电子传递, 并且隐丹参酮与 DNA 之间的相互作用导致隐丹参酮氧化峰电流的减小和峰电位的正移.

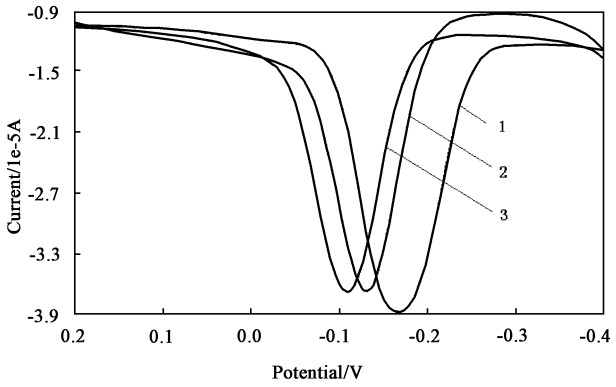


图 12 方波伏安对比图

Fig. 12 Comparison of OSWV

(1) GCE 电极; (2) BLM-GCE 电极;
(3) BLM-DNA-GCE 电极, 静止时间 2 s, 扫描电位- 0.4~ 0.2 V,
[隐丹参酮]= 6.00×10^{-5} mol/L, 扫速 100 mV/s.

2. 2. 3 pH 对 BLM 膜及隐丹参酮与 DNA 相互作用的影响

在 pH 2.00~ 12.00 范围内的 BR 缓冲液中分别使用 GCE 电极, BLM-GCE 电极和 BLM-DNA-GCE 电极对 6.00×10^{-5} mol/L 的隐丹参酮进行 OSWV 实验, 以研究 pH 对 BLM 膜及隐丹参酮与 DNA 相互作用的影响(见图 13, 图 14).

pH 对自组装膜及隐丹参酮与 DNA 的相互作用都有较大影响. 由图 14 可知, 在不同 pH 条件下 GCE 电极、BLM-GCE 电极及 BLM-GCE-DNA 电极所测得的隐丹参酮的峰电位均依次正移. 其中, 低 pH 对 3 种电极电位影响不大, 而高 pH 条件对峰电位的影响明显. 从图 5 可以看到, GCE 上隐丹

参酮在酸性条件(2.00~ 7.00) 时能稳定存在, 在碱性条件下则响应逐渐降低, 这已有文献[10, 11] 报道, 这可能是隐丹参酮发生了分解. 隐丹参酮 BLM 膜电极上的响应与在 GCE 电极上相类似. 而在 DNA 存在时, 由于 pH 在中性的条件下, DNA 最稳定且最容易与隐丹参酮发生相互作用, 因此在 pH 值为 7.00 时隐丹参酮的电化学响应最小.

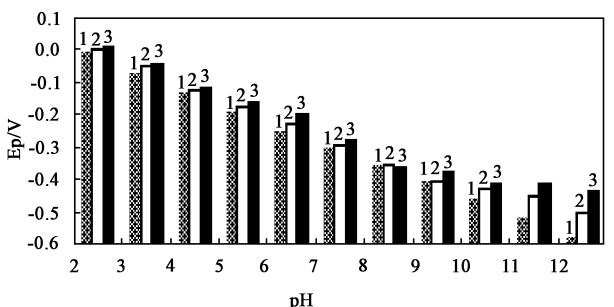


图 13 3 种电极所测隐丹参酮 pH- Ep 关系图

Fig. 13 Relationship of Ep with pH of CT

(1) GCE 电极; (2) BLM-GCE 电极; (3) BLM-DNA-GCE 电极,
OSWV 法, 扫描电位- 0.7~ 0.4 V,
[隐丹参酮]= 6.00×10^{-5} mol/L, 扫速 100 mV/s

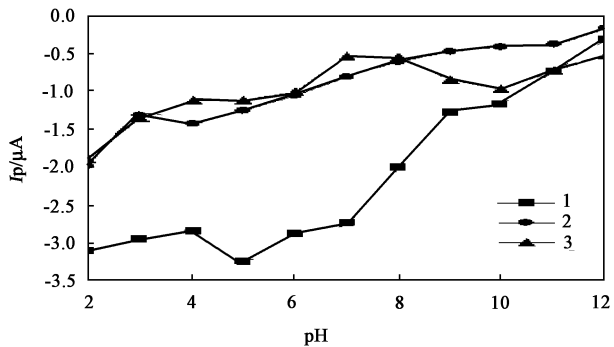


图 14 3 种电极所测隐丹参酮 Ip~ pH 关系图

Fig. 14 Relationship of Ip with pH of CT

(1) GCE 电极; (2) BLM-GCE 电极; (3) BLM-DNA-GCE 电极,
OSWV 法扫描电位- 0.7~ 0.4 V,
[隐丹参酮]= 6.00×10^{-5} mol/L, 扫速 100 mV/s

3 结论

本实验利用各种现代电化学技术对隐丹参酮在玻碳电极(GCE) 上的吸附行为及氧化还原机理进行了较为详细的探讨. 隐丹参酮在 pH 4.50 的乙酸盐缓冲液中发生的是受吸附控制的、有两电子两质子参与的准可逆电化学反应, 并对其一系列动力学参数进行了测定. 此外, 还利用嵌有 DNA 的双层磷

脂膜修饰玻碳电极, 作为传感器直接检测与 DNA 作用的隐丹参酮的电化学响应, 并探讨了 pH 对自组装膜及隐丹参酮与 DNA 相互作用的影响.

参考文献:

- [1] Lee D S, Lee S H, Noh J G, *et al.* Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(12): 2 236-2 239.
- [2] 傅乃武, 范贤骏, 王永泉, 等. 丹参对实验肿瘤生长和转移的影响及其作用原理的初步探讨[J]. *中华肿瘤杂志*, 1981, 3(2): 165-170.
- [3] Xue M, Cui Y, Wang HQ, *et al.* Reversed-phase liquid chromatographic determination of cryptotanshinone and its active metabolite in pig plasma and urine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 21(1): 207-213.
- [4] 李俊芬, 许志成, 董川. 隐丹参酮和丹参酮 IIA 滤纸基质室温磷光法的研究[J]. *分析科学学报*, 2003, 19(3): 213-216.
- [5] 张静, 陈敬华, 叶桦珍, 等. 隐丹参酮的电化学行为及其测定[J]. *分析试验室*, 2006, 25(10): 7-10.
- [6] Tong Y, Han X, Song Y, *et al.* Characterization and property of DNA incorporated bilayer lipid membranes [J]. *Biophysical Chemistry*, 2003, 105(1): 1-9.
- [7] 董川, 乔锦丽, 杨频. pH 对隐丹参酮和丹参酮 IIA 的荧光特性及分子结构影响研究[J]. *光谱实验室*, 2000, 17(4): 369-372.
- [6] 梁英珍, 薛磊. 丹参中丹参酮 IIA 和隐丹参酮在不同 pH 值条件下含量变化规律探讨[J]. *西北药学杂志*, 2003, 18(3): 108-109.
- [7] 李启隆. 电分析化学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1995. 314.
- [8] 张祖训, 汪尔康. 电化学原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 439.
- [9] 吴浩青, 李永舫. 电化学动力学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 98.

The Study on the Electrochemical Behaviors of Cryptotanshinone and Its Interaction with DNA

LIU Wei^{1,2}, WU Xiaoping¹, ZHENG Guosen³, ZHANG Lan¹,
CHEN Hongqing², CHEN Guonan¹

(1. Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety, Ministry of Education, Fuzhou university, Fuzhou 350002, China;

2. Instrumental and Analysis Research Center, Fuzhou university, Fuzhou 350002, China;

3. SGS-CSTC Standards Technical Services CO., Xiamen, 361000, China)

Abstract: The electrochemical behavior of cryptotanshinone was investigated on glassy carbon electrode (GCE) in detail, and its adsorptive behavior and redox mechanism was also discussed. The preparation and characterization of self-assembled DNA modified electrode was preliminary discussed. Furthermore, this electrode has been used to investigate the interaction of cryptotanshinone with DNA.

Key words: cryptotanshinone; electrochemistry; modified electrode; DNA; interaction

Classifying number: O657.1