

# 芹菜素镧配合物的结构表征及生物活性研究

杨云裳<sup>1</sup>, 陶莲春<sup>1</sup>, 张应鹏<sup>1</sup>, 孙世琪<sup>2</sup>, 郭慧琛<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>兰州理工大学石油化工学院, 兰州 730050; <sup>2</sup>中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046

**摘要:**以芹菜素和硝酸镧为原料首次合成芹菜素镧配合物, 通过元素分析、摩尔电导、红外光谱、热差分析、核磁共振氢谱来分析测定配合物的组成和结构, 并对配合物进行了清除超氧自由基( $O_2^{\cdot -}$ )和羟自由基( $\cdot OH$ )的研究以及对宫颈癌细胞 Hela 的抗肿瘤活性的研究。结果表明, 配合物组成为:  $La(C_{15}H_9O_5)_2NO_3 \cdot 1.5H_2O$ , 其具有较强的抗氧化活性和抗宫颈癌细胞 Hela 活性。

**关键词:**芹菜素; 稀土配合物; 抗氧化活性; 抗肿瘤活性

中图分类号: R91

文献标识码: A

## Structure and Biological Activity of the La(III) Complex with Apigenin

YANG Yun-shang<sup>1\*</sup>, TAO Lian-chun<sup>1</sup>, ZHANG Ying-peng<sup>1</sup>, SUN Shi-qi<sup>2</sup>, GUO Hui-chen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Petrochemical Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 730046, China

**Abstract:** The La(III) complex with apigenin was first synthesized through lanthanum nitrate with apigenin, the complex was characterized by elemental analysis, molar conductance, IR, <sup>1</sup>H NMR, TG-DSC. The scavenging effect on the superoxide radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) and the antitumor activity on cervical cancer cells with complex were also studied. The results showed that the molecular formula of the complex is  $La(C_{15}H_9O_5)_2NO_3 \cdot 1.5H_2O$  and it has stronger antioxidant activity and antitumor activity.

**Key words:** apigenin; La(III) complex; antioxidative activity; antitumor activity

黄酮类化合物, 是有共同母核(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)苯丙吡喃酮的多酚类化合物, 他们具备较强的自由基清除活性、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性, 以及抗炎、镇痛活性<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物在植物界分布很广, 黄酮苷元化合物有较大极性, 微溶于水, 因此不利于吸收<sup>[2]</sup>。

芹菜素, 是一种黄酮类化合物。已研究出, 芹菜素对人类中乳腺癌细胞、白血病细胞和恶性肿瘤细胞等的生长有明显抑制<sup>[3,4]</sup>。由于芹菜素分子结构中, 有着 C-5 位羟基与 C-4 位羰基, C-2 与 C-3 之间的双键, C-5 与 C-7 上的羟基, 所以芹菜素具有较强的螯合作用<sup>[5]</sup>。

稀土配合物独特的生物活性越来越受到关注。黄酮类化合物与稀土元素形成稀土配合物, 作为治

疗糖尿病的药物活性分子<sup>[6]</sup>, 以及作为抗肿瘤及治疗骨质疏松的活性<sup>[7]</sup>药物。本文通过首次合成了芹菜素镧配合物, 通过元素分析、摩尔电导、红外光谱、热差分析、核磁共振氢谱来分析测定配合物的组成和结构, 并研究了配合物的抗氧化活性和对宫颈癌细胞 Hela 的抗肿瘤活性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Perkin Elmer 2400 型元素分析仪; 美国 Avater-360 傅立叶红外光谱仪 (KBr 压片); Varian Inova-400 型超导核磁共振仪; STA 409 PC 热重-差热分析仪; DDS-308A 型电导率仪; VIS-7220G 紫外分光光度计; 酶标仪 (680), CO<sub>2</sub> 培养箱, 生物显微镜。

芹菜素 97% (购买于阿拉丁试剂); 硝酸镧 99% (AR, 购买于阿拉丁试剂); 三羟甲基氨基甲烷、邻苯三酚、亚甲蓝、DMF 等试剂均为国产分析纯, 所用水均为蒸馏水; 宫颈癌细胞 Hela、PBS 胎牛血清、

收稿日期: 2013-07-22 接受日期: 2013-12-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100688); 甘肃省教育厅硕博基金项目(1101ZTC103)

\* 通讯作者 E-mail: yangyunshang@tom.com

高糖培养基 DMEM、胰酶等均来自于中国农业科学院兰州兽医研究所。

## 1.2 配合物的合成

取配体芹菜素 1.0 mmol 溶于 15 mL 的丙酮溶液中,在室温下(23.1 °C)避光搅拌 10 min,然后将 0.1 mmol 稀土硝酸铜加入到混合液中,搅拌 2 h 后,再滴加 1.0 mmol 的三乙胺。片刻后,溶液中有沉淀产生。室温继续搅拌 20 h 后,常压常温过滤分离,得黄色固体物,并用丙酮反复洗涤沉淀,置于真空干燥箱中(35 °C)干燥备用,产率为 71.08%。

## 1.3 抗氧化活性实验

### 1.3.1 配合物对·OH 自由基的清除作用:

·OH 自由基清除试验用  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ -亚甲基蓝体系<sup>[8]</sup>来测定,本实验中略有改动。在 10 mL 容量瓶中依次加 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液 3.0 mL,0.02 g/L 亚甲基蓝 1.0 mL,2 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液 1.0 mL,试样溶液 1.0 mL,0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 1.0 mL,蒸馏水稀释至刻度。30 °C 水浴中加热反应 30 min,在 617 nm 处测其吸光度。自由基清除率的计算:抗氧化剂清除羟自由基作用按上述方法,加入抗氧化剂后测  $A_{617}$ (加药),则得自由基清除率 K 的计算公式如下:

$$K = (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4) \times 100\%$$

其中:

$A_1$  为加入抗氧化剂反应后亚甲基蓝溶液的吸光度值;

$A_2$  为不加抗氧化剂,羟自由基与亚甲基蓝溶液反应后的吸光度值;

$A_3$  为不加抗氧化剂和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,亚甲基蓝溶液的吸光度值;

$A_4$  为空白参比蒸馏水的吸光度值。

### 1.3.2 配合物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除作用

超氧自由基清除试验采用碱性条件下邻苯三酚的自氧化产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$  自由基体系<sup>[9]</sup>。取 pH 8.2 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 9.0 mL,置于 25 °C 水浴中预热 20 min,分别加入 0.2 mL 试样和 25 °C 预热过的 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.8 mL,混匀后于 25 °C 水浴中反应 5 min,加入 8 mol/L 的盐酸 0.5 mL 终止反应,318 nm 处测定吸光度( $A_{\text{样}}$ )。空白对照组( $A_0$ )以相同体积的蒸馏水代替样品。

自由基清除率计算公式为:清除率 =  $[(A_0 - A_{\text{样}}) / A_0] \times 100\%$ 。

## 1.4 抗肿瘤活性实验

细胞培养:本实验用宫颈癌细胞 HeLa 作为实验对象。肿瘤细胞采用含有 5% PBS、抗生素的 DMEM 生长培养基培养。肿瘤细胞在饱和相对湿度,恒温 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。每天两次置于生物显微镜观察细胞生长情况。当细胞呈对数生长,细胞覆盖培养瓶底的 70% ~ 80% 时,用 2.5 g/L 的胰酶消化成单个细胞接种传代。取对数生长期的细胞用于实验。

MTS 检测细胞存活率:取对数生长期的肿瘤细胞制成细胞悬液,再将细胞接种至 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。接种完毕,培养 12 h 待细胞贴壁并长到一定数量,吸取出每孔中的培养液,分别加入不同浓度的受试配合物 100  $\mu\text{L}$ ,其最终浓度分别为:10、30、50、120、180 和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,同时设置空白对照组(只接种等体积等密度的细胞悬液,不加入药品),各组设置 4 个重复孔,加样体积为每孔 100  $\mu\text{L}$ 。药物作用 24、48 h 两个时间段之后,每孔加入 MTS/PMS(体积比为 2 mL/100  $\mu\text{L}$ )混合溶液 20  $\mu\text{L}$ ,在饱和相对湿度,恒温 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中继续培养 1 ~ 4 h,然后使用 ELISA 平板读数在 490 nm 处读取吸光值。每个组分别取 4 个重复孔  $\text{OD}_{490}$  均值<sup>[10]</sup>。

存活率计算公式为,存活率 = (试验组  $\text{OD}_{490}$  / 空白对照组  $\text{OD}_{490}$ )  $\times$  %。

## 2 结果与讨论

### 2.1 配合物的组成及一般性质

对芹菜素稀土铜配合物,测定了其摩尔电导。在 25 °C 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中进行测试,根据电解质类型与摩尔电导的关系,可确定配合物为非电解质<sup>[11]</sup>。用不同的溶剂测试配合物的溶解性,得知:配合物易溶于 DMF、DMSO 等溶剂,微溶于甲醇、乙醇和吡啶,难溶于水、乙醚、丙酮、环己烷、乙酸乙酯等,在空气中较稳定。用元素分析仪测定出配合物 C、H、N 的含量。相关测定结果数据见表 1。

### 2.2 配合物的红外光谱

芹菜素及其稀土铜配合物的红外光谱见图 1。从两物质红外光谱图(如图 1)可以看出配合物的红外光谱的主要特征峰与芹菜素相比较有明显差异。配体化合物在 900 ~ 1700  $\text{cm}^{-1}$  范围内的苯环骨架特征吸收带基本无改变,说明配合物的苯环结构依然存在;配位后芹菜素的羟基伸缩振动吸收带 3000

表 1 配合物的元素分析与摩尔电导率

Table 1 Elemental analysis and molar conductance data for the complex

分子式 Molecular Formula	碳含量(计算值) C% (Cal) %	氮含量(计算值) N% (Cal) %	氢含量(计算值)H% (Cal) %	电导率 $\Lambda S \cdot cm^2 mol^{-1}$
La(C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> · 1.5H <sub>2</sub> O	52.63(52.79)	2.046(1.927)	3.07(3.53)	43.8

cm<sup>-1</sup>处明显减弱,此弱宽峰带是由于芹菜素的 6 位羰基和 5 位羟基与稀土镧形成配位键,引起羰基电子密度偏离几何中心而移向氧原子,降低了双键性质。配位前在 2922 ~ 2560 cm<sup>-1</sup>之间有四个吸收峰,2921.08 cm<sup>-1</sup>为强吸收峰;形成配合物后,在 3097 ~ 2621 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰明显减弱且宽度变宽。而其 C=O 的吸收峰从 1683.43 cm<sup>-1</sup>向低波红移到 1652.84 cm<sup>-1</sup>,C-O 的吸收峰从 1598.98 cm<sup>-1</sup>红移到 1608.71 cm<sup>-1</sup>,说明配体中羰基上的氧原子同中心的稀土镧离子形成配位,使得羰基的双键振动减弱,波数减少。配合物红外谱图中,可以看出 La-O 伸缩振动的吸收峰在 495 ~ 520 cm<sup>-1</sup>出现了,说明了配合物的形成。配合物红外图谱中有 1356.78 cm<sup>-1</sup>和 831.04 cm<sup>-1</sup>两处吸收峰,可以知道有 NO<sub>3</sub> 的存在,未能发现游离硝酸根的吸收峰,表明配合物中没有游离的硝酸根,硝酸根以双齿形式参与配位<sup>[12]</sup>。

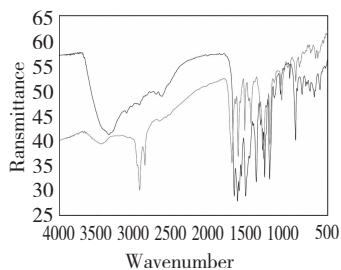


图 1 配合物的红外光谱(a,配合物 b 芹菜素)

Fig. 1 IR spectra of complex and apigenin (a, complex b, apigenin)

### 2.3 配合物的核磁共振氢谱

以氘代二甲亚砜(DMSO)为溶剂测定了配体芹菜素及配合物的<sup>1</sup>H NMR 谱图。芹菜素:<sup>1</sup>H NMR (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>),  $\delta$ (ppm): 6.19d,  $J = 2$  Hz, (1H); 6.48 (d,  $J = 2$  Hz, 1H); 6.77s, (1H); 6.93d,  $J = 2, 4.4$  Hz, (2H); 7.92(d,  $J = 8.8$  Hz, 2H); 12.96 (s, 1H)。如图 3。芹菜素稀土镧配合物:<sup>1</sup>H NMR,  $\delta$  (ppm): 5.94 (s, 1H); 6.20 (s, 1H); 6.60 (s, 1H); 6.89 (d,  $J = 2, 5.6$  Hz, 2H); 7.87 (d,  $J = 11.6$  Hz, 2H); 12.89 (s, 1H)。如图 2。由核磁共振氢谱中可以看到 5 位羟基 H 在核磁谱中消失,这表明羟基 H 被稀

土金属离子所取代,羟基 O 参与配位,与文献比较 [13] 进一步说明配合物的生成。

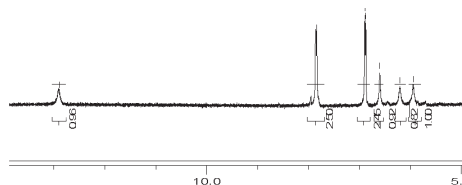


图 2 配合物的氢谱

Fig. 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of complexes

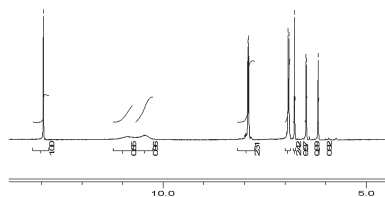


图 3 芹菜素的氢谱

Fig. 3 <sup>1</sup>H NMR spectra of Apigenin

### 2.4 配合物的热分析

对配合物进行热重-差热分析,空气气氛下以 10 °C/min 的速率从 25 °C 升温至 800 °C 获得 TG-DTA 曲线(见图 4)。热分析结果表明,配合物在 100 °C 以下 TG-DTA 曲线上有失重现象和一个小的吸热峰,而失去的重量近似等于所含结晶水的重,推测出此峰为失去结晶水的吸热峰<sup>[14]</sup>。继续升温,经氧化放热后配合物体系在 595 °C 达到恒重,可能是得到稳定的对应氧化产物,配合物总失重为 88.4%,与计算值基本相符。

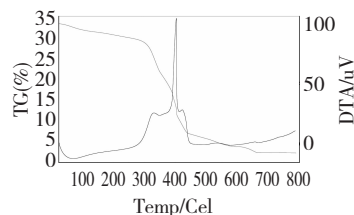


图 4 配合物的差热-热重分析

Fig. 4 TG-DTA curves of complexes

根据芹菜素稀土镧配合物的元素分析、红外光谱、核磁共振氢谱和热重-差分析结果,可初步确定

芹菜素稀土配合物的可能结构如图 5。

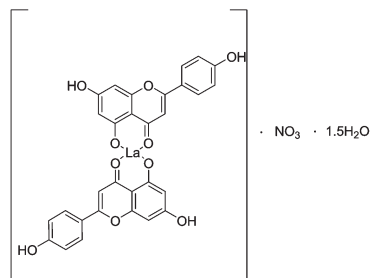


图 5 芹菜素镧配合物的可能结构

Fig. 5 Possible structure of the apigenin-La( III ) complexes

## 2.5 配合物的抗氧化活性

配合物对  $O_2^{\cdot -}$  自由基的清除作用:配合物对超氧自由基( $O_2^{\cdot -}$ )的清除率如图 6。从图中可以看到配合物对  $O_2^{\cdot -}$  的清除能力较强,随着浓度的增大,配合物对  $O_2^{\cdot -}$  的清除能力逐渐加强,在浓度为  $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  时基本达到了最高清除率。

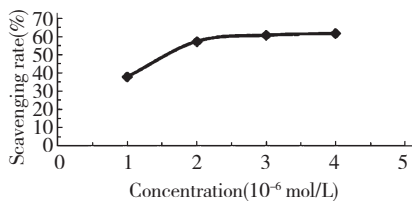


图 6 配合物对超氧阴离子的清除效果

Fig. 6 Scavenging effect of complexes against  $O_2^{\cdot -}$  radical

配合物对  $\cdot \text{OH}$  自由基的清除作用:配合物对羟自由基( $\cdot \text{OH}$ )的清除率如图 7。从图中可以看到配合物对  $\cdot \text{OH}$  的清除能力也较强,随着浓度的增大,配合物对  $\cdot \text{OH}$  的清除能力逐渐加强。

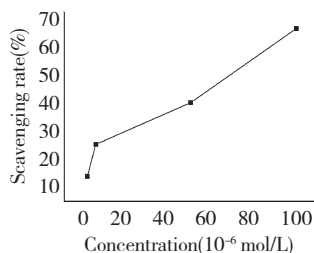


图 7 配合物对羟自由基的清除效果

Fig. 7 Scavenging effect of complexes against  $\cdot \text{OH}$  radical

## 2.6 配合物的抗肿瘤活性

图 6 为芹菜素稀土配合物对宫颈癌细胞 Hela 在 24、48 h 时不同浓度下对应的存活率。由图可见,配合物在两个时间段对此种细胞株的抑制活性

较强。在 24 h,低浓度  $30 \mu\text{g/mL}$  以下对细胞存活抑制率效果不明显,当细胞浓度到  $120 \mu\text{g/mL}$  时细胞株的抑制率较高,已达到 50% 左右。在 48 h,浓度在  $30 \mu\text{g/mL}$  时对细胞存活率的抑制效果已经很高,达到了 50% 左右;浓度为  $50 \mu\text{g/mL}$  时对细胞的抑制率达到 60%。从图中可以明显看出,在同一时限,抑制作用随化合物浓度的增加而增加;在同一浓度点,抑制效应随配合物作用时间的延长而增强。

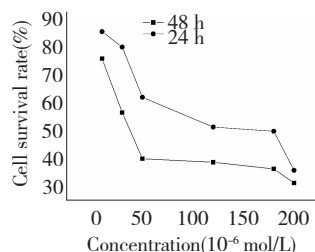


图 8 配合物对宫颈癌细胞 Hela 在 24、48 h 时不同浓度下对应的存活率

Fig. 8 Survival rate of the complexes in Hela cells (24 h and 48 h)

## 3 结论

本文以芹菜素为配体合成了一个芹菜素镧配位化合物,利用元素分析、红外光谱、热重分析、核磁共振氢谱等对其结构进行了表征,确定该配合物的组成为:  $\text{La}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5)_2\text{NO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 。并通过研究该稀土配合物对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除作用,得知:该配合物具有一定抗氧化活性,其中对超氧阴离子自由基、羟自由基的抑制作用较为明显。配合物对宫颈癌细胞 Hela 的抗肿瘤活性研究表明:浓度大于  $30 \mu\text{g/mL}$  时对细胞株 Hela 增值有明显的抑制作用;在同一时限,抑制作用随化合物浓度的增加而增加;在同一浓度点,抑制效应随配合物作用时间的延长而增强。其生物活性均强于配体芹菜素的作用,这一结论与文献报道的结果相似<sup>[15]</sup>,揭示该配合物在抗癌药物方面的应用有很大潜力,说明芹菜素与稀土元素具有协同抗氧化效应。

## 参考文献

- Weston LA, Mathesius U. Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chemical Ecology*, 2013; 1-15.
- Du H, Wang H, Yu J, et al. Enrichment and purification of total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extracts with

- macroporous resins. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, 51:7349-7354.
- 3 Lefort  $\epsilon$ C, Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57:126-144.
  - 4 Chen KK(陈况况), Zhang HH(章宏慧), Chen JC(陈健初). Research progress in mechanism of apigenin's anticarcinogenic activity on cancer cells. *Sci Tech Food Ind(食品工业科技)*, 2013, 3:392-395.
  - 5 Badea M, Olar R, Marinescu D, *et al.* Thermal stability of new vanadyl complexes with flavonoid derivatives as potential insulin-mimetic agents. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2010, 99:823-827.
  - 6 Badea M, Olar R, Uivarosi V, *et al.* Synthesis and characterization of some vanadyl complexes with flavonoid derivatives as potential insulin-mimetic agents. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2012, 107:279-285.
  - 7 Ferrer EG, Salinas MV, Correa M J, *et al.* Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV) complexes. *J Biolo Inorg Chem*, 2006, 11:791-801.
  - 8 Cai Z(蔡卓), Zhang X(张娴), Li Y(李园), *et al.* Determination of hydroxyl radical scavenging rate of health products by fenton-methylene blue chemiluminescence system. *Chin J Spec Lab(光谱实验室)*, 2011, 28:583-586.
  - 9 Quansah JK, Udenigwe CC, Saalia FK, *et al.* The effect of thermal and ultrasonic treatment on amino acid composition, radical scavenging and reducing potential of hydrolysates obtained from simulated gastrointestinal digestion of cowpea proteins. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2013, 68:31-38.
  - 10 Pawlowski JE, Nesterov A, Scheinman RI, *et al.* NF-kappa B does not modulate sensitivity of renal carcinoma cells to TNF alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Anticancer research*, 2000, 20:4243-4255.
  - 11 Geary WJ. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord Chem Rev*, 1971, 7:81-122.
  - 12 Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. New York: Wiley, 1986.
  - 13 Pereira R, Andrades NED, Paulino N, *et al.* Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules*, 2007, 12:1352-1366.
  - 14 Modi CK, Thaker BT. Some novel tetradentate Schiff base complexes VO (IV) and Cu (II) involving fluorinated heterocyclic  $\beta$ -diketones and polymethylene diamines of varying chain length. *J Thermal Analysis & Calorimetry*, 2008, 94:567-577.
  - 15 Zhao F(赵芳), Liang H(梁慧), Cheng H(程惠), *et al.* Synthesis, characterization and antioxidative activity of metal complexes with Rhein. *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2011, 69:925-930.
- 
- (上接第 1401 页)
- 8 Na MK, Kim BY, An JS, *et al.* Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus commixta*. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2009, 24:1056-1059.
  - 9 Salimuzzaman S, Farrukh H, Sabira B, *et al.* Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. *Nat Prod*, 1988, 51:229-233.
  - 10 Nakajma K, Taguchi H, Endo T, *et al.* The Constituents of *Scirpus fluvialis* (Torr.) A Gray I The Structures of Two New Hydroxystibene Dimers, Scirpusin A and B. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26:3050-3057.
  - 11 Monaco P, Pervitera L. Isoprenoids from the Leaves of *Quercus Suber*. *J Nat Prod*, 1984, 47:673-676.
  - 12 Im KR, Jeong TS, Kwon BM, *et al.* Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase Inhibitors from *Ilex macropoda*. *Arch Pharm Res*, 2006, 29:191-194.
  - 13 Puapairoj P, Naengchomnong W, Kijjoa A, *et al.* Cytotoxic Activity of Lupane-Type Triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* Two of which induce Apoptosis. *Planta Med*, 2005, 71:208-213.
  - 14 Xie JQ(谢洁琼). Anti-drug targets for type 2 diabetes Research Progress. *FMS(国外医学)*, 2005, 32:105-109.