

## 紫薯中四种花色苷抗氧化活性的密度泛函理论研究

马懿<sup>1\*</sup>, 肖雄峻<sup>1</sup>, 包文川<sup>1</sup>, 霍丹群<sup>1,2</sup><sup>1</sup>四川理工学院生物工程学院, 自贡 643000; <sup>2</sup>重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

**摘要:**本研究旨在分析紫薯中四种不同花色苷的抗氧化机理。利用 DPPH 试验和脂肪过氧化抑制能力试验分析四种花色苷的体外抗氧化活性, 进而通过密度泛函理论对花色苷及其简化分子模型的优化结构、键离能、电离势等进行分析, 探讨抗氧化机理。结果显示, 四种花色苷的 OH-4' 酚羟基的活性最高, 键离能小于白藜芦醇的键离能, 抗氧化活性的理论计算结果与体外抗氧化试验结果一致。研究结果表明, 紫薯花色苷具有较好的抗氧化活性, 并且 DFT 方法为花色苷抗氧化活性的开发提供了有力的理论基础。

**关键词:** 花色苷; 抗氧化活性; 密度泛函理论; 键离能

中图分类号: R285.5; Q946.83

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.9.010

## The Density Functional Theoretical Study on the Antioxidant Activities of Four Anthocyanins from Purple Sweet Potato

MA Yi<sup>1\*</sup>, XIAO Xiong-jun<sup>1</sup>, BAO Wen-chuan<sup>1</sup>, HUO Dan-qun<sup>1,2</sup><sup>1</sup>College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Technology, Zigong 643000, China;<sup>2</sup>College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

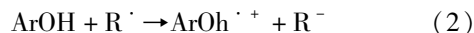
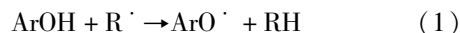
**Abstract:** This study was focused on the antioxidant mechanisms of four anthocyanins from purple sweet potato. DPPH assay and lipid peroxidation assay were used to determine the antioxidant activities of the anthocyanins. And the geometrical features, bond dissociation energy (BDE) and ionization potential (IP) parameters were computationally explored using DFT (density functional theory) study. The results showed that the phenolic hydroxyl with OH-4' were the most active, and the BDE were lower than that of resveratrol. The theoretical calculation results were consistent with the experimental conclusions. Thus, the anthocyanins could have good antioxidant activities. The DFT method could be potential for the development of antioxidant activity of anthocyanin.

**Key words:** anthocyanin; antioxidant activity; density functional theory; bond dissociation energy

花色苷是一类广泛存在于水果、蔬菜等植物中的水溶性色素, 其具有抗氧化、抗心血管疾病、抗肿瘤、抗炎等广泛的生理活性<sup>[1]</sup>。这些生理活性与其特殊的化学结构密切相关<sup>[2]</sup>。花色苷分子具有 C6-C3-C6 的母核结构, 氢原子容易从芳香环的酚羟基离去, 并通过  $\pi$  电子共轭提高未配对电子的离域能力。大量前期研究早已证实不同化学结构的花色苷分子的抗氧化活性差异, 该差异主要与糖苷化和酰基化程度有关<sup>[3,4]</sup>。

酚类化合物的体外抗氧化机理主要存在两种机制: 氢原子转移机制和单电子转移机制<sup>[5]</sup>。这两种

机制可分别由如下两种方程进行表示:



研究者已应用该理论对黄酮类化合物和原花青素的键离能和电离势进行了较好的分析和研究<sup>[6-8]</sup>。结果显示化合物的键离能越低, O-H 越容易断裂, 抗氧化能力越好; 同理, 电离势越低, 抗氧化能力越好。在气相中的理论研究表明, 黄酮类的 BDE 和 IP 分别在 70 ~ 90 和 160 ~ 190 kcal/mol 之间<sup>[9]</sup>。本课题组前期对多种紫薯花色苷抗氧化机理进行了分析。然而, 取代基对花色苷抗氧化活性的影响及构效关系还缺乏深入研究。因此, 本研究通过对 4 种紫薯花色苷键离能和电离势的量子化学计算, 说明其清除 DPPH 自由基和抑制脂肪过氧化能力, 进而通过简化分子模型的方法阐明构效关系。

收稿日期: 2018-03-19 接受日期: 2018-07-02

基金项目: 国家自然科学基金(81772290); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2017-04); 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金(2016GTJ004)

\* 通信作者 E-mail: zhangyer2008@suse.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

芍药色素-3-咖啡酰桑布糖苷-5-葡萄糖苷 (A1), 矢车菊素-3-双咖啡酰桑布糖苷-5-葡萄糖苷 (A2), 芍药色素-3-咖啡酰-p-苯酚酰桑布糖苷-5-葡萄糖苷 (A3) 和矢车菊素-3-咖啡酰-p-苯酚酰桑布糖苷-5-葡萄糖苷 (A4) 购于印度 Clearsynth 公司。白藜芦醇标准品 (纯度  $\geq 99\%$ ), 南京紫竹生物科技有限公司; DPPH 清除能力试剂盒, 其它常用试剂均为分析纯, 成都科龙试剂有限公司。

紫外可见光分光光度计 (北京普析·中国); 电子天平 (Mettler-Toledo 集团·瑞典); Milli-Q advantage 超纯水系统 (Millipore 公司, 德国)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DPPH 自由基清除能力试验

根据 Kahkonen 的试验方法<sup>[10]</sup>进行四种紫薯花色苷的 DPPH 自由基清除能力测定。将 2 mL 样品溶液 (10  $\mu\text{M}$ ) 分别与 2 mL DPPH 乙醇溶液 (60  $\mu\text{M}$ )、2 mL 蒸馏水混合均匀, 在室温条件下避光静置 1 h, 测定其在 517 nm 处的吸光值; 再将 2 mL DPPH 乙醇溶液与 2 mL 蒸馏水混匀, 以相同方法测定吸光值作为对照。

#### 1.2.2 脂肪过氧化抑制能力试验

抗脂质氧化效果采用硫代巴比妥酸反应 (TEARS) 试验进行<sup>[11]</sup>。首先配制 1.0 g 小鼠肝脏与 100 mL 三蒸水的混合物, 以此作为脂肪富集环境。然后, 取 1 mL 上述混合物与 0.2 mL (10  $\mu\text{M}$ ) 样品溶液和 50  $\mu\text{L}$  的  $\text{FeCl}_2$  溶液 (0.1 mM) 进行均质, 并在 37  $^\circ\text{C}$  条件下反应 1 小时。该反应通过加入 0.3 mL 三氯乙酸 (20%, w/v) 和硫代巴比妥酸 (0.8%, w/v) 终止。然后, 将反应溶液在 100  $^\circ\text{C}$  下

加热 15 分钟, 再以 6 000 rpm 条件下离心 5 分钟。最后, 测量上清液在 532 nm 处的吸光值。

#### 1.2.3 计算方法

花色苷及简化分子模型通过 GaussView 5.0 进行建立。它们的优化结构利用 Gaussian 09, Revision A.02 软件<sup>[12]</sup>, 通过密度泛函方法 (DFT) 方法在 B3LYP 6-31G(d)<sup>[13]</sup> 水平上进行计算。所有频率分析结果均无虚频。零点振动能利用校正因子 0.973 进行修正, 最后计算 BDE 和 IP。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫薯花色苷的抗氧化能力

DPPH 自由基清除能力试验和脂肪过氧化清除能力试验分别是基于电子转移和氢原子转移两种机理设计的体外抗氧化试验方法。图 1 展示了四种不同取代的花色苷和白藜芦醇清除 DPPH 自由基的能力。由图可知, 待测化合物均有较好的抗氧化能力, 4 种紫薯花色苷清除 DPPH 自由基的能力均高于白藜芦醇。特别是 A3 清除 DPPH 自由基的能力达到 90.3%, 其它三种紫薯花色苷抑制能力顺序为  $A1 > A4 > A2$ 。由此可见, 5' 羟甲基取代的芍药色素清除 DPPH 自由基的能力较强。此外, 苯酚酰基取代比咖啡酰取代的花色苷清除 DPPH 自由基的能力更强。然而, 脂肪过氧化清除能力试验并没有反映出相同的规律。白藜芦醇的抑制脂肪过氧化能力明显高于紫薯花色苷。4 种花色苷抑制脂肪过氧化的能力顺序为:  $A2 > A3 > A4 > A1$ , 其中 A2 的脂肪过氧化抑制率为  $87.3 \pm 6.1\%$ 。由此可见, 酰化基团有利于提高花色苷抑制脂肪过氧化的能力。尽管在上述两种抗氧化试验中, 紫薯花色苷均表现出较好的抗氧化活性, 但同时不同体外抗氧化试验中也表现出差异, 因此, 其抗氧化机理需要进一步研究。

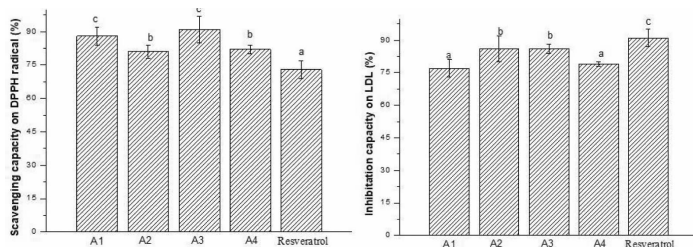


图 1 紫薯花色苷清除 DPPH 能力和抑制脂肪过氧化能力 ( $n = 3$ )

Fig. 1 DPPH test and Scavenging activities on the lipid peroxidation of the anthocyanins ( $n = 3$ )

### 2.2 取代情况对花色苷键离能和电离势的影响

由图 2 可知, 4 种紫薯花色苷分子的骨架结构

均为矢车菊素或芍药色素。它们的主要区别是 3' 的取代情况、3 位和 5 位糖苷配体的酰化程度。本

研究中 4 种紫薯花色苷分子的 B 环与 C 环存在一定的二面角, Rustioni 等<sup>[14]</sup> 研究认为该二面角的存在有利于结构的稳定, 这可能与 3-OH 的构象有关。

5 位取代基的存在使花色苷形成“三明治”结构<sup>[15]</sup>, 进一步提高其结构稳定性。

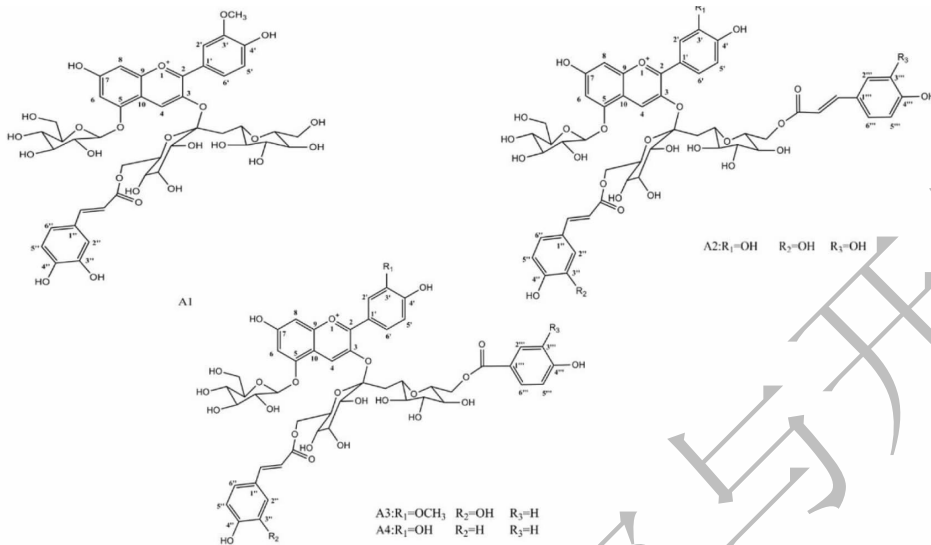


图 2 紫薯花色苷 (A1 ~ A4) 的分子结构图

Fig. 2 Structure of isolated anthocyanin (A1-A4)

氢原子转移机理(HAT)是氢原子直接从抗氧化剂转移给活性自由基从而中断链式反应。四种紫薯花色苷由于 3' 位取代基和 3 位糖苷化和酰基化程度的不同, 花色苷的键离能(BDE)也有明显差异。表 1 列出了四种花色苷的所用键离能。由表可知, A1-A4 中 OH-4' 键离能最低, 这与自由基的稳定性相关。如: A2 分子中酚羟基的 BDE 顺序为: OH-4' < OH-4'' < OH-4''' < OH-3'' < OH-8 < OH-3'。OH-4' 的 BDE 值比 OH-3' 的 BDE 值低 40.8 kcal/mol, 这也说明 OH-4' 中的氢原子更容易离去。A1 和 A3 OH-4' 的 BDE 值分别比 A2 低 5.8 和 7.2 kcal/mol。这说明当 4' 的邻位发生甲氧基取代时, BDE 显著降低<sup>[16]</sup>。而 A1 与 A3, 以及 A2 与 A4 的 BDE 并没有显著差异, 证明酰化程度没有对花色苷的 BDE 产生重要影响。

4 种花色苷的 BDE 与白藜芦醇 BDE (80.28 kcal/mol)<sup>[17]</sup> 的对比说明紫薯花色苷具有更好的抗氧化能力。此外, 理论计算结果也与体外抗氧化试验结果一致。

单电子转移是说明多酚类物质抗氧化能力的另一重要机理。电子能够从抗氧化剂转移至自由基从而中断自由基的链式反应。电离势(IP)能通过单电子转移途径预测抗氧化能力。IP 值越低说明抗氧化剂给电子能力越强。四种紫薯花色苷电离势的计算值如表 1 所示。A1 的 IP 值最高, 达 139.7 kcal/mol。随着糖苷配体上的酰化程度的增加, IP 值逐渐下降。尤其是 A2 和 A3 桑布糖苷的双酰化, 使 IP 值分别降低 8.5 和 8.3 kcal/mol。与白藜芦醇的电离势(126 kcal/mol)相比, 紫薯花色苷的 IP 值略高, 表明白藜芦醇具有更强的给电子能力<sup>[18]</sup>。

表 1 四种紫薯花色苷的键离能和电子势

Table 1 Bond Dissociation Energy (BDE) and Ionization potential (IP) of PSPa (A1-A4)

花色苷 Anthocyanins	BDE(kal/mol)							IP (kal/mol)
	OH-7	OH-3'	OH-4'	OH-3''	OH-4''	OH-3'''	OH-4'''	
A1	83.4	-	72.8	79.4	74.1	-	-	139.7
A2	93.8	134.6	78.6	129.1	81.1	100.8	83.1	131.2
A3	91.9	-	71.4	91.3	79.4	-	82.3	131.4
A4	99.9	89.4	78.4	89.1	81.4	-	88.4	139.2

### 2.3 花色苷抗氧化活性的构效分析

通过抗氧化试验和理论计算对紫薯中四种花色苷的抗氧化活性进行了研究,但抗氧化活性与分子结构的关系仍没有完全阐明。分子简化法是一种研究抗氧化机理的经济有效的方法<sup>[19,20]</sup>。在本研究中,由图2可见,A1分为四种简化模型,用以确定这些药效基团对抗氧化的作用。它们的BDE和IP也在同样的水平进行计算。A1与其简化模型的BDE和IP的对比研究可以阐明不同药效基团对抗氧化活性的贡献,结果如表2所示。

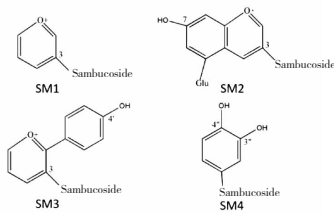


图3 A1及其简化模型的结构

Fig. 3 The structures of A1 and its simplified models

由表可知,OH-4'是A1的活性位点,SM3的OH-4'BDE值为88.7kal/mol,这比A1的BDE值高15.9 kal/mol,这说明A1的OH-4'BDE依赖于A环的取代和酰化基团。SM2的OH-7的BDE值也显著高于A1相应的BDE值。SM1、SM2、SM3和SM4的IP值分别比A1的IP值高199.8、131.6、99.8和36.1 kal/mol。很显然,四种简化模型的IP值显著高于A1的IP值,说明这些简化模型具有相对较弱的给电子能力,其中C环的给电子能力最弱,酰化基团可能提供了更强的给电子能力。

表2 A1及其简化模型的BDE和IP值

Table 2 The OH BDEs and IP of A1 and simplified models

Compounds	Bond	BDE (kal/mol)	IP (kal/mol)
SM1	-	-	330.5
SM2	OH-7	92.6	271.3
SM3	OH-4'	88.7	239.5
SM4	OH-3''	81.5	175.8
	OH-4''	78.1	-
A1	OH-4'	72.8	139.7

### 3 结论

4种紫薯花色苷的体外抗氧化活性说明其均具有较好的抗氧化活性,但由于分子结构不同,抗氧化

活性仍存在一定的差异。为了说明其取代基不同对抗氧化活性的影响以及理论基础,通过密度泛函方法从氢原子转移和电子转移等两种机理对4种花色苷的构效关系进行研究。各花色苷分子的BDE、IP值很好的揭示了其体外抗氧化试验的结果。同时,通过简化模型分析阐明了花色苷抗氧化活性的构效关系,为花色苷等类黄酮类化合物抗氧化活性的进一步开发提供了有效的理论基础。

### 参考文献

- 1 Fernandes I, Faria A, Calhau C, *et al.* Bioavailability of anthocyanins and derivatives[J]. *J Funct Foods*, 2014, 7:54-66.
- 2 Jing P, Qian B, Zhao S, *et al.* Effect of glycosylation patterns of Chinese eggplant anthocyanins and other derivatives on antioxidant effectiveness in human colon cell lines[J]. *Food Chem*, 2015, 172:183-189.
- 3 Deepha V, Praveena R, Sivakumar R, *et al.* Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 121:737-745.
- 4 Zou B(邹波), Zeng D(曾丹), Wu JJ(吴继军), *et al.* Antioxidant capacity and anthocyanins of purple-fleshed sweet potato cultivars[J]. *Food Sci(食品科学)*, 2018, 2:38-44.
- 5 Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, (53):1841-1856.
- 6 Alcaro S, Chiodo SG, Leopoldini M, *et al.* Antioxidant efficiency of oxovitisin, a new class of red wine pyranoanthocyanins, revealed through quantum mechanical investigations[J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53:66-75.
- 7 Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants[J]. *Food Chem*, 2011, 125:288-306.
- 8 Hu DB(胡栋宝), Wu XX(伍贤学), Chen WJ(陈文静), *et al.* Theoretical investigation on antioxidant activity of four flavonoids from *Medicago sativa* L. by density functional theory[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29:1666-1670.
- 9 Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123:1173-1183.
- 10 Kahkonen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:628-633.