

木犀草素配合物的制备表征及抑制黄嘌呤氧化酶的研究

肖凯军¹, 钟炼军², 蔡胜¹, 朱良¹, 龚斌¹, 朱子沛¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州百花香料股份有限公司, 广东广州 510660)

摘要: 本文运用配位效应将木犀草素与金属离子 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 反应生成了木犀草素配合物, 采用了红外、紫外、热重及元素分析对配合物进行了结构表征, 同时研究了对黄嘌呤氧化酶的抑制作用, 比较了木犀草素及其配合物抑制能力的大小, 确定了对黄嘌呤氧化酶的抑制作用类型。结果表明, 木犀草素与金属离子 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 发生了配位反应, 形成了稳定的配合物, 配合位点位于 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 处。相比于木犀草素, 木犀草素配合物对黄嘌呤氧化酶表现出更好的抑制效果, 通过固定黄嘌呤底物浓度为 0.6 mmol/L, 酶浓度对酶活力作图可知, 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型均属于可逆抑制, 通过固定黄嘌呤氧化酶浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型表现为竞争性抑制。

关键词: 木犀草素; 配合物; 黄嘌呤氧化酶; 抑制类型

文章编号: 1673-9078(2017)3-47-53

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.008

Synthesis and Characterization of Luteolin Complexes and Their Inhibition Effects on Xanthine Oxidase

XIAO Kai-jun¹, ZHONG Lian-jun², CAI Sheng¹, ZHU Liang¹, GONG Bin¹, ZHU Zi-pei¹

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Baihua Flavours & Fragrances Co., Ltd, Guangzhou 510660, China)

Abstract: The coordination effect was used to synthesize luteolin complexes between luteolin and metal ions Zn^{2+} and Mn^{2+} , and the complexes were examined by ultraviolet UV-visible spectroscopy, infrared spectroscopy, thermogravimetric-differential scanning calorimetry, and elemental analysis techniques. Moreover, the inhibition of xanthine oxidase by the luteolin complex was studied, the inhibitory capacities of luteolin and its complexes were compared, and the type of inhibition of xanthine oxidase was determined. The results indicated that coordination reactions occurred between luteolin and the metal ions Zn^{2+} and Mn^{2+} to form stable complexes. The chelation site was located at the 5-OH of ring A and 4-C=O of ring C. Compared to luteolin, its complexes exhibited a better inhibitory effect on xanthine oxidase. When the xanthine substrate concentration was 0.6 mM, the graph of enzyme concentration versus enzyme activity showed that the types of inhibition by luteolin and its complexes were reversible. When the concentration of xanthine oxidase was 10 $\mu\text{g/mL}$, the double reciprocal Lineweaver-Burk plot showed that the types of inhibition by luteolin and its complexes were competitive.

Key words: luteolin; complex; xanthine oxidase; type of inhibition

微量金属元素对人体有着极为重要的作用, 人体内的新陈代谢、防病及抗病能力均与微量元素有着极为密切的关系。微量元素 Mn 和 Zn 具有多种药理作用^[1,2]。Mn 是体内多种酶的活性基因或辅助因子, 又是某些酶的激活剂, 参与体内多方面的物质代谢, 具有重要的生理功能。Zn 是构成人体多种蛋白质所必需

收稿日期: 2016-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371743); 广州市产学研协同创新重大专项项目 (201508020086); 广东省应用型科技研发专项资金项目 (2015B020230001)

作者简介: 肖凯军, 男, 教授, 博导, 研究方向: 绿色碳水化合物加工

的元素, 参加人体内许多金属酶的组成, 能维持细胞膜的稳定性并参与许多酶的代谢和免疫功能过程, 促进机体的生长发育和组织再生, 缺锌后导致一系列代谢紊乱及病理变化。木犀草素 (Luteolin) 是一种具有多种生物活性及药理作用的天然黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗动脉粥样硬化等多种生理功效^[3-6]; 多以糖苷的形式存在于多种植物中, 在自然界中分布广泛。郑必胜等人^[7]从金银花叶粗提取物中提取出了木犀草素, 采用高效液相色谱法测定含量为 1.12%, 结果表明提取物中的木犀草素组分具有良好的抗氧化性。当微量金属元素与活性成分发生

络合后,不但能够改善此有效成分的理化性质,促进人体对其吸收利用,还可以通过协同作用,增强其生理生化功能,甚至可以产生某种新的生物活性。而络合物的形成对微量金属元素的吸收、转运和代谢又起着十分重要的作用^[8]。经研究发现,木犀草素与微量元素形成配合物后,不但可以增强其各自的生物活性,还可降低毒副作用,甚至产生某种新的生物功效。如 Luciana G. Naso 等人^[9]研究了木犀草素与钒配合物的抗肿瘤作用,结果表明钒配合物对 MDAMB231 乳腺癌细胞和 A549 肺癌细胞具有比木犀草素更强的杀伤能力。Souvik Roy 等人^[10]研究了木犀草素与钒配合物的抗氧化作用,结果表明钒配合物清除自由基的能力高于木犀草素。白海强^[11]所合成的木犀草素配合物对二甲苯和角叉菜胶引起的急性炎症具有明显的抑制作用。

黄嘌呤氧化酶(XO)在人体内可以催化次黄嘌呤和黄嘌呤生成尿酸,产生过多的尿酸会导致高尿酸血症,最终导致痛风等疾病。目前国内外降尿酸或抗痛风方面的研究焦点主要集中在对黄嘌呤氧化酶的抑制作用的研究上。研究发现木犀草素对酪氨酸酶、 α -葡萄糖苷酶和黄嘌呤氧化酶均具有一定的抑制作用, Jiakai Yan 等人^[12]研究表明木犀草素对黄嘌呤氧化酶具有显著的抑制活性,其半数抑制浓度(IC₅₀)为 4.79×10^{-6} mol/L,且抑制类型为竞争性抑制。

本文通过对木犀草素进行配位反应合成了木犀草素锌配合物和锰配合物,并进行了结构表征,这对于木犀草素配合物的研究具有重要意义,为深入研究木犀草素配合物的分子结构具有指导意义。同时,比较了木犀草素与配合物抑制黄嘌呤氧化酶作用的差异,为研究木犀草素及配合物的药理活性提供了思路,拓展了木犀草素及其配合物的应用领域。

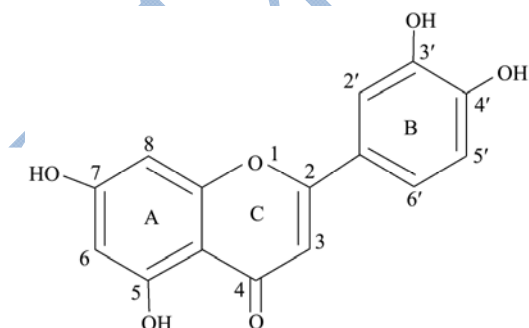


图1 木犀草素的结构式

Fig.1 Chemical structure of luteolin

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:木犀草素(C₁₅H₁₀O₆, HPLC 检测:95.76%),实验室自制;乙酸锌和乙酸锰均购自广州生化试剂厂;黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶均购自美国 Sigma 公司。

仪器: DZF-6050 真空干燥箱,上海博讯实业有限公司; SHZ-D(III)循环式多用真空泵,广州星烁仪器有限公司; BS2202S 电子分析天平,上海精密仪器仪表有限公司; pHB-3 便携式 pH 计,上海三信仪表厂; KJ1006C 超声波清洗机,广州市番禺科进超声波设备厂; HH-S 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂; JB-2 加热磁力搅拌器,常州澳华仪器有限公司; VERTEX 70 傅里叶红外光谱仪,德国 Bruker 公司; UV-1601 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司; STA449 F3 同步热分析仪,德国 NETZSCH/耐驰公司; EPMA-1600 电子探针,日本岛津公司。

1.2 木犀草素配合物的制备

实验方法主要参考 Souvik Roy 等人^[10]的研究,并加以改进。称取 0.286 g 木犀草素(1 mmol)溶于 100 mL 的无水乙醇中,振荡圆底烧瓶,并超声使其充分溶解。加入物质的量比为 2:1(木犀草素:M²⁺=2:1)的金属盐,溶液迅速变成浑浊溶液。用 1 mmol/L 的 HCl 调节 pH=4,在恒温水浴为 60 °C 的条件下,回流磁力搅拌反应 4 h,生成沉淀。真空抽滤,将所得固体用无水乙醇反复洗涤,直至洗液变成无色为止,真空干燥后可得固体粉末,称重并计算金属配合物的产率。在此条件下,木犀草素-Zn 配合物的产率可到达 83.29%,木犀草素-Mn 配合物的产率可到达 85.73%。

1.3 木犀草素配合物的结构表征

通过紫外可见光谱、红外光谱、热重分析及元素分析对木犀草素配合物的结构进行表征和分析。

1.3.1 红外光谱分析

分别称取 2 mg 木犀草素及木犀草素配合物的固体粉末置于玛瑙研钵,加入 KBr 粉末,进行研磨及压片处理,通过傅里叶红外光谱仪(FT-IR)进行红外光谱分析。

1.3.2 紫外可见光谱分析

分别称取 1 mg 木犀草素及木犀草素配合物溶于 5 mL 去离子水中,以去离子水为对照液,在紫外可见分光光度计上进行全波长扫描,波长扫描范围为 190 nm~650 nm,扫描间隔为 1 nm。

1.3.3 TG-DSC 分析

利用差示扫描热重分析仪对木犀草素配合物进行结构分析,采用氮气作为保护气体,气体流速为 10 mL/min,升温范围为 25 °C~800 °C,升温速率为

10 °C/min。

1.3.4 元素分析

利用电子探针对样品进行点扫描分析, 分别对微区的元素进行相对质量分数及相对原子数的定量分析, 为减小误差, 分别取样品中三个不同位置的点微区进行分析, 取其平均值。其中主元素定量分析的相对误差为1%~3%。

1.4 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制能力的测定

黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤产生尿酸, 尿酸在 290 nm 处具有特征吸收峰。在 5 mL 的反应体系中, 依次加入 0.6 mmol/L 的黄嘌呤底物溶液 2 mL, 0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液 2.8 mL, 不同浓度的样品溶液 0.2 mL, 充分混匀后置于 25 °C 恒温水浴 30 min, 然后加入 0.2 mL 已在 25 °C 保温 30 min 的黄嘌呤氧化酶溶液 (0.5 U/mL) 启动反应。利用分光光度计测定在 290 nm 处的吸光值, 从加入酶时开始计时, 记录反应体系中 5 min 内的吸光值变化, 每隔 30 s 测定一次。同时设立对照组。黄嘌呤氧化酶的抑制率按如下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right) \times 100\%$$

式中, A_1 指加酶加样品的反应体系的吸光值变化; A_2 指不加酶加样品的反应体系的吸光值变化; A_3 指加酶不加样品的反应体系的吸光值变化; A_4 指不加酶不加样品的反应体系的吸光值变化。

1.5 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型

在反应体系中, 固定黄嘌呤底物浓度为 0.6 mmol/L, 改变黄嘌呤氧化酶的浓度, 测定不同浓度木犀草素及配合物对酶活力的影响, 通过分析酶促反应中反应速度与酶浓度的关系, 作出拟合直线。若直线过原点, 属于可逆抑制。若直线与 X 轴平行, 属于不可逆抑制。

1.6 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制动力学分析

在反应体系中, 固定黄嘌呤氧化酶浓度为 10 μg/mL, 改变黄嘌呤底物的浓度, 测定不同浓度木犀草素及配合物对酶活力的影响。用 Lineweaver-Burk

双倒数作图, 判断木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型。如果得到一组交于 Y 轴的直线, 说明此抑制剂为竞争性抑制; 如果得到一组交于 X 轴的直线, 说明此抑制剂为非竞争性抑制; 如果得到一组平行的直线, 说明此抑制剂为反竞争性抑制。

1.7 数据分析

每个试验重复三次, 取其平均值, 采用 SPSS 软件进行显著性分析, $p < 0.05$ 时表示差异显著, $p < 0.01$ 时, 表示差异极显著。用 excel 2010 对数据进行分析处理, 用 origin 9.0 作图软件进行图形绘制。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

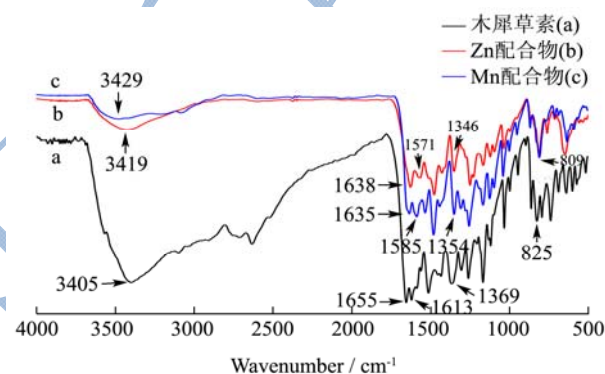


图2 木犀草素 (a)、木犀草素-Zn 配合物 (b) 和木犀草素-Mn 配合物 (c) 的红外光谱

Fig.2 IR spectra of luteolin (a), luteolin-Zn complex (b), and luteolin-Mn complex (c)

木犀草素, 木犀草素-Zn 配合物及木犀草素-Mn 配合物的红外谱图如图 2 所示, 表 1 分析了主要特征吸收峰的波长位置。从图 2 中可知, 木犀草素配合物, 相比于木犀草素本体而言, 表现出了特有的酚羟基 (C-OH) 吸收峰和羰基 (C=O) 特征吸收峰, 同时出现了特有的金属氧键 (M-O) 特征吸收峰。木犀草素的酚羟基伸缩振动吸收峰为 1369 cm^{-1} , 形成配合物以后, Zn 配合物和 Mn 配合物的酚羟基伸缩振动吸收峰分别移动至 1346 cm^{-1} 和 1354 cm^{-1} , 说明酚羟基 (C-OH) 参与了配位反应。木犀草素的羰基伸缩振动吸收峰为 1655 cm^{-1} , 形成配合物以后, Zn 配合物的羰基伸缩振动吸收峰移动至 1638 cm^{-1} , Mn 配合物的羰基伸缩振动吸收峰移动至 1635 cm^{-1} , 说明 C 环上的羰基 (C=O) 也参与了配位反应。同时, 木犀草素配合物表现出特有的吸收峰, Zn-O 及 Mn-O 的伸缩振动吸收峰分别为 808 cm^{-1} 和 809 cm^{-1} , 说明经过配位反应以后, 生成了新的金属氧键。木犀草素中苯环的 C=C 吸收峰为 1613

cm⁻¹, 形成配合物以后, Zn 配合物及 Mn 配合物的苯环 C=C 吸收峰分别移动至 1571 cm⁻¹ 和 1585 cm⁻¹, 说明参与反应以后形成了稳定的六元环结构, 使得苯环的共轭效应增强。木犀草素 C 环中的 C-O-C 键的吸收

峰相比于配合物没有变化, 说明 C 环并未开环。由此可知, 木犀草素与金属参与了配位反应, 形成了稳定的木犀草素配合物, 配合位点位于 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 处。

表 1 木犀草素及其配合物的主要红外光谱分析

Table 1 IR spectra of luteolin and its complexes

化合物	N(O-H)	v(C=O)	v(C=C)	v(C-OH)	v(C-O-C)	v(M-O)
木犀草素	3405	1655	1613	1369	1164	-
木犀草素-Zn	3419	1638	1571	1346	1165	809
木犀草素-Mn	3429	1635	1585	1354	1164	809

2.2 紫外-可见光谱分析

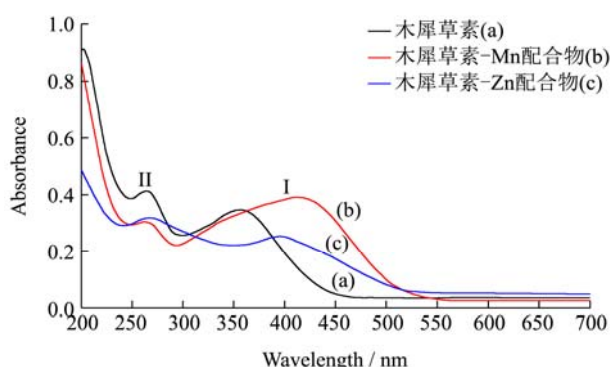


图 3 木犀草素 (a)、木犀草素-Mn 配合物 (b) 及木犀草素-Zn 配合物 (c) 的紫外光谱

Fig.3 UV spectrum of luteolin (a), luteolin-Mn complex (b), and luteolin-Zn complex (c)

表 2 木犀草素及其配合物的紫外主要吸收特征峰波长位置

Table 2 Wavelength positions of main absorption peaks of luteolin and its complexes

物质名称	峰位/nm	
	带 II	带 I
木犀草素	264	356
木犀草素-Mn 配合物	268	414
木犀草素-Zn 配合物	267	394

大多数黄酮类化合物在甲醇中的紫外吸收光谱由两个主要吸收带组成。在 300~400 nm 之间出现的峰带对应 B 环的苯甲酰基, 称为带 I; 在 240~280 nm 之间出现的峰带对应 A 环的桂皮酰基, 称为带 II。带 I 是由 B 环桂皮酰基系统的电子跃迁所引起的吸收, 带 II 是由 A 环的苯甲酰基系统的电子跃迁所引起的吸收。从图 3 可知, 木犀草素的最大吸收波长主要位于 264 nm 和 356 nm 处, 形成配合物以后, 木犀草素-Zn 配合物的位于 267 nm 和 394 nm 处, 木犀草素-Mn 配合物的最大吸收波长主要位于 268 nm 和 414 nm 处, 在 300~400 nm 之间出现的峰带 I 发生了移动, 说明木犀草素与金属离子发生了配位反应, 形成了稳定的

配合物。同时, Zn 配合物及 Mn 配合物最大吸收波长所对应的带 I 分别移动了 42 nm 和 58 nm, 究其原因是 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 参与了配位反应, 形成了稳定的六元环结构, 参与共轭体系的 π 电子发生了离域, 形成了一个大 π 键。由于共轭 π 键的离域作用, 使得体系的共轭效应增强, 导致了吸收带 I 发生了较大偏移。由此可知, 进一步证实了木犀草素与金属离子形成了稳定的配合物, 且配合位点位于 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 处。

2.3 热失重分析

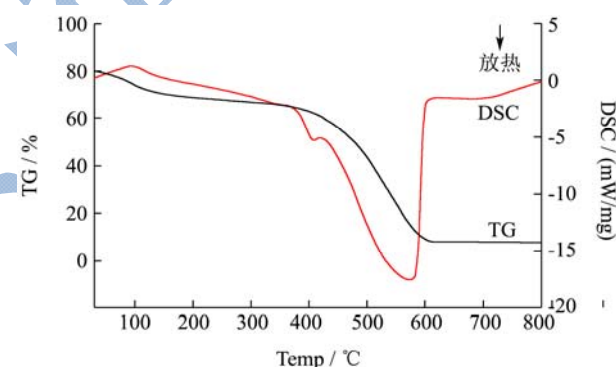


图 4 木犀草素-Zn 配合物的 TG-DSC 分析

Fig.4 TG-DSC analysis of luteolin-Zn complex

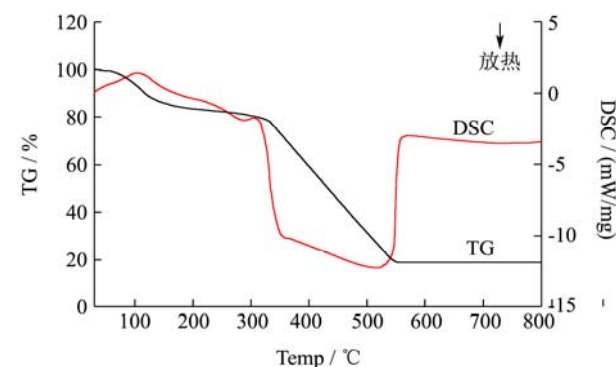


图 5 木犀草素-Mn 配合物的 TG-DSC 分析

Fig.5 TG-DSC analysis of luteolin-Mn complex

从图 4 中可知, 木犀草素-Zn 配合物在 92.3 °C 附近有一个微弱的吸热峰, 质量损失为 9%, 推测该

配合物具有吸潮现象, 样品表面吸附空气中的水分蒸发所致。在 405.3 °C 附近有一个微弱的放热峰, 质量损失 4%, 推测该配合物含有结晶水。在 575.7 °C 附件有一个明显的放热峰, 质量损失 57%, 推测该配合物发生了分解反应, 从而转化成了碳氧化合物和水, 导致了失重, 最后分解剩下锌的氧化物及其他残留物而趋于稳定。

从图 5 中可知, 木犀草素-Mn 配合物在 106.1 °C 附近有一个吸热峰, 质量损失为 15%, 推测该配合物也具有吸潮现象, 样品表面吸附空气中的水分蒸发所致。在 510.2 °C 附件有一个明显的放热峰, 质量损失 64%, 推测该配合物发生了分解反应, 从而转化成了碳氧化合物和水, 导致了失重, 最后分解剩下锰的氧化物及其他残留物而趋于稳定。

2.4 元素分析

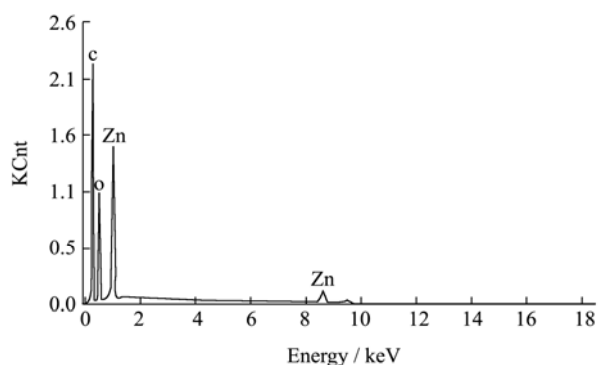


图 6 木犀草素-Zn 配合物的 EPMA 分析

Fig.6 EMPA analysis of luteolin-Zn complex

表 3 木犀草素-Zn 配合物的元素相对质量分数及相对原子数分析

Table 3 Analysis of relative element mass fraction and relative atom number of luteolin-Zn complex

元素	Wt*/%	理论值/%	At*/%	理论值/%
C	55.49	58.35	68.36	69.77
O	35.87	31.12	28.40	27.90
Zn	8.64	10.53	3.24	2.33

注: Wt*表示重量百分比; At*表示原子数百分比。

利用电子探针分别对样品中的元素进行了定量分析, 由图 6 和图 7 分析可知, 样品中主要元素为 C、O 及金属元素, 由此进一步证实了木犀草素与金属离子发生了配位反应, 生成了稳定的配合物。由表 3 和表 4 分析可知, 在木犀草素-Zn 配合物中, C、O 和 Zn 元素相对质量分数分别为 55.49%、35.87% 和 8.64%, 相对原子数分别为 68.36%、28.4% 和 3.24%。在木犀草素-Mn 配合物中, C、O 和 Mn 元素相对质量分数分别为 62.48%、29.19% 和 8.33%, 相对原子数

分别为 68.24%、28.81% 和 2.95%。根据 2.1 及 2.2 分析, 木犀草素与金属离子的配合位点位于 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 处, 初步推断木犀草素-Zn 配合物的分子式为 $C_{30}H_{16}O_{12}Zn$, 木犀草素-Zn 配合物的分子式为 $C_{30}H_{16}O_{12}Mn$ 。结合理论值分析, 相对误差均控制在 1%~3% 之间。

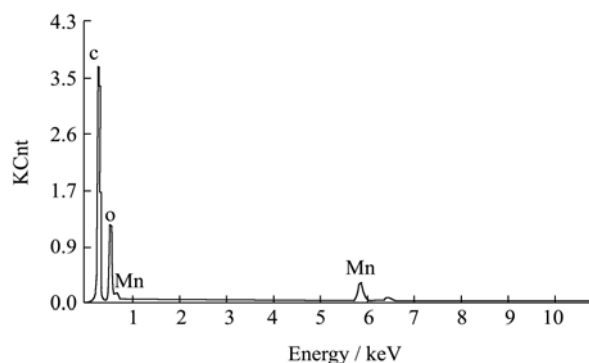


图 7 木犀草素-Mn 配合物的 EPMA 分析

Fig.7 EMPA analysis of luteolin-Mn complex

表 4 木犀草素-Mn 配合物的元素相对质量分数及相对原子数分析

Table 4 Analysis of relative element mass fraction and relative atom number of luteolin-Mn complex

元素	Wt*/%	理论值/%	At*/%	理论值/%
C	62.48	59.31	68.24	69.77
O	29.19	31.63	28.81	27.90
Mn	8.33	9.06	2.95	2.33

注: Wt*表示重量百分比; At*表示原子数百分比。

2.5 不同浓度的木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用

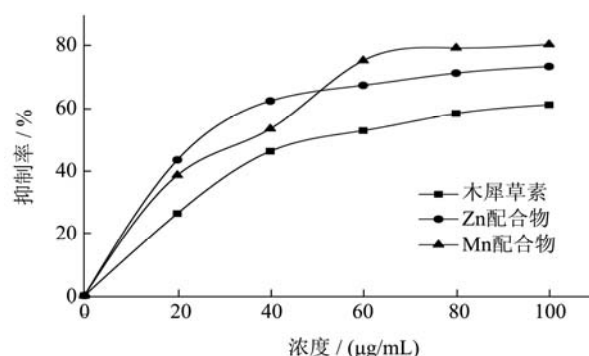


图 8 不同浓度的木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of luteolin and its complexes on inhibition rate of xanthine oxidase

图 8 分析了不同浓度的木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率的影响, 由图中可知, 在试验浓度

范围内,随着浓度的增加,木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率也表现出增大的趋势。在相同浓度下,配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率均高于木犀草素。在浓度为 20~40 $\mu\text{g/mL}$ 时,木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率大小为: Zn 配合物>Mn 配合物>木犀草素,且差异性极显著 ($p<0.01$)。在浓度为 40~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率大小为: Mn 配合物>Zn 配合物>木犀草素,且差异性显著 ($p<0.05$)。在较高浓度时,抑制率曲线逐渐平缓,说明黄嘌呤氧化酶的活性并没有完全失活。综上所述,木犀草素形成配合物以后,对黄嘌呤氧化酶的抑制作用得到加强。

2.6 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型

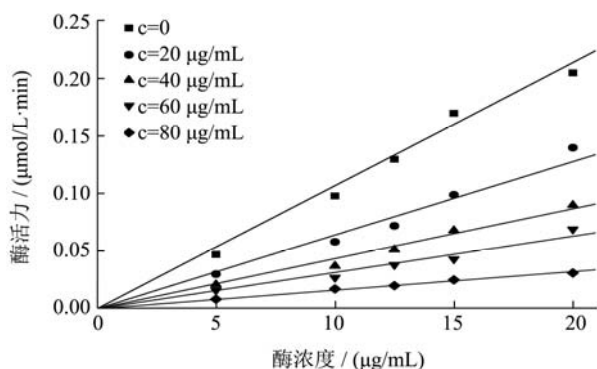


图9 木犀草素对 XO 的抑制类型

Fig.9 Type of inhibition of xanthine oxidase by luteolin

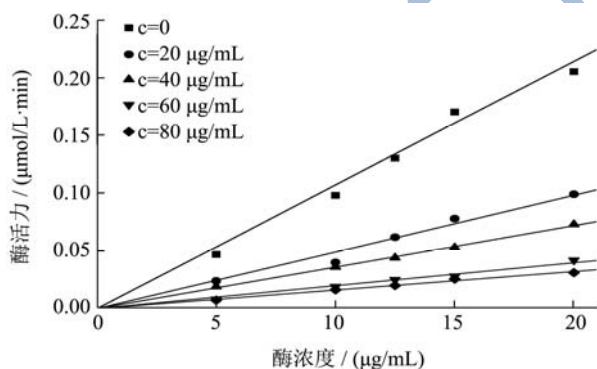


图10 木犀草素-Mn 配合物对 XO 的抑制类型

Fig.10 Type of inhibition of xanthine oxidase by luteolin-Mn complex

固定黄嘌呤底物浓度为 0.6 mmol/L, 改变黄嘌呤氧化酶的浓度, 测定不同浓度木犀草素及配合物对酶活力的影响。结果如图 9、10 和 11 所示, 在不同浓度的木犀草素及其配合物条件下, 均能得到一条过原点的直线, 且随着浓度的增加, 直线的斜率逐渐减小, 说明木犀草素及其配合物对对黄嘌呤氧化酶的抑制类

型均属于可逆抑制。

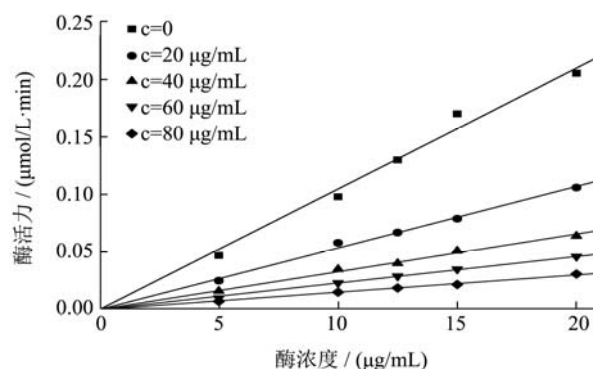


图11 木犀草素-Zn 配合物对 XO 的抑制类型

Fig.11 Type of inhibition of xanthine oxidase by luteolin-Zn complex

2.7 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制动力学分析

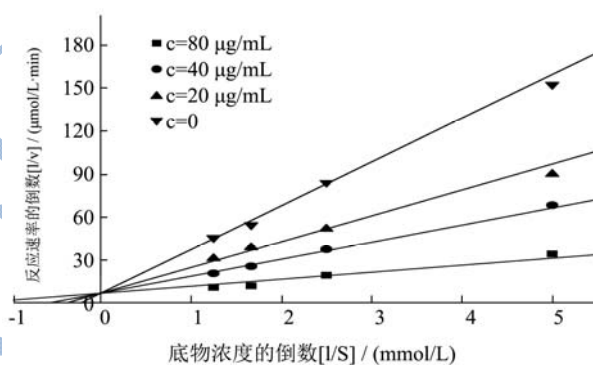


图12 木犀草素抑制 XO 的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.12 Lineweaver-Burk plot for inhibition of xanthine oxidase by luteolin

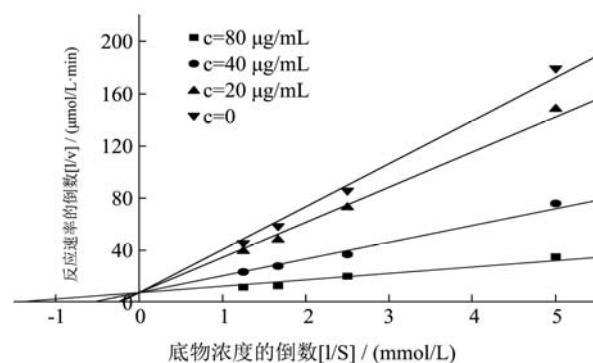


图13 木犀草素-Mn 配合物抑制 XO 的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.13 Lineweaver-Burk plot for inhibition of xanthine oxidase by luteolin-Mn complex

固定黄嘌呤氧化酶浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 改变黄嘌呤底物的浓度, 测定不同浓度木犀草素及配合物对酶活力的影响。用 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 以底物浓度的倒数[1/S]为横坐标, 以酶促反应速率的倒数

[1/v]为纵坐标, 所得直线与纵坐标的截距的倒数即为表观米氏常数 K_{mapp} 。结果如图 12、13 和 14 所示, 在不同浓度的木犀草素及其配合物条件下, 所得直线与纵坐标的截距保持不变, 说明木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型表现为竞争性抑制。

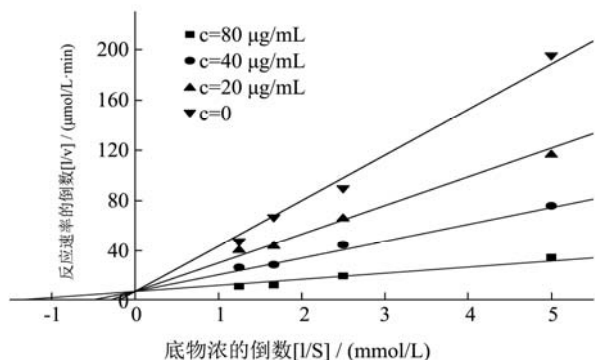


图 14 木犀草素-Zn 配合物抑制 XO 的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig.14 Lineweaver-Burk plot for inhibition of xanthine oxidase by luteolin-Zn complex

3 结论

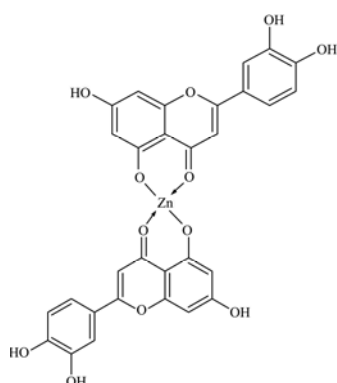


图 15 木犀草素-Zn 配合物的分子结构

Fig.15 Chemical structure of luteolin-Zn complex

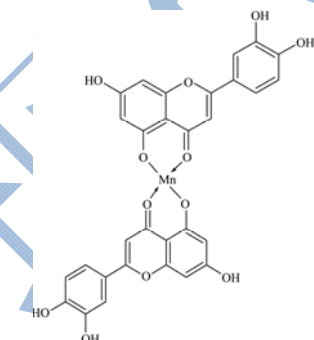


图 16 木犀草素-Mn 配合物的分子结构

Fig.16 Chemical structure of luteolin-Mn complex

3.1 由红外谱图和紫外谱图可知, 木犀草素与金属离子发生了配位反应, 形成了稳定的配合物, 且配合位点位于 A 环的 5-OH 及 C 环的 4-C=O 处。由木犀草素配合物的热重分析可知, 木犀草素配合物具有一定的热稳定性。由此推断, 木犀草素-Zn 配合物的分子结

构可能如图 15 所示, 木犀草素-Mn 配合物的分子结构可能如图 16 所示。

3.2 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶均表现出一定的抑制作用。随着浓度的增加, 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶抑制率逐渐增大。在试验浓度范围内, 相比于木犀草素, 木犀草素-Zn 配合物及木犀草素-Mn 配合物对黄嘌呤氧化酶表现出更好的抑制效果。通过酶动力学分析, 木犀草素及其配合物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型均属于竞争性可逆抑制。

参考文献

- [1] Hänsch R, Mendel R R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(3): 259-266
- [2] Cingaram P K R, Nyeste A, Dondapati D T, et al. Prion protein does not confer resistance to hippocampus-derived zpl cells against the toxic effects of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} not supporting a general protective role for PrP in transition metal induced toxicity [J]. Plos One, 2015, 10(10): 139-219
- [3] Seelinger G, Merfort I, Schempp C M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin [J]. Planta Medica, 2008, 74(14): 1667-1677
- [4] Kim J S, Kwon C S, Son K H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin a flavonoid [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(11): 2458-2461
- [5] Basu A, Das A S, Majumder M, et al. Anti-atherogenic roles of dietary flavonoids chrysin, quercetin and luteolin [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2016, 68(1):89
- [6] Cook M T, Liang Y, Goyette S, et al. Therapeutic effects of luteolin against progesterin-dependent breast cancer involves induction of apoptosis, and suppression of both stem-cell-like cells and angiogenesis [J]. Cancer Research, 2015, 75(15): 4159-4159
- [7] 郑必胜,李会娜.金银花叶有效成分的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2013,12:2870-2876
ZHENG Bi-sheng, LI Hui-na. Antioxidant activity constituents of *LohiceYa japonica* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 12: 2870-2876
- [8] 曾白林,陈启霞,居明乔.微量元素与中药功效的相关性分析[J].时珍国医国药,2001,12(7):658
ZENG Bai-lin, CHEN Qi-xia, JU Ming-qiao. Correlation analysis of trace elements and the efficacy of traditional

- Chinese medicine [J]. LISHIZHEN Medicine and Material Medic Research, 2001, 12(7): 658
- [9] Naso L G, Lezama L, Valcarcel M, et al. Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium (IV) complex with luteolin [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2016
- [10] Roy S, Mallick S, Chakraborty T, et al. Synthesis, characterisation and antioxidant activity of luteolin-vanadium (II) complex [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 1172-1178
- [11] 白海强.木犀草素衍生物的合成及其抗炎活性研究[D].南宁:广西大学,2008
- BAI Hai-qiang. The synthesis and anti-inflammation activities of the derivatives of luteolin [D]. Nanning: Guangxi University, 2008
- [12] Yan J, Zhang G, Hu Y, et al. Effect of luteolin on xanthine oxidase: Inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3766-3773