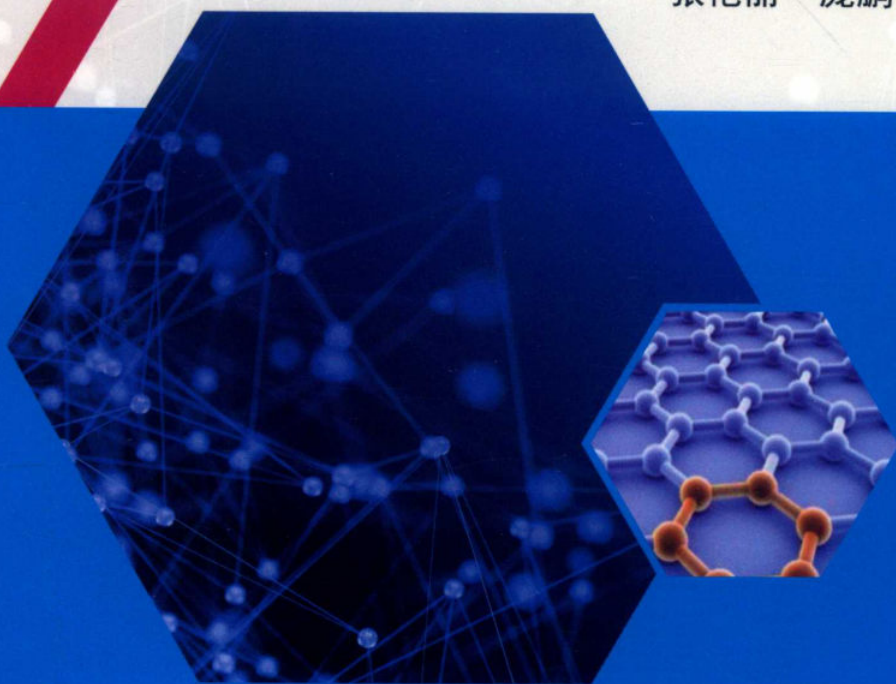


植物多酚的石墨烯 电化学传感研究

张艳丽 庞鹏飞 著



科学出版社

植物多酚的石墨烯电化学传感研究

张艳丽 庞鹏飞 著

贵州师范学院内部使用

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书依据作者十余年来在电分析化学与传感领域中的教学实践和科学研究经验及成果,结合国内外石墨烯及其复合材料的研究现状,对石墨烯的制备、表征及化学修饰电极进行了深入浅出的阐述,并对石墨烯及其复合材料修饰电极在植物多酚检测领域中的应用进行了较详细的叙述和介绍。

本书内容包括植物多酚、石墨烯和化学修饰电极的基础知识,重点研究了阿魏酸、咖啡酸、芦丁、木犀草素、花旗松素、槲皮素、洋蓟素等七种植物多酚化合物在石墨烯及其不同复合材料修饰电极上的电化学反应,结果证明石墨烯及其复合材料能有效的增强植物多酚在电极表面吸附和促进电子转移,提高传感器的灵敏度,并可用于实际样品中植物多酚的高灵敏度、高选择性的分析测定。

本书可作为高等院校化学、环境科学和材料科学等专业研究生的教学参考书,以及大学本科高年级学生的课外读物,也可作为相关领域科技工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

植物多酚的石墨烯电化学传感研究 / 张艳丽, 庞鹏飞著. —北京: 科学出版社, 2020. 1

ISBN 978-7-03-063659-1

I. ①植… II. ①张… ②庞… III. ①植物-多元酚-石墨-纳米材料-电化学-化学传感器-研究 IV. ①TP212.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 273309 号

责任编辑: 霍志国 / 责任校对: 杜子昂

责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 东方人华

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2020 年 1 月第 一 版 开本: 720×1000 1/6

2020 年 1 月第一次印刷 印张: 10 1/2

字数: 207 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

植物多酚(plant polyphenol)又称植物单宁(vegetable tannin),是植物体内的复杂酚类次生代谢产物,具有多元酚羟基结构。植物多酚主要存在于植物的皮、根、叶、果壳和果肉中,在植物体中的含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素,是果蔬感官品质和营养品质的主要决定因素。植物多酚的研究始于18世纪末,大量文献报道表明,植物多酚具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗辐射、抑制心脑血管疾病以及降血脂血糖等多种生物活性。目前,植物多酚已广泛应用于医学、食品、营养、保健等相关领域,并发挥着不可替代的作用。植物多酚的研究与应用需要以多酚活性分析为基础,因此,植物多酚含量的有效测定和活性分析方法也是多酚研究中不可缺少的环节。本书针对近年来受到广泛关注和研究较多的植物多酚芦丁、阿魏酸、咖啡酸、木犀草素、花旗松素、槲皮素和洋蓟素等,总结和归纳了作者在植物多酚电化学传感器检测方面的研究成果。

石墨烯(graphene)是一种由碳原子以 sp^2 杂化轨道组成六角形呈蜂巢晶格的二维碳纳米材料,与其他碳纳米材料相比,具有比表面积大、热导率高、力学性能好和电子迁移率高等优异的物理化学性质。石墨烯稳定的苯六元环结构单元使其具有良好的共轭体系,在保证石墨烯的结构刚性和稳定性的同时,使得石墨烯具有良好的导电性。此外,石墨烯还具有电化学窗口宽、电催化活性高和电子传输速率快等优异的电化学性能,在电化学传感领域有着广阔的应用前景。大量研究表明,石墨烯修饰电极能对多种目标物与电极界面的电子转移过程起到良好的促进作用,表现出明显的电催化效应。但固态或液相环境中的石墨烯由于不可逆团聚现象,其在电化学传感等领域的直接应用受到了极大限制。因此,人们开始探索对石墨烯进行功能化改性或与其他纳米材料复合,功能化后的石墨烯可有效改变和调控材料表面的电子结构,提高材料的电子传输、电催化性能及电化学选择性。

化学修饰电极是20世纪70年代中期发展起来的一门新兴的,也是目前最活跃的电化学和电分析化学的前沿领域。化学修饰电极是在电极表面进行人为分子裁剪和分子设计,将具有优良化学性质的分子、离子、聚合物设计固定在电极表面,从而获得具有高选择性和高灵敏度等特定功能的电极结构和界面,在化学分离和富集、传感分析等领域展示出了诸多优点,广泛应用于电化学催化、选择性富集分离以及电化学传感等研究领域。化学修饰电极拓展了电化学的研究领域,目前已广泛应用于生命、环境、能源、分析、电子以及材料学等诸多领域。基于利用石墨烯本征和复合纳米材料修饰电极对植物多酚的研究,本书总结了作者在石墨烯化学

修饰电极及其对植物多酚进行电化学传感器检测方面的研究工作, 以期对植物多酚的电化学活性研究提供参考。

本书内容与作者近十余年来一直从事的功能纳米材料和化学与生物传感研究密切相关。这些研究工作得到了国家自然科学基金(21205104、21565031、21665027)以及云南省科技厅和教育厅基金项目的资助, 同时与课题组多位研究生的工作和付出密不可分, 在此一并致以衷心的感谢!

植物多酚的基础知识和分析检测涉及学科面较广, 由于作者水平和知识面所限, 本书的内容和写作可能存在许多缺陷和不足, 请读者多指正, 作者不胜感谢!

作者

2019年5月于

云南民族大学雨花校区

目 录

第1章 植物多酚概述	1
1.1 引言	1
1.2 植物多酚的分类	1
1.3 植物多酚的提取	3
1.4 植物多酚的分离纯化	5
1.5 植物多酚的成分分析	6
1.6 植物多酚的理化性质	8
1.7 植物多酚的生理功能	10
1.8 植物多酚的应用	12
参考文献	14
第2章 石墨烯概述	17
2.1 引言	17
2.2 石墨烯的发现及结构	18
2.3 石墨烯的基本性质	19
2.4 石墨烯的合成	20
2.5 石墨烯的表征	22
2.6 石墨烯的功能化	24
2.7 石墨烯基复合材料	25
2.8 石墨烯及其复合材料的电化学应用	28
参考文献	31
第3章 化学修饰电极概述	38
3.1 引言	38
3.2 化学修饰电极的发展	39
3.3 化学修饰电极的类型	40
3.4 化学修饰电极的基底电极	40
3.5 化学修饰电极的制备	42
3.6 化学修饰电极的表征	48
3.7 纳米材料在化学修饰电极中的应用	51

3.8	化学修饰电极的作用	54
3.9	化学修饰电极在分析化学中的应用	55
	参考文献	56
第4章	阿魏酸在石墨烯修饰玻碳电极上的电化学行为研究	63
4.1	引言	63
4.2	实验部分	63
4.3	结果与讨论	65
4.4	小结	74
	参考文献	74
第5章	咖啡酸在纳米金/石墨烯修饰玻碳电极上的电化学行为研究	76
5.1	引言	76
5.2	实验部分	77
5.3	结果与讨论	78
5.4	小结	84
	参考文献	84
第6章	芦丁在石墨烯/铂纳米粒子复合物修饰玻碳电极上的电化学行为研究	85
6.1	引言	85
6.2	实验部分	86
6.3	结果与讨论	87
6.4	小结	92
	参考文献	93
第7章	木犀草素在羟基磷灰石/石墨烯复合物修饰玻碳电极上的电化学行为研究	94
7.1	引言	94
7.2	实验部分	95
7.3	结果与讨论	96
7.4	小结	102
	参考文献	102
第8章	花旗松素在石墨烯/氧化铜纳米棒复合物修饰玻碳电极上的电化学行为研究	104
8.1	引言	104

8.2 实验部分	105
8.3 结果与讨论	106
8.4 小结	112
参考文献	113
第9章 槲皮素在石墨烯/金包聚多巴胺复合材料修饰玻碳电极上的电化 行为研究	115
9.1 引言	115
9.2 实验部分	117
9.3 结果与讨论	118
9.4 小结	127
参考文献	127
第10章 洋蓍素在石墨烯/磁性二氧化钛@金纳米粒子复合材料修饰电极上的 电化学行为研究	129
10.1 引言	129
10.2 实验部分	130
10.3 结果与讨论	131
10.4 小结	138
参考文献	138
第11章 芦丁在氮掺杂石墨烯量子点/金纳米粒子复合物修饰玻碳电极上的 电化学行为研究	139
11.1 引言	139
11.2 实验部分	139
11.3 结果与讨论	141
11.4 小结	146
参考文献	147
第12章 阿魏酸在氮掺杂石墨烯量子点/金纳米粒子/多壁碳纳米管复合物 修饰电极上的电化学行为研究	148
12.1 引言	148
12.2 实验部分	148
12.3 结果与讨论	150
12.4 小结	156
参考文献	156

第 1 章 植物多酚概述

1.1 引 言

植物多酚(plant polyphenol)又称植物单宁(vegetable tannin),是分子中两个或多个苯环相连的多羟基酚类化合物的总称。它是一类广泛存在于植物体内的具有强抗氧化活性的次生代谢物质,主要存在于植物皮、根、叶、果中,在植物中的含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素,是果蔬感官品质和营养品质的主要决定因素^[1],对植物的生长发育和调节、基因的诱导表达、信号传导等都有一定的影响^[2,3]。植物多酚的研究历史悠久,最初人们将其用于鞣制皮革,并将这类化合物称为单宁(tannins)。18 世纪末,White 和 Bate-Smith 把植物单宁定义为分子量在 500~3000 范围内的具有鞣性多元酚^[4]。1981 年,Haslam 首次提出“植物多酚”这一术语,涵盖了所有的单宁及衍生物^[5],这个名字一直沿用至今。狭义上说,植物多酚是分子量在 500~3000 之间的单宁;广义的植物多酚还包括小分子酚类化合物,如没食子酸、儿茶素、花青素等。

1.2 植物多酚的分类

植物多酚是一类结构复杂的化合物,从化学结构上讲,它以苯酚为基本骨架,以苯环的多羟基取代基为特征,囊括了从低分子量的简单酚类到分子量达数千道尔顿(符号为 Da,1Da=1.66054×10⁻²⁷kg)的聚合单宁类。天然存在的植物多酚多以极其复杂的形式存在,有的以与单糖或多糖结合成苷的形式存在,还有的以酯或甲酯等衍生物的形式存在,其由于结构的复杂性,存在着多种分类方法。Freudenberg 按照单宁的化学结构特征将其分为水解单宁和缩合单宁两大类。水解单宁主要是聚鞣酸类多酚,即鞣酸及其衍生物与多元醇以酯键连接而成;缩合单宁主要是聚黄烷醇类多酚或原花青素,即羟基环烷醇类单体的组合物,单体间以 C—C 键相连。

另有人依据多酚分子量大小及结构的不同,将其分为两大类,一类是多酚的单体,即非聚合物,另一类则是由单体聚合而成的低聚或多聚体,统称为单宁类物质,具体分类如图 1.1 所示。单聚体包括类黄酮、酚酸两大类,类黄酮种类较多,而酚酸类主要有羟基肉桂酸、羟基苯甲酸、鞣花酸等。多聚体包括缩聚型和可水解型,

缩聚型有原花青素,而可水解型包括没食子单宁和鞣花酸单宁等。图 1.2 为几种植物多酚的结构示意图,下面具体介绍酚酸类和类黄酮类多酚物质。

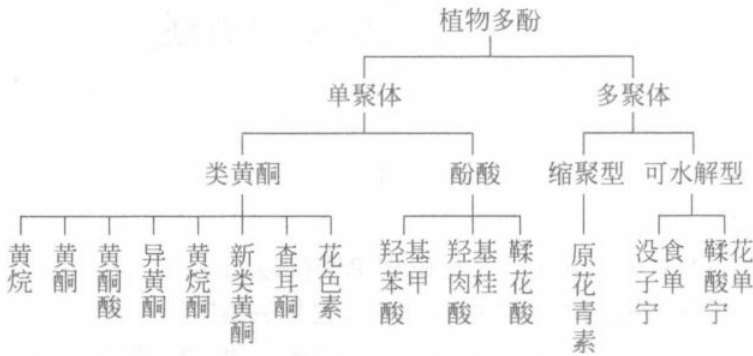


图 1.1 植物多酚的分类

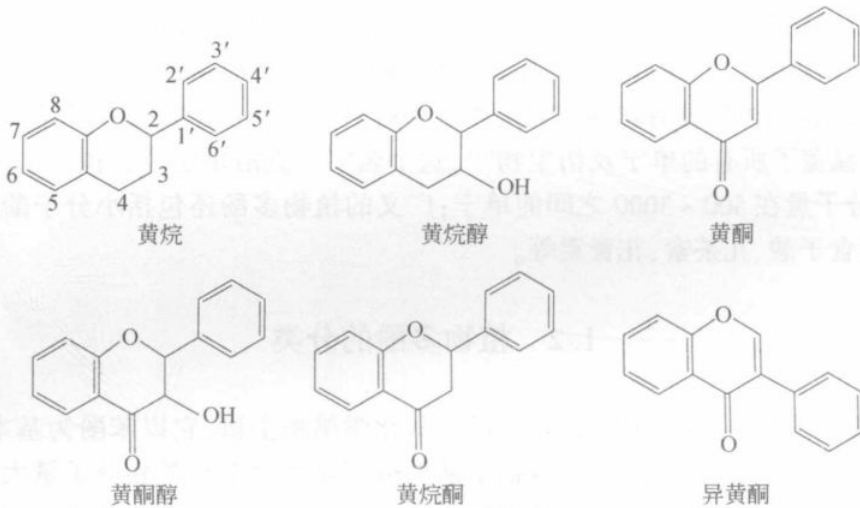


图 1.2 几种植物多酚的结构示意图

1.2.1 酚酸类

酚酸类化合物是指在一个苯环上有多个酚羟基取代的芳香羧酸类化合物,其由于结构中有较多的酚羟基,因而结构并不稳定,容易受到水分、温度、光、酶、酸及碱等的影响而变质,这也是制约酚酸类化合物提取和应用的一个重大问题,也是未来研究中将要解决的重大问题。目前,已经从植物中检出多种酚酸类成分,根据—COOH的位置又可将酚酸分成羟基苯甲酸类(C_6-C_1 型,如对羟基苯甲酸、没食子酸等)和羟基肉桂酸类(C_6-C_3 型,如咖啡酸、阿魏酸和芥子酸等)。酚酸类化合物广泛地分布于自然界中,特别是一些常用中药中,如金银花、当归、川芎等。植物

中,酚酸类主要以糖、各种酯类以及有机酸的形式存在,很少以游离形式存在。在植物中分离所得到的活性酚酸类化合物大多数是一类复杂的酚酸衍生物,如没食子单宁由多个没食子酸与葡萄糖构成,丹参酚酸由多个苯丙酸衍生物单元组成^[2]。据报道,甘薯的薯块、茎叶均含有多酚化合物,含量与绿原酸含量呈正相关。甘薯茎蔓含有6种绿原酸衍生物,主要的种类为3,5-双咖啡酸-*O*-绿原酸(3,5-diCQA)和4,5-双咖啡酸-*O*-绿原酸(4,5-diCQA)。这些酚酸类化合物在抗氧化、抗菌消炎、抗肿瘤和降血脂等方面有很强的药理作用^[1-5]。

1.2.2 类黄酮类

类黄酮又称生物类黄酮,是指基本母核为2-苯基色原酮类化合物,现在则泛指两个具有酚羟基的苯环通过中央三碳原子相互连接的一系列化合物,也是人类饮食中含量最丰富的一类多酚化合物。它们以结合态(黄酮苷)或自由态(黄酮苷元)形式存在于水果、蔬菜、豆类和茶叶等许多食源性植物中。虽然它们不被认为是维生素,但是在生物体内的反应中,被认为有营养功能,曾被称为“维生素P”。类黄酮具有抗氧化、自由基清除和二价阳离子螯合作用,具有广泛的生物学功能。据研究,柑橘皮渣中含有类黄酮、类柠檬苦素、类胡萝卜素等丰富的生物活性物质,其中类黄酮是含量最为丰富、种类最多的一类活性成分,具有较高的利用价值。槲皮素是膳食中最常见的类黄酮化合物之一,属类黄酮化合物中的黄酮醇。洋葱、苹果、茶叶中含有较为丰富的槲皮素及其糖苷衍生物,其含量分别为284~486mg/kg、21~72mg/kg、17~25mg/kg。黄烷醇类主要为儿茶素,在茶叶中含量十分丰富,1.0L绿茶中儿茶素含量高达1.0g。

1.3 植物多酚的提取

植物多酚成分复杂、结构不稳定,目前还没有标准化的提取方法,其提取方法一般分为传统提取方法与新型提取方法。其中,传统提取方法有浸渍法、渗滤法、煎煮法、有机溶剂法以及回流提取法等,这些方法提取时间长,在提取过程中多酚易发生氧化分解而大量损失,因此提取效果不佳,同时存在目的成分含量低、杂质多、影响药效等缺点;新型提取方法包括超声波辅助提取法、微波辅助提取法、酶辅助提取法以及超临界流体萃取法等。与传统提取法相比较,这些新技术具有目的成分纯度高、收率高、节能等优点。

1.3.1 溶剂提取法

溶剂提取法是传统提取方式中最为经典且应用最为广泛的一种提取方法,此方法主要是根据“相似相溶”的原理,将多酚物质从植物组织内萃取到具有较大溶

解度的溶剂中,同时除去不溶性的杂质。而多酚是多羟基化合物,它的结构特点决定了多酚易溶或可溶于水、醇类、醚类、酮类、酯类等,所以溶剂提取法主要有水溶剂提取和有机溶剂提取两种。常用的溶剂主要有水、甲醇、乙醇和乙酸乙酯等。水虽然是多酚的良好溶剂,但多酚在植物体内通常以氢键或疏水键与蛋白质、多糖等结合,形成稳定结构,因此水通常并不能很好地从植物组织中提取出多酚,需要以一定的比例与甲醇、乙醇、乙醚、丙酮和乙酸乙酯等可以断裂氢键或疏水键的有机溶剂结合使用才能达到满意的效果。溶剂提取法原理简单,操作便捷,与其他新型仪器提取相比较,成本较低,因而被广泛使用。但与近年来提取多酚的新技术相比,此方法耗时较长,影响提取物收率的因素较多,难以控制,且提取剂多为有机溶剂,既污染环境,又对研究者身体健康有一定影响,因此,该方法逐步被其他新型提取方法取代。

1.3.2 超声波辅助提取法

超声波辅助提取法是利用超声波产生的强烈振动、空化效应、搅拌作用等,并改变超声波条件,使植物细胞壁及整个生物体在短时间内破裂,加速细胞内有效成分向溶剂中扩散的速率,从而提高植物多酚提取率,缩短提取时间,并可避免高温对多酚结构和生物活性的影响。超声波提取的操作具有简便快捷、提取温度低、时间短、提取率高、提取物结构不易被破坏的特点,适用于大多数有效成分的提取,但同时也存在机器耗能大,溶剂消耗过快的缺点^[6]。

1.3.3 微波辅助提取法

微波辅助提取法是近年来新兴的且具有潜力的提取技术,主要是利用选择合适的溶剂通过微波使植物细胞产生巨大的热量,从而使多酚物质从细胞中扩散出来。提取的原理主要有两方面:①微波辐射能穿透介质,到达物料内部,使内部迅速升温,连续升温时其内部的压力超过了细胞空间膨胀的压力,因而细胞破裂,有效成分流出,增加了有效成分在介质中的溶解度;②微波产生的电磁场加速了有效成分向溶剂界面的扩散速度,缩短了扩散时间,最大限度地保证萃取的质量。该方法有效地减少了多酚在高温下的氧化,使多酚类物质不被破坏,且微波提取多酚的效率,设备较便宜,对环境无污染,因此被广泛使用^[7]。但微波可使局部温度短时间升高,操作时应注意防护。

1.3.4 超临界流体萃取法

超临界流体萃取是一种新型的现代萃取分离技术,它是利用超临界流体作为萃取剂,从固体或液体中萃取某种高沸点和热敏性成分,以达到分离和提纯的目的。其中,超临界 CO₂ 流体廉价易得,化学性质稳定,无毒无污染,在被提取物中无

残留而应用最多。超临界流体萃取技术具有良好的选择性,能有效萃取易挥发物质,且可有效避免生物活性物质的氧化分解^[8]。但是它在萃取过程中成本较为昂贵,不适用于工业化提取植物多酚。

此外,还有色谱分析、高压脉冲电场法、生物酶解提取法、树脂吸附提取法、闪式提取法等方法。总之,在提取植物多酚时,应选择适宜的提取方法,同时也可将几种方法联合起来,取长补短,以进一步提高提取率。

1.4 植物多酚的分离纯化

植物多酚的分离纯化至关重要,关系到后续的定性定量分析及功能活性研究。植物多酚的提取是从原料中得到相应多酚粗品,然后对多酚粗品进一步进行提纯,从而得到高纯度的多酚产品或者单体组分。目前,植物多酚的分离纯化方法主要有金属离子沉淀分离法、柱层析法、薄层层析法、超滤法、大孔树脂吸附法、凝胶柱层析分离纯化法、大孔树脂吸附法、膜分离技术以及色谱法等。

1.4.1 金属离子沉淀分离法

沉淀分离技术是一种经典的化学分离方法。通常将植物多酚的粗提取液与相应金属离子反应产生配位沉淀,经过后续过滤、洗涤等工艺处理,得到纯度较高的植物多酚。该方法的关键技术是选择合适的沉淀剂。常用沉淀剂有四类,即无机盐类、生物碱类、蛋白质类和高分子聚合物类(环糊精、聚乙烯吡咯烷酮类等)^[9]。其中无机盐类最为常用,其他三类沉淀剂由于成本较高,目前尚处于试验阶段。

金属离子沉淀分离法具有设备简单、原材料廉价易得等优点。但是,沉淀分离由于需要经过沉淀、洗涤等工序,所以操作较为烦琐。此外,有些组分的沉淀分离选择性较差,分离不够完全,所得产品纯度也相应较低。

1.4.2 凝胶柱层析分离纯化法

凝胶柱层析是以不同酚类物质的分子量、极性大小等不同来进行分离,根据被分离酚类物质的性质来选用不同的填料和层析条件。层析的固定相载体是凝胶颗粒,目前应用较广的是具有各种孔径范围的葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。凝胶柱层析分离纯化植物多酚最常用的是葡聚糖凝胶。葡聚糖凝胶是一种多孔网状的高分子化合物,由直链的葡聚糖分子和交联剂交联而成^[10]。通过调节葡聚糖和交联剂的比例可以控制凝胶颗粒中网孔的大小。其中,交联度越大,网孔结构越紧密;交联度越小,网孔结构越疏松。葡聚糖凝胶层析就是使待分离物质通过葡聚糖凝胶层析柱,根据被分离物质的分子大小、形状不同,在凝胶柱上受到的阻力不同以及扩散到凝胶孔隙内的速度不同,从而达到分离的目的。

一般情况下,凝胶柱层析分离可用于大量样品的处理,其主要缺点是耗时较长,且溶剂消耗量也较大。

1.4.3 大孔树脂吸附法

大孔吸附树脂是一类不含离子交换基团,具有大孔结构、理化性质稳定的高分子吸附剂,能够从粗提取液中有选择性地吸附其中的有效成分,除去无效成分。大孔树脂吸附法是基于树脂对植物提取物的吸附-解吸作用实现多酚物质的分离,是一种提取精制的新工艺,其吸附性能与范德瓦耳斯力或氢键有关。根据树脂的表面性质,大孔吸附树脂可以分为非极性、中极性和极性三类。根据其作用力的差别,可分为物理吸附、化学吸附和离子交换吸附。其中常用的吸附剂有 C_{18} 、苯乙烯-二乙烯基苯共聚物、乙烯醇和甲基丙烯酸酯共聚物。

大孔树脂吸附法是一种适合于工业化生产的分离提纯技术。虽然耗时较长,消耗溶剂量大,但所需设备简单,操作简便,且吸附容量大,所得产品纯度较高,而且具有多选择性。因此,在中药研究和生产中的应用日益广泛。

1.5 植物多酚的成分分析

多酚物质组成复杂,结构不稳定,易氧化分解,但是多酚物质的定性定量以及结构分析对于功能活性评价至关重要。目前对于多酚分析方法的灵敏度和选择性要求越来越高,研究人员也开发出更多的新方法、新技术用于多酚成分的分析。

1.5.1 紫外分光光度法

紫外分光光度法是植物多酚定量分析的常用方法,根据多酚种类不同而选择不同的前处理条件和仪器参数。酚类物质中的酚酸一般在260~330nm范围内有特征吸收峰,而不同类型的黄酮类化合物其I带(300~400nm)和II带(240~280nm)紫外吸收的峰形、峰位和吸收强度差异较大,因此可通过酚类物质紫外光谱推测黄酮类化合物的可能结构类型^[11],但是分光光度法的局限在于只能测定同类结构的总酚含量,不能区分结构类似的单一酚类物质含量。

采用分光光度法测定植物多酚,按化学反应机理进行分类可分为:

- (1)蛋白质沉淀法^[12]:利用植物多酚与蛋白质的配位沉淀特征测定多酚含量。
- (2)金属离子螯合法:利用植物多酚中的特征取代基与某些金属离子配位形成有色螯合物的性质定量测定多酚含量,如酒石酸亚铁法^[13]、碳酸钠-苯酚法^[14]、钼酸铵法^[15]、硝酸铝法^[16]等,上述均为配位反应方法,均形成有色的配合物,在最大吸收波长下测定吸光度来测定多酚含量。

(3) 氧化还原法:利用植物多酚中酚羟基的还原性,与氧化试剂形成有色化学物质。例如福林酚法^[17]是利用在碱性条件下,植物多酚可以将磷钨钼酸还原成蓝色,蓝色深浅与多酚含量呈正相关,可用分光光度计进行测定。

1.5.2 近红外光谱法^[18]

近红外光的波长为 $0.75 \sim 2.5 \mu\text{m}$,它是介于可见光与中红外光之间的电磁波。植物多酚中的 C—H、O—H 和 C=O 等基团振动频率的合频(分子两种振动状态的能级同时发生跃迁)与倍频(振动状态在相隔一个和几个能级间的跃迁)的吸收正好落在近红外区,产生吸收峰。

近红外光谱法具有简便、快速、低成本、无污染以及样品的非破坏性等优点,可用于快速检测植物多酚含量。

1.5.3 原子吸收光谱分析法^[19]

原子吸收光谱分析法分为直接法和间接法。直接法是利用特定的波长直接测定目标元素的含量。间接法是利用某些特定的金属离子可与药物的某些成分间有缔合、沉淀、氧化还原等的定量反应,经离心分离后,利用原子吸收光谱法测定体系中游离的金属离子含量,从而间接测出目标分子含量。与经典滴定法对比,其测定结果基本无变化,且较为简单快速。

1.5.4 色谱法

色谱法是一种分离分析方法,根据待测组分间的吸附、分配、分子大小或电荷大小等性能的差异,利用在相对运动的两相系统中的差速迁移而使混合物分离,进而对待测组分进行定性定量分析。

1. 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)具有灵敏度高、准确、快速、简便、专属性强等优点,通过与标准物质的保留时间进行比对来确定单体酚组成,该方法是目前分离鉴定植物多酚的首选方法。HPLC 检测多酚时一般选用分离度较高的 C_{18} 反相色谱柱,对于流动相的选择,一般根据基质的性质以及所含多酚种类选择适当极性的溶剂。此外,由于多酚物质特别是酚酸类易分解,因而常出现色谱峰拖尾、变宽和不对称等现象,研究中常在流动相中加入适量的酸性抑制剂来抑制此类化合物的电离,改善峰形,常用的有甲酸、乙酸、磷酸、三氟乙酸等。HPLC 虽然定量准确,但需准备标准品,通过与已知标准物质进行比对方可确定具体成分。此外,HPLC 难以鉴定未知化合物的结构,需与质谱联合使用,液质联用技术可在没有标准品的情况下推断样品的种类及结构。

2. 液质联用技术

目前,液质联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)是植物多酚成分研究的常用方法,也是多酚结构鉴定最有效的手段,可用于新化合物的发现与鉴别。电喷雾技术是一种软电离质谱技术,通过提高源内锥孔电压使被测化合物在离子源内发生碰撞诱导裂解,产生碎片离子而获得化合物的分子量信息,从而实现化合物的结构鉴定,必要时需通过正负两种模式进行确证^[20]。目前使用较多的质谱有:三重四极杆质谱、飞行时间质谱、静电场轨道阱质谱和傅里叶变换离子回旋共振质谱等。

除了高效液相色谱法之外,还有气相色谱法,但该方法具有一定的局限性,无法测定挥发性小或者热稳定性差的物质。还可使用毛细管电泳对多酚成分进行检测。毛细管电泳是以毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力的与电化学方法相结合的液相分离技术,该技术具有分析速度快、分离效率高、重现性好、样品和试剂用量少等众多优点。

1.6 植物多酚的理化性质

1.6.1 与蛋白质、生物碱、多糖的反应

植物多酚与蛋白质的结合反应是其最重要的化学特征,这方面的研究工作开展得也最多、最深入。人们最初对多酚-蛋白质分子反应的认识是从单宁开始的。单宁可从溶液中把蛋白质[如明胶和牛血清白蛋白(BSA)]沉淀出来,但这只是一个表面现象,此反应可以分为两步:首先是多酚在蛋白质表面结合,然后在蛋白质分子间形成多点交联,最终导致沉淀。多酚-蛋白质分子反应是分子识别机理的一个典型例子,分子识别反应受到配体和受体两者组成、结构和构型等各因素的影响。现在普遍接受的是20世纪80年代Haslam等提出的“手套-手”反应模式,即植物多酚以疏水键和多点氢键与蛋白质相结合的反应理论,如图1.3所示。反应历程主要是含疏水基的植物多酚先通过疏水键向蛋白质分子表面靠近,多酚分子进入疏水袋,然后多酚的酚羟基与蛋白质的极性基(主要是肽基,此外还有胍基、羟基、羧基等)发生多点氢键结合,此后多酚以多点结合的方式在蛋白质分子间形成疏水层,使蛋白质分子聚集最终导致沉淀。事实也证明了这种匹配模型对多酚-蛋白质分子反应的适用性。此外,植物多酚与生物碱、多糖,甚至与核酸、蛋白质等生物大分子的分子复合反应也与此相似。对这些反应的深入研究,不仅澄清了分子复合的机理,而且揭示了植物多酚在生物学中的价值。

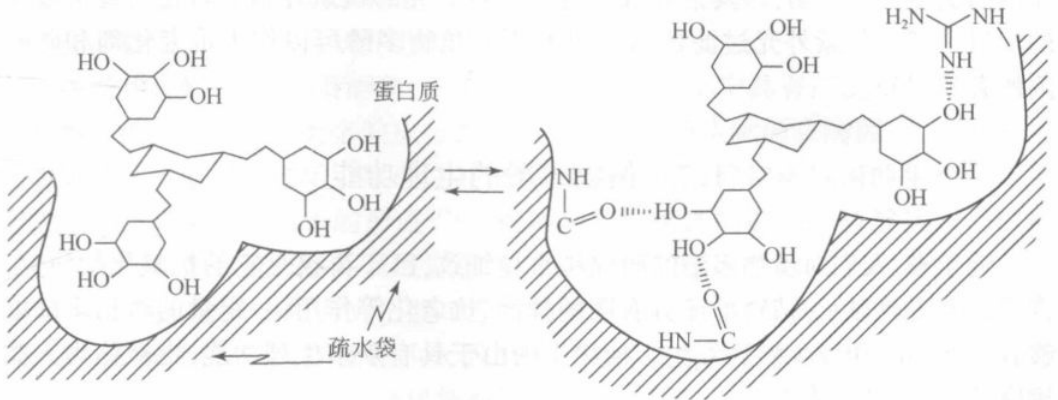


图 1.3 植物多酚与蛋白质的反应模型

1.6.2 植物多酚与金属离子的配位

多酚对无机盐是高度敏感的,其作用包括两个方面:一是静电作用,二是配位反应。具有特殊化学性能的一个重要表现为植物多酚与金属离子的反应。在多酚中的多个邻位酚羟基可以作为一个多基配体与金属离子发生配位反应,从而形成稳定的五元环螯合物。由于植物多酚配位基团多、配位能力强、配合物稳定,所以大部分金属离子与多酚配位结合后都形成沉淀。尤其是在碱性条件下,多酚与金属离子易形成多核配合物。例如植物多酚与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子的配位结合,可以使这些金属离子的金属酶活性受到抑制。这可能也是多酚具有酶活性、抗病毒、抗微生物等生物活性的原因之一。金属离子 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等是许多自由基产生过程的催化剂,尤其是 Fe^{3+} 等自由基产生的媒介物。多酚分子中的邻苯二酚结构可螯合铁离子,形成无活性的铁复合物,从而影响氧化过程,这也是植物多酚具有抗氧化性的原因。

1.6.3 植物多酚的抗氧化性和自由基清除能力

酚羟基的还原性是酚类化合物的共性之一。这一性质在植物多酚中得到了充分的体现。酚类的氧化机理存在两种途径:一是通过酚羟基的解离,二是通过自由基途径。植物多酚的酚羟基结构(邻苯二酚或邻苯三酚)中的邻位酚羟基很容易被氧化成醌类结构,消耗环境中的氧,同时对活性氧等自由基具有很强的捕捉能力,这使多酚具有较强的抗氧化性以及清除自由基的能力,如消除各种氧自由基和活性氧等。

此外,植物多酚因分子中含有苯环结构,在 200 ~ 350nm 间具有较强的紫外吸收特性,特别是在能量高、破坏力大的远紫外区有更强的吸收。植物多酚作为植物